

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**FARKLI LÖSEMİ TİPLERİNDE
NÜKLEER MANYETİK REZONANS TABANLI
METABOLOMİK PROFİLLEME**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Ayşe Zehra GÜL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

TEMMUZ 2023

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**FARKLI LÖSEMİ TİPLERİNDE
NÜKLEER MANYETİK REZONANS TABANLI
METABOLOMİK PROFİLLEME**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Ayşe Zehra GÜL

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20211203 numaralı ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından 122S744 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

TEMMUZ 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Tıpta Uzmanlık öğrencisi, Ayşe Zehra GÜL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “FARKLI LÖSEMİ TİPLERİNDE NÜKLEER MANYETİK REZONANS TABANLI METABOLOMİK PROFİLLEME” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Fatih ÖZÇELİK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Hamidiye Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI
Medipol Üniversitesi

Teslim Tarihi : 7 Temmuz 2023
Savunma Tarihi : 14 Temmuz 2023



Eşim ve oğullarıma,

ÖNSÖZ

Öncelikle bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan, güler yüzlü ve çözüm odaklı yaklaşımı ile yol göstericimiz olan, öğrencisi olmaktan mutluluk ve gurur duyduğum saygıdeğer Hocam **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**' e; Tıbbi Biyokimya Bölümü'nü kocaman bir aile yapan, anlayışlı tutumu ile bizlere geniş hareket alanı tanıyan Değerli Anabilim Dalı Başkanımız **Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT**' e,

Çalışmamızın bir kısım analizini gerçekleştirerek laboratuvarının kapılarını açan ve NMR alanındaki tecrübelerini paylaşarak katkıda bulunan Sayın **Doç. Dr. Somer BEKİROĞLU**' na; örnek/ ilgili klinik verilerin eldesinde katkıda bulunan değerli Hocalarımız **Prof. Dr. Fatma Betül ÇAKIR** ile **Uzman Dr. Bülent UYANIK**' a, flow sitometre uzmanımız Sayın **Erdem AKALIN** ve **Ziya Engin SEÇKİN**' e; örneklerimizi titizlikle saklayan ve uzmanlık eğitimim boyunca her çalışmamızda emeği olan Sayın **Tağı POLAT**' a; analizleri büyük özenle gerçekleştiren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi ekibinin güler yüzlü uzmanları **Ahmet BALCI** ile **Ece Kolay ÇAYIR**' a; TÜBİTAK Gebze kampüsüne örnek taşıma sürecinde yolumuzu sıkıcı olmaktan çıkaran arkadaşım **Sametay KAYA**' ya,

Ekip arkadaşlarımdan örnek çalışma etiği ve kişiliğe sahip **Dr. Fatmanur KÖKTAŞOĞLU** ve engin genel kültürü ile sohbetinden çok keyif aldığım **Dr. Metin DEMİREL** başta olmak üzere; her türlü katkıları için **Dr. Halime AĞAÇ**, **Mehtap GÜNGÖR ALİM** ve **Dr. Ufuk SARIKAYA**' ya; ilk iş tecrübemi sağladıkları destekleyici yaklaşım ile güzel kılan ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma; yaşadığımız türlü probleme getirdiği çözümlerle hayatımızı kolaylaştıran laboratuvarımızın Sevgili abisi **Mustafa KARABONCUK**' a,

30 yıllık yaşantımın her anındailmek ilmek emeği olan ve olmaya devam eden, bugünlere gelmemde ellerinden gelenin fazlasını gerçekleştirmeleri ve sundukları güzel çevre sayesinde çocukluk ve gençlik yıllarımı çok güzel hatırlayabilmeme vesile oldukları, bu sayede yoluma ışık tuttukları için başta annem **Zuhal KARADERE** ve babam **Gültekin KARADERE** ile her zaman engin şefkati ve sabrıyla yanımda olan abim **Ahmet KARADERE**' ye; en güzel anılarımı paylaştığım ve eğitim serüvenimin çok değerli meyvelerini toplarken yanımda olan, gerekli koşulları sağlayarak özverili desteğini ve sevgisini esirgemeyen, her daim beni yüreklendiren hayat arkadaşım **Ahmet Münir GÜL**' e, telaşeli anlarda pratik çözümleriyle imdadıma yetişen, tecrübe ve birikimiyle hayatıma çok büyük zenginlik katan annem **Hayrunnisa GÜL**' e; hayatımı sonsuz kolaylaştıran sevgili **Gülser BAHAR** ile **Elif KAYA**' ya; isimleri geçtiğinde dahi kalbimi ısıtan en değerli varlıklarım canım oğullarım **Abdullah Kerem GÜL** ile **Ahmet Eren GÜL**' e,

En içten teşekkür ve sonsuz sevgilerimi sunarım.

Temmuz 2023

Ayşe Zehra Gül
Doktor

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ayşe Zehra GÜL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
BEYAN.....	viii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	Error! Bookmark not defined.
1. GİRİŞ ve AMAÇ	Error! Bookmark not defined.
1.1 Hematolojik Maligniteler ve Metabolomiks Uygulamaları	1
1.2 Tezin Amacı	7
1.3 Hipotez	8
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1 Hematolojik Maligniteler ve Hastaların Sınıflandırılması	9
2.1.1. Akut myelositik lösemi.....	9
2.1.2. Non-Hodgkin lenfoma.....	12
2.1.3. Kronik lenfositik lösemi.....	16
2.2 Metabolomiks.....	21
2.3 NMR Spektroskopisi	22
2.3.1 NMR Spektroskopisi Kısa Tarihçesi.....	23
2.4 Kütle Spektrometresi	32
2.4.1 Kütle Spektrometresi Kısa Tarihçesi	39
2.5 Hematolojik Maligniteler ve Metabolomik Araştırmalar	42
2.7.1. NMR tabanlı metabolomik çalışmalar.....	42
2.7.2. MS tabanlı metabolomik çalışmalar	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	48
3.1 Etik Kurul Onamı	48
3.2 Çalışma Dizaynı	48
3.3 Örneklem Büyüklüğü.....	51
3.4 Numune Eldesi	51
3.5 Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri.....	53
3.6 Gereç.....	54
3.6.1. Cihazlar	54
3.6.2. Kimyasallar	54
3.7 Yöntem.....	55
3.7.1 Bir Boyutlu (1D) ¹ H NMR	55
3.5.1.1 Bir boyutlu (1D) kantitatif ¹ H NMR deney tasarımı	56
3.5.1.2 Bir boyutlu NMR deney parametreleri	57

3.5.1.3 Spektral işleme	58
3.5.1.4 Deney kalite kontrolü	58
3.7.2 İki Boyutlu (2D) ¹ H NMR	59
3.5.2.1 İki boyutlu (2D) kalitatif ¹ H NMR deney tasarımı.....	62
3.5.2.2 2D NMR deney parametreleri.....	64
3.7.3 NMR verilerinin istatistiksel analizi.....	66
3.7.4 Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi deneyleri (HR-LCMS)....	67
3.7.5 HR-LCMS Verilerinin İstatistiksel Analizi ve Yorumlanması.....	71
4. BULGULAR	73
4.1 Hastaların Demografik Ve Klinik Özellikleri	73
4.2 Serum NMR Analizlerine ait Sonuçlar	75
4.3 Serum LC-HRMS Analizi Sonuçları	96
4.4 Lökosit İzolatları LC-HRMS Analizi Sonuçları.....	121
5. TARTIŞMA	128
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	138
KAYNAKLAR	141
EKLER.....	157
ÖZGEÇMİŞ.....	160

KISALTMALAR

NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
MS	: Kütle Spektrometresi
LC-HRMS	: Likit Kromatografi-Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrometresi
DDA	: Veri Bağımlı Analiz (İng. Data-Dependant Analysis)
DIA	: Veri Bağımsız Analiz (İng. Data-Independent Analysis)
RF	: Radyofrekans
FID	: Serbest İndüksiyonlu Bozunum (Free Induction Decay)
S/N oranı	: Sinyal/ gürültü oranı (İng. signal/ noise ratio)
NOE	: Nükleer Overhauser Etkisi
CD	: Başkalaşım kümesi (İng. Cluster Designation)
ACN	: Asetonitril
AA	: Amonyum asetat
AF	: Amonyum format
FA	: Formik asit
FDR	: Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate)
IPI	: Uluslararası Prognostik İndeks (International Prognostic Index)
VKİ	: Vücut kitle indeksi
CRP	: C-reaktif protein
LYMP	: Lenfosit
MONO	: Monosit
NEU	: Nötrofil
PLT	: Platelet
N/ L	: Nötrofil/ lenfosit mutlak sayıları oranı
WBC	: Beyaz kan hücresi
LDH	: Laktat dehidrojenaz
TG	: Trigliserit
eGFR	: Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
AST	: Aspartat aminotransferaz
PyrG	: Piroglutamat
Phe	: Fenilalanin
Fum	: Fumarat
Leu	: Lösin
Val	: Valin
Tyr	: Tirozin
Cre	: Kreatinin
O-PEA	: Fosfoetanolamin
O-AC	: Asetilkolin
LAK	: Laktat

SEMBOLLER

°C	: Derece (santigrat)
mL	: Mililitre
dL	: Desilitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
IU	: Enternasyonal enzim ünitesi

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Çalışmada yer alan AML hastalarına (n=30) ait sitogenetik ve moleküler genetik skorlama.	11
Tablo 2.2 : Çalışmada yer alan AML hastalarının 2022 ELN risk kategorilerine göre dağılımı (n=30). APL: Akut Promyelositik Lösemi.....	11
Tablo 2.3 : Çalışmada yer alan AML hastalarının FAB alt tiplerine göre dağılımı (n=30).....	12
Tablo 2.4 : Çalışmadaki farklı Uluslararası Prognostik İndeks (NHL-IPI) kategorilerine ait hasta dağılımı (n=30).....	14
Tablo 2.5 : Çalışmada yer alan NHL hastalarına (n=30) ait sitogenetik ve moleküler genetik skorlama.....	15
Tablo 2.6 : Lugano sınıflamasına göre NHL hasta dağılımı (n=30). Bütün evreler için A: B semptomları (ateş, terleme, %10'dan fazla kilo kaybı) yok, B: B semptomları mevcut, E: ektranodal tutulum.....	15
Tablo 2.7 : Çalışmada yer alan KLL hastalarına (n=32) ait sitogenetik ve moleküler genetik skorlama.....	19
Tablo 2.8 : Çalışmadaki farklı Uluslararası Prognostik İndeks (KLL-IPI) kategorilerine ait hasta dağılımı (n=32).....	19
Tablo 2.9 : Rai evreleme sistemine göre KLL hasta dağılımı (n=32).....	20
Tablo 2.10 : NHL, KLL ve AML hastalarına ait serum, plazma, lökosit örneklerinde son 10 yılda gerçekleştirilen metabolomiks çalışmaları (NMR, GC, LCMS).....	43
Tablo 3.1 Çalışmaya ait genel akış.....	51
Tablo 3.2 : Kullanılan cihazlar ve markaları.....	54
Tablo 3.3 : Kullanılan kimyasallar ve markaları	54
Tablo 3.4 : Hidrofilik amino asit internal standart karışımında yer alan bileşikler ve konsantrasyonları (Cambridge Isotope Laboratories).....	54
Tablo 3.5 : 1D NMR deneylerinde uygulanan cihaz parametreleri.....	58
Tablo 3.6 : 2D NMR deneylerinde uygulanan cihaz parametreleri.....	64
Tablo 3.7 : Çift Kanallı Gradient Programı.....	69
Tablo 3.8 : Analitik kondisyon parametreleri.....	70
Tablo 4.1 : Gruplara ait sosyo-demografik ve klinik parametreler.....	73
Tablo 4.2 : Çalışmada yer alan 4 grupta ortak kimliklendirilen edilen serum NMR (1D, 2D) metabolitleri.....	76
Tablo 4.3 : AML grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler (p<0.05).....	78
Tablo 4.4 : AML grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, Pathway Analysis).....	78
Tablo 4.5 : AML-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları.....	80
Tablo 4.6 : AML hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları.....	83
Tablo 4.7 : KLL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler.....	84

Tablo 4.8 : KLL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları.....	84
Tablo 4.9 : KLL-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları.....	86
Tablo 4.10 : KLL hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları.....	89
Tablo 4.11 : NHL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler.....	89
Tablo 4.12 : NHL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları.....	90
Tablo 4.13 : NHL-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları.....	92
Tablo 4.14 : NHL hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları.....	95
Tablo 4.15 : Konrol serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları.....	96
Tablo 4.16: AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	96
Tablo 4.17 : AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları.....	99
Tablo 4.18 : KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	103
Tablo 4.19 : KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları.....	108
Tablo 4.20 : NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	111
Tablo 4.21 : NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları.....	116
Tablo 4.22: AML-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	121
Tablo 4.23 : KLL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	123
Tablo 4.24 : NHL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).....	126

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Sistem biyolojisi yaklaşımında yer alan öğeler ve metabolomiks.....	22
Şekil 2.2 : NMR ve MRI teknolojisi.....	25
Şekil 2.3 : Net manyetizasyon vektörünün manyetik alan (B_0) doğrultusunda hizalanması.....	28
Şekil 2.4 : Manyetizasyon vektörünün dönen referans çerçevesindeki hareketi.....	29
Şekil 3.1 : NMR analizi gerçekleştirilen serum örneklerine ait örnek hazırlama aşamaları.....	57
Şekil 3.2 : 2D NMR spektrumu eldesinde uygulanan FT çalışma diyagramı.....	60
Şekil 3.3 : 2D puls sekansı şematik gösterimi; t_1 ve t_2 fonksiyonu olarak FID ölçümü; f_1 ve f_2 fonksiyonu olarak Fourier spektrumu.....	60
Şekil 3.4 : Serum ve lökosit izolatlarında gerçekleştirilen LC-HRMS analizlerine ait genel akış.....	68
Şekil 4.1 : Çalışmada yer alan bir AML hastasına ait örnek 1D 1H NMR spektrumu.....	75
Şekil 4.2 : Sırasıyla HSQC ve TOCSY 2D deneyleri ham verilerine ait örnekler.....	76
Şekil 4.3 : AML ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi.....	79
Şekil 4.4 : AML ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği.....	80
Şekil 4.5 : AML-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru >1 bulunan metabolitler.....	81
Şekil 4.6 : AML-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşılan 10 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli.....	82
Şekil 4.7 : KLL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi (PCA) skor grafiği.....	85
Şekil 4.8 : KLL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği.....	86

Şekil 4.9 : KLL-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru>1 bulunan metabolitler.....	86
Şekil 4.10 : KLL-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşılan 3 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli.....	88
Şekil 4.11 : NHL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi.....	91
Şekil 4.12 : NHL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği.....	92
Şekil 4.13 : NHL-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru>1 bulunan metabolitler.....	93
Şekil 4.14 : NHL-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşılan 5 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli.....	94
Şekil 4.15 : AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar.....	99
Şekil 4.16 : AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç vizüalizasyonu.....	101
Şekil 4.17: AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.....	102
Şekil 4.18 : AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları.....	103
Şekil 4.19 : KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar.....	107
Şekil 4.20 : KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.....	110
Şekil 4.21 : KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları.....	111
Şekil 4.22 : NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar.....	115
Şekil 4.23 : KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç vizüalizasyonu.....	118
Şekil 4.24 : NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç vizüalizasyonu.....	119
Şekil 4.25 : NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.....	120

Şekil 4.26 : NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları.....	121
Şekil 4.27 : AML-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar.....	123
Şekil 4.28 : KLL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar.....	125



FARKLI LÖSEMİ TİPLERİNDE NÜKLEER MANYETİK REZONANS TABANLI METABOLOMİK PROFİLLEME

ÖZET

Lösemi, çocukluk çağında %30'luk oran ile en sık görülen kanser türü olup, tüm kanserler içerisinde 3.2%' lik oranı kapsamaktadır. Lenfomalar ise orijin aldığı doku açısından lösemi ile ayrılmakla beraber ortak semptomlar gösterebilmektedir. Hastalık gelişiminde temelde beyaz kan hücrelerinin kemik iliği/ lenfoid organlardaki maturasyon bozukluğu yer almaktadır. Literatürde lösemi ve lenfomada metabolik profillemeye çalışmaları mevcut olup, belirlenen biyobelirteç aday metabolitlerin erken tanı, prognoz, tedaviye cevapta kullanılabilirliği tartışılmaktadır. Yüzlerce metaboliti kapsayan metabolomik çalışmaları çok yönlü istatistiksel modelleme kullanılarak bu aday belirteçlerin ilişkili olduğu yollar belirlenebilmekte, kişiselleştirilmiş tedaviler için değerli bilgiler sunulabilmektedir. Bunu mümkün kılan analitik kimya tekniklerinden ve metabolomiksin en önemli enstrümanlarından nükleer manyetik rezonans (NMR) ile kütle spektrometresi (MS), birbirini tamamlayıcı şekilde farklı moleküllerin ölçümünde başarılıdır ve entegre analizlerde analit spektrumun tamamına yakını kapsamaktadır. NMR; yüksek tekrarlanabilirlik, tek internal standartla yüzlerce metabolit kantitasyonuna olanak vermesi, uzun stabilite, kalibrasyon gerektirmemesi gibi avantajlarıyla son yıllarda metabolomikte artan sıklıkta kullanılmaktadır. Öte yandan rutin kullanımı oturmuş MS ise yüksek sensitivitesi ve proteomik-lipidomik moleküllerin başarılı tespiti ile pratik kullanımda halen en ön sırada yer almaktadır. Güncel tez çalışması, sık görülen lösemi/ lenfoma tiplerini kapsayacak şekilde bütüncül yaklaşımla kantitatif NMR ve kalitatif MS metodlarını entegre eden bir çalışma düzeni içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir grupta (AML, KLL, NHL) yer alan 30 yetişkin hastaya ait serum ile lökosit izolatlarında bir ve iki boyutlu ^1H NMR ile yüksek-rezolüsyonlu MS (HR-MS) analizleri tamamlandıktan sonra diferansiyel metabolitler ile ilgili metabolik yollar tek değişkenli-çok değişkenli istatistiksel metotlarla MetaboAnalyst ve TidyMass çevrimiçi platformlarında belirlenmiştir. 1D deneylerde kimliklendirilen metabolitler, 2D NMR analizleri ile doğrulanmıştır. Lökosit izolatları ise HRMS platformunda serum örnekleri ile eşit koşullar altında çalışılarak bu matrikste kontrollere kıyasla anlamlı eksprese edilen metabolitler belirlenmiştir (TidyMass). Serum NMR analizlerinde ortaya konan bulgulara göre; AML grubunda kontrol bireylere kıyasla artış gösteren metabolitler (VIP skoru > 1) metilguanidin, izobütirat, glisin, 2-hidroksiizobütirat, glukoz, üre, betain ve azalanlar (VIP skoru > 2) piroglutamat, 3-hidroksiizovalerat, alanin olarak kaydedilmiştir. KLL grubunda artan metabolitler içerisinde AML ile ortak bulunanlar haricinde kreatinin-kreatin fosfat, tirozin ve fosfoetanolamin molekülleri de yer almaktadır. Burada her üç grupta da artan moleküllerin protein degradasyon ürünü olmaları, hematolojik malignitelerde gözlenen hızlı protein turnover'ını doğrulamaktadır. VIP skoru 2.5' ten büyük bulunan fumarat ve asetat moleküllerinin azalışı da KLL ve NHL gruplarında ortak öne çıkan farklılıklar olarak Krebs siklusu ara bileşenlerinin proliferasyon için yüksek tüketimine işaret etmektedir. Ayrıca NHL grubuna özgü bir farklılık olarak düşük bulunan serum karnitin seviyesi (VIP skoru > 1), lenfoma hastalarında artan enerji ihtiyacının beta oksidasyon artışı ile kompanse edildiğini düşündürmektedir. Serum NMR sonuçlarını kapsayan alıcı özelliği (ROC) analizi ile AML için 10, KLL için 3 ve NHL için 20 en anlamlı metabolit ile eğri altı alanı > 0.98 olan tanısal biyobelirteç modelleri oluşturulmuştur. Grup bazlı değişim gösteren yollar analizlerinde glutatyon,

glukojenik ile dallı zincirli amino asit metabolizması ve kolin oksidasyonu AML' de birinci sıradayken; KLL ve NHL gruplarında ise Krebs ve üre siklusu öne çıkmaktadır. Serum HRMS sonuçlarında ise yüksek sensitif metodoloji yardımıyla çeşitli polar lipidler (yağ asitleri ve fosfolipitler) tanımlanarak özellikle AML grubunda anlamlı artan doymamış yağ asitleri dokozatrienoik ve cis-13-dokozenoik asit ($p=0.002$ ve 0.003 , sırasıyla, Tidymass) olarak kaydedilmiştir. Serum HRMS sonuçlarına göre KLL grubunda anlamlı bulunan oleamid artan ve gliserofosfokolin ile piroglutamat ise NMR sonuçlarını doğrulayan şekilde düşük seviyelerde bulunmuştur ($p=0.001$ ve 0.000 , sırasıyla, Tidymass). Öte yandan NHL serum HRMS bulguları artan doymamış yağ asitleri açısından AML ve oleamid açısından KLL ile; azalan piroglutamat seviyeleri açısından ise KLL ile benzerlik göstermektedir. Lökosit izolatlarında gerçekleştirilen HRMS analizlerinde ise seruma göre daha az sayıda anlamlı metabolit tanımlanmış olup; spermin ve uzun zincirli yağ asitlerinin (serumda sonuçlarını destekleyen biçimde) artan, biyotin gibi koenzimlerin ise düşük seviyeleri her üç grupta da ortak olarak kaydedilmiştir. Sonuç olarak güncel çalışmada, lösemi/ lenfoma hastalarında NMR ve MS metodolojilerinin komplementer kullanımı ile oldukça geniş metabolit spektrumu içeren serum-lökosit matriks profillemesi gerçekleştirilmiştir. Literatürde bir ilk olarak, farklı hematolojik malignitelerde serum metabonomu kantitatif yaklaşımla belirlenmiş ve HR-MS teknolojisi ile yapılan global tarama ile entegrasyon sağlanarak geniş kapsamlı parametre araştırması yapılmıştır. Bir diğer yenilik ise, global serum araştırması yanı sıra lökosit izolatlarında MS analizi ile hücresel düzeyde anlık metabolik profillemeye ile bireysel etyolojilere dair önemli veriler sunulmasıdır. Grup bazlı değişiklikleri ortaya çıkaran mevcut bulgular bireysel itici güçlerin yanı sıra farklı alt sınıflarda yaygın olarak gözlemlenen patojenik mekanizmalar hakkında da ipuçları sağlamaktadır. Tüm bunlarla birlikte sunulan güncel sonuçların, her grup için oluşturulacak geniş kohort ve omiks teknolojilerinden gelen tamamlayıcı veriler ile doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Hematolojik malignansi, Kronik lenfositik lösemi, Non-Hodgkin lenfoma, Akut miyeloid lösemi, Metabolomiks, Nükleer manyetik rezonans, Kütle spektrometresi, Kuadrupol-Orbitrap kütle analizörü, fenotipik sınıflandırma, metabolom profillemeye, diferansiyel metabolitler, biyobelirteç, Kişiselleştirilmiş tıp.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE BASED METABOLOMIC PROFILING IN DIFFERENT TYPES OF LEUKEMIA

SUMMARY

Leukemia is the most common cancer in childhood with a frequency of %30 and has a 3.2% incidence among all new cancer cases. Lymphoma in other respects differs in tissue origin but may manifest with similar symptoms to leukemia. Disease pathogenesis involves impairments that may belong to any maturation step of white blood cells in bone marrow/ lymphoid organs. Metabolomics literature harbors various works investigating whether defined biomarker molecules would be valuable for early diagnosis-prognosis or monitoring treatment response in leukemia/ lymphoma patients. In fact, these studies covering hundreds of metabolites offer great opportunities for identifying affected pathways related to the biomarkers and submit valuable information for individualized therapy options via multivariate statistical analysis. Nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) constitute the two elemental instruments of metabolomics that precede each other in the measurement of different molecules because of their innate characteristics and so studies combining the two methods may cover the whole metabolite spectrum. NMR has several advantages as having high reproducibility, allowing real-time quantitation with only one internal standard for each run, long stability, and not requiring frequent calibration procedures. However, MS has still wider applications in the field with its high sensitivity allowing the detection of low-abundance molecules in mixtures, and being able to define a proteomic-lipidomic profile with high accuracy makes it the first choice in routine laboratories. The current dissertation study was designed to integrate the two methods of analyzing common types of leukemia and lymphoma with a global metabolomic profiling approach. In detail, serum and leukocyte isolate samples of acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and non-Hodgkin's lymphoma patients (30 participant for each) were investigated on 1D, 2D ^1H NMR and high-resolution MS platforms. For the metabolic profiling, quantitative ^1H NMR (qNMR) and untargeted HR-MS methods were applied, and data were analyzed with univariate-multivariate statistics to identify differential metabolites and pathways (MetaboAnalyst, TidyMass). Metabolites identified in 1D experiments were confirmed by 2D NMR analyses. Leukocyte isolates were studied on the HRMS platform under equal conditions with serum samples, and metabolites that were significantly expressed compared to controls were determined (TidyMass). According to the serum NMR analysis; metabolites increased in the AML group compared to controls (VIP score > 1) were recorded as methylguanidine, isobutyrate, glycine, 2-hydroxyisobutyrate, glucose, urea, betaine, and those that decreased (VIP score > 2) were pyroglutamate, 3-hydroxyisovalerate, alanine. The metabolites increased in the CLL group (apart from common ones with AML) included creatinine-creatine phosphate, tyrosine and phosphoethanolamine molecules. The fact that the molecules increased in all groups are protein degradation products confirms the rapid protein turnover observed in hematological malignancies. The decrease in fumarate and acetate molecules with a VIP score greater than 2.5 also indicates the intense

consumption of Krebs cycle intermediate components in proliferating leukoblasts, as common differences in the CLL and NHL groups. In addition, the low serum carnitine level (VIP score > 1), which is a specific difference in the NHL group, suggests that the increased energy need in lymphoma patients is compensated by an increase in beta oxidation. The receiver operating characteristic (ROC) analyzes including serum NMR results showed area under the curve values greater than 0.98 for diagnostic biomarker models with 10 top metabolites for AML, 3 for CLL, and 20 for NHL. In pathway analyzes showing group-based variation; glutathione, glucogenic/ branched-chain amino acid metabolism and choline oxidation ranked first in AML while Krebs and urea cycle were prominent in the CLL and NHL groups. According to the serum HRMS results, distinct polar lipids (fatty acids and phospholipids) were identified with the help of highly sensitive methodology, and the unsaturated fatty acids that increased significantly in the AML group were recorded as docosatrienoic with cis-13-docozenoic acid ($p=0.002$ and 0.003 , respectively, TidyMass). Serum HRMS results also revealed that oleamide was significantly increased in the CLL group, and glycerophosphocholine and pyroglutamate were found to be at low levels, confirming the NMR results ($p = 0.001$ and 0.000 , respectively, TidyMass). NHL serum HRMS findings were similar to AML in terms of increased unsaturated fatty acids and to CLL in terms of oleamide while decreased pyroglutamate levels were observed as CLL. In HRMS analyzes performed on leukocyte isolates, fewer significant metabolites were identified compared to serum as increased levels of spermine and long-chain fatty acids (supporting the serum results) with low levels of coenzymes such as biotin that were common in all groups. In conclusion, complementary use of NMR-MS methodologies expanding the metabolite spectrum in both matrixes allowed comprehensive profiling of leukemia patients. The current findings eliciting group-based changes provide essential tips about pathogenetic mechanisms commonly observed in distinct subclasses along with individual driving forces. In the perspective of personalized medicine, identifying custom targets and monitoring aberrant changes in affected individuals is of great importance and could only be possible by virtue of using strengths of metabolomics tools as NMR and MS. Hence, this work also contributed to the future construction of a workflow for hematological malignancy inspection to be used in routine hospital laboratories in the metabolomics boom era. Yet, emerging results need to be validated with wider cohorts and omics information for each patient within the frame of personalized medicine approach.

Keywords: Hematologic malignancy, Chronic lymphocytic leukemia, Non-Hodgkin lymphoma, Acute myeloid leukemia, Metabolomics, Nuclear magnetic resonance, Mass spectrometry, Quadrupole-Orbitrap mass spectrometers, Phenotypic stratification, Metabolome profiling, Differential metabolites, Biomarker discovery, Personalized medicine.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Hematolojik Maligniteler ve Metabolomiks Uygulamaları

Hematolojik maligniteler (HM) lösemi, lenfoma, multipl miyelom (MM) ve miyelodisplastik sendrom (MDS) alt tiplerinden oluşan ve yeni görülen kanserlerin yüzde 9.8’lik dilimini kapsayan oldukça kompleks ve heterojen bir grup antiteyi temsil etmektedir (1). Hematolojik kanserlerin en sık görülen alt tipleri sırasıyla lösemi, Non-Hodgkin lenfoma (NHL), Hodgkin lenfoma (HL), MM, MDS ve miyeloproliferatif neoplazmlardır (2). Lösemi ve lenfoma en genel anlamıyla beyaz kan hücrelerinin kemik iliğindeki maturasyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Altta yatan etyolojik faktör ise çoğunlukla genetik predispozisyon ve/ veya epigenetik değişimlerdir (3). Lösemi, beyaz kan hücrelerinde görülen erken evre maturasyon problemleri ve kan dolaşımına çıkan çok yüksek miktarda beyaz kan hücresini temsil ederken, lenfoma grubu maligniteler lenfoid dokuların lokal tümörü olarak kabul edilmektedir. Semptomlar ve başlangıç yaşları benzer olabilse de, orijin dokunun farklı oluşu ve dolaşımda bulunan aberan lökosit miktarının lösemi lehine olması iki tümörün ayırt edilmesinde fikir verebilmektedir (4).

Akut ve kronik lösemi, tüm kanserlerin 3.2%’ sini oluşturmakta ve 4 ana grupta incelenmektedir; akut lenfositik lösemi (ALL), akut myelositik lösemi (AML), kronik lenfositik lösemi (KLL) ve kronik myelositik lösemi (KML) (5). Tanı şeması morfolojik inceleme için kemik iliği aspiratı analizi, flow sitometrik immünofenotipleme, sitogenetik (karyotipleme, floresan in situ hibridizasyon [FISH]) ve genetik analizi içermektedir (6, 7). Erken tanı ve ayrıntılı moleküler analizler, sağkalımı ciddi oranda artırmakla beraber özellikle son yıllarda geliştirilen hedefe yönelik tedaviler bazı lösemi tiplerinde kür sağlayabilmektedir (8).

Lenfoma türü kanserler lenf nodu, timus, dalak ve kemik iliği gibi lenfosit hücrelerinden oluşan dokulardan orijin alarak lösemiden farklılık göstermekte ve Hodgkin (HL) ile Non-Hodgkin lenfoma (NHL) olarak iki ana grupta incelenmektedir.

Kompleks alt gruplar ise, tümörün köken aldığı hücre serisi (B, T lenfosit/ natural killer cell) ve belirli moleküler anomaliler ile ilişkili olarak tayin edilmektedir (9). NHL ortalama başlangıç yaşı 55 ve üzeri olan, erkeklerde daha yaygın olmak üzere toplumda en sık görülen (90%, tüm lenfomalar içerisinde) lenfoma grubudur (10). HL ise ortalama başlangıç yaşının 39 olması, üst vücut lenf nod tutulumu (boyun, göğüs, koltuk altı) ve mikroskopta seçilen tipik Reed-Steinberg hücreleri ile NHL'dan kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (11). Tüm kanserlerin 4%'ünü oluşturan ve her yaş grubunda görülebilen NHL, 5 yıllık sağkalım oranının evre 1 kanserde 83% olan oranın evre 4'te 63%'e düşmesiyle dikkat çekmektedir (5). International Prognostic Index'te yüksek riskli hastaları belirleyen faktörler; ileri yaş, evre 3-4 kanser, LDH yüksekliği, metastatik kanser dokusu varlığı olarak belirlenmiştir (12). Bu yönüyle bahsedilen diğer HM' lerde olduğu gibi NHL için de erken tanı sağkalım ve prognozu belirleyen en önemli etkidir.

HM tanısı alan bireylerde tüm alt tipleri kapsayan anlamlı sağkalım artışı kaydedilmesine rağmen (1) lösemi ve lenfomaya bağlı ölüm oranının günümüzde halen tüm kanserlerin % 6 (kadın)-8 (erkek)' lik dilimini kapsaması, erken tanı ve etkili tedavinin önemini vurgulamaktadır (5). Özellikle AML gibi konvansiyonel tedavilere dirençli hasta grubunun yüksek sıklıkta rastlandığı alt tiplerde moleküler analizlerle bireysel profillemeye ve etyolojiye yönelik hedef tedavileri geliştirilmesi büyük önem kazanmaktadır (13). Öte yandan oldukça heterojen genetik risk faktörleri içerebilen ALL hastalarında benzer şekilde gözlenen kötü prognoz ve mortalite (14), bu alt grupta da yeni tanı-tedavi arayışlarına yol açmıştır. En yüksek sağkalıma sahip KLL grubunda dahi rutin klinik/ moleküler verilere ek incelenen genetik-epigenetik anomaliler ile alt tiplendirilen hasta bireylerde tedavi başarısı oldukça yükselmektedir (15).

HM oluşum sürecinde en önemli itici faktörler olarak belirli genetik predispozisyona sahip bireylerde eksprese olan moleküler anomaliler ve kanser transformasyonuna yol açan epigenetik regülasyon sorumlu tutulmaktadır (16, 17). Bu noktada beyaz kan hücrelerine özgü çoklu matürasyon basamakları ile ortaya çıkan kompleks organizasyonel yapının mutasyon hassasiyeti oluşturması ve diğer serilere kıyasla yüksek turnover hızı ile (özellikle granülositleri kapsayacak şekilde (18)) karsinojenetik hücre hattı takibinin zorlaşması, lökomogenetik/ lenfomagenetik süreçleri kolaylaştırıcı rol oynamaktadır (19). Güncel çalışmaların HM' e özgü çeşitli genetik-epigenetik değişimleri ortaya koyması ile patogenetik mekanizmaların

aydınlatılmasında büyük yol kat edilmekle beraber, benzer mutasyonel alt yapıya sahip hastaların farklı tanılar alarak birbiriyle uyumsuz klinik prezantasyona sahip olmaları merak konusu olmuştur (20).

Bahsedilen şekilde yüksek heterojenite gösteren HM vakalarında bireysel etyogenetik prosesleri belirlemek ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri geliştirmek adına ‘kişiselleştirilmiş tıp (precision medicine)’ yaklaşımının uygulanması klinik çıktı açısından değerli bulunmuş ve artan sayıda araştırmacı/ klinisyen tarafından benimsenmiştir (21). Kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımı çerçevesinde uygulanan ‘omiks teknolojileri’ sırasıyla genom, transkriptom, proteom, metabolom gibi organizmanın yapısal ve fonksiyonel kısımlarını bütüncül olarak inceleyerek (22) fenotip-genotip ilişkisinin anlaşılmasında kompütasyonel sistem biyolojisi modelleri sunmaktadır (23). HM alt gruplarını kapsayan ve yüksek-çıktılı 'omik' metodolojilerini entegre eden oldukça güncel çalışmalarda karsinojenetik mekanizmalar bütünsel olarak değerlendirilerek tümör mikroçevresine dair önemli bulgular kaydedilmiş (24) ve yeni terapötik hedefler belirlenmiştir (25). Buna ek olarak, hematolojik kanserlere özgü olarak benzer moleküler anomalileri taşıyan vakalarda temel fenotipik farklılıkların sebebini ortaya koymak ve bireysel tedavi yaklaşımları geliştirmek adına bir non-genomik omiks yaklaşımı olan metabolomiks analizlerinin uygulanması, bahsedilen problemlerin çözümünde büyük potansiyel taşımaktadır (26).

‘Dört büyük omik (27, 28)’ teknolojilerinde son basamağı oluşturan ve genomun fonksiyonel işlevini yürüten metabolomiks, kimyasal reaksiyonlar sonucu üretilen ara ürün veya ürünler olan metabolitleri (<1500 Da) incelemektedir. Metabolomiks ile incelenen metabolik süreçlerin non-genomik yansıması ve nihai fonksiyonu olan metabolit üretim/ yıkım yollarındaki aktivasyon ya da yavaşlama, bireylerde etyolojik yollara ait değerli bilgiler sunarak yeni terapötik hedefler oluşturmaktadır (29). Hücresel metabolizmanın dinamik değişimi anlık profillemeye gerçekleştiren çalışmalarda karşılaşılan önemli bir handikap olmakla beraber, anlamlı metabolit değişimleri bireylerdeki genetik-epigenetik maruziyet hakkında değerli ipucu verebilmektedir (30, 31). Metabolomiks uygulamaları tüm vücut sıvılarında gerçekleştirilebilmekte ve erken tanı-tedavi açısından yönlendirici bilgiler sağlayabilmektedir (32). Son yıllarda düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerin genotipik ekspresyon paternini yansıtmaları yanı sıra çeşitli moleküler etkileşimler ve sinyal yolları yardımı ile gerçekleşen çevresel etkilerinden bahsedilmektedir (33).

Bu noktada ortaya çıkan ve ‘metabolit aktivite taraması (MAS)’ olarak adlandırılan güncel araştırma alanı, downstream genomik ürünleri inceleyen metabolomiks verilerini diğer sistem biyolojisi katmanlarıyla (proteomiks ve transkriptomiks) entegre ederek fenotipik değişime yol açan endojen metabolit gruplarını analiz etmektedir (34). Dolayısıyla, hastalık veya sağlıklı hal kondisyonlarına ait global metabolom işleyişi ve biyoaktif molekül etkileşimlerinin aydınlatılarak etkili terapötik uygulamalar için hedef molekül/ yolaklar oluşturulması tıp uygulamalarında büyük önem arz etmektedir (35). 2000’li yıllardan başlayarak giderek artan ve 2018’ de 1300 sayısına ulaşan insan metabolomiks çalışmalarına ait yayın sayısı, bu alanda artan popüleritenin önemli göstergesi olarak kabul edilmektedir (36).

Metabolomiks teknolojisinin tıp alanındaki güncel kullanımı metabolik yolakların kompütasyonel tahmininden (fluksomik) moleküllerin sinyal transdüksiyon etkilerini inceleyen analizlere kadar genişletilmiş olsa da (37), erken tanı ve hastaların fenotipik sınıflandırılması noktasında biyobelirteç araştırmaları insan çalışmalarının merkezini oluşturmaktadır (38). Bu noktada hastalığa özgü biyobelirteçleri tanımlamada yüksek-çıkıtlı veriler sunan iki temel metabolomiks enstrümanı nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrometrisi (MS), metodolojilerinden ötürü doğal olarak sahip oldukları gelişmiş hassasiyet ve tekrarlanabilirlikleri ile keşifsel metabolomik (heuristic metabolomics) uygulamalarında en sık tercih edilen teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır (39).

NMR, belirli atomlara ait yüklü çekirdeklerin elektromanyetik alanda magnet özelliği göstermesi prensibinden yararlanarak moleküler tanımlama yapan bir analitik kimya tekniği olarak saf/ karışım çözeltilerde 3 boyutlu yapı, formül, fiziksel özellikler ve konsantrasyon hakkında ayrıntılı bilgi sunmaktadır (40). Tarihsel olarak ilaç analizi, polimer ve sentetik kimya araştırmalarında sıklıkla molekül yapı tayini amaçlı uygulanan NMR, ilk defa 1974’ te Wilson & Burlingame tarafından gösterildiği üzere ratlarda gerçekleştirilen etanol metabolizması araştırmasında başarılı sonuç vermesi (41) ile tıp uygulamalarında da dikkat çekmiş ve analitik kimyanın bir diğer vazgeçilmez enstrümanı olan MS yanında yerini almıştır. NMR teknolojisinin biyobelirteç belirleme çalışmalarında sağladığı başlıca avantajlar; yüksek tekrarlanabilirlik (reproducibility), internal-eksternal kalibrasyon ihtiyacı bulunmaması, numune hazırlığında ekstraksiyon/ türevlendirme ihtiyacının olmayışı, uygun işletim maliyeti ve uzun enstrümantal stabiledir (36, 42). NMR

metodolojisinin modern tıp uygulamalarındaki önemli katkılarının başında, tanı konamamış metabolik hastalıklara sahip bireylerin analizi sonrasında literatüre kazandırılan hastalıklar gelmektedir (43). Bunun yanı sıra tüm patolojik kondisyonlarda uygulanabilmek üzere vücut sıvılarının eş zamanlı metabolik profilini ortaya koyabilmesi yönüyle de kohort çalışmalarda artan sıklıkta kullanılmaktadır (44, 45). Bu çalışmalarda çok-yönlü istatistiksel analizlerle belirlenen metabolitler grup ayırımındaki potansiyellerine göre skorlanarak biyobelirteç adayı olarak tayin edilmekte ve ilişkili oldukları yollar etyoloji ve terapötik hedef açısından incelenmektedir (46).

Lösemi/ lenfoma grubu hastalıklarda NMR tabanlı metabolomik çalışmalar 2000'li yıllardan itibaren hız kazanmış ve alt gruplara ait çeşitli tanısal ve prognostik biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bu patolojileri kapsayan hücre kültürü çalışmalarında hücre düzeyinde moleküler değişimler kaydedilirken (47, 48), vücut sıvı analizlerinde artan sayıda araştırma ile global metabolik profillemeye gerçekleştirilmektedir (49). Bu çalışmaların bir kısmında çeşitli metabolitlerin kanser alt tipleri veya sitogenetik yapılarla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (50-52). Örneğin leptomeningeal metastatik B-hücreli NHL'ya sahip bireylerin beyin-omurilik sıvısı ve serum NMR analizinde metastatik olmayan tümöre sahip bireylere göre glisin, alanin, pirüvat, karnitin, asetilkarnitin ve fenilalanin düzeyleri grup ayırıcı metabolitler olarak tanımlanmış, NMR'ın non-invaziv bir metot olarak tanı ve tedaviye cevapta komplementer kullanımı önerilmiştir (53). 183 AML hastası ve 232 kontrol bireyi içeren bir başka çalışmada, serum NMR metabonom analizi ile glikoliz, glukoneogenez, Krebs döngüsü, protein ve lipoprotein sentezi, yağ asidi metabolizmasına ait yollarla grupları belirgin biçimde ayırabilen ve aynı zamanda sitogenetik risk ile korele olarak değişen metabolit grupları raporlanmıştır (54). NHL ve HL hastalarını içeren bir kohort analizde ise, otolog hematopoetik hücre transplantasyonu öncesi periferik kök hücrelerde NMR analizi gerçekleştirilmiş, tedavi sonrası terapiye bağlı AML (t-AML) gelişen hastalardaki mitokondriyal disfonksiyonun NMR analizi ile kestirilebildiği gösterilmiştir (55). Son olarak, 2018 yılında gerçekleştirilen ve çalışmamız ile benzerlik gösteren bir NMR çalışmada AML, NHL, KLL ve kontrol bireylerde serum kalitatif analizi ile önemli bulunan grup ayırıcı metabolitlerden yararlanılarak kompleks hastalık alt modelleri oluşturulmuştur (56). Bu şekilde çoğaltılabilecek örnekler, NMR teknolojisinin ilgili patolojilerde eş zamanlı ölçümlenen ve anlamlı

bulunan yüzlerce metabolitin yolak analizleri ile biyobelirteç belirleme ve erken tanıda yol gösterici olma potansiyeli hakkında fikir vermektedir.

Elektromanyetik alanda yüklü partikülerin hareketine dayalı bir ölçüm prensibine sahip olan analitik kimyanın bir diğer kanonik metodu MS ise günümüzde gelişmiş iyonizasyon teknikleri ile binlerce molekülün yüksek sensitivite ve spesifite ile kantitasyonuna olanak sağlamaktadır (57). MS rutin pratikte özellikle peptit dizilimi, lipidomiks, posttranslasyonel modifikasyon, ilaç düzeyi ve polimer tayini gibi analizlerdeki başarısı ile sıklıkla tercih edilen bir metot haline gelmiştir (58). Buna örnek olarak serum steroid hormonlarının kantitasyonunda sağladığı pg düzeydeki duyarlılık ve yüksek spesifite ile MS metodolojisinin yükselişi, rutin laboratuvarlardaki immünassay otoanalizörlerin bitiş çağı olarak nitelendirilmektedir (59).

Lösemi/ lenfoma hastalarına ait MS analizlerinde öne çıkan çalışmalar sıklıkla antilösemik ajanların artçı metabolitlerinin farmakokinetik takibini içermektedir (60-63). Ayrıca 2021 yılına ait bir derleme çalışma lösemi alt tiplerinin sınıflandırmasında, biyobelirteç ve hücre yüzey belirteçleri tanımlamada, minimal rezidü hastalık takibinde, proteomik ekspresyon değişimleri tespitinde MS'in konvansiyonel tanısal testlere yardımcı analiz tekniği olarak kullanımını önermiştir (64). Merkezi sinir sistemi lenfomalarında da ilgili protein biyobelirteçler tanımlanmış ve mutasyonlara bağlı aktive-deaktive olan proteinlerin varlığı tespit edilebilmiştir (65).

Metabolomiks yaklaşımı ile elde edilen lösemi/ lenfoma patogenezinin ait bilgiler en temelde, rekürren genetik anomalilere sahip klonlarda metabolik yeniden programa ile proliferasyon ve yaşam devamlılığı için gerekli artan enerji ve kompleks molekül üretimine yönelik yolak aktivasyonuna işaret etmektedir (66). Artan bazal glukoz uptake' i ile aerobik glikoliz yolağı en çok öne çıkan değişim olmakla beraber, kanser hücrelerinin transformasyonunda Warburg etkisinden öte birçok farklı metabolik etki gözlenmektedir (67). Örneğin AML'de farklı sitogenetik gruplar için değişen şekilde etkilenen yolaklar; glukoz, amino asit, lipid ve sterol metabolizması ile oksidatif fosforilasyon-mitokondriyal metabolizma olarak kaydedilmiştir (67). AML metabolizmasında glutamin mevcudiyetinin mTORCH1 aktivasyonu için hız kısıtlayıcı basamak olduğu ve tedavi başarısının (L-asparaginase) glutaminaz aktivitesi ile ilişkisi gösterilmiştir (68). Ayrıca artan proliferasyon ve biyokütleyle bağlı

de novo lipid biyosentezi aktive olmakta, ilişkili yollardaki enzimleri hedef alan tedaviler AML hücrelerinde apoptozu uyarabilmektedir (69). Bunlara ek olarak oksijen varlığında dahi glikolitik yolların aktivasyonu önceleri mitokondriyal disfonksiyonu düşündürse de (70), birçok çalışma ile kanıtlanan şekilde kanser hücrelerinde yaşam devamlılığında oksidatif fosforilasyon ve mitokondrinin vazgeçilmez olduğu bilinmektedir (71).

1.2. Tezin Amacı

Çalışmaya ait detaylandırılmış temel amaçlar şu şekildedir:

1. AML, KLL ve NHL malignitelerinde yüksek klinik heterojenite ile prezente olan fenotiplerin ayırt edilmesi, karyotipik alt tipler ile belirli metabolitlerin ilişkisinin saptanması ve patogenetik süreçlere ait bilgi edinilmesi ile literatüre katkıda bulunulması,
2. Yeni nesil tedavi geliştirilmesine yardımcı olacak metabolik yolların aydınlatılmasında kanser hücrelerine ait metabolizmal kimliğin, diğer anlamda fenotipik fonksiyonun sistemsal biyolojinin son basamağını oluşturan metabolomiks yaklaşımı ile ortaya konması,
3. Kolay uygulanabilir bir çalışma akışı ile gerekli donanıma sahip tanı/ araştırma laboratuvarlarının gelecekte rutin kullanıma entegre edilmesi muhtemel metabolomiks yöntemlerini envanterlerine eklemelerinin teşvik edilmesi ve çalışma protokolleri açısından örnek olunmasıdır.

Çalışmaya ait temel hedefler ise:

1. Yüksek-çıkıtlı, güncel ve gelişmiş non-genomik teknolojilerden metabolomiks yaklaşımı yardımıyla literatürde bir ilk olarak serum ve lökosit izolatlarını eş zamanlı inceleyen metabolik profillemeye çalışmasının gerçekleştirilmesi,
2. Metabolomiksin en önemli iki enstrümanı olan ve özellikleri açısından birbirini tamamlayıcı nitelikteki NMR ve MS metotlarının kombine edilerek; hasta örneklerinde incelenen analit spektrumunun genişletilmesi ve her iki platformda validasyon ile güvenilir sonuçlara ulaşılması olarak belirlenmiştir.

Çalışmada lökosit kanser hücrelerinin metabolik disfonksiyonlarını ortaya çıkarmayı hedeflerken, tümör patogenezi ve ilerlemesinde vazgeçilmez role sahip olduğu belirlenmiş ana biyokimyasal gruplara ait moleküllerin (karbonhidrat, lipid, amino asit, ara metabolitler) ayrıntılı şekilde inceleme yolu seçilmiştir. Benzer örneklemi kapsayan (NHL, AML, KLL) bir 2018 çalışmasında serum ^1H NMR analizi gerçekleştirilmiş olup (72), güncel çalışmanın ^1H NMR yanı sıra LC-MS analizini kapsaması ve NMR metodolojisinin serum haricinde tümör karakteristiğini yansıtan lökosit izolatlarında da uygulanmış olması proje tasarımını özgün kılan ana faktörlerdir.

1.3. Hipotez

Güncel çalışmanın başlangıcı, vücut sıvılarında gerçekleştirilecek metabolik profillemeye yaklaşımının HM hastalarında gözlenen yüksek klinik heterojenitenin aydınlatılmasında değerli veriler sunacağı ve bu yolla hastaların fenotipik sınıflandırılmasının gerçekleştirilebileceği düşüncesine dayanmaktadır. Bu noktada oluşturulan hipotez, kompleks klinik prezentasyona sahip lösemi/ lenfoma hastalarında metabolomik enstrümanlarından elde edilecek veriler ile (bireysel metabolik farklılıklara ait) genomik profil tabanlı terapötik ajanların hedef alacağı yeni moleküller ortaya konabileceği ve bu şekilde hastaların sağkalım süresi/ hayat kalitesinin artırılmasına katkı sağlanabileceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çalışmada Yer Alan Hematolojik Maligniteler

2.1.1. Akut myelositik lösemi

Akut lösemi tablosu, kemik iliğinde anormal prekürsör (immatür) hücrelerin 20% oranını aşması durumunda ortaya çıkmakta ve temelde lenfoid/ myeloid seriye ait hücrelerin genetik mutasyon, gen ekspresyon anomalisi, haberci RNA (mRNA) değişimleri gibi etkenlerle maturasyon basamaklarını tamamlayamamasına dayanmaktadır (73).

Hastaların çoğu tarihsel anlamda kabul gören French-American-British (FAB) sınıflandırmasına göre morfolojik olarak 8 alt tipte (74) ve etyolojik kökenin göz önüne alındığı Dünya Sağlık Örgütü 2016 sınıflamasında ise 6 alt gruba incelenmektedir (75, 76). Fakat günümüzde hassas moleküler metotların gelişimiyle hastalar FAB sınıflamasında olduğu gibi hücre morfolojilerinin yanı sıra taşıdıkları klon/ subklon düzeyinde translokasyon/ küçük mutasyonların sofistike tespiti yapılarak tedavi açısından değerlendirilmektedir (74).

AML'de ortaya konan heterojen yapıların sebebi (77), birçok farklı hücre popülasyonundan köken alabilmesi ve farklı maturasyon basamaklarındaki bloklara bağlı gelişebilmesidir (74, 78). FAB sınıflandırmasında aynı gruba dahil hastalarda dahi farklı gen ekspresyon paternleri gösterildiğinden (79, 80), özellikle kemosensitif bireylerde ayrıntılı genetik inceleme sonucu tedavi kararının verilmesi gerekliliği vurgulanmıştır (81).

2.1.1.1. Epidemiyoloji

Myeloid seri hücrelerden köken alan alt tip AML, yetişkinlerin en sık akut lösemi tablosu olarak aynı zamanda lösemiye bağlı ölümlerin en sık sebebinin oluşturmaktadır (13, 82).

2.1.1.2. Klinik ve tanı

Aberan ve kontrolsüz çoğalan hücreler periferik kan dolaşımına salındığında hastalığın tipik belirtileri olan yüksek ateş, terleme, titreme ve açıklanamayan kilo kaybı görülmektedir. Kemik iliğindeki kontrolsüz çoğalmaya bağlı eritrosit ve trombosit seride yetersiz üretim (ve baskılanma) gerçekleşerek anemi, halsizlik, kanama diyatezi ortaya çıkmaktadır (83).

Hastalarda şüpheli klinik bulgu ve kan sayımı sonuçları varlığında kesin tanı, kemik iliği aspirasyon/ biyopsi örneklerinde yapılacak mikroskopik inceleme ile konmaktadır. AML hastalarında kemik iliğinde oranı %20'yi aşan tipik lösemik blast hücreleri gözlenmektedir. Prognoz ve tedavi seçiminde kemik iliği biyopsisi haricinde istenebilecek ek testler ise; immünofenotipleme (flow sitometri) ve sitogenetik analiz ile gen ekspresyon profillemesi/ mikroarray analizlerini içermektedir (84). Bezmialem Üniversitesi Merkez Rutin Laboratuvarında ilk defa AML tanısı alan hastalar için incelenen yüzey belirteçleri: CD 13, CD14, CD15, CD 64, CD3, CD5, CD34, CD19, CD10, CD45, CD117, CD33 şeklindedir.

2.1.1.3. AML patogenezi ile ilişkili biyobelirteç çalışmaları

AML hastalarında panel halinde incelenen en güçlü moleküler belirteçler TP53, FLT3, NPM1, CEBPA, KIT, RUNX1, IDH1, ve IDH2 mutasyonlarını kapsamaktadır (85). Ayrıca FAB sınıflamasındaki her bir alt tipe ilişkin anormal genetik/epigenetik allelik yapılar belirlenmiştir (78). Kemik iliğinde blast sayısının %10-19 arasında gözlemlendiği miyelodisplastik sendrom (MDS)/ AML tablosunda ise kötü prognozla ilişkili genetik değişimler çeşitli sitogenetik anomaliler veya gen mutasyonları (ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ve ZRSR2) olarak kaydedilmiştir. European Leukemia Net (ELN) platformunca 2010 ve 2017 yıllarında ortaya konan AML tanı ve hastalık yönetimi rehberi, yeni moleküler belirteçlerin keşfi ve genomik tanı yöntemlerinin gelişmesi ile 2022 yılında genetik risk kategorilendirmesi açısından revize edilmiştir (86). Risk değerlendirmesi buna göre 3 ana grup şeklinde (iyi, orta, kötü) moleküler ve sitogenetik anomalilerin tespitiyle gerçekleştirilmektedir.

2.1.1.4. Çalışmada yer alan AML hastalarının sınıflandırılması

Çalışmada yer alan AML hastalarının 2022 ELN risk kategorilerine göre dağılımı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafınca paylaşılan karyotip (konvansiyonel sitogenetik) ve FISH analiz sonuçları (Tablo 2.1) ile belirlenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.1 Çalışmada yer alan AML hastalarına (n=30) ait sitogenetik ve moleküler genetik skrolama.

AML- Genetik Sınıflaması	FISH	Vaka Oranı	Karyotip	Vaka Oranı
Skor 0	t(15;17)(q22;q21) negatif	% 60 (n=18)	normal	% 43 (n=13)
Skor 1	t(15;17)(q22;q21) pozitif	% 3 (n=1)	anormal	% 20 (n=6)
Bilinmeyen	-	% 37 (n=11)	-	% 37 (n=11)

Tablo 2.2. Çalışmada yer alan AML hastalarının 2022 ELN risk kategorilerine göre dağılımı (n=30).
APL: Akut Promeiyositik Lösemi.

AML- 2022 ELN Risk Kategorisi	Vaka oranı	Genetik Anomali
İyi (favorable)	% 46	
	% 3 (n=1)	t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1
	-	inv(16)(p13.1q22) veya
	-	t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11
	-	NPM1 mutasyonu (FLT3-ITD harici)
	% 43 (n=13)	CEBPA geni bZIP bölgesinde çerçeve kayması mutasyonu (frameshift)
		FISH ve karyotip analizleri normal
Orta (intermediate)	% 7	
	-	FLT3-ITD mutasyonu eşliğinde NPM1 mutasyonel/ vahşi tip
	-	t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A
	% 7 (n=2)	İyi veya kötü olarak sınıflandırılmayan moleküler/ sitogenetik anomaliler

AML- 2022 ELN Risk Kategorisi	Vaka oranı	Genetik Anomali
Kötü (adverse)	% 7	
-	-	t(6;9)(p23;q34.1)/DEK::NUP214
-	-	t(v;11q23.3)/KMT2A-yeniden düzenlenmiş (rearranged)
-	-	t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1
-	-	t(8;16)(p11;p13)/KAT6A::CREBBP
-	-	inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1)
-	% 7 (n=2)	t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)- yeniden düzenlenmiş (rearranged)
-	-	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
-	-	Kompleks veya monozomal karyotip
-	-	MDS-ilişkili gen mutasyonları
-	-	TP53 mutasyonu
APL	% 3 (n=1)	t(15;17)(q22;q21), PML-RARA
Bilinmeyen	% 37 (n=11)	FISH ve karyotip sonucuna ulaşılamayan bireyler

Çalışmamızda yer alan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından tanı konan AML hastalarının morfolojik French-American-British (FAB) sınıflaması (74) ise aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Tablo 2.3 Çalışmada yer alan AML hastalarının FAB alt tiplerine göre dağılımı (n=30).

AML-FAB Alt Tipi	Vaka oranı	Atipik Hücre Morfolojisine Göre
M0	% 7 (n=2)	Minimal diferansiye AML
M1	% 27 (n=8)	Az diferansiye (maturasyonun olmadığı) AML
M2	% 7 (n=2)	Maturasyonun olduğu AML
M3	% 33 (n=10)	Promyelositik lösemi
M4	% 3 (n=1)	Myelomonositik lösemi
M5	% 23 (n=7)	Monositik lösemi
M6	-	Eritrolösemi
M7	-	Megakaryositik lösemi

2.1.2. Non-Hodgkin lenfoma

Non-Hodgkin lenfoma, lenfoid dokulardaki matür lenfositlerden köken alan ve tüm lenfomaların %90'ını oluşturan bir HM olarak 30'dan fazla alt türü ile oldukça heterojen bir grup hastalığı kapsamaktadır (87). Alt gruplar tümörün köken aldığı hücre serisi (B, T lenfosit/ doğal öldürücü hücre) ve çeşitli moleküler anomaliler ile ilişkili olarak belirlenmektedir (9).

2.1.2.1. Epidemiyoloji

NHL, erkeklerde daha yaygın olmak üzere toplumda çok daha sık görülmekte ve tanı genellikle 55 yaş ve üzerinde konulmaktadır (10). Tüm kanserlerin 4%'ünü oluşturan ve her yaş grubunda görülebilen NHL, 5 yıllık sağkalım oranının evre 1 kanserde 83% iken evre 4'te 63%'e düşmesiyle dikkat çekmektedir (5). 45 yaş altı tanı alan bireylerde ise bu oran %84.7 olarak kaydedilmiştir.

2.1.2.2. Klinik ve tanı

NHL hastalarında klinik, %60'lık oran ile daha sık gözlenen hızlı (yüksek-dereceli) ve yavaş (indolan, düşük-dereceli) seyirli formlar olarak incelenmektedir (88). Oldukça farklı klinik ve prognoza sahip hastalık gruplarını barındıran NHL için Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 yılında revize ettiği sınıflama, lenfositin köken aldığı hücre grubuna göre matür B veya T-doğal öldürücü hücre kökenli olarak 2 ana grupta; histolojik büyüme paterni göz önüne alındığında ise nodüler veya diffüz hücreli lenfoma olarak belirlenmiştir (88). En sık görülen hızlı seyirli kliniğe sahip B-hücreli gruplar diffüz büyük B-hücreli ve mantle hücreli lenfoma iken; yavaş formlar foliküler, marjinal zon (splenik, nodal, ektranodal) ile küçük-hücreli lenfositik lenfoma (SLL) alt tiplerini kapsamaktadır.

Hastalarda NHL açısından ileri tetkik gerektiren en sık semptom bir veya birden fazla lenf nodunda ağrısız şişliktir. B-semptomları varlığı (gece terlemesi, ateş, 6 ay içinde %10'dan fazla kilo kaybı) ise agresif formlarda gözlenen kötü prognoz ile ilişkilidir (89). Bunların dışında halsizlik, kilo kaybı, ateş gibi yaygın semptomlarla da hastaneye başvurabilen bireylerde kesin tanı, lenf nodu biyopsi örneğinde yapılacak mikroskopik inceleme ile konulmaktadır. Bezmialem Üniversitesi Merkez Rutin Laboratuvarında ilk defa NHL tanısı alan hastalar için incelenen yüzey belirteçleri KLL'ye benzerdir: CD5, CD10, CCD23, CD3, CD34, CD19, CD20, CD43, Lambda-Kappa oranı (klonalite araştırması). Tanı ve

tiplendirmede istenebilecek ek testler; immüfenotipleme (flow sitometri), sitogenetik analiz ile gen ekspresyon profillemesi/ mikroarray analizini içermektedir (90).

2.1.2.3. NHL patogenezi ile ilişkili biyobelirteç çalışmaları

Mekanistik çalışmalar NHL patogenezinde anormal genetik değişim, epigenetik regülasyon bozukluğu, farklılaşmadan sorumlu yollarda aberan aktivasyon ile spesifik tümör-mikroçevre etkileşimleri ortaya koymuştur (91, 92). NHL vakalarının büyük çoğunluğunda translokasyon, kopya sayısı anomalileri ve nokta mutasyonu gibi genetik değişimler, onkojenik sinyal yolak aktivasyonu yapmaktadır (93). Genellikle kötü prognoz ile ilişkili bu değişimler, en sık agresif lenfoma tipleri olan *diffüz büyük B hücreli (DLBCL)* ve *mantle hücreli lenfoma (MHL)* hastaları için aşağıdaki genlerde kaydedilmiştir:

-*DLBCL* için; BCL-2, BCL-6, CARD11, CD79A-B, EZH2, MYC, MYD88, NOTCH1-2, TNFAIP3, TCF4, SPIB, CIITA (91, 94),

-*MCL* için; ATM, CCND1, P53, NOTCH1, BIRC3, MEF2B (93, 95).

İndolan seyirli grubun en sık görülen tipi olan *foliküler* lenfoma ile ilişki değişimleri ise:

- *Foliküler* lenfoma için: BCL2, CREBBP, EZH2, KMT2D, SOCS1, STAT6, MEF2B, PAPOLG, REL, MYC, TP53, TNFAIP3 genlerinde tespit edilmiştir (91, 93).

Ayrıca bahsedilen genlerdeki metilasyon, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA ekspresyonu (96) gibi mekanizmalarla gerçekleşen epigenetik değişimler de çeşitli lenfomagenез süreçlerinden sorumlu tutulmuştur (97).

NHL Uluslararası Prognostik İndeksinde (NHL-IPI) yüksek riskli hastaları belirleyen faktörler ise; cinsiyet (erkek), ileri yaş, Lugano sınıflandırması evre 3-4 kanser (98), LDH yüksekliği, B-semptom ile metastatik kanser dokusu varlığı olarak belirlenmiştir (12). Bu yönüyle bahsedilen diğer malignitelerde olduğu gibi NHL için de erken tanı, sağkalım ve prognozu belirleyen en önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.2.4. Çalışmada yer alan NHL hastalarının sınıflandırılması

Güncel çalışmada toplumda sık görülen alt tiplere yer verildiğinden, lenfoma grubu olarak klinik başvurularının %90'ından fazlasını oluşturan matür B-hücreli NHL hastaları seçilmiştir. NHL hastalarının IPI risk gruplarına göre dağılımı klinik, radyolojik ve biyokimyasal evrelendirme ile belirlenen risk faktörü sayılarına göre oluşturulmuştur (Tablo 2.4). Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafınca paylaşılan karyotip (konvansiyonel sitogenetik) ve FISH analiz sonuçları ise Tablo 2.5' Te görülmektedir.

Tablo 2.4 Çalışmadaki farklı Uluslararası Prognostik İndeks (NHL-IPI) kategorilerine ait hasta dağılımı (n=30).

NHL-IPI kategorisi	Vaka oranı	Klinik Çıktı
Düşük risk (1 risk faktörü)	% 23 (n=7)	Tedavisiz izlem
Düşük-orta risk (2 risk faktörü)	% 47 (n=14)	Semptomatik olana kadar tedavisiz izlem
Yüksek-orta risk (3 risk faktörü)	% 13 (n=4)	Kombinasyonel kemoterapi tedavisi (asemptomatik harici)
Yüksek-risk (4 veya fazla risk faktörü)	% 17 (n=5)	Kemoterapi yerine hedefleyici ajanlar veya klinik çalışma aşamasındaki tedaviler

Tablo 2.5 Çalışmada yer alan NHL hastalarına (n=30) ait sitogenetik ve moleküler genetik skorlama.

NHL-Genetik Sınıflaması	FISH	Vaka Oranı	Karyotip	Vaka Oranı
Skor 0	17p13 delesyon negatif	% 44 (n=13)	normal	% 33 (n=10)
Skor 1	17p13 delesyon pozitif	% 3 (n=1)	anormal	% 17 (n=5)
Skor 2	13q14 delesyon pozitif	% 3 (n=1)		
Bilinmeyen	-	% 50 (n=15)	-	% 50 (n=15)

Çalışmada yer alan ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından tanı konan B-hücreli NHL hastalarına ait Lugano klinik evrelemesi ise aşağıdaki şekildedir:

Tablo 2.6 Lugano sınıflamasına göre NHL hasta dağılımı (n=30). Bütün evreler için A: B semptomları (ateş, terleme, %10'dan fazla kilo kaybı) yok, B: B semptomları mevcut, E: ektranodal tutulum.

NHL-Lugano Sınıflandırması	Vaka oranı	Klinik
Sınırlı (non-bulky)- Evre 1 ve 2		
Evre 1	% 46	Tek lenfoid alan/ tek ektranodal bölge tutulum
A	% 43 (n=13)	
B	% 3 (n=1)	
E	-	
Evre 2	% 13	Diyaframın aynı tarafında 2 veya fazla lenf nodu tutulumu/tek ektranodal bölge ve birden fazla komşu lenfoid alan tutulumu
A	% 13 (n=4)	
B	-	
E	-	
İleri (advanced)- Evre 3 ve 4		
Evre 3	% 14	Diyaframın farklı taraflarında 2 veya fazla lenf nodu tutulumu/ dalak ve diyafram üstü birden fazla lenfoid alan tutulumu
A	-	
B	% 7 (n=2)	
E	% 7 (n=2)	
Evre 4	% 27	Lenf nodu tutulumu bakılmaksızın difüz kemik iliği, karaciğer veya akciğer tutulumu
A	-	
B	% 7 (n=2)	
E	% 20 (n=6)	

2.1.3. Kronik lenfositik lösemi

Kronik lenfositler lenfoma, yetişkinlikte görülen en sık lösemi türü olarak kemik iliği, lenfoid dokular (sıklıkla dalak) ve kanda matür lenfositöz varlığı ile karakterize bir klinik tablodur.

Köken aldığı hücre açısından B hücreli NHL ile aynı olmakla beraber, periferik kanda $>5.000/mm^3$ monoklonal B lenfositöz varlığı KLL ayırıcı tanısında belirleyici rol oynamaktadır. Agresif seyretmeyen indolan NHL alt grubunda yer alan küçük lenfositik lenfoma (small lymphocytic lymphoma-SLL), KLL ile birlikte olgun “B” hücreli neoplaziler arasında yer almakta ve aynı hastalığın farklı iki klinik tablosunu ifade etmektedir (99).

Patogenez, kemik iliğine ait B, T veya doğal öldürücü kök hücre serisinde proliferasyon ile apoptozis düzenlenmesinde görev alan genlerde kazanılmış (acquired) bir/ çoklu mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. 2 tipi mevcut olup, vakaların %95’ ten fazlasında B-Hücreli KLL ve %1’ inde T-Hücreli KLL gözlenmektedir (100). KLL ile ilişkili antitelerden yine nadir gözlenen bir ara form olan Prolenfositik Lösemi, B veya T hücre serisinde gözlenebilmekte ve KLL’ deki küçük matür lenfositler ile akut lenfositik lösemideki immatür, geniş lenfositlerin karışımından oluşmaktadır.

2.1.3.1. Epidemiyoloji

Yetişkinlikte (ortanca yaş 70) yıllık 100.000’ de 4.9 insidans ile en sık görülen lösemi tipi olan KLL (99); 2023 verilerine göre yıllık görülen yeni lösemi vakalarının %31,4’ ünü, lösemiye bağlı ölümlerin ise %18,9’ unu oluşturmaktadır (101).

2.1.3.2. Klinik ve tanı

Lösemi hücreleri sağlıklı lenfositlere göre daha uzun canlı kaldığından; kan, kemik iliği ve dalaktaki birikim diğer hücrelerin fonksiyonlarını etkileyerek anemi, enfeksiyon ve kanama yatkınlığı gibi tipik lösemi semptomlarına yol açmaktadır. Farklılaşma kusuru gözlenen B lenfosit KLL hücrelerinde etkili antikor üretimi olmadığı ve diğer sağlıklı hücrelerin de üretim fonksiyonu etkilendiğinden, hastalarda derkantitatif immünglobulin testiyle ortaya konan düşük antikor düzeyleri gözlenmektedir (G, A ve M tipi antikorlar) (102).

B-hücreli KLL, klinik olarak daha sık gözlenen yavaş ve hızlı seyreden formlar olarak incelenmektedir. İndolan seyreden fakat kür sağlanamayan KLL, asemptomatik olabilmekle beraber prolenfositik lösemi veya büyük B-hücreli lenfomaya transforme olabilmektedir (Richter sendromu) (103). Asemptomatik bireylerde tedaviye hemen başlamazken, semptomatik vakalarda acil tedavi protokolü uygulanmaktadır.

Halsizlik, kilo kaybı, ateş gibi yaygın semptomlarla hastaneye başvuran bireylerde tanı kan hücre sayımı ve ileri tetkiklerle konmaktadır. Lenfositöz saptanan hastalar ileri tetkik açısından öncelikle immünofenotipleme (flow-sitometrik analiz) ve sonrasında kemik iliği analizi yönünden incelenmektedirler. Flow-sitometri testi sonucu mikrolitre başına 5000 veya daha fazla anormal B hücre ile tipik hücre yüzeyi belirteçleri varlığında KLL tanısı konmaktadır (104). Bezmialem Üniversitesi Merkez Rutin Laboratuvarında KLL tanısı alan hastalar için incelenen yüzey belirteçleri şu şekildedir: CD5, CD10, CD23, CD3, CD34, CD19, CD20, CD43, Lambda-Kappa oranı (klonalite araştırması). KLL'ye ait ayırt edici pozitif belirteçler; CD5, CD19, CD20 (zayıf ekspresyon), CD23 ve CD43 iken; negatif belirteç ise CD10 şeklindedir.

2.1.3.3. KLL patogenezi ile ilişkili biyobelirteç çalışmaları

KLL tanısı konan bireylerdeki klinik seyir oldukça heterojen seyretilmektedir. Bunun en önemli sebebi, patogenezdaki moleküler mekanizmaların genomik (105) ve non-genomik yaklaşımlarla (106) ortaya konduğu şekilde büyük oranda farklılık göstermesidir. En yüksek sağkalıma sahip hematolojik malignite olmasına rağmen (101) günümüzde KLL hastalarının barındırdığı genetik ve epigenetik anomalilere göre alt tiplendirilmesi tedavi yaklaşımları açısından hala büyük önem taşımaktadır (15). Uygun tedavi seçeneği ve prognoz belirlemede incelenen rutin belirteçler çoğunlukla spesifik mutasyon ve karyotipleme analizleri ile ortaya konmaktadır. Vakaların yaklaşık %80'i anormal karyotipe sahiptir, hastaların %20'sinde trizomi 12 (tek başına orta risk) ve %50'sinde 13q14 delesyonu rapor edilmiştir (103). Son yıllarda KLL progresyonu ve tedavisi açısından incelenen belirteçler aşağıdaki şekilde özetlenebilmektedir (107):

- Tam kan sayımında 1 yılda iki kat artan lenfosit sayımı (yüksek risk),
- Serum belirteçleri (beta-2 mikroglobulin, laktat dehidrojenaz yüksekliği hastalığın ileri progresyonu/ artan hücre sayısı ile ilişkili olarak),
- DNA sekanslama ile en güçlü prognoz belirteci olan (iyi prognozla ilişkili) immünglobulin ağır zincir değişken bölgesi (IgVH) ve NOTCH1, SF3B1, TP53 gen mutasyonel durumu (kötü prognozla ilişkili),
- Floresans in situ hibridizasyon (FISH, %80 hastada kromozom 11, 12, 13 ve 17'ye ait anormal bulgu) veya sitogenetik analiz (karyotipleme; del(13)-düşük risk, del(11)-yüksek risk, del(17p)-yüksek risk ve kemoterapi rezistansı) ,

-Yüzey protein belirteçleri (yüksek riskle ilişki olarak zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70), CD38, CD49d pozitifliği).

2.1.3.4. Çalışmada yer alan KLL hastalarının sınıflandırılması

Çalışmada yer alan KLL vakalarının tümü, erişkinlerin en sık lösemi tablosu olan B-hücreli KLL alt tipine ait olarak seçilmiştir. KLL hastalarının 2016 Uluslararası Prognostik İndeks (International Prognostic Index, IPI) çalışma grubunun belirlediği risk gruplarına göre dağılımı (108), Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafınca paylaşılan karyotip (konvansiyonel sitogenetik) ve FISH analiz sonuçları (Tablo 2.7) ile belirlenen skorlara göre oluşturulmuştur (Tablo 2.8).

Tablo 2.7 Çalışmada yer alan KLL hastalarına (n=32) ait sitogenetik ve moleküler genetik skorlama.

KLL-Genetik Sınıflaması	FISH	Vaka Oranı	Karyotip	Vaka Oranı
Skor 0	17p13 delesyon negatif	% 44 (n=14)	normal	% 53 (n=17)
Skor 1	17p13 delesyon pozitif	% 6 (n=2)	anormal	% 6 (n=2)
Skor 2	13q14 delesyon pozitif	% 6 (n=2)		
Skor 3	t(14;18)(q32;q21) pozitif	% 3 (n=1)		
Bilinmeyen	-	% 41 (n=13)	-	% 41 (n=13)

Tablo 2.8 Çalışmadaki farklı Uluslararası Prognostik İndeks (KLL-IPI) kategorilerine ait hasta dağılımı (n=32).

KLL-2016 IPI kategorisi	Vaka oranı	Potansiyel Klinik Çıktı
Düşük-risk, skor 0-1	% 22 (n=7)	Tedavisiz izlem

KLL-2016 IPI kategorisi	Vaka oranı	Potansiyel Klinik Çıktı
Orta-risk, skor 2-3	% 22 (n=7)	Semptomatik olana kadar tedavisiz izlem
Yüksek-risk, skor 4-6	% 12 (n=4)	Kombinasyonel kemoterapi tedavisi (asemptomatik harici)
Çok yüksek-risk, skor 7-10	% 3 (n= 1)	Kemoterapi yerine hedefleyici ajanlar veya klinik çalışma aşamasındaki tedaviler
Bilinmeyen	% 41 (n= 13)	FISH sonucuna ulaşamayan hastalar

Çalışmada yer alan ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından tanı konan KLL hastalarına ait klasik Rai evreleme sistemi dağılımı aşağıda belirtilmiştir (109):

Tablo 2.9 Rai evreleme sistemine göre KLL hasta dağılımı (n=32).

KLL-Rai Evreleme Sistemi	Vaka oranı	Klinik
Düşük Risk- Evre 0	% 25 (n=8)	Lenfositoz
Orta Risk- Evre 1	% 31 (n=10)	Lenfositoz + lenfadenopati
Evre 2	% 22 (n=7)	Lenfositoz + hepatosplenomegali
Yüksek Risk- Evre 3	% 6 (n=2)	Lenfositoz + Hb < 11 g/dL

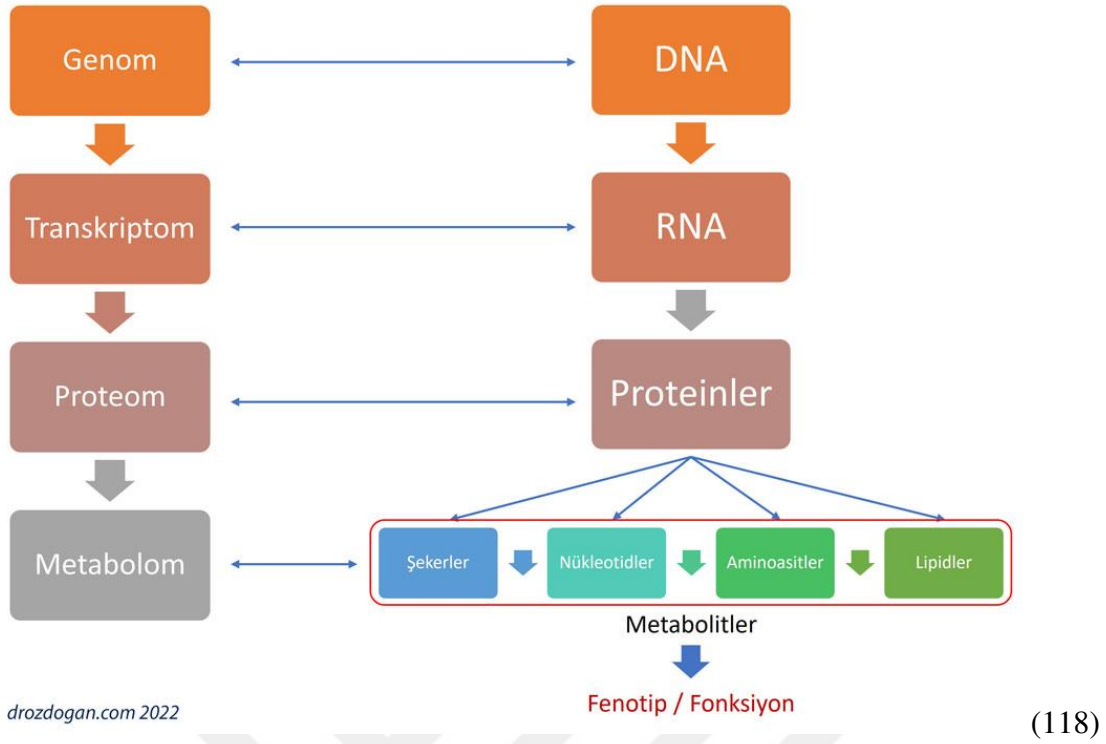
KLL-Rai Evreleme Sistemi	Vaka oranı	Klinik
Evre 4	% 16 (n=5)	Lenfositoz + Trombositopeni <100,000/mm ³

2.2. Metabolomiks

Metabolomiks, organizmaların kompleks fizyolojik fonksiyonunda son basamak olan fenotipi inceleyen bir ‘omiks’ yaklaşımı olarak farklı sınıflara ait düşük-molekül ağırlıklı metabolitleri (<1,500 Da) tanımlamakta ve miktar ölçümlemesi gerçekleştirmektedir (110). Anabolik-katabolik yolaklarda görevli metabolitler ile eksojen/ mikrobiyaya ile edinilen metabolitler bütünü temsil eden yapı ise metabolom olarak adlandırılmaktadır. Geniş aplikasyonları gıda kalite kontrolü, tarım gibi alanları kapsıyor dahi olsa, metabolomiks günümüzde özellikle kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına enformasyon sağlayan en önemli araştırma alanlarından biridir ve tıp uygulamalarında giderek artan sıklıkta yer almaktadır (111, 112). Genomik-transkriptomik düzeyde kodlanan bilgi kapasitesi ile fenotip olarak beliren metabolomiks, organizmada nihai fonksiyonallite hakkında bilgi vermektedir. Çevresel birçok faktörden etkilenerek ortaya çıkan bu fenotipik parmak izi, bireylerin çeşitli patolojilere veya uygulanan tedavilere cevabının izleminde çok değerli bilgiler vermektedir (113). Eksternal ve internal birçok uyarandan etkilenen metabolomun bu uyarıların etkilerini yansıtmaları bir avantaj olmak ile beraber, incelenen etkiyi ortaya çıkaran faktörlere ait çıkarımların objektif-doğru şekilde yapılabilmesi adına kontrollü çalışma düzenleri ile güçlü, kantitatif enformasyon sağlayan teknolojilere ihtiyaç artmaktadır (112). Bu noktada genomik veri 4 farklı azotlu organik baz ve proteomik veri ise 20 amino asit molekülü ile çeşitlenmekte iken; Human Metabolome Database (HMDB) veri tabanında paylaşılan güncel bilgiye göre metabolomiks çalışmalarında ortaya konduğu üzere 200.000’ i aşkın farklı insan metabolitinden bahsedilmektedir (114). Bu nedenle bahsedilen kimyasal kompleksitenin aydınlatılması ve metabolit spektrumunun tamamını kapsamak adına metabolomiks alanında oldukça fazla tekniğe ve enstrümana ihtiyaç duyulmaktadır (32, 115). Metabolomiks çalışmaları araştırmacının gereksinimlerine göre 2 ana yaklaşımla yürütülmektedir. Kalitatif (untargeted) metabolomikste ölçülebilen tüm metabolitler in silico

kütüphanelerle eşleştirilerek tanımlanmakta, integralitelerine göre rölatif kantitasyonları ölçülmektedir. Elde edilen kompleks veri seti çok yönlü istatistiksel analizle gruplanabilir küçük setlere indirgenerek yorumlanmaktadır (116). Avantajı, global değerlendirme ile biyobelirteç çalışmalarında değerli olması ve bilinmeyen metabolitlerin keşfi iken; olası güçlükler yüksek miktarda bulunan moleküllerin baskın sinyalleri ve kompleks datanın dekonvolüsyonunun büyük uğraş gerektirmesini kapsamaktadır (116). Öte yandan kantitatif (targeted) analizde ilgili metabolitlere ait internal standartlar kullanılarak mutlak konsantrasyon ölçümü yapılabilmekte, ilgilenilen metabolitler özel ekstraksiyon metotlarıyla düşük miktarda bulunsada dahi zenginleştirilerek görünür hale getirilebilmektedir (116). Böylece önceden belirlenen metabolitlerin hangi metabolik yollaklarda görev aldığı ve katkı şekli hastalıklara özgü biçimde ortaya konabilmektedir. Bu noktada unutulmaması gereken bir nokta da, spesifik metabolitlere ait özellikler araştırılırken NMR ve MS yöntemlerinin doğasında var olan özelliklerinden dolayı spektrumda aynı metabolitin birden çok kompleks sinyaller oluşturabileceğidir (117). Çalışma planında spesifik metabolit izlem metotları (izotoplama algoritmaları, targeted analizle pik eşleştirmesi) içerilerek bu problem aşılabilmektedir. Güncel çalışmada metabolitlerin güvenilir tanımlanmasında (bahsedilen sorunların aşılması adına) LC-MS analiz kısmında polar maddeleri içerecek şekilde internal standart kullanımı ile kalitatif analizde kalite kontrolü ve kantitatif NMR kısmında ise 1D deney sonuçlarının (metabolit kimliklendirmelerinin) 2D puls sekans metotları ile valide edilmesi planlanmıştır.

Şekil 2.1 Sistem biyolojisi yaklaşımında yer alan ögeler ve metabolomiks.



2.3. NMR Spektroskopisi

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, elektromanyetik alana maruz kalan örnekteki atom/ molekülleri spesifik frekanslarda absorplanan radyofrekans dalgalarının ölçümüne dayanarak hızlı ve doğru şekilde tespit eden bir yöntemdir. Temel analitik kimya tekniklerinden biri olan NMR ile örnek saflığı/ içeriği belirlenebilmekte; solüsyon içeriğine ait moleküler formül ve konformasyon, fiziksel özellikler, konsantrasyon hakkında bilgi edinilebilmektedir. NMR, tekniksel karakteristiği ile özgül birtakım avantaj/ dezavantajlar barındırmaktadır. NMR'ın diğer analitik tekniklere göre başlıca üstün özellikleri güçlü (cihaz stabilitesi olarak) ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olması (reproducibility), tek internal standartla yüzlerce metabolit kantitasyonu sağlanması, uygun işletim maliyeti ve destrüktif olmayan pratik ön işlem aşamaları içermesi olarak sayılabilmektedir. Yüksek çıktılı teknolojisi sayesinde büyük kohort ve longitudinal çalışmalara oldukça uygun bir çalışma platformu sağlamaktadır.

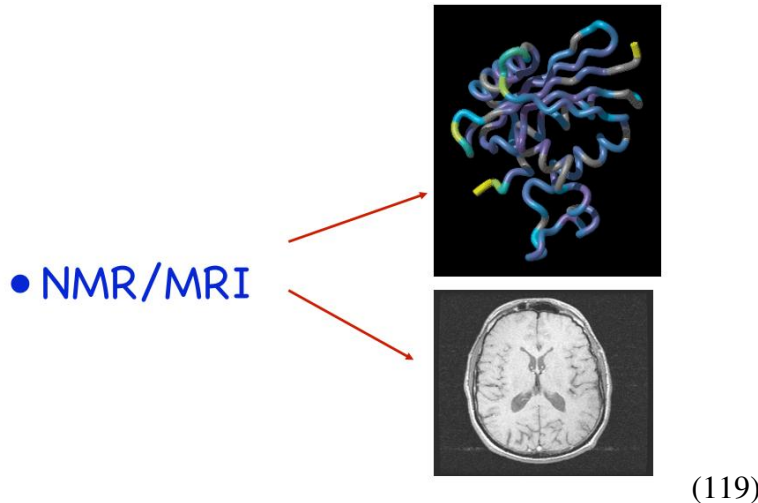
3.6.1. NMR spektroskopisi kısa tarihçesi

NMR'ın fiziksel prensipleri ve spektrometrik cihazın oluşturulması 1940-1950 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Atomların manyetik momentum ve nükleer spin özelliklerini

geliştirdiği NMR tekniğini kullanarak ilk kez inceleyen Columbia Üniversitesi'nden Amerikalı fizikçi Isidor Rabi (1938) NMR'ın mucidi olarak anılmaktadır. 1946'da Amerikalı fizikçiler Felix Bloch ve Edward Mills Purcell bağımsız olarak neredeyse aynı sayılabilecek yeni bir metod geliştirerek likit ve katı maddelerde nükleer manyetik momentum ölçümü gerçekleştirerek Rabi'nin tekniğini ilerletmişlerdir (119). 1951 yılında ise ilk NMR cihazı patenti Varian Associates şirketinin sahibi Russell Varian tarafından A.B.D.'de alınarak ileriki yıllarda 'dubbed NMR HR-30' adlı ilk cihaz üretilmiştir. NMR'ın tıp uygulamalarına kazandırılması ise, kanser taramalarında kullanılmak üzere geliştirilen MRI teknolojisi ile gerçekleşmiştir. Medikal NMR tarihçesi 1970'li yıllarda Amerikalı medikal doktor Raymond Vahan Damadian'ın hücreler üzerinde yaptığı çalışmalar sırasında tümör dokusunun normal dokulardan MR ile ayırt edilebileceğini keşfetmesine dayanmaktadır. Kanser hücrelerinin artan potasyum içeriğine bağlı olarak uzamış T1 ve T2 relaksasyon zamanlarına sahip olması bu ayrımı oluşturan ve ölçümlemesini sağlayan fiziksel sebebi ortaya koymaktadır (120). NMR'ın kanser taraması amaçlı deneysel kullanımı Damadian tarafında 1977 yılında gerçekleştirilmiş; günümüzde vazgeçilmez yere sahip manyetik rezonans görüntüleme kavramı tıp dünyasına kazandırılmıştır. Medikal NMR tarihçesinde Damadian ile beraber öncülük yapan Amerikalı kimyacı Paul Lauterbur, sinyal eldesinde alan-odaklı metodun aksine gradient kullanarak ilk 2 ve 3 boyutlu NMR görüntülerini elde etmiştir ve dokulardan elde edilen sinyal farklılıklarını pratik kullanıma uygun görüntülere çevirmiştir. Lauterbur'un 2003 Nobel ödülünü paylaştığı İngiliz fizikçi Peter Mansfield ise geliştirdiği matematiksel formül sayesinde saatler süren taramaları saniyelere indirmiş ve daha berrak görüntüler elde etmiştir. Öte yandan Amerikalı fizikçi Herman Carr ise, 1950 yılında manyetik alanda gradient kullanımının ilk tekniksel gösterimini gerçekleştirmiş ve ilk 1 boyutlu NMR görüntüsünü elde etmiş olup, Lauterbur ile Mansfield ile 2003 Nobel ödülünü paylaşmaması tartışma konusu olmuştur. Aynı yıllarda atom çekirdeklerinin Larmor frekanslarının kimyasal bağ/atomik komşuluklara göre hafif değişim göstermesine dair aydınlatılan fiziksel prensipler ile (kimyasal kayma ve spin eşleşmesi), NMR'ın saf veya kompleks karışımların materyal içeriğinin aydınlatılması amacıyla kullanımı söz konusu olmuştur ve NMR spektroskopisi analitik kimyanın en önemli enstrümanlarından biri haline gelmiştir. 1964 yılında Varian Associates çalışanı İsviçreli fizikokimyacı Richard Ernst'ün Fourier Transform- NMR tekniğini geliştirmesi ile karmaşık sinyallerin ayrıştırılarak spesifik atom/ moleküllere ait parmak izlerinin belirlenmesi kolaylaştırılmış, yüksek rezolüsyonlu spektrumların eldesine katkılarından dolayı Ernst, 1992 Nobel Kimya ödülü sahibi olmuştur (119). Ernst aynı zamanda korelasyon spektroskopisi (COSY) puls sekansı kullanarak 2

boyutlu NMR'ın ilk gösterimini yapmış; medikal MR tomografi ile 1980' de protein makromolekülüne ait 3 boyutlu yapıyı NMR ile görüntüleyen meslektaş Kurt Wuthrich' in biyopolimerlerin yapısal tayini aydınlatılması çalışmalarına destek olmuştur (121). Gelişen bilgisayar teknolojileri ile ticarileşme yolunda oldukça büyük hız yakalayan NMR, 1980' li yılların ortalarından itibaren medikal komünitenin kullanımına sunulmuştur (122). Günümüzde NMR görüntüleme (NMRI) terimi tıp uygulamalarında kullanım alanı açısından yerini manyetik rezonans görüntüleme (MRI)' ye bırakmıştır. NMR spektroskopisi ise saf/ kompleks karışımlarda spesifik molekül identifikasyonu, üç boyutlu yapı tanımlaması yapabilen metabolomik teknolojilerin en önemli iki enstrümanından birini tanımlamaktadır. Bu noktada her iki terim de aynı fiziksel prensiplere dayalı çalışan teknolojileri tanımlamakla beraber, araştırma tezimizde kullanılan NMR spektroskopisinde süperiletken magnetler sayesinde MRI' da kullanılan manyetik alan gücünün (1.5-7 Tesla) onlarca katı güçte manyetik alan oluşturulabilmektedir (9.4-21 Tesla).

Şekil 2.2 NMR ve MRI teknolojisi.



2.3.2. NMR spektroskopisi çalışma prensipleri- fizikokimyasal parametreler

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) metodunun çalışma prensibi, elektromanyetik alanda pozitif yüklü atom çekirdeğinin sahip olduğu momentumun (osilasyon manyetik momentumu) eksternal radyofrekans dalgaları ile uyarılması sonucu değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır (40). NMR’ da yalnızca spin-aktif özellikteki atom çekirdekleri magnet özelliği göstermekte (spesifik spin oryantasyonuna sahip olarak) ve spin oryantasyonundaki değişime bağlı olarak absorplanan radyofrekans dalgaları ölçümlenmektedir. Burada spin, bir partikülün kendi eksenini etrafındaki açısal dönüşünü ifade etmektedir. Spin, kütle veya yük gibi en temel partikül elementlerinden birisidir ve partikülün uzaysal hareketine bağlı oluşan momentumunun aksine intrinsik momentumunu ifade eder. Elektromanyetik alan davranışlarını inceleyen Maxwell eşitliklerine göre belirli yüke sahip hareketli/ spin-aktif partiküller magnet davranışı sergilemekte ve manyetik alan oluşturmaktadır (Ampere’s law) (123). Atom çekirdeği de benzer şekilde pozitif yüklü bir partikül olarak kendi eksenini etrafında yaptığı spin hareketi ile manyetik alan kuvveti oluşturmaktadır. Bu hareket ile indüklenen nükleer manyetik momentum vektörü, nükleer spin momentum vektörü ile direkt orantılıdır ve aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$\vec{\mu} = \gamma \times \vec{I}$$

$\vec{\mu}$: nükleer manyetik momentum

γ : giromanyetik oran (her nükleus için özgül değeri deneysel belirlenmektedir)

$\vec{I}$: nükleer spin angular momentumu

Spin kuantum numarası (I) her bir çekirdek türüne özgü bir değerdir ve proton/ nötron sayısının tek veya çift olmasına göre belirli bir patern izlediği gözlenmiştir. Proton ve nötron numarası tek sayı ise (örneğin ^2D) spin kuantum değeri tam sayı olmakta (1,2,3,...) ve nükleus küresel olmayan yük dağılımı göstermekte iken; proton veya nötron tek sayı ise (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) I kesirli sayı olmaktadır (1/2, 3/2, 5/2,...) ve nükleus küresel yük dağılımı göstermektedir. Proton ve nötron sayısı çift ise, spin kuantum sayısı 0’dır (tanecikler birbirine aksi yönde dönmektedir) ve çekirdek spin-aktif değildir. NMR spektrumunun gözlenebilmesi adına nükleer spin kuantum sayısının sıfırdan farklı olması gerekmektedir. NMR, $1/2$ spin kuantum sayısına sahip atomlar için standardize ve matematize edilmiştir; incelenen atom çekirdeğine göre proton veya karbon NMR spektroskopisi olarak adlandırılmaktadır.

Eksternal manyetik alan yokluğunda ($\vec{B}_0$), nükleus spinleri dejenere halde bulunmakta ve net manyetik momentum sıfır olmaktadır. Güçlü bir $\vec{B}_0$ varlığında ise spinler belirli bir oryantasyona sahip olarak net bir yığın (bulk) manyetizasyon paterni göstermektedir. Net manyetizasyon (bulk) her bir spin manyetik momentin ortalaması olarak hesaplanmaktadır. Burada manyetik momentum enerjisi, alan çizgilerine olan göreceli oryantasyona bağlıdır ve manyetik alana paralel dizilen spine sahip atomlar minimum enerjide iken anti-paralel sıralananlar maksimum enerji konformasyonundadır. Atomlara ait spin durum (spin state) sayısı $n = 2I + 1$ formülü ile belirlenmektedir, bu durumda $I = \frac{1}{2}$ atomları için 2 spin durumu mevcut olmaktadır: alfa ve beta. Alfa düşük enerji düzeyindeki atom spin durumunu (manyetik alana paralel dizilişli) ve beta ise yüksek enerjili atomları ifade etmektedir. Termal dengeye sahip sistemlerde farklı nükleer spin dağılımının (yüksek enerjili/ düşük enerjili atom popülasyonu oranı) olasılık hesabı, Boltzmann dağılımına göre matematize edilmiştir (124):

$$\frac{N_{Yüksek}}{N_{Düşük}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

ΔE : Enerji farkı ($E_{Yüksek} - E_{Düşük}$)

k : Boltzmann sabiti

T : Sıcaklık (Kelvin)

Transisyon Frekansları : NMR spektroskopisi temelinde, komşu spin enerji durumları arasındaki değişimin eksternal RF dalgaları ile indüklenmesi sonucu absorplanan enerjinin ölçümüne dayanmaktadır (58). Her farklı atom çekirdeği, düşük enerji düzeyinden (α) yüksek seviyeye (β) geçeceği enerji farkı ile orantılı frekansı absorplamaktadır:

$$\Delta E = h \times \nu$$

(ν : Frekans, h : Planck sabiti)

Nükleusa ait manyetik momentum vektörü, eksternal manyetik alan varlığında B_0 ile orantılı olarak enerji doğurmaktadır:

$$E = -\vec{\mu} \times \vec{B}_0 \text{ ve } \vec{\mu}_z = \gamma \times \hbar \times \mu_1 \text{ olarak hesaplandığından;}$$

$$E_{ml} = -\vec{\mu}_z \times \vec{B}_0 = \gamma \times \hbar \times \mu_1 \times B_0$$

$$\Delta E = \gamma \times \hbar \times B_0 \text{ (transisyona uğrayan atom çekirdeğinin enerji değişimi)}$$

$$(\hbar = h / 2\pi)$$

Dolayısı ile çekirdeklerin absorpladığı rezonant frekans (Larmor frekansı (ν));

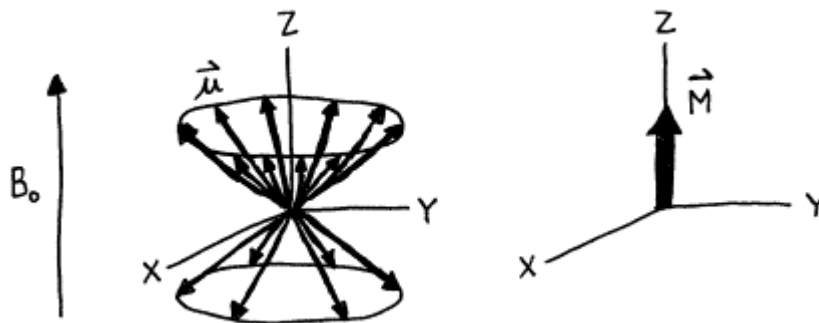
$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \gamma \times B_0 / 2\pi \text{ olarak hesaplanmaktadır.}$$

NMR spektroskopisi terminolojisi içinde saniyedeki siklus sayısı olan frekans yerine saniyedeki radyan değeri olan angular frekans (ω) tercih edilmektedir. Bir siklus = 2π radyan olduğundan;

$\omega = 2\pi \times \nu$ ve transisyon angular frekansı $\omega_0 = \gamma \times B_0$ olarak ifade edilmektedir (birimi Hertz (s^{-1})).

NMR Sinyal Oluşumu: NMR sinyali oluşumu, absorplanan foton frekansını ölçen klasik infrared/ UV-visible spektroskopisi çalışma prensibinden oldukça farklı kabul edilmektedir. Yaygın kabul alan görüşe göre NMR spektrumu, foton emilimi/ yayılımı mekanizmasından çok manyetik indüksiyon deney parametreleri ile elde edilmektedir (58). Klasik bir NMR deneyinde, güçlü manyetik alan içerisinde denge halindeki sistemin sekonder transvers bir manyetik alan uygulanması ile uğradığı değişim ölçümlenmektedir. Burada uygulanan eksternal manyetik alan, sistemi denge halinden çıkarabilecek ve rezonansı indükleyebilecek olan değişen frekanstaki RF dalgaları ile elde edilmektedir. Farklı elektrokimyasal çevredeki atomların zaman bağımlı olarak denge haline dönüşü ise Fourier dönüşümü ile kaydedilerek frekans spektrumu oluşturulmaktadır.

Net Manyetizasyon Vektörü (Ekilibrasyon Manyetizasyon Vektörü): Manyetik alan (B_0) doğrultusunda presesyona (salınım) uğrayan tüm çekirdeklerin net manyetik moment vektörü ($\vec{M}$) Z-aksisi çevresinde tanımlanabilmektedir (58). Düşük enerji (manyetik alana paralel presesyonların toplamı) projeksiyonu yüksek enerjiye (anti-paralel) oranla oldukça cüzi miktarda fazlaştığından, Z-aksisi yönündeki net manyetizasyon küçük bir değer almaktadır. Öte yandan manyetik alan doğrultusunda rastgele presesyon hareketi yapan atomların X-Y planında baskın tercihi olmadığından eşit miktarda gözlenen projeksiyonlar bu plandaki net manyetizasyonun sıfır olmasıyla sonuçlanmaktadır:



(58)

Şekil 2.3 Net manyetizasyon vektörünün manyetik alan (B_0) doğrultusunda hizalanması.

$\vec{M}$ değerin hesaplanması aynı doğrultuda uygulanan güçlü manyetik alan varlığında çözülmesi güç bir problem haline gelirken, ilk defa Nobel fizik ödülü sahibi Bloch ve Purcell tarafından 1946’ da gerçekleştirilmiştir. Bu gelişme günümüzde NMR analizlerinde 0.1 ppm’ den küçük manyetik momentum farklılıkların ölçümünü mümkün kılarak molekül içerisinde farklı kimyasal çevrede bulunan aynı cins atomların tespitini sağlamıştır.

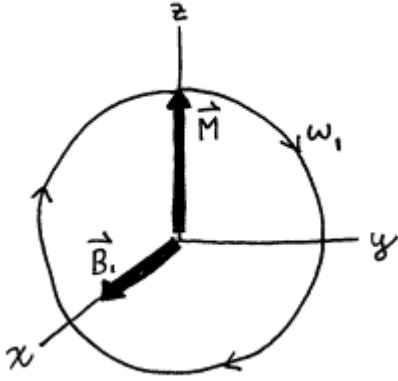
Larmor Presesyonu: Presesyon kelime anlamıyla, dönen bir cisme ait eksenin dış kuvvet etkisinde oluşan dönme momentumu ile diğer bir eksen çevresinde yaptığı açısal hareketi ifade etmektedir. Belirli bir açıda manyetik alana maruz kalan manyetik momentuma sahip nükleus da benzer şekilde bir dönme kuvveti ile bu manyetik alan doğrultusunda presesyona uğramaktadır ve presesyon frekansı Larmor eşitliğinde tanımlanmıştır. NMR cihazında değişen frekansta RF dalgaları uygulandığında spesifik atomlara ait Larmor frekansı yakalanır ise, atomlar alfa-beta düzey değişimini gerçekleştirecek enerji farkıyla orantılı olan Larmor frekansı absorplamaktadır. Larmor frekansı bu yönüyle nükleer spin kuantum durumları arasındaki transisyonu indükleyen elektromanyetik radyasyonun frekansıdır (58). Presesyon frekansı (Larmor frekansı):

$$\omega_0 = \gamma \times B_0$$

Transvers Manyetik Alan: Örnekteki her bir atoma ait nükleer manyetik moment vektörü uygulanan B_0 alanı doğrultusuna (Z-aksisi) eğimli olacak şekilde rastgele presesyona uğramaktadır. Fakat net manyetizasyon vektörü ($\vec{M}$) Z-aksisi boyunca yönlendiğinden net manyetizasyon vektörü presesyona uğramamaktadır. Ölçülebilir bir presesyon gözlenmesi adına, Z-aksisine dik ikinci bir eksternal manyetik alan (B_1) uygulanarak $\vec{M}$ vektörü Z-aksisinden uzaklaştırılmaktadır. B_1 statik olarak uygulandığında B_0 ’ a göre oldukça küçük kalmakta ve $\vec{M}$ vektör yönü ölçülebilir sapmaya uğramamaktadır. Öte yandan B_1 , Z-aksisi çevresinde Larmor frekansı ile (ω_0) dönecek şekilde uygulandığında $\vec{M}$ vektörü oldukça kompleks bir presesyon hareketi sergilemektedir. $\vec{M}$ ’ e ait ω_1 değeri, uygulanan B_1 alanı çevresinde yapılan presesyon hareketini ifade etmektedir. Net manyetizasyon vektörü ayrıca Z-aksisi çevresinde ω_0 frekansı ile spiral hareket çizmektedir. Sonuçta $\vec{M}$ uç açısı Z-aksisinden 90° uzaklaşarak ölçülebilir NMR sinyali oluşturabilmektedir. Dönen B_1 manyetik alanı XY planı yerleşimli bir solenoid bobin sisteminin, ω_0 frekanslı sinüzoidal çıktı voltajı sağlayan alternatif akım kaynağına bağlanması ile üretilmektedir (58). NMR deneylerinde bahsedilen karmaşık presesyon hareketini kolayca görselleştirmek adına ‘dönen referans çerçevesi (rotating frame of reference)’ adlı yeni bir sanal aks sisteminin kullanımı

önerilmiştir. Bu referans çerçevesinin dönme frekansı ve yönü B_1 vektörü ile aynı olduğunda (ω_0), manyetizasyon vektörünün Z-eksisindeki presesyonu statik hale gelmektedir, diğer anlamıyla B_0 manyetik alanı bu sanal aksta kaybolmaktadır. Bu durumda $\vec{M}$ vektörü yalnızca ω_1 frekansı ile B_1 alanı etrafında presesyon hareketi sergilemektedir (ZY planında):

Şekil 2.4. Manyetizasyon vektörünün dönen referans çerçevesindeki hareketi (58).



FT-NMR spektrometresinde net manyetizasyonun sapma yönü, açısı ve hızı uygulanan farklı puls sekansları ile kontrol edilebilmektedir. $\vec{M}$ vektörü ucuna ait eğilme hız ve açısı, prob içerisindeki örneğe sarmal koiller aracılığıyla uygulanan kısa RF pulslarının gücü (power) ve uygulanma süresi ile ilişkilidir (58). Güçlü RF puls, güçlü B_1 alanı oluşturarak yüksek değerli açısal frekansa yol açmaktadır (ω_1). Uzun süreli RF puls ise presesyon hareketinin devamlılığını artırmaktadır. Bu kontrol mekanizması çoklu puls NMR deneylerini mümkün kılan temel faktördür.

Relaksasyon: B_0 manyetik alanında bulunan çekirdeklere presesyon frekansı ile eşit frekanslı RF dalgası uygulandığında düşük enerjili spin durumunda bulunan (manyetik alana paralel yönelmiş) çekirdekler RF elektrik enerjisini absorblamakta ($\Delta E = h \cdot \nu$) ve manyetik alana zıt yönelmektedir. Bu etkileşim nükleusun manyetik rezonansı veya nükleer geçişi olarak adlandırılmaktadır (62). Rezonans, osilasyona sahip iki fiziksel sistem arasındaki enerji transferinin sistemlere ait frekansın eşit olduğu durumda maksimum olduğu durumu ifade etmektedir. Bu anlamda nükleer manyetik rezonans, RF elektriksel sinyalinin manyetizasyon vektörü ile rezonant eşleşmesi prensibini açıklayan uygun bir terim olarak kabul edilmektedir (58). Öte yandan termal stabil sistemlerde Boltzman dağılımında belirtildiği üzere nükleer spin popülasyonları ekilibrazyonda bulunmakta, yüksek-düşük spin enerji durumları arası dinamik transisyon gerçekleşmektedir. Ekilibrasyon durumu, RF transmitter koil aracılığıyla uygulanan transvers B_1 manyetik alanı ile bozulmaktadır; yüksek spin enerjili nükleus, 0.1-1

sn gibi kısa bir süre sonra absorbladığı enerjiyi h.v şeklinde geri vermekte ve düşük enerjili spin durumuna geçmektedir. Bu olay relaksasyon (durulma) olarak adlandırılmaktadır. Relaksasyon hızını etkileyen faktörler çekirdek tipi, manyetik alan homojenitesi, sıcaklık, spine sahip veya paramanyetik özellikte manyetik materyallerin varlığıdır (125). Durulmaya ait başlıca iki spesifik zaman sabiti bulunmaktadır:

T1 relaksasyonu (spin-lattice relaksasyon): Manyetizasyon vektörünün büyüklük ve yön (z-aksisine geri dönerek) açısından ekilibrazyondaki haline ulaşması için gerekli zamanı ifade etmektedir. T₁ zaman sabiti diğer anlamıyla termal dengedeki düşük-yüksek enerjili spin popülasyonunun oluşması için gerekli süredir. Bir sonraki RF pulsunun hangi gecikme süresiyle (delay) uygulanması gerektiğinin direk ölçüsüdür ve ardışık puls gerçekleştirilen NMR deneyine göre 0 veya 5 x T₁ saniye sonra uygulanmalıdır (125).

T2 relaksasyonu (spin-spin relaksasyon): T₂ sabiti, manyetizasyon vektör şiddetinin xy-düzleminde sönümlendiği zamanı ifade etmektedir ve tipik olarak 1-2 saniye sürmektedir. NMR sinyali xy-düzlemindeki manyetizasyon vektörünün ölçümüne dayandığından, T₂ relaksasyon süresi sinyalin gözlenebildiği zaman uzunluğunun direk ölçüsüdür. Genel yaklaşım transceiver koiller aracılığıyla kaydedilen serbest indüksiyonlu bozunum (FID-Free Induction Decay) sinyalinin 3-4 x T₂ süresi uzunluğunda olması gerektiği şeklindedir (125).

Kimyasal Kayma: Moleküldeki her bir çekirdeğe özgü rezonant frekans değeri, çekirdeğe etkiyen efektif manyetik alan kuvveti ile belirlenmektedir. Efektif manyetik alansa çevrelendiği elektronlar, dolayısı ile bulunduğu kimyasal çevreden etkilenmektedir. NMR teknolojisi temelde bu özellikten yola çıkarak rezonant frekans sinyali ölçümü ile atom çekirdeklerinin bulunduğu kimyasal çevreyi tanımlamakta ve molekül tespiti gerçekleştirmektedir. Genel prensip olarak elektronegativite arttıkça elektronların oluşturduğu ‘perdeleme (shielding)’ etkisi ile efektif manyetik alan değeri düşer ve spektrumda gözlenen rezonans frekansı azalır. Aromatik ve ikili/ üçlü bağ içeren yapılarda gözlenen manyetik anizotropi fenomeni de rezonant frekans değerini etkilemektedir. Her bir atoma ait kimyasal kayma frekans değeri (δ , ppm) Hertz cinsinden ifade edildiğinde uygulanan manyetik alana bağlı olarak değişeceğinden, evrensel değerler belirlemek adına aşağıda belirtilen eşitlik kullanılmaktadır (125):

$$\delta (ppm) = \frac{\vartheta - \vartheta_0}{\vartheta_0}$$

ϑ : Tetrametilsilan (TMS) referans molekülünün Hertz cinsinden rezonant frekans değeri
Bu eşitliğe göre TMS molekülünün ppm cinsinden kimyasal kayma değeri 0 olmaktadır.

Spin-Spin Yarılması (Multipisite, Eşleşme, coupling): Bir atoma ait absorbant pik sinyalinin komşu atomlarca yarıklanmasını ifade etmektedir (40, 126). Farklı kimyasal çevrede bulunan komşu atom/ atomların spin pozisyonuna göre oluşturduğu lokal manyetik alanın değişimi, efektif manyetik alanda değişime sebep olarak bu yarıklanmaya yol açan temel faktördür. Kimyasal ekivalan protonlar moleküler simetriden dolayı aynı frekansta kimyasal kaymaya uğramaları ve tek bağ etrafındaki hızlı dönüş ile spin-spin eşleşmesi paterni göstermemektedir (126). Eşleşme paterni gösteren bir protona ait kimyasal kayma değeri, yarıklanmış sinyalin santral merkezi olarak kabul edilmektedir (127, 128). Yarılma fenomeni, komşu proton sayısının tespitinde ve dolayısı ile moleküler yapı hakkında çok önemli bilgiler sağlamaktadır. Yarılma paterninin gözlenebilmesi adına uygulanacak NMR frekansı yeterince yüksek olmalıdır. Multipisite, komşu ekivalan protonların sayısı (N) ile ilişkilidir (62). Bir protona ait sinyal, $I=1/2$ spin kuantum sayılı ve en fazla 3 bağ uzaklığında bulunan N adet komşu çekirdek tarafından $2N \times I + 1$ sayıda yarılmaktadır (N+1 kuralı). Yarıklanmış sinyalin pik noktaları arasındaki mesafe, çiftlenim sabiti (J) olarak hesaplanmaktadır (128). J; birbiriyle eşleşen protonların etkileşim gücünü (diğer ifadeyle komşu nükleus spin durumunun ne kadar güçlü etkilediğini) ifade etmektedir. Çiftlenim sabiti değeri manyetik alan gücü/ operasyon frekansından bağımsızdır ve Hertz birimi ile ifade edilmektedir. Pikler arası mesafe, eşleşen çekirdek türüne göre eşit veya farklı olabilmektedir. Çiftlenim sabiti NMR analizi ile molekül yapısını aydınlatmada özellikle bağ yapısı hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Örneğin eşit çiftlenim sabitine sahip iki sinyal gözlemlendiğinde, bu piklerin yanyana yerleşimli karbonlara bağlı protonlara ait olduğu belirlenmektedir. Öte yandan cis veya trans ikili bağ yapısında bulunan protonların sahip oldukları farklı J değerleri, molekülün yapısı hakkında yol gösterici olmaktadır. Eşleşen proton sinyallerinin kimyasal kayma fark değeri ($\Delta\nu$, Hertz) J sabitinden çok yüksek olduğunda, birinci derece yarılma paterni gerçekleşmektedir ($\Delta\nu/J \geq 8$). Birinci derece spektrumlarında, sinyalin kaç pike ayrılacağını belirleyen multipisite ve intensite dağılımını açıklayan Pascal üçgeni kuralları geçerli olmaktadır (128). Yüksek dereceli (ikinci dereceli) yarılma paterni ise, eşleşen protonlar arası kimyasal kayma farkı ($\Delta\nu$) J sabitinden oldukça düşük veya eşit büyüklükte olduğunda gerçekleşmektedir ($\Delta\nu/J \leq 10$). İkinci dereceli spektrumlarda çatı etkisi (roof effect) olarak adlandırılan, birbirine bakan iç piklerin yüksek ve dış piklerin ise düşük intensiteli gözlemlendiği klasik patern gözlenmektedir. Yarılma paterni manyetik alana bağlı olarak değişmekte, alan gücü artırıldığında ikinci dereceli spektrum birinci dereceli spektruma rezolve olabilmektedir.

2.4. Kütle Spektrometresi

Kütle spektroskopisi; elektromanyetik alanda hareket eden yüklü partiküllerin hareketini inceleyerek kompleks karışımlarda molekül/ atomlara ait kimlik ve miktar tayinini yüksek sensitivite ile gerçekleştirebilen bir analitik kimya tekniğidir. Tipik bir kütle spektrometre sistemi başlıca örnek tanıtma, iyon kaynağı, kütle analizörü, detektör ve data analizi olmak üzere 5 kısımdan oluşmaktadır. Örnek tanıtma sistemleri yığın (batch), direkt prob, membran veya kromatografik arayüz (GC/ LC-MS) şeklinde MS cihazına entegre edilebilmektedir. İyon kaynağından detektöre kadar gerçekleşen partikül hareketi, yüksek negatif basınçlı vakum sistemleri ile gerçekleştirilmekte ve oluşturulan iyonların başarılı şekilde detektöre iletilmesinde yüksek vakum sağlayan pompa sistemleri hayati önem taşımaktadır.

MS tekniğinin son yıllarda rutin laboratuvar pratiğine türlü kullanım alanları ile girmesi sebebiyle (129) bu alanda hem enstrümental, hem de metodolojik anlamda büyük gelişmeler kaydedilmiştir (130). Bu noktada ana enstrümental kısımlardan biri olan analizör sistemlerinde quadropole kullanımı fragmentasyon ve kantitasyon adına avantaj sağlamakta iken güncel çalışmada kullanılan orbitrap teknolojisi ise femtomolar seviyesinde (sub-ppm kütle farklılıklarını ortaya çıkaracak şekilde) doğruluk ile yüksek pik rezolüsyonu sağlamaktadır. Orbitrap teknolojisi bir iyon tuzağı kütle analizörü türü olup, bir santral ve iki dış elektrot içermektedir. Santral elektroda uygulanan direkt DC akım dış elektrotlar arasında sağladığı yüksek statik negatif voltaj ile, iyonların daha küçük radyal çaplı yörüngede osilasyonunu ve etkili tuzaklanmasını sağlamaktadır ("electrodynamic squeezing"). Farklı iyonların farklı frekanslarda osilasyonu, iyon ayrımını sağlayan temel noktadır. Burada dış elektrotlar osilasyon frekansı ölçümü yaparak orbitrap' in kütle analizörü haricinde detektör görevi gören kısmını ve iyonlara ait kütle spektrogramı görüntülerini oluşturmaktadır (131). Orbitrap teknolojisi, yüksek rezolüsyon ve kütle doğruluğu (high-resolution, accurate-mass (HRAM)) ile kompleks karışımlardaki düşük miktarda bulunan ve bilinmeyen metabolitlerin aydınlatılmasında büyük başarı sağlaması yönüyle çalışmada tercih edilmiş ve önemli katkıda bulunmuştur (132).

2.4.1. Kütle spektrometresi komponentleri

İyon kaynağı

Örnek içerisindeki organik moleküller, kütle analizörüne ulaştıklarında gaz fazda iyon partikülleri haline dönüşmüş olmalıdır. Analizde seçilecek iyonizasyon kaynağı örneğin başlangıç fazına göre değişiklik göstermekte ve temelde ikiye ayrılmaktadır; *gaz faz ve*

desorpsiyon. Elektron iyonizasyon (EI), kimyasal iyonlaştırma (CI) ile atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI); gaz faz iyon kaynağı olarak kullanılan tekniklere örnektir. Burada iyonizasyon örnek önce buharlaştırılıp gaz hale döndükten sonra gerçekleşmektedir. Uçucu olmayan/ termal instabiliteye sahip likit ve katı örnekler için kullanılan desorpsiyon kaynakları ise molekülleri direkt gaz iyonlarına dönüştürmektedir. Elektrosprey (ESI), hızlı atom bombardmanı (FAB) ve matris destekli iyonizasyon desorpsiyon (MALDI) en sık kullanılan desorpsiyon iyonizasyon teknikleridir. İyonizasyon kaynakları ayrıca sebep oldukları fragmentasyon paternine göre yumuşak (soft) veya sert (hard) olarak da sınıflandırılabilir. Sert iyonizasyonda; moleküller yüksek enerji aktarımı ile elektron kaybederek radikal katyon haline dönüşmekte ve yüksek oranda parçalanarak kütle spektrogramındaki karakteristik fragmentasyon paternini göstermektedir.

Elektron iyonizasyon (EI), prototip olarak geliştirilen ilk sert iyonizasyon tekniğidir. Katot yüzeyinden termiyonik emisyon ile yönlendirilen elektron ışını kinetik enerjisi iyonizasyon enerjisinden yüksek olduğunda (katot ile kaynak bloğu arasında uygulanan 70 eV ile) 10^{-6} torr basınç altında gaz fazdaki moleküller ile etkileşerek iç kabuk elektronlardan birinin kopmasına sebep olmaktadır. EI sistemlerinde iyonizasyon prosesini geliştirmek adına elektronların izlediği yola paralel olarak zayıf manyetik alan uygulanmaktadır. Bu sayede daha dar bir helikal yörünge izleyerek anoda (trap) ulaşan elektronların kat ettiği yol uzatılmaktadır ve iyonizasyon verimliliği artırılmaktadır. Sonuçta pozitif iyon radikali (tek sayıda eşleşmemiş elektron sayısına sahip olarak) oluşarak molekül fragmentasyona yatkın hale gelmektedir. Genellikle GC kromatografi ile eşleştirilen EI, 600 Dalton'dan küçük uçucu organik moleküllerin tespitinde oldukça sensitif ve basit uygulanır bir iyonizasyon tekniği olarak günümüzde halen tercih edilmektedir (133). Fakat EI sistemlerinde organik makromoleküllerin çoğunluğu parçalanarak spektrumda moleküler iyon piki sergileyememekte ve fragmentasyon paterni spesifikite gösterememektedir (134). Bu nedenle termal ve kütle limitasyonuna sahip analizler için sıklıkla MALDI/ ESI gibi teknikler tercih edilmektedir.

Kimyasal iyonlaştırma (CI), moleküler protonasyon sağlayan ilk yumuşak iyonizasyon tekniği olarak geliştirilmiştir. Burada ilk olarak reaktif gaz (metan, amonyak, izobütan) iyonlaştırılmakta ve kuvvetli radikal asit oluşumu sağlanarak örnek içerisindeki moleküllerin protonasyonu sağlanmaktadır ($[M+H]^+$). Fakat EI ile benzer şekilde yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllerin (protein, oligosakkarit, nükleik asit) iyonizasyonundaki başarısızlık ve gaz fazda görülen stabilizasyon problemleri nedeniyle yerini FAB gibi yumuşak iyonizasyon tekniklerine bırakmıştır.

FAB, 1980 ile 1990 yılları arasında geliştirilen, uçucu olmayan yüksek moleköl ağırlıklı polar moleküllerin iyonizasyonunda başarılı olmuş bir yumuşak iyonizasyon tekniğidir. FAB yönteminde visköz solvent matriks (gliserol, nitrobenzilalkol) içerisindeki örnek, hızlı hareket eden atom (kV enerji ile hızlandırılmış Ar, Xe) ile etkileşerek pozitif, negatif veya quasimoleküler iyon oluşumu gerçekleşmektedir. Günümüzde bu tekniğin yerini daha sensitif protonasyon sağlayan ESI ile MALDI iyonizasyon teknolojileri almıştır (85).

EI ve CI tekniklerinde bahsedilen yüksek fragmentasyon ve fragilite problemin aşılması, sert iyonizasyona göre daha yüksek oranda stabil moleküler iyon oluşturabilen (M^+) yumuşak iyonizasyon tekniklerinin gelişimi ile mümkün kılınmış (135); böylece protein, DNA, glikan gibi makromoleküllerin analizi kolaylaşarak klinik alanda MS kullanımı hız kazanmıştır (136). Yüksek moleköl ağırlıklı (5000 kDa' a kadar) biyomoleküllerin tespitinde oldukça başarılı olan ve atmosferik basınç iyonizasyon (API) arayüzleri ile uyumlu ESI, rutin kullanımda en sık tercih edilen yumuşak iyonizasyon tekniğidir. ESI, iyon oluşumunu protonasyon ve deprotonasyon mekanizmaları ile gerçekleştirmektedir. Burada oluşan iyonlar 1 veya daha fazla proton kazanımı $[M+H]^+$ / kaybedimi $[M-H]^-$ ile moleküler iyondan farklı kütlede iyon formları oluşturmakta ve bu iyonlar 'quasimoleküler iyon' olarak adlandırılmaktadır. Kantitatif LC-MS analizinde ESI kullanımının başlıca avantajı, protonasyon/ deprotonasyona uğrayan moleküllerin minimal fragmentasyon ile oldukça selektif prekürsör iyon seçilimine izin vermesi ve sensitivitenin artırılmasıdır. Öte yandan eş zamanlı elüsyona uğrayan analit veya matriks komponentlerine bağlı olarak görülen sensitivite kaybı ve matriks etkileri, ESI tekniğinin majör problemlerini oluşturmaktadır (137). Güncel çalışmaya ait MS analizlerinde de tercih edilen ESI tekniğinin çalışma prensipleri aşağıda özetlenmiştir:

- Kromatografik arayüzden ayrılan eluent, prob içerisindeki metal kapiller çıkışında nebulizasyona uğrayarak (nebulizör gaz) damlacık formunda sprej içerisine karışır (droplet).
- Kapiller ile karşıt elektrot arasında 2-5 kV yüksek gerilime maruz kalan damlacıklara yük transferi gerçekleşir.
- Kurutucu nitrojen gazı (N_2) ile mobil faz buharlaştırılarak damlacık boyutu küçülür.
- Damlacık yüzeyinde yük yoğunluğu arttığında elektriksel repulsiyona bağlı olarak damlacık fisyonu gerçekleşir.
- Bu itme kuvveti damlacık yüzey geriliminin üzerine çıktığında ise 'Coulombic fisyon' ile sonuçlanır ve kütle analizörüne iletilecek olan gaz faz iyonlar oluşturulur.

API arayüzleri ile uyumlu diğer teknikler olan APCI ile atmosferik basınç fotoiyonizasyon (APPI) ise polar olmayan organik moleküllerin (steroid vb.) iyonizasyon verimliliğini

artırmak adına geliştirilmiştir (135). Bir gaz faz iyonizasyon tekniği olan APCI ile ESI tekniğine oranla daha az iyon baskılanması (ion suppression) problemi yaşanmaktadır. Fakat kimyasal iyonizasyon gerçekleştiğinden mobil fazda daha yüksek konsantrasyonlu solvent kullanımı gerekmekte ve bu sebeple solvent içeriği analit sinyal baskılanmasının önüne geçilmesi adına dikkatle belirlenmelidir (137).

Kütle Analizörü

1. Manyetik Sektör Analizörü: manyetik ayırıştırıcı olarak büyük magnetler

kullanılmaktadır. Prototip bir manyetik sektör analizöründe iyonların ayrımı, manyetik alan (B) içerisinde hareket eden yüklü parçacığın (q) merkezci kuvvet etkisiyle (centripetal force, F_C) kavisli bir yörünge çizerek detektöre belirli bir lokasyonda varması ile gerçekleşmektedir. Burada detektör, yörünge yarıçapını (r) kaydederek iyonun ağırlık/kütle oranını belirlemektedir:

$$F_M (\text{manyetik kuvvet}) = F_C (\text{merkezcil kuvvet})$$

$$q (\text{yük}) \cdot v (\text{hız}) \cdot B (\text{manyetik alan}) = m (\text{kütle}) \cdot v^2 (\text{hız}) / r (\text{yörünge yarıçapı})$$

Aynı yükteki hafif iyonlar, küçük yörünge çapı ile daha büyük açıda saparak detektöre ulaşmaktadır.

2. Kuadrupol Analizör: klinik laboratuvarlarda en sık tercih edilen analizör tipidir.

Paralel yerleşimli dört silindirik metal roddan (çubuk) oluşur. Kuadrupol sistemlerinde moleküllere ait m/z verisi statik veya tarama modlarında olmak üzere iki şekilde elde edilmektedir. Statik modda RF ve DC voltajları optimum ayarlar yapılarak belirli moleküller en sensitif şekilde seçilebilmektedir. Yüksek sensitivite, detektöre ait asgari bekleme süresinin (dwell time) spesifik bir moleküler iyonun m/z sinyali elde edilmesinde harcanması ile başarılmaktadır. Tarama modunda ise RF/ DC ayarı sürekli değiştirilerek farklı m/z değerine sahip partiküller seçilmekte ve uçuş yörüngesini tamamlayarak detektöre ulaşmaktadır. Tekli (single) kuadrupol sistemleri kompleks matrislerde selektivite açısından iyi performansa sahip olmadığından rutinde sıralı (tandem) MS/ MS cihazları tercih edilmekte ve kantitatif analizde en başarılı sonuçları vermektedir. Tandem MS cihazları MS1, çarpışma odası (collision cell) ve MS2 olmak üzere üç kuadrupolün sıralı yerleşimiyle meydana gelmiştir ve tarihsel olarak çarpışma odasının da bir kuadrupol olması sebebiyle aynı zamanda ‘triple quadrupole (QQQ)’ olarak anılmaktadır. MS/ MS cihazlarında prekürsör moleküller (parent iyon) birinci analizörde (MS1) seçilmekte, çarpışma odasında ‘collision-induced dissociation (CID)’ fiziksel prensibi ve inert gazların yardımıyla (helyum, argon, azot)

ikincil iyon fragmanlarına (daughter iyon) ayrılmaktadır. Sonrasında farklı m/z oranına sahip bu fragman iyonlar MS2 kuadropolünde uygulanan optimum RF/ DC voltajları ile seçilerek detektöre ulaşmakta ve klasik kütle spektrogramı elde edilmektedir. Son yıllarda TOF ve Orbitrap cihazları ile hibritleştirilen LC-MS analizörleri, yüksek kütle rezolüsyonu ile oldukça selektif ve doğru molekül ayrımı gerçekleştirebilmektedir (137). Ayrıca hızlı data eldesi ile kromatografik pik boyunca yeterli sayıda data noktası üreterek yüksek sensitiviteli sonuçlar sağlamaktadır.

3. *Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri (Time of Flight, TOF)*: sıklıkla MALDI iyon kaynağı ile entegre edilerek mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılırlar (138). Tof analizörleri tandem kuadropollerden farklı olarak çarpışma odası sonrasında bir uçuş tüpü içerirler. Lineer veya reflektör olmak üzere iki tip tüp formu bulunmaktadır. Uçuş tüpüne giren Reflektör tipin rezolüsyonu daha yüksek olduğundan daha sık tercih edilmektedir. Burada tüpe giren iyonlar reflektör ile yansıtılarak detektöre iletilirler. Tüpe giren her iyonun kinetik enerjisi sabit tutulmakta ve böylece daha hafif tanecikler yüksek hız ile detektöre daha kısa zamanda ulaşmaktadır.
4. *İyon Tuzaklı Analizörler*: elektrik ve manyetik alan kombinasyonunu kullanarak iyonları yakalayan, tutan ve detektöre ileten sistemlerdir. 3D ion trap (QIT), 2D linear ion trap (LIT), electrostatic trap (orbitrap) ile magnetic field-based ion trap (ion-cyclotron resonance, ICR traps) gibi farklı tipleri geliştirilmiştir (139). QIT, kuadropol ile benzer prensipte çalışırken (statik DC akım ve RF elektronik osilasyonu kullanarak), temelde yapısal farklılık göstermektedir. Kuadropoldeki paralel rodlar her iki uçta bulunan hiperbolik metal elektrotlar (end caps) ile yer değiştirirken halkasal bir elektrot ise bu uç elektrotların arasına konumlandırılmıştır. İyon tuzaklı sistemler bir nevi kapalı kuadropol sistemlerine benzetilebilir (140). Burada iyonlar uygulanan selektif elektrik alana göre dairesel uçuş yörüngelerinde yakalanarak tutulmaktadır. LIT sisteminde ise, kuadropol çubuk setleri end cap elektrotlarla kombine edilerek iyon tuzaklandırılması sağlanmaktadır. Bu özellik LIT sistemlerine kütle filtreleme (analizör) ve iyon tuzaklandırması olarak ikili fonksiyon kazandırmaktadır. Orbitrap ise iğsi şekilli santral bir elektrot ile dış elektrotları içermektedir. Orbitrap sisteminde uygulanan DC akım sayesinde farklı iyonların farklı frekanslarda osilasyonu ve elektrotları terk edişi, iyon ayrımını sağlayan temel noktadır. Burada iyonlara ait aksiyal hareket frekansı, direkt olarak m/z oranları ile ilişkilidir. ICR traps ise, iyonların radyal yörünge hareketini indükleyen güçlü manyetik alan kullanarak opere edilmektedir (benzer şekilde hareket frekansı m/z oranı ile ilişkilidir). Orbitrap ve ICR

analizörlerinin bir diğer ortak özelliği, her iki sistemin de hem kütle analizörü (iyon tuzaklama) hem de Fourier dönüşümü kullanarak detektör özelliği göstermeleridir. Burada kütle spektrogramı, uygulanan RF voltajlarının taranarak artan m/z değerine göre sistemi terk eden iyonların frekanslarının belirlenmesi ile detekte edilmektedir (140). İyon tuzaklı analizörler özellikle proteomiks ve post-translasyonel modifikasyonların kalitatif analizlerinde tercih edilmektedir. Maksimum iyon tutma kapasitesine sahip iyon tuzaklı sistemler, bu özellikleri ve düşük m/z oranlarını tespit etmede yaşanan problemler sebebiyle kantitatif analizlerde tercih edilmemektedir.

5. *Fourier-Transform İyon Siklotron Rezonans Analizörleri (FT-ICR):* Rezolüsyonu ($>10^6$) ve doğruluğu (<1 ppm) en yüksek kütle analizörüdür (141). ICR analizörünün çalışma prensibi, statik manyetik alana dik hareket eden yüklü partikülün manyetik Lorentz kuvveti ile merkezci kuvvet etkisinde siklotron frekansı ile dairesel yörünge çizmesine dayanmaktadır (142). Burada detektör tarafından tespit edilen siklotron frekansı hareket çapı ve partikül hızından (dolayısı ile kinetik enerjiden) bağımsız olarak yalnızca m/z oranı ve manyetik alan büyüklüğü ile değişmektedir. ICR sisteminde analizör hücreye ulaşan iyonların başlangıç yörünge çapları detekte edilemeyecek kadar küçük olduğundan, eksternal radyofrekans sinyali ile uyarılan (siklotron frekansına eşit) iyonlar absorbladıkları enerji ile daha geniş çaplı orbital hareket fazına geçmekte, böylece detektör tarafından tespit edilebilmektedir (143). Kütle spektrumu, farklı frekanslardan oluşan sinüzoidal dalgaların kompoziti olan görüntü sinyalinin (free induction decay, FID) Fourier-transformasyon ile zaman fonksiyonundan frekansa çevrimi ile elde edilmektedir (144). Günümüzde güçlü süperiletken magnet ve ultra yüksek vakum sağlayan sistemler içeren ICR cihazlarının klinik kullanımı yüksek maliyet sebebiyle kısıtlı kalmıştır (143).

Detektör

Detektör, aktif yüzeyine (dinot) çarpan iyonlar ile oluşan elektrik akımını ölçülebilir sinyallere dönüştüren MS bölümüdür. Kütle spektrometresinde molekül seperasyonu ve iyon seçiliminde kaydedilen ilerlemeler sebebiyle detektör teknolojilerine olan ilgi nispeten kısıtlı kalmıştır fakat en son aşamada iyonların görünür kılınması oldukça büyük önem taşımaktadır (145). MS sistemlerinde uzun süredir kullanılan detektör tipleri, geleneksel analog (Faraday cups, FC) ve electron multiplier (EM) detektörleri kapsamaktadır.

Elektron çoğaltıcılar (electron multipliers, EM): MS sistemlerinde en sık kullanılan detektördür. Birbirine seri ve aralıklı olarak bağlanmış yüksek negatif voltaj uygulanan metal

plakalar (dinot), yüzeyine çarpan iyon akımını $\sim 10^6$ kat amplifiye ederek sekonder elektron emisyonu (ve ardışık oluşan elektron kaskadı ile) ile ölçülebilir elektron akımı sinyaline dönüştürmektedir (145). Final dinot ise akümüle olan yükü voltaj atımı olarak kaydetmektedir. EM detektörü, nötral partiküllerin dinot yüzeyine çarparak gürültü oluşturmalarının önüne geçilmesi adına iyonların çıkış eksenine dışına yerleştirilmiştir. En önemli avantajları gürültünün az oluşması ve tek iyon tespitine olanak sağlamasıdır (146).

Faraday cup (FC): Basit ve uygun fiyatlı analog bir sistem olarak FC, oldukça sensitif EM detektörler ile ölçülemeyen yüksek iyon akımlarını tespitinde başarılıdır (147). FC yapısı, çukur bir iletici elektrotun yüksek direnç ile topraklanmasından oluşmaktadır. İletici elektrota çarpan iyonlar, direnç üzerinden akan ve topraktan iletilen elektron akımına sebep olmakta, böylece direnç üzerinde düşen potansiyel fark ölçülerek sinyal kaydedilmektedir. Fakat termal ve elektriksel gürültünün yüksek olması, düşük iyon akımlarının tespitinde başarısızlıklar gibi faktörler günümüzde FC detektörlerin MS sistemlerinde kullanımını sınırlı kılmıştır.

Fotomultiplier tüp (PMT) Dönüşüm Dinot: PMT sistemlerinde mikrokanal dinot plakaya (MCP) çarpan pozitif iyon, elektron emisyonuna sebep olmakta ve fosfor ekrana çarpan elektronlar ise foton salınımını indüklemektedir. Sonrasında çoğaltıcı tüpe ulaşan fotonlar amplifikasyon kaskadına dahil olmaktadır. Elektronların fotona çevrilmesinin başlıca avantajı, çoğaltıcı bölümün yüksek vakum altında tutularak kontaminasyondan korunması, böylece detektör ömrünün uzatılmasıdır (148).

Array Detektörleri: Array detektörler çalışma prensibine göre farklı m/z oranına sahip iyonların eş zamanlı tespiti ile pozisyon duyarlı iyon deteksiyonu olarak iki çeşide ayrılmaktadır (149). Farklı m/z oranı tespit eden MS sistemleri EM (nadir izotopların ölçümü) ve FC detektörü (sık izotopların tespiti) kombinasyonuna sahiptir. Pozisyon duyarlı ölçüm sistemleri ise petek görünümünde dizilmiş elektriksel bağlantıya sahip çoklu cam kanallardan oluşmaktadır (5-50 mm çaplı). Burada her bir kanal devamlı dinot EM detektör görevi görerek 10^4 kat amplifikasyon kazancı sağlamaktadır. Sekonder elektronların kanallarda sınırlandırılması, uzaysal konum bilgisi vermekte ve final elektron bulut dağılımı charge-couple device (CCD) gibi kamera sistemleri ile kaydedilebilmektedir. Pozisyon duyarlı detektörler kalitatif analizde yararlı bilgiler sunarken, sık kalibrasyon ihtiyacı gibi faktörler kantitatif analizdeki başarısını düşürmektedir (150).

3.6.1. Kütle spektrometresi kısa tarihçesi

MS tarihçesi, elektron partikülünün kaşifi İngiliz fizikçi Joseph John Thomson' ın katkılarıyla başlamaktadır. Thomson 1897 yılında bazı atomların yük/ kütle oranını belirlemiş, iki yıl sonrasında öğrencisi Francis William Aston ile yeni bir cihaz ile eş zamanlı yük ölçümü gerçekleştirmeyi ve elektron kütlesi ölçümünü başarmıştır. 1919' a gelindiğinde ise Aston, ilk kütle spektrografını üreterek 287 doğal izotopun 212' sine ait kütle ölçümlerini başarıyla gerçekleştirmiştir. 1940' a kadar atomların incelenmesi için kullanılan MS, elektrik mühendisi Alfred Nier tarafından endüstriyelendirilerek geniş bilim komünitesinin kullanımına sunulmuştur. Nier üretimi MS cihazları sayesinde özellikle jeokimya ve biyoloji alanında gelişmeler sağlanmış, uranyum-235 izotopunun nükleer fisyon özelliği belirlenmiş, 1943-45 yılları arasında Manhattan Projesi ile geliştirilen atom bombasında kullanılacak uranyum atomlarının izolasyonu sağlanmıştır. MS teknolojisinin fiziksel çalışma prensipleri ise 1950' lerde yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır. Fred McLafferty yapısı bilinen metabolitlerle MS metodolojisi ve terminolojisi alanında katkı sağlamış (McLafferty rearrangement, (151)) ; Klaus Biemann ise alkaloid ve peptitler üzerine çalışmaları ile ilk kez doğal ürünlerdeki bilinmeyen maddelerin MS ile keşfedilebileceğini göstermiştir. Oral kontraseptiflerin mucidi olarak anılan Carl Djerassi ise Stanford Üniversitesi' nde kurduğu MS laboratuvarında steroid/ terpenoid bileşik analizleri gerçekleştirmiştir. MS' in klinik laboratuvarlarda kullanımı ise 1980 yıllarında başlamıştır. Rutin kullanımın çoğalması özellikle uyuşturucu madde taramalarına olan ihtiyaç ile paralel seyretmiştir. Bu noktada MS teknolojisi (GC-MS) toksikolojik araştırmalarda kullanılan klasik yöntem olan immunoassay' ın sık yanlış pozitif ve düşük spesifiteli sonuçlarının validasyonu için bir gereklilik haline gelmiştir. Aynı yıllarda düşük molekül ağırlıklı organik moleküller başarıyla iyonize edilerek MS analizinde incelenebilirken, protein/ kompleks karbonhidratlar gibi büyük moleküllerin iyonizasyon problemi ortaya çıkmıştır. 1988' de dört farklı bilim adamının katkıları, eş zamanlı geliştirdikleri teknolojiler sayesinde protein iyonizasyon problemini çözmüştür. Yale Üniversitesi' nden John Fenn, günümüzde dahi en sık kullanılan iyonizasyon tekniği olan elektrosprey metodunu (ESI) keşfederek alanda çığır açmıştır (152). Japan bilim adamı Koichi Tanaka (Shimadzu) yumuşak lazer desorpsiyonu ile büyük protein moleküllerini iyonize etmeyi başarmıştır. Böylece iki farklı yumuşak iyonizasyon tekniği geliştirilerek analiz edilen metabolit spektrumu oldukça genişletilmiş (biyolojik makromoleküllerin eklenmesi ile) ve kolaylaştırılmıştır. Eş zamanlı olarak protein iyonizasyonu üzerine çalışan Frankfurt Üniversitesi biyofizik profesörleri Franz Hillenkamp ile Michael Karas, lazer mikroprob kütle analizörü geliştirerek başarılı olmuş ve bu teknolojiyi 'matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu (MALDI)' olarak adlandırmışlardır (153). Bu gelişmeler sayesinde

tüm dünyada klinik/ araştırma laboratuvarların hizmetine sunulan MS, kullanıcı dostu bir teknoloji olarak analitik kimyadaki vazgeçilmez yerini almıştır (154, 155).

2.4.3. Kütle spektrometresi çalışma prensipleri- fizikokimyasal parametreler

Partiküllerin kütle/ yük (m/z) oran değerleri, MS cihazındaki hareketlerini etkileyen ve kimlik tayininde belirlenen asıl parametredir. Farklı kütle analizör tipleri ise (kuadrupol, TOF, ion trap) m/z oranlarını daha önce bahsedilen şekilde farklı fizikokimyasal parametreleri ölçümleyerek belirlemektedir (spesifik radyofrekans tarama/ uçuş zamanı/ iyon tuzaklama).

Likit Kromatografi Analizinde Değerlendirilen Parametreler:

Alıkonma zamanı (t_R): Analitin kolon içerisinde kalma süresini veya enjeksiyon ile kolondan elüsyon arası geçen süreyi ifade etmektedir (156).

Rezolüsyon (R_S): Piklerin ayrılma derecesini ifade eden bir ölçüttür. LC-MS kantitasyon başarısını etkileyen en önemli kromatografi parametresidir (137). İki pik arası taban çizgisi ayrımı rezolüsyon artışı ile iyileşmektedir. “Etkinlik (N)”, “Seçicilik/ Selektivite (α)” ve “Alıkonma/Kapasite Faktörü (k)” parametreleri ile hesaplanmaktadır. Formülasyonda görüleceği şekilde seçicilik (α), rezolüsyonu en çok etkileyen parametredir:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \quad (157)$$

Alıkonma (Kapasite) faktörü (k): Analitin kolon içerisinde tutulma derecesini ifade etmektedir (137). k , molekülün yapısı, sabit ve hareketli fazın cinsi ile değişim gösterirken, mobil fazın akış hızı, kolon ve tubing çapı gibi parametrelerden etkilenmemektedir. Formülasyonu, sabit faz ile etkileşimde harcanan sürenin (analit pikinin alıkonma zamanı) mobil fazda harcanan süreye görece oranlanması ile elde edilmiştir. Burada oranlanan mobil faz üzerinde geçirilen süre, hareketli faz pikinin alıkonma zamanıdır (veya sabit fazla etkileşmeyen bileşiğin kolonu terk etmesi için geçen ölü zaman, t_M). Alıkonma faktörü rezolüsyonu etkileyen en önemli parametrelerin başında gelmektedir (156). Çok hızlı elüsyonlarda alıkonma zamanı değişime açıktır ve koelüsyona uğrayan maddeler sebebiyle izobarik interferans görülmektedir, diğer anlamıyla incelenecek analit piki maskelenebilmektedir. Bu durumda rezolüsyon sıfıra yaklaşmaktadır. Öte yandan geç elüsyonlarda görülen pik genişlemesi ise doğru ve kesin integrasyonda problemlere yol açmaktadır. Kapasite faktörü genellikle $1 < k < 10$ aralığında olmalıdır ve mobil fazın gücü değiştirilerek (zayıf ve kuvvetli solvent kompozisyonu değiştirilerek) kontrol edilmektedir. Rezolüsyon k arttıkça artmakta fakat $k = 10$ üzerine çıktığında bu artış yavaşlayarak oldukça uzun alıkonma süreleri gözlenmektedir.

Selektivite (Ayrım Faktörü, α): İki farklı analit pikinin maksimum noktaları arasındaki zaman/ mesafenin bir ölçüsüdür. İki farklı matriks komponentinin görelî alıkonması veya ayrımı şeklinde düşünölebilmektedir. Kapasite faktörlerinin oranlanması ile hesaplanmaktadır.

Selektivite; kolon paketlemesi (sabit fazla doldurulması), mobil (pH)-sabit faz kompozisyonu ile sıcaklık faktörlerinden etkilenmektedir. $\alpha=1$ değeri, iki pikin eşit alıkonma süresi ve aynı elüsyona sahip olduğu durumu ifade etmektedir (156).

$$\alpha = (k_2)/(k_1)$$

Etkinlik (Kolon Plaka Sayısı, N): Kolondaki partisyona bağı moleköl bandı dağılımının bir ölçütüdür ve farklı kolon etkinliklerini karşılaştırabilmek amacıyla kullanılmaktadır. Etkinlik, alıkonma zamanı ile doğru orantılı iken, pik genişliğı ile ters orantılıdır. Kolonda dar pik elde ediliyorsa etkinlik yüksek; geniş pik elde ediliyor ise etkinlik düşüktür. Diğer bir ifade ile etkinliğı yüksek kolonlar ile, daha yüksek rezolüsyon ve kolay madde ayrımı elde edilebilmektedir. Terorik plaka sayısı olarak da anılan etkinlik bu yönüyle kolon performansını değerdirmek amacıyla en sık kullanılan parametrelerdendir. Etkinlik kolon uzunluğı, partiköl çapı, akış hızı ve ekstra-kolon etkilerinin (tubing) bir fonksiyonu olarak oluşmaktadır. Etkinlik kolon uzunluğı ile doğru orantılı iken partiköl çapı ile ters orantılıdır (137). Küçük partiköl çapına sahip kolonda difüzyon yolu da küçük olmakta, maddenin partiköl içine giriş ve çıkışı hızlı gerçekleşmektedir. Böylece pik difüzyonunun gerçekleştiğı partikölde daha az zaman harcanmaktadır. Fakat çap küçüldüğünde akış hızının etkinlik üzerindeki etkisi azalmaktadır ve basınç artmaktadır. Dolayısı ile etkinliğı artırmak adına partiköl çapı optimal düzeyde tutulmalıdır. Son zamanlarda geliştirilen ‘superficially porous particles (SPP)’ teknolojisi ile ultra-yüksek performanslı likit kromatografi (UHPLC) sistemlerinde görölen yüksek arka plan basıncı olmaksızın düşük difüzyon yolu ve sonuçta yüksek etkinlik elde edilmektedir. Öte yandan akış hızı ile etkinlik arasındaki bağıntı ise, *Van Deemter eşitliğı* ile ortaya konmuştur (158). Bu eşitlik ile elde edilen akış hızı- etkinlik grafiklerinde 2 μ m çap altı boyutundaki partiköllerin kullanıldığı UHPLC sistemlerindeki etkinlik ile büyük (2.7 μ m) SPP partiköllerin tercih edildiğı sistemlerdeki etkinlik görselleştirilebilmektedir (137).

$$N = 16 \times \left(\frac{t \text{ (alıkonma zamanı)}}{W \text{ (taban pik genişliğı)}} \right)^2$$

2.5. Hematolojik Maligniteler ve Metabolomik Araştırmalar

2.5.1. NMR tabanlı metabolomik çalışmaları

Lösemi/ lenfoma grubu hastalıklarda 2000’li yıllardan itibaren hız kazanan NMR tabanlı çalışmalar, çeşitli diagnostik ve prognostik biyobelirteçler tanımlamıştır. Hücre kültürü çalışmaları ile hücre düzeyindeki moleküler değişimler incelenirken (47, 48), artan sayıda araştırmada vücut sıvılarında NMR analizleri gerçekleştirmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında çeşitli metabolitlerin kanser alt tipleriyle ve sitogenetik varyasyonlarla ilişkisi ortaya konmuştur (50-52). Örneğin leptomeningeal metastatik B-hücreli NHL’ya sahip bireylerin beyin-omurilik sıvısı ve kan örneklerinde gerçekleştirilen kalitatif NMR çalışmasında, metastatik olmayan tümöre sahip bireylere göre glisin, alanin, pirüvat, karnitin, asetilkarnitin ve fenilalanin düzeyleri farklı bulunarak grup ayırıcı metabolitler olarak tanımlanmıştır ve NMR’ın invaziv olmayan bir metot olarak tanı ve tedaviye cevapta komplementer kullanımı önerilmiştir (53). 183 AML hastası ve 232 kontrol bireyi içeren bir çalışmada, serum NMR metabonom analizi ile glikoliz, glukoneogenez, Krebs döngüsü, protein ve lipoprotein sentezi, yağ asidi metabolizmasına ait yollarda hastaları kontrollerden ayıran ve aynı zamanda hastalığın sitogenetik riskine göre değişen önemli metabolitler raporlanmıştır (54). Lenfoma hastalarını (HL, NHL) içeren bir kohort analizde ise, otolog hematopoetik hücre transplantasyonu öncesi periferik kök hücrelerde NMR analizi gerçekleştirilmiş, tedavi sonrası terapiye bağlı AML (t-AML) gelişen hastalardaki mitokondriyal disfonksiyonun NMR analizi ile kestirilebildiği gösterilmiştir (55). Özellikle alanin-aspartat-fenilalanin metabolizması, Krebs döngüsü, aminoasit-t-RNA sentezi gibi yollar ile ilişkili metabolitler anlamlı bulunmuştur. Bu şekilde çoğaltılabilecek örnekler, NMR ile eş zamanlı ölçümlenen yüzlerce metabolitin yolak analizi ile biyobelirteç belirlemede ve erken tanıda ne şekilde yol gösterici olacağı hakkında fikir vermektedir. Çalışmamız ile kohort tipi açısından benzerlik gösteren bir 2018 araştırmasında, AML, NHL, KLL ve kontrol bireylerde kalitatif serum NMR analizi gerçekleştirilmiş ve önemli bulunan grup ayırıcı metabolitlerle kompleks hastalık alt modelleri oluşturulmuştur (56).

2.5.2. MS tabanlı metabolomik çalışmalar

Lösemi/ lenfoma grubu hastalıklarda MS tabanlı çalışmalar, sıklıkla antilösemik ajanların artçı metabolitlerinin farmakokinetik takibini içermektedir (60-63). Ayrıca 2021 yılına ait bir derleme lösemi alt tiplerinin sınıflandırmasında, biyobelirteç ve hücre yüzey belirteçleri tanımlamada, minimal rezidü hastalık takibinde, proteomik ekspresyon değişimleri tespitinde MS’in konvansiyonel tanısal testlere yardımcı analiz tekniği olarak kullanımını önermiştir

(64). Ayrıca merkezi sinir sistemi lenfomalarında ilgili protein biyobelirteçler mutasyonlara bağlı aktive veya deaktive olan proteinlerin varlığını tespit edebilen bir MS çalışması ile tanımlanabilmiştir (65).

Tablo 2.10 NHL, KLL ve AML hastalarına ait serum, plazma, lökosit örneklerinde son 10 yılda gerçekleştirilen metabolomiks çalışmaları (NMR, GC, LCMS).

İncelenen Matriks	Etkilenen Endojen Analitler	Deneysel Tasarım	Analitik Faktörler	Veri Analizi	Referans
NHL					
Plazma	Glukoz, aspartat, metiyonin, sistein, malat, 2-OH-2-metilbütirik asit	Kalitatif veri eldesi n=43	GC-MS	GraphPad Prism 6.07, SIMCA (v.14, Umetrics), MetaboAnalyst	Fei, Fei, et al., 2022
Serum	Valin, heksadekenoik asit, piroglutamik asit, 1-pirolin-3-OH-5-karboksilik asit, galaktoz	Kalitatif veri eldesi n=80	GC-MS	R	Mi, Mi, et al, 2021
Plazma	Hipoksantin, elaidik asit, 2-aminoadipik asit, 2-aminoheptandioik asit, eritritol, treitol	Kalitatif veri eldesi n=50	GC-MS	MetaboAnalyst 4.0	Barberini, Luigi, et al., 2019
Serum	Kreatin, sarkozin, asetat	Kalitatif veri eldesi n= 26	¹ H NMR	SIMCA (Umetrics), Matlab (Mathworks, Inc.), MetaboAnalyst 3.0, STATISTIC A 12 (Statsoft Inc.)	Wojtowicz, Wojciech et al., 2018
Plazma	NADH, fosfotidilkolin, glutatyon	Kalitatif veri eldesi n= 2	LC-QTOFMS	Limma	Medriano, Carl Angelo D., et al., 2017
Serum	Lizin, arjinin, 2-OH-bütirat (oksidatif stres), aspartat,	Kalitatif veri eldesi	¹ H NMR Carr-Purcell-	MATLAB (MathWorks)	Stenson, Martin, et al., 2016

	valin, ornitin, piroglutamat	n=87	Meiboom-Gill (CPMG)	, SIMCA (v. 14, Umetrics)	
Serum	Kolin, araşidonik asit, LizoFC (17:0), palmitik asit, koproporfin, benzenbütanoik asit, β -OH-bütirik asit, D-2-OH-oktanoik asit, pirüvik asit	Kantitatif veriler n= 54	UPLC-QTOFMS ve GC-TOFMS	SIMCA-P (v.12.0, Umetrics), SPSS 19.0 (IBM)	Zhou, Junyi, et al., 2014
KLL					
Plazma	2-aminoadipik asit, 2-aminoheptandioik asit, 4-OH-prolin, glukohptonik asit, eritritol, treitol	Kalitativ veriler n=6	GC-MS	MetaboAnalyst 4.0	Barberini, Luigi, et al., 2019
PBMC	Alanin, glutamin, glutamik asit, serotonin, fosfotidilkolin, sfingomyelin	Kantitatif veriler n=4	QTRAP LC-MS/MS	oPOSSUM	Mayer, Rupert L., et al., 2018
Serum	Kolin, alanin, prolin	Kalitativ veriler n= 21	^1H NMR	SIMCA (Umetrics), Matlab (Mathworks, Inc.), MetaboAnalyst 3.0, STATISTIC A 12 (Statsoft Inc.)	Wojtowicz, Wojciech et al., 2018
Serum	Dodekanamit, linoleamit, oleamit, lökotrien B4, eikazopentanoik asit, dokosaheksaenoik asit, palmitik asit, açilkarnitin, hekzanoilkarnitin, ornitin, piperidin, lizofosfolipitler	Kantitatif veriler n= 93	LC-QTOF-MS	MATLAB 7.10 R2010a (MathWorks Inc.)	Piszczyński, Jarosław, et al., 2016

Serum	Lökotrien B4, heksakozandioik asit, açilkarnitinler, eikazopentanoik asit, lizofosfotidilkolinler, monoaçilgliseroller, aminokaproik asit, fenilasetilglutamin	Kalitatif veriler n= 8	LC-QTOF-MS	SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics)	Piszczyński, Jarosław, et al., 2013
AML					
Serum	Fenilalanin, glutamat, format	Kalitatif veriler n= 38	¹ H NMR	SIMCA (Umetrics), Matlab (Mathworks, Inc.), MetaboAnalyst 3.0, STATISTICA 12 (Statsoft Inc.)	Wojtowicz, Wojciech et al., 2018
Serum	İzositrat, süksinat, 3-OH-bütirat, ürat, sitrat, 2-OH-glutarat, süksinat, fumarat, malat; 3-fosfoglisarat, fosfoenolpirüvat, piroglutamat	Kantitatif veriler n=20	LC-MS/MS		Hlavackova, Alzbeta, et al., 2018
Serum	Pantotenik asit, alanin, aspartat, glutamat, arjinin, prolin	Kalitatif veriler Organik Asit ve açilkarnitin kantitasyonu n=94	LC-MS	MetaboAnalyst, R	Stockard, Bradley, et al., 2018
Serum	Laktat, fenilalanin, valin, alanin, lizin/arjinin, glutamin, tirozin, treonin, histidin, asetat, sitrat, format, adipik asit, glukoz, 1-metil-histidin, LDL, VLDL	Kalitatif veriler n=32	¹ H NMR Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)	SIMCA-P (v.14, Umetrics)	Musharraf, Syed Ghulam, et al., 2016

Serum	1-Iodo-dodekan, 2,3-dihidroksipropil palmitat, palmitik asit, stearik asit, araşidik asit, oleik asit, trietanolamin	Kalitatif veri eldesi n=64	GC-MS	Mass Profiler Professional (MPP)	Musharraf, Syed Ghulam, et al., 2017
Serum	Laktat, 2-okzoglutarat, pirüvat, 2-OH-glutarat, gliserol-3-fosfat, sitrat	Kalitatif veri eldesi n=400	GC-TOFMS	SIMCA-P+ (v.11.0, Umetrics), R	Chen, Wen-Lian, et al., 2014
Serum	Fenilalanin, tirozin, <i>N</i> -açil-glikoproteinler (NAG), sitrat, mannoz ve glukoz, kolin-gliserofosfokolin (GPC)-fosfokolin (PC), açilkarnitin, doymamış yağ asitleri, HDL, valin, izolösin, lösin, lizin, arjinin, glutamin, alanin, histidin, laktat	Kantitatif veri eldesi n=183	¹ H NMR Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)	SIMCA-P+ (V12.0, Umetrics)	Wang, Yihuang, et al., 2013
Plazma	Araşidonik asit, PGF2 α , koenzim Q10, total kolesterol, yağ asitleri, glisero- ve sfingolipitler	Kantitatif veri eldesi (GC-MS/FLC-QqLIT-MS) Kalitatif veri eldesi (UPLC-QTOFMS) n=20	GC-MS, UPLC-ESI-QTOFMS, FLC-QqLIT-MS	GraphPad Prism 6.07, SIMCA (v.14, Umetrics)	Pabst, Thomas, et al., 2017
Lökosit	Palmitoleik asit, glikolat, dipeptit (L-Lösil-L-prolin), araşidonik asit, sitramalat, benzoat, glikodeoksikolik asit, süksinat, glukoz, gliseraldehit, lösin, L-karnitin, L-metiyonin, 4-okzoprolin, LL-2,6-diaminoheptandioat, L-açilkarnitin, nükleozitler	n=16 (serum eşleştirilmiş)	UHPLC-MS	MetaboAnalyst 3.0	Stockard, Bradley, et al., 2018

Kemik İliği Aspiratı	Seramik sfingolipitler	ve	‘Shotgun’ lipidomiks n=16	LC-MS/MS (TriVersa NanoMate ESI kaynağı)	GraphPad Prism 6.0, SIMCA (v.14, Umetrics)	Stefanko, Adam, et al., 2017
-----------------------------	------------------------	----	------------------------------	--	--	------------------------------



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onamı

Tüm deneyler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde 27.02.2023 – 05.06.2023 tarihleri arasında yürütülmüştür. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. ve Erişkin Onkoloji-Hematoloji A.B.D. ile çok disiplinli çalışma koordinasyonu içerisinde yürütülen çalışma, 30.11.2021 tarihli 2021/391 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiş, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 20211203) ve TÜBİTAK 1002 - A Hızlı Destek Modülü (Proje No: 122S744, 01/09/2022) tarafından desteklenmiştir.

3.2. Çalışma Dizaynı

3.2.1. Deney Tasarımı (Design of Experiments) Yaklaşımı

Deney tasarımı (DoE), incelenecek sonuç (response) ile ilişkili faktörlerin sistematik varyasyonuna izin vererek bunları eş zamanlı ele alan ve bu faktörlerin sonuca kombine etkilerini, birbirleriyle etkileşimini ortaya koymak veya sonuç optimizasyonu yapmak amaçlı uygulanan algoritmik model yaklaşımlarını tariflemektedir (159). Bir DoE çalışmasından elde edilen veriler, faktörler ve ölçülen yanıtlar arasındaki ilişkiyi en iyi şekilde tanımlayan matematiksel fonksiyonlar oluşturmak için kullanılmaktadır (160). Bu matematiksel ilişki jenerasyonunda kullanılan veriler deneme yanılma veya faktörlerin tek tek incelenmesi ile elde

edilmektedir. DoE, sebep-sonuç ilişkisini inceleyen ampirik yarı-deneyssel (quasi-experiments) düzenlerde ise (güncel çalışmada olduğu gibi), doğal kondisyonların değişkenlik gösterdiği yani varyans faktörü olarak ele alındığı gözlemsel metodolojiye işaret etmektedir. DoE yaklaşımı ilk defa, düşük örnek sayılı gerçek veri analizi üzerine çalışan ünlü biyoistatistikçi Ronald Fisher tarafından ‘*The Arrangement of Field Experiments* (1926)’ adlı kitabında ortaya konmuştur (161, 162). Fisher, bu metodolojinin dört elemanını sırasıyla faktöryel prensibi, randomizasyon, replikasyon ve bloklama olarak tarif etmiştir (160). Bu prensipler ışığında geçmişte manuel hesaplamalar (fonksiyonlar) kullanılırken günümüzde kompütasyonel tabanlı deney jenerasyonları ile daha verimli ve etkili deneysel tasarım modelleri oluşturulabilmektedir. Taguchi ve Shainin gibi bilim adamlarının matematiksel model geliştirimleriyle günümüzde çok farklı alanlarda uygulanabilen ve bütüncül bir bilimsel metodoloji haline gelen DoE (163), öncelikle farmasötik ürün ve reaksiyon optimizasyonu ile malzeme mühendisliği gibi endüstriyel alanlarda kendine yer edinmiştir (164, 165).

DoE yönteminin tıbbi alandaki uygulamaları ise incelenecek hastalık veya duruma etkiyen parametrelerin (variables) sistematik olarak ortaya konması ile hem değişkenler arası ilişkinin hem de hastalık cevabına etkisinin net şekilde ortaya çıkarılmasını içermektedir (166, 167). Birçok tıbbi kondisyonun multifaktöryel etyolojisi göz önüne alınırsa, DoE yaklaşımının özellikle vaka çalışmalarında baskın etkileri ortaya çıkarmada ve bireysel heterojeniteyi aydınlatmada sistematik ve etkili bir deney akışı sağlayacağı aşikardır. Bu nedenle DoE, son yıllarda tıp alanı uygulamalarında da artan trend halinde metodolojik bir gereksinim haline gelmiştir (159).

3.2.2. DoE Yaklaşımı ile Çalışma Değişkenlerinin Belirlenmesi ve Genel Akış

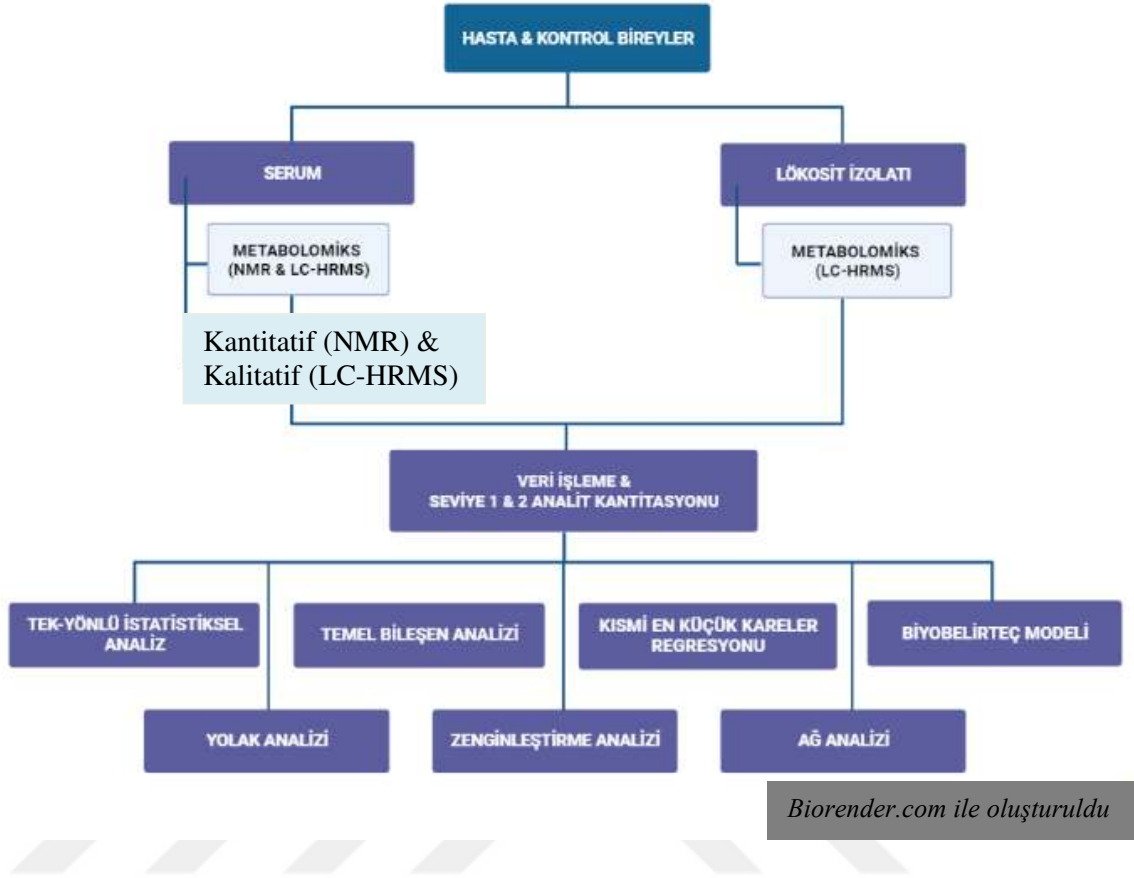
Güncel çalışmada DoE yaklaşımına uygun olarak tasarlanan kavramsal öğeler: -*Bağımsız değişkenler*: İncelenecek örnek tipi (serum ile tam kandan elde edilecek lökosit izolatu) seçimi, benzer çalışmalar (168) ve pilot denemelerden yola çıkılarak en az örneklem sayısının belirlenmesi; lökosit izolasyon protokolü (169) ve bu örneklerde total protein miktarı belirlenmesinde kullanılacak metot seçimi (170), serum (171) ile lökosit izolatu (172) örneklerinde uygulanacak 1D kantitatif NMR metodu (173) ile 2D NMR metot seçimi (174, 175), çevrimiçi veri tabanı

COLMARm (176) kullanılarak analit tespiti- validasyonu, kalitatif (untargeted) LC-MS deneylerinin gerçekleştirilmesi (177), veri analizinde tercih edilen tek (SPSS) ve çok-değişkenli istatistiksel metot ile analizin gerçekleştirildiği yazılımsal platformların seçimi (Chenomx NMR Suite, MZmine 3, MetaboAnalyst 5.0, TidyMass).

-Bağımlı değişkenler: Hasta/ kontrol bireylere ait serum ile lökosit izolatu örneklerinde belirlenecek analitler ve seviyeleri, analit intensiteleri arası korelasyon verisi, spesifik analitlerin karyotipik alt grupları ayırma gücüne ait sonuçlar, analit intensiteleri ile bireylerin demografik veya farklı tam kan sayımı parametreleri (nötrofil/ lenfosit oranı, blast oranı vb.) arası korelasyon verisi, çok değişkenli istatistiksel analizler ve analitlerle ilişkili yolak analizi sonuçları, gruplar arası diferansiyel modelleme (regresyon analizi) sonuçları, network/ temel bileşenler analizi ve biyobelirteç tanımlama analizlerine ait sonuçlar.

-Kontrol değişkenler: Hasta ve kontrol bireylerin farklı bir malignite/ eşlik eden metabolik hastalık tanısı almamış olması, tüm örneklerin aynı şekilde alınması, aynı ortamda saklanması, aynı koşullarda tek kişi tarafından NMR ve MS analizleri için hazırlanması, NMR analizlerinin tek seferde ve MS analizlerinin ardışık 3 gün içerisinde gerçekleştirilmesi, LC-MS deneylerinde kalite kontrol materyalleri kullanarak ‘deney-içi (İngilizce: intra-batch) ve deneyler-arası (inter-batch) kesinlik (precision)’ değerlerinin belirlenmesi (177), lökosit izolatlarında homojenizasyon sonrası bikinkoninik asit (BCA) analizi ile total protein ölçümü ve metabolomiks verisinin normalizasyonu (178) olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmaya ait genel akış.



3.3. Örneklem Büyüklüğü

Metabolik fenotipleme yaklaşımlarında en az 0.8 güç düzeyinde örneklem ve etki büyüklüğü tahmini için pilot çalışmalar (117) ile klasik güç analizine ek algoritmalar yardımıyla öncelikli bir değerlendirme gerçekleştirilmelidir (168, 179). Seçilen HM türlerini inceleyen benzer çalışmalardaki (56) ve pilot denemelerde bulunan anlamlı sonuçlar göz önüne alındığında çalışma örneklemini, her bir grupta 30’ar birey olacak şekilde belirlenmiştir. Numune hazırlığı ve analitik süreçte yaşanan örnek kaybı vb. deneysel faktörlerden ötürü nihai örneklem büyüklüğü 30 KLL, 27 NHL, 29 AML ve 30 kontrol bireyi kapsamıştır.

3.4. Numune Eldesi

Bezmialem Vakıf Üniversitesi yetişkin hematoloji poliklinik/ servisinden, flow sitometrik analiz istemiyle Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Rutin Tıbbi Biyokimya Laboratuvarına refere edilen hasta serumları, sarı kapaklı jelli tüplere (BD Vacutainer®, 6 cc) alındıktan sonra 3500 rpm, 10 dakika santrifüj sonrası alikotlanarak saklanmış (-80 °C, en az iki ependorf olarak); mor kapaklı K3 EDTA (BD Vacutainer®, 3 cc) tüpe alınan tam kan örneklerinde ise hemogram ile hücre sayımı tamamlandıktan sonra immünfenotipleme sonrası lökosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (169). İmmünfenotipleme, BD FACSCanto™ Clinical Flow Cytometry System cihazında yapılmıştır. NMR ve LC-MS analizleri, muhafaza edilen örneklerden yalnızca KLL, NHL ve AML tanılı raporlanan numunelerde ve kontrol bireylere ait örneklerde gerçekleştirilmiştir.

Lökosit İzolasyon Protokolü: Güncel çalışmada HR-LCMS teknolojisinden yararlanılarak, lösemi ve lenfoma grubu hastalarda patogenetik değişimleri ortaya koymak amacıyla kanserin köken aldığı lökosit hücreleri izole edilmiş ve bu hücrelerde metabolom analizi gerçekleştirilmiştir. Lökosit eldesinde eritrosit lizis metodu (180) elde edilen izolatların tüm hücre serilerini içermesi, hızlı ve yüksek verimlilikte hücre eldesi gibi yoğunluk gradyan ayırma göre üstünlükleri ile çalışmada tercih edilen yöntem olmuştur. Lizis yöntemi temelinde ozmotik şok ile eritrositlere ait hücre membran ve kalıntıların uzaklaştırılarak tüm lökositlerin %60'ını oluşturan granülositleri de içerecek şekilde yüksek çıktılı hücre popülasyonu izole edilmesi yer almaktadır. Bu amaçla güncel çalışmada (169):

- Periferik tam kan örneğinin 300 g, 5 dakika santrifüj edilerek plazma kısmının atılması,
- 500 µl kan örneğinin 5 ml eritrosit lizis tamponu (BD FACS Lysing solution 10X Concentrate) ile 1:10 (v/v) oranında seyreltilmesi,
- 10 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon,
- 300 g, 5 dakika santrifüj sonrasında süpernatantın atılması,
- Lizis reaktifi kalıntılarını uzaklaştırmak üzere pelletin, 5 ml hücre yıkama solüsyonu eklenerek (BD Biosciences X5L Cell Wash) 300 g, 5 dakika santrifüj basamağının iki kez tekrarlanacak şekilde yıkanması,

-Elde edilen pelletteki hücrelerin mm³ başına minimum 1.000.000 hücre içermesi koşuluyla (Thoma lamı ile sayılarak) 2 ml'lik eppendorflara aktarılması, ileri analizler için -80°'ye kaldırılması aşamaları uygulanmıştır.

Lökosit İzolat Numunelerinin Homojenizasyonu: HR-LCMS analizi öncesinde lökosit izolatları oda sıcaklığında çözöldükten sonra homojenizasyon amacıyla ilk olarak;

-0.5 mm zirkonyum bilye ile 30 frekansta (1/sn) 10 dk homojenizasyon (Retsch Mixer Mill MM400),

-1500 g'de 30 dk santrifüj,

-Üst fazın filtreden geçirilerek temiz bir eppendorfa alınması aşamalarından geçirilmiştir (181).

Lökosit İzolatlarında Total Protein Ölçümü: Eppendorflara alınan her bir izolat, analit normalizasyonunda (178) kullanmak üzere total protein konsantrasyonu açısından Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) metodu ile araştırılmıştır. Pulverize edilen lökosit izolatlarında total mikroprotein değerleri, kit protokolünde belirtilen şekilde her bir örnekten 25 µL kullanılarak mikropilaka okuyucu üzerinde 562 nm'de alınan absorbans değerleri ile elde edilmiştir (Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader, Thermo Scientific).

3.5. Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Dahil edilme kriterleri: İlk defa KLL, NHL ve AML tanısı alan hastalardan yalnızca hastalığın aktif evresinde ve kemoterapi tedavisi almamış olanlara ait örnekler toplanmıştır. Kontrol örnekleri ise hasta gruplarıyla cinsiyet, yaş (40-65 yaş), BMI açısından eşleşen, ek hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerden tam kan ve serum örneklerinde rutin istemleri çalışıldıktan sonra tıbbi atık olarak imha edilecek tüplerden (serum ve lökosit izolatı olarak iki şekilde) elde edilmiştir.

Dışlanma kriterleri: İlaç-sigara kullanımı, sekonder tümör varlığı, hipertansiyon, diyabet, malnutrisyon, kronik enflamatuvar hastalık varlığı.

3.6. Gereç

3.6.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz	Marka
Otomatik pipetler	CAPP, Almanya; Eppendorf, Almanya.
Distile su cihazı	Millipore Co., ABD
Ultra saf su cihazı	Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Hassas terazi	Daihan, Kore
Santrifüj	Hermle, Almanya; Beckman Coulter, ABD
Vorteks	Stuart, İngiltere
Buzdolabı (+4°C)	Beko, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Türkiye; Haier, Çin
pH metre	Milwaukee, Mi 151, Rocky Mount, ABD
Manyetik ısıtıcı karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Otomatize klinik kimya analizörü	Siemens Atellica® CH 930 analyzer, Almanya
UV-vis spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD; Biochrom, ABD
Homojenizatör	Retsch, Almanya
700 MHz NMR	Bruker, Almanya
Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™	Thermo Fisher, Almanya

3.6.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.3 ve HR-LCMS analizlerinde kullanılan internal standart içeriği (AA-IS Mix, Cambridge Isotope Laboratories) Tablo 3.4 ‘te belirtilmiştir.

Tablo 3.3 Kullanılan kimyasallar ve markaları.

Kimyasal	Marka
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum azid	Sigma-Aldrich, Almanya

Tablo 3.4. Hidrofilik amino asit internal standart karışımında yer alan bileşikler ve konsantrasyonları (Cambridge Isotope Laboratories).

Bileşik	İşaret & Zenginleştirme	Kons. (ug/mL)
L-lösin	D10, 98%	2.24

L-glutamik asit	2,3,3,4,4-D5, 98%	2.08
L-alanin	D7, 98%	1.6
L-valin	D8, 98%	1.44
L-izolösin	D10, 98%	1.28
L-fenilalanin	D8, 98%	1.28
L-aspartik asit	2,3,3-D3, 98%	0.96
Glisin	D5, 98%	0.96
L-treonin	D5, 98%	0.8
L-prolin	D7, 97-98%	0.64
L-tirozin	D7, 98%	0.64
L-lizin:2HCL	D9, 98%	0.48
L-arjinin:HCL	D7, 98%	0.48
L-serin	3,3-D2, 98%	0.48
L-histidin:HCL:H2O	Ring-2,4-D2; Alpha, Beta, BetaD3, 98%	0.32
Rezerpin		4

3.7. Yöntem

3.7.1. Bir boyutlu (1D) NMR deneyleri

1 boyutlu NMR deneylerinde sinyal, kimyasal kayma değeri ile tek bir parametre fonksiyonu olarak sunulmaktadır. Farklı kimyasal çevrelerde konumlanmış H atomlarına ait kimyasal kayma (δ), çiftlenim sabiti, eşleşme paternleri ile ilgili edinilen bilgiler, kompleks karışımlardaki moleküllerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (125). 1D NMR deneyleri yüksek tekrarlanabilirlik ve doğruluk seviyeleri ile özellikle kantitasyonda tercih edilmekte (175, 182) ve MS analizlerinde sık yaşanan analite özgü metot seçimi ile internal standart gereksinimi veya tekrarlı analizlerde grup içi-gruplar arası varyasyon (intra-interbatch) gibi problemlerin çözümünde fizibilite açısından kolaylık sağlamaktadır (183). Ayrıca NMR analizlerinde önemli bir dezavantaj olarak gözlenen göreceli düşük sensitivite de son yıllarda geliştirilen hiperpolarizasyon teknikleriyle aşılarak (dinamik nükleer polarizasyon, DNP), bu teknolojinin son yıllarda metabolomikte artan sıklıkta uygulanması sağlanmıştır (184). Bahsedilen ileri metotların kullanımı uzman

tecrübesi ve pahalı ekipman desteği gerektiriyor olsa da, yazılım geliştiricilerin bu teknolojileri kolaylaştırılarak daha geniş komünite ve laboratuvarlara adapte etmek adına çalıştıkları ifade edilmektedir (184). Örneğin gelişmiş altyapı gerektiren DNP metoduna alternatif olarak başarılı hiperpolarizasyon sağlayan “signal amplification by reversible exchange” (SABRE, (185)) ile para-hidrojen kullanımı (186) gibi düşük maliyetli hiperpolarizasyon teknikleri geliştirilerek araştırmacıların kullanımına sunulmuştur.

3.7.1.1. Bir boyutlu (1D) kantitatif ^1H NMR deney tasarımı

NMR ile analit kantitasyonu, yalnızca serum örneklerinde ve bu tür matrislerde su sinyalinin baskılamada en sık tercih edilen 1D Nuclear Overhauser etkisi spektrometresi (NOESY) sekansı ile (171, 173, 187) kantitatif (qNMR) metot şeklinde gerçekleştirilmiştir. 1D NOESY NMR deneyleri, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) NMR Laboratuvarı bünyesindeki Bruker Avance III 700 MHz cihazında (298 Kelvin) ve kriyojenik prob (QCI CryoProbe, Bruker) ucu kullanılarak uygulanmıştır.

Serum numune hazırlığında literatürde yer alan çalışmalar modifiye edilerek (171, 188) aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

Serum numunelerinin hazırlanması: Analit konsantrasyonları, her bir numune içerisine internal standart olarak eklenen DSS molekülüne göre belirlenmiştir (189).

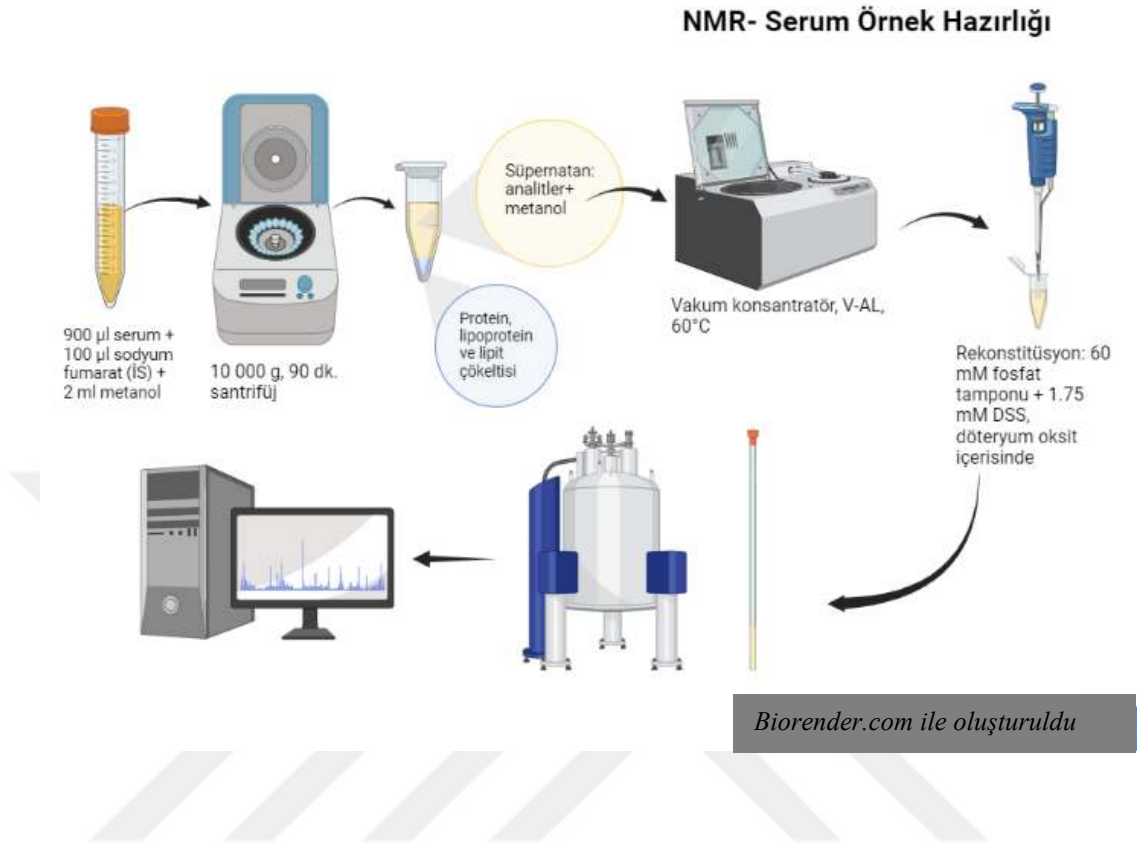
Örnek hazırlama aşamalarında sırasıyla;

-15 ml’lik falkon tüplerde 1 ml serum içerisine 2 ml soğuk metanol eklenerek vortekslenmiş ve 10 000 g’de 1,5 saat santrifüj edilmiş,

-Süpernatant filtrelenerek 2 ayrı eppendorfa aktarılmış ve vakum konsantratörde (Eppendorf™ Concentrator Plus) V-AL modunda 60°C’de kurutulmuş,

-Elde edilen pelete toplamda 600 µL 60 mM fosfat tamponu ve 100 µL döteryum oksit içerisinde hazırlanmış 1.75 mM sodyum trimetilsililpropansülfonat (DSS, %0.2 sodyum azit) eklenerek vortekslenmiş, elde edilen karışım son hacim 700 µL olacak şekilde 5-mm (Medium Wall Precision NMR Sample Tube, Wilmad) NMR tüplerine aktarılmıştır (Şekil 3.1).

Şekil 3.1 NMR analizi gerçekleştirilen serum örneklerine ait örnek hazırlama aşamaları.



3.7.1.2. Bir boyutlu (1D) NMR deney parametreleri

NMR spektrum eldesinde ilgili cihaz parametreleri: Tüm parametrelere ait optimizasyon analizleri Bruker Avance III 700 MHz cihazında önceki bir çalışmada tanıtilan metodun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (187). Seçilen puls programı Bruker terminolojisi ile ifade edildiğinde 'noesygppr1d' olmak üzere;

Tablo 3.5 1D NMR deneylerinde uygulanan cihaz parametreleri.

1D Cihaz Parametreleri	
Kazanım zamanı (acquisition time, AQ)	4 sn
Spektral genişlik (sweep width, SW)	12 ppm
Transient sayısı (number of scans, NS)	128
Yapay tarama (Dummy scans, DS)	8
Su sinyali	4,69 ppm
Gevşeme gecikmesi (recycle delay, d1)	3 sn
Alıcı kazancı (receiver gain, RG)	101
Nokta sayısı (number of points, NP)	64K
Karıştırma süresi (mixing time, MT)	0,2 sn
FID boyutu (time-domain, TD)	2 sn

3.7.1.3. Spektral işleme

Veri işlenmesi otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Fourier transformasyonu, baseline düzeltme ve pik hizalama gibi ön işlemler TopSpin (v. 4.1.3.) ve Chenomx NMR Suite (v.9.02) programında gerçekleştirilmiştir. Çizgi enlenmesi (line broadening) 0.3 Hz ve zero-filling faktörü 2 (132K veri noktası oluşturularak) olarak ayarlanmıştır. Otomatik fazlama yalnızca zero-order faz düzeltme ile gerçekleştirilmiştir. Analitlere ait kimyasal kayma frekans değerleri DSS ile (0.0 ppm) kalibre edilmiştir. Veri işlenimi sonrası *kalite kontrol* kriterleri, bu amaçla hazırlanan serum havuzu örneklerine ait spektrumların incelenmesi yoluyla karşılanmıştır.

3.7.1.4. Deney kalite kontrolü

Çalışmada internal standart olarak kullanılan sodyum trimetilsililpropansülfonat (DSS)'ın plazma/ serum gibi matrikslerde endojen proteinlere bağlanarak kimyasal kayma referans sinyalinin genişlemesine yol açtığı bilinmektedir (190). Bu sebeple üst üste binen rezonans sinyalleri özellikle küçük molekül analizinde sorun oluşturabilmektedir. Bahsedilen problemin varlığını araştırmak adına spektrumun

ilgili bölgesinde H1 protonu ile 5.23 ppm’de dublet rezonant sinyal gösteren küçük organik moleküllerden α -glukoz, manyetik alan homojenitesi ve kalite monitorizasyonunda kullanılmaktadır (190). Güncel çalışmada analiz edilen serum matrislerinde ölçülebilir düzeyde bulunan α -glukoza ait sinyal, deney kalite kontrolü olarak incelenmiştir. Manyetik alan homojenite tespitinde bir diğer parametre olarak, serum örneklerinde 4.13 ppm’de dördüz (quadruplet) yarıklanma paterni gösteren laktata ait santral piklerin spektral çizgi genişliği analiz edilmiştir. 0.3 Hz çizgi enlenmesi (line broadening) uygulaması sonrası santral piklerin simetrik olması ve çizgi yarı genişliklerinin 1.15 Hz’ten büyük olmaması gerekmektedir (187). Ayrıca kalite kontrol serum havuzlarına ait spektrumlarda, rezidüel su pikinin 4.6-4.8 ppm arası bölge harici taban hattını etkilemediği gözlenmiştir. Ortaya konan deney akışına göre serum örneklerinden elde edilen NMR spektrumlarında, düşük molekül ağırlıklı polar bileşikler (amino asit, organik asit ve ara metabolitler) başta olmak üzere, nötral ve polar lipidlerin kantitasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.

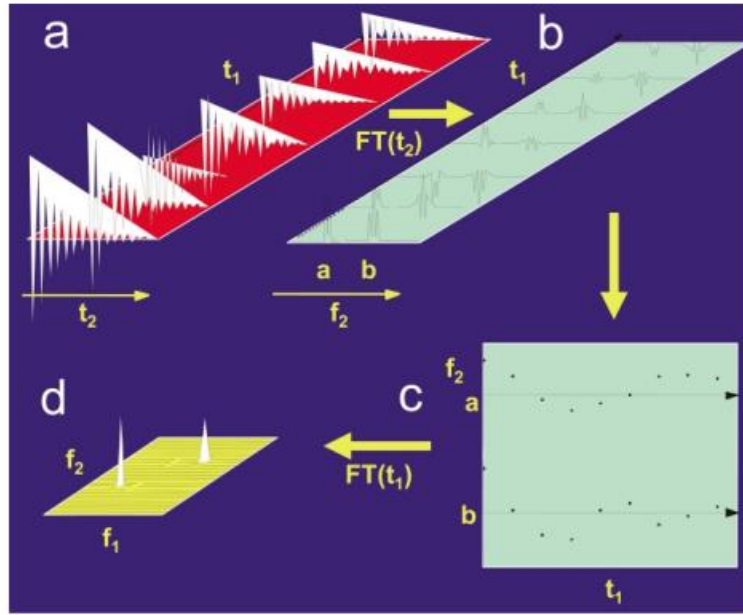
3.6.1. İki boyutlu (2D) NMR deneyleri

Geleneksel 1D NMR küçük moleküllerin fonksiyonel grupları ile saf analit konsantrasyonu belirlemede başarılı olsa da, büyük yapıli bileşikler içeren kompleks karışımlarda üst üste binen pik (overlapping) problemi oldukça sık gözlemlenmektedir (191). Ayrıca 1D spektrumlarında gözlenen dar kimyasal kayma penceresi (veya spektral genişlik) de üst üste binen piklere sebep olan bir başka faktördür (192). Bu problemi aşmak adına 2D NMR ile, rezonant piklerin spektrumun ek boyutunda dağılımı sağlanmakta ve daha başarılı diskriminasyon elde edilmektedir. 2D NMR tekniğinde analit dekonvolüsyonu daha iyi gerçekleştirilse de, kompütasyonel analiz ile deney sürelerine ait uzun zaman gereksinimi önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (175). İlk defa 1971 yılında Jean Jeener tarafından ortaya atılan 2D NMR konsepti, zamanla alana kazandırılan yeni tekniklerle gelişerek günümüzde özellikle 3 boyutlu yapı analizi ve analit kantitasyonu amacıyla tercih edilmektedir.

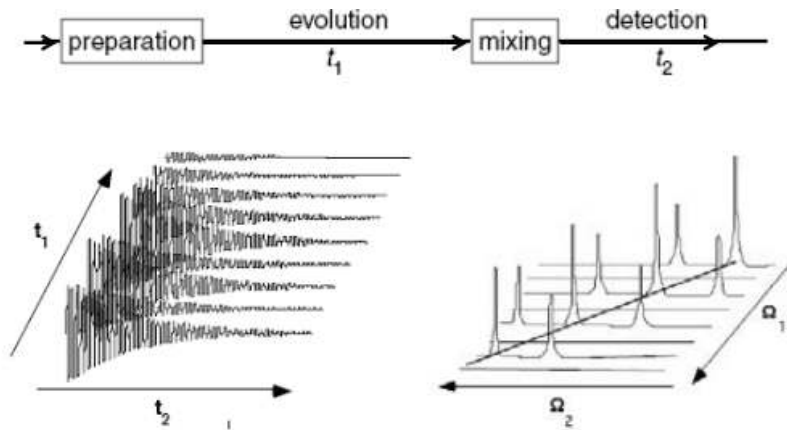
1 boyutlu deneylerde data eldesi puls sekansından hemen sonra gerçekleştirilirken, 2 boyutlu deneylerde eksitasyon öncesinde evolüsyon ve karıştırma (‘mixing’) şeklinde ara basamaklar mevcuttur. 2D NMR deneylerinde tipik puls sekansı, puls- t_1

(evolüsyon zamanı)- puls- t_2 (FID sinyal toplama zamanı) aşamalarını içermektedir. Sinyal eldesi, t_1 zamanı artırılarak birçok kez gerçekleştirilmekte ve elde edilen FID 2 zaman boyutu içermektedir (x aksis- t_1 ve y- t_2 olmak üzere). Bir sonraki aşamada FID, 2 boyutta da Fourier transformasyona uğrayarak 2 farklı frekans ekseninde elde edilmektedir (f_1 - evolüsyon frekansı ve f_2 - sinyal frekansı). Son olarak, sinyal intensitesi de z aksisinde (değişen renk yoğunluğu şeklinde) gösterilmekte, böylece spektral veri 3 boyutlu kontür diyagramı olarak sunulmaktadır.

Şekil 3.2 2D NMR spektrumu eldesinde uygulanan FT çalışma diyagramı (193).



Şekil 3.3 2D puls sekansı şematik gösterimi; t_1 ve t_2 fonksiyonu olarak FID ölçümü; f_1 ve f_2 fonksiyonu olarak Fourier spektrumu (194).



2D NMR deneylerinde temelde ölçülen olgu, manyetizasyon transferidir (polarizasyon transferi). Polarizasyon transfer metodu en basit anlamda, giromanyetik değeri yüksek olan sensitif nükleusa ait büyük popülasyon fazlalığını ('large population excess') insensitif çekirdeğe aktarmayı ifade etmektedir. Polarizasyon transferi, iki çekirdek arasındaki *spin Hamiltonian* etkileşimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu olgu kimi zaman *kimyasal bağ* yapısı üzerinden, kimi zaman da *uzaysal yakınlık* ile oluşmakta ve aynı/ farklı nükleus tiplerine etkimektedir. COSY, TOCSY ve INADEQUATE deneylerinde *kimyasal bağ* ile aynı tip çekirdekler arası; HSQC, HMBC deneylerinde ise farklı tip çekirdekler arası manyetizasyon transferi gerçekleşmektedir. NOESY, ROESY deneylerinde ise bu etki *uzaysal yakınlık* ile gerçekleşmektedir. 2D NMR deneylerinde araştırılan nükleus, kendisiyle eşleşen aynı (homonükleer) veya farklı tip (heteronükleer) atomların kimyasal kayma frekansları ile modüle edilmekte ve kimyasal kayma korelasyon spektroskopisi elde edilmektedir. Bu modülasyonu başarmanın önemli bir yolu, bahsedildiği üzere çekirdekler arası polarizasyon transferidir. Her iki çekirdeğe uygulanan eş zamanlı 90° *puls çiftleri* ile istenilen spin komponentleri elde edildiğinde kimyasal kayma frekans değerinde modülasyona uğrayan (inversiyon) yüksek γ değerli atomla ilişkili popülasyon farkı, düşük γ değerli atoma transfer edilmektedir.

NMR spektroskopisinde sensitivite ve sinyal/ gürültü oranı; giromanyetik değer ve konsantrasyon (doğada bulunma sıklığı) ile direkt orantılı olduğundan, ^{13}C ve ^{15}N atomları için elde edilecek sinyal büyüklüğü, ^1H 'a göre oldukça düşük kalmaktadır. Örneğin ^{13}C spektroskopisi ele alındığında, giromanyetik değeri (γ) ^1H ' in dörtte biri olduğundan 64 kat (γ^3 ile orantılı olarak) ve yine 1.1%' lik doğada bulunma sıklığı ile 100 kat olarak toplamda 6000 kat sensitivite azalışı gözlenmektedir (^1H spektroskopisine kıyasla) (195). Ayrıca, ^{13}C ve ^{15}N atomlarına ait T_1 relaksasyon zamanları uzun olduğundan, deneyler arası bekleme süresi artmaktadır. Bu noktada sensitivite problemi, 2D NMR metotlarında uygulanan Nükleer Overhauser Etkisi (NOE) ile veya INEPT, DEPT (non-selektif popülasyon transferi) gibi çapraz polarizasyon mekanizmaları ile aşılabilmektedir (196). Selektif transfer teknikleri genellenemedikleri, diğer anlamda popülasyon transfer etkisini tek bir rezonansa göstermeleri ve tüm rezonanslar için her seferinde farklı deney düzeni gerektirmeleri sebebiyle yalnızca sinyal multiplisitesi-çiftlenim sabiti belirlenmesinde

kullanılmaktadır (196, 197). Öte yandan geniş kullanım alanı bulmuş non-selektif metotta tek bir deney ile tüm rezonanslara ait satellit frekanslar (tüm eşleşen atomlar) eş zamanlı inversiyona uğratılabilmekte; yüksek verimli spektrumlar elde edilmektedir.

3.7.2.1 İki boyutlu (2D) kalitatif NMR deney tasarımı

2D deneylerindeki en önemli dezavantaj olan uzun kompütasyonel zamanın literatüre kazandırılan yeni puls sekanslarıyla kısalması ve yüksek çıktılı deney düzenlerinde kullanılabilmesi ile yüksek kohort sayılı metabolomiks çalışmaları hız kazanmıştır (192, 198). Fakat deney süresini kısaltan çok boyutlu NMR metotlarının sensitivite ve rezolüsyon kaybı ile ilişkisi de kaydedilmiştir (175). Bu problemlerin aşılması, önceleri protein rezonans tayininde kullanılan hızlı puls tekniklerinin metabolomikse entegre edilerek, ayrıca sensitivite artışı sağlayan dinamik nükleer polarizasyon (DNP) ve rezolüsyon artışı sağlayan non-uniform örnekleme (NUS)/ faz modülasyonu ile kombinasyonu sonucu gerçekleşmiştir (192). Kalitatif ve kantitatif çok boyutlu çalışmalarda hızlı data eldesinde en sık kullanılan iki teknik, ultrafast (single scan UF) NMR ile NUS olarak belirtilmektedir (198). NUS kısaca, direkt olmayan zaman boyutunda sadece belirli zaman artışları ilişkili veriyi kaydederek kalan kısmı algoritmik olarak tamamlama yaklaşımıdır ve deney süresini 4 kata kadar kısaltabilmektedir (199). NUS veri kazanım metoduna ait diğer bir avantaj ise, 2D spektrumlarda bile gözlenebilen kompleks karışımlara ait üst üste binen pik problemini ortadan kaldıran gelişmiş rezolüsyon yeteneğidir (200). Ultrafast (UF) NMR metodu ise bir uzaysal kodlama stratejisi olarak, örneğin farklı kesitlerini farklı evolüsyon zamanlarına maruz bırakarak tek taramada bütünsel 2D spektrum eldesini ifade etmektedir (198, 201). Tek tarama (single-scan) yaklaşımında gözlenen sensitivite problemleri ise hibrit çok taramalı (multi-scan) metoda sahip UF NMR metotlarıyla aşılabilmektedir (200, 202). Çok taramalı UF metodların konvansiyonel 2D deneylere kıyasla sağladığı zaman başına elde edilen yüksek sensitivite sonucu cihazda daha stabil sonuçlar elde edilmekte, böylece analit konsantrasyonlarına ait tekrarlanabilirlik ve doğruluk artışı gözlenmektedir (203). Bahsedilen sensitivite ilişkili sebeplerden dolayı UF tabanlı metodların metabolomiks uygulamaları, homonükleer deneyler ile sınırlı kalmıştır (204). Güncel çalışmada analitlere ait konsantrasyonlar, serum gibi matrikslerde su sinyalinin başarıyla baskılayan 1D

sekansları ile (171, 188, 205) tayin edilmiş olup, 2D veri eldesi ise yalnızca kimliklendirilen analitlerin validasyonu amacıyla gerçekleştirilmiştir (56, 191, 206). Çalışmada 1D NMR deneyleri ile gerçekleştirilen ve serum numunelerindeki polar metabolitler başta olmak üzere nötral-polar lipitleri de içeren kimliklendirme, 2D NMR metotlarından TOCSY ve HSQC uygulanarak *kalitatif* yaklaşımla valide edilmiştir (175). Metotlara ait genel çalışma prensibi aşağıda özetlenmiştir:

¹H-¹H TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY): Homonükleer 2D NMR deneylerinden olan TOCSY sadece 2-3 bağ uzaklığında değil, incelenen örnekteki spin sistemini oluşturan tüm protonların arasındaki eşleşme (korelasyon) bilgisini vermektedir. Özellikle multiplet sinyallerin üst üste binmesi ile komplike olan veya biyopolimer (oligosakkarit, nükleik asit) molekül içeren karışımlara ait spektrumlarda büyük rezolüsyon artışı sağlamaktadır. TOCSY sayesinde molekülü oluşturan farklı rezidüler veya farklı moleküllere ait spin sistemleri belirlenebilmektedir. Bu amaçla çalışmamız, kompleks biyopolimerleri içeren vücut sıvılarında gerçekleştirilmesi sebebiyle ve 1D NMR deney sonuçlarının kalitatif validasyonu amacıyla TOCSY puls sekansını içeren deney düzeni çerçevesinde gerçekleştirilmiştir (174, 175, 207). TOCSY spektrumunda, COSY'e benzer şekilde eşdeğer protonlara ait sinyalleri gösteren tipik diagonal pikler ile, eşleşen farklı protonların oluşturduğu çapraz pikler mevcuttur ("cross-peaks"). Çapraz pik oluşumu, bir protona ait sinyalin evölüsyon zamanı ile frekans değişimine uğrayarak, eşleştiği diğer bir proton üzerinden gözlenmesi esasına dayanmaktadır.

¹H-¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence): Heteronükleer 2D NMR deneylerinden HSQC, tek bağ karbon-proton eşleşme (korelasyon) bilgisini vermektedir. Bir diğer anlamıyla, hangi proton/ protonların hangi karbona direkt olarak bağlı olduğunu göstermektedir. HSQC metodunda tespit edilen sinyal ¹H olduğundan bu yöntem, ¹³C 'ü tespit eden HETCOR (Heteronuclear Correlation, heteronükleer COSY) spektroskopisine göre daha sensitiftir. Ayrıca homonükleer eşleşmelerin (¹H-¹H) singlet olarak verildiği HSQC, spektrumda kalabalık bölgelerin yorumlanmasında ve büyük biyomolekülleri içeren analizlerde sinyallerin multiplet olarak verildiği HETCOR'a kıyasla tercih edilmektedir. Bunlarla beraber HETCOR' a göre önemli bir dezavantajı, in-vivo gözlenen büyük su sinyalidir (208). HSQC spektrumunda f₂ alanı (x-aksisi) ¹H' e ait sinyalleri gösterirken, f₁ alanı (y-aksisi) ¹³C'

e ait olanları belirtmektedir. Burada x eksenindeki her bir proton sinyali, y ekseninde tek bir karbona ait sinyal ile eşleşmek ve çapraz pike sahip olmak zorundadır. f_1 ve f_2 alanları farklı çekirdek sinyallerini gösterdiğinden, COSY veya TOCSY' deki benzer diagonal pikler yoktur, yalnızca tek bağ olarak eşleşen karbon-hidrojen atomlarına ait çapraz pikler mevcuttur. HSQC spektrumunda dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta, 'phasing' ayarıdır. Faz-sensitif HSQC puls sekansı ('edited HSQC pulse sequence') ile phasing ayarı manuel yapılarak, DEPT-135 deneyine benzer şekilde multiplisite bilgisi elde edilebilmektedir (209). Çalışmamızda HSQC metodunun tercih edilme sebebi, bu deneyin üst üste binen (overlapped) sinyallerce zengin bir 1D spektrumda karmaşık H sinyallerini 2. bir boyutta farklı farklı sinyallere rezole edebilme yeteneğinden faydalanmaktır (56, 191).

3.7.2.2. İki boyutlu (2D) NMR deney parametreleri

2D TOCSY ve HSQC deneyleri, TÜBİTAK MAM bünyesinde bulunan 700 MHz Bruker AVANCE III sıvı-hal NMR spektrometresi enstrümantasyonunda 298 Kelvin ve kriyojenik prob (QCI CryoProbe, Bruker) ucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1D NMR deneyleri tamamlanan serum numunelerinde, her bir deney grubunu oluşturan örneklerden 10 µl alınarak elde edilen toplamda 5 kalite kontrol serum havuzu (4 farklı grup haricinde tüm grupların yer aldığı havuz olarak toplamda 5 adet) elde edilerek ekstra bir işlem uygulanmadan 2D spektrumları kaydedilmiştir (3 tekrarlı olarak).

2D NMR deney prosesleri, 2016 yılında yayınlanan insan serumunda uygulanmış bir çalışma akışı parametrelerini içermektedir (206). Seçilen puls programları Bruker terminolojisi ile ifade edildiğinde "*hsqcetgpsisp2.2*" ve "*dipsi2gpphzs*" olmak üzere;

Tablo 3.6 2D NMR deneylerinde uygulanan cihaz parametreleri.

^{13}C - ^1H HSQC	
Spektral genişlik (sweep width, SW)	Direkt boyut (^1H): 11.7; İndirekt boyut (^{13}C): 185 ppm
Transient sayısı (number of scans, NS) (<i>t1 (indirekt karbon evölüsyon zamanı) artışı başına düşen</i>)	64
Transmitter frekansı görelî konum ayarı (offset)	^{13}C : 75 ppm; ^1H : 4.726 ppm
Gevşeme gecikmesi	1,5 sn

(recycle delay, d1)	
Nokta sayısı (number of points, NP)	^1H : 1024; ^{13}C : 512
İzotropik karıştırma süresi (mixing time, MT)	80 ms
^1H-^1H TOCSY	
Spektral genişlik (sweep width, SW)	12 ppm
Transient sayısı (number of scans, NS)	48
Transmitter frekansı görelî konum ayarı (offset)	^1H : 4.726 ppm
Gevşeme gecikmesi (recycle delay, d1)	2 sn
Nokta sayısı (number of points, NP)	^1H : 2048; ^1H : 512
İzotropik karıştırma süresi (mixing time, MT)	80 ms

TopSpin yazılımı (v.4.1.3) ile ön işlemler olarak sırasıyla zero-filling, Fourier transformasyonu, fazlama, taban hattı düzeltme (baseline correction) ve pik hizalama uygulandıktan sonra elde edilen 2D NMR spektrumlarında analit tayini, Ohio State Üniversitesi yazılımı ‘complex mixture analysis by NMR (COLMARm)’ adlı ücretsiz çevrimiçi platformda gerçekleştirilmiştir (<http://spin.ccic.ohio-state.edu/index.php/colmarm/index>, (210)). Burada temel prensip, 2 farklı 2D NMR puls sekansının (^1H - ^1H TOCSY, ^{13}C - ^1H HSQC) eş zamanlı uygulanarak ‘dual receiver (DR)’ spektrumlarının eldesi (211) ve metabolit tayininin COLMARm platformunda iki adımda gerçekleştirilmesidir (212). İlk adım olarak deneysel HSQC spektrumu yazılımsal HSQC metabolomiks veri tabanı ile karşılaştırılmakta (213) ve aday analit listesi oluşturulmaktadır. Sonrasında her bir eşleşen analit için karşılık gelen teorik TOCSY spektrumları COLMAR ^1H -(^{13}C) TOCCATA veri tabanında oluşturularak (214) en son deneysel TOCSY spektrumu ile örtüştürülmektedir (206). Kullanıcı, pikler arası süperimpozisyonun yüzdesine göre aday metaboliti manuel olarak doğrulamakta veya dışlamaktadır.

Çalışmanın 2D NMR deney sonuçlarında yalnızca %100 pik örtüşmesine sahip aday moleküller yer alarak, yüksek doğruluğa sahip analit tayini validasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.7.3. NMR verilerinin istatistiksel analizi

2D NMR analizleri ile analit kimliklendirilmesi yapılan 1D spektrumlarına ait ham veriler Bruker cihazları ile uyumlu TopSpin yazılımı (4.1.3) ile ön-işleme tabi tutularak (0.3 Hz line broadening, su piki baskılaması, otofazlama, baseline düzeltme), sonraki adımda analit eşleştirmesi ve kantitasyonu Chenomx NMR Suite (v.9.02) analiz programı ile gerçekleştirilmiştir (215). Metabolit kantitasyon değerleri, internal standart olarak kullanılan DSS molekülüne ait sinyalin pik alanı referans alınarak hesaplanmıştır ve ileri istatistiksel analizler bu değerleri içeren ‘csv (virgülle ayrılan değerler)’ konsantrasyon tablosunda uygulanmıştır.

Tek-değişkenli istatistiksel analizlerin tümü (analit kantitasyon değerlerine ait ortalama, standart sapma belirlenmesi ve sosyo-demografik/ rutin parametreler ile korelasyonu) SPSS programı (Version 27.0., IBM) ile gerçekleştirilmiştir.

NMR spektrumlarında metabolitlerle eşleşen rezonans sinyallerine ait kantitasyon değerlerinde anlamlı analit keşfi için kat-değişimi (fold change, FC) ile t-testi birleştiren volkan grafiği uygulanmıştır. 2D NMR ile valide edilerek kimliklendirmesi gerçekleştirilen analitlerin karyotipik/ moleküler alt tipler ve rutin kan parametreleri ile korelasyonu Spearman katsayıları (r_s) hesaplanarak incelenmiştir.

Çok-değişkenli analiz ve analitlerin ilişkili olduğu yolak analizleri ise, otomatik ölçeklendirme ve log-transformasyon işlemleri uygulanarak gerçekleştirilen veri normalizasyonu sonrası MetaboAnalyst (5.0) platformu kullanılarak raporlanmıştır. Örneklerin gruplar arası dağılım trendini tespit etmek ve yaş/ cinsiyet ilişkili farklılık oluşturan uç değerlerin ekarte edilmesi adına öncelikle güdümsüz (unsupervised) bir analiz türü olan “Temel Bileşen Analizi (İngilizce: Principal Component Analysis, PCA)” uygulanmıştır. Gruplar arası diferansiyel modelleme ise temelde Partial Least-Squares (PLS) regresyon analizi ile yapılmıştır. Ayrım gücünü geliştirmek adına ‘Variable Importance in Projection (VIP)’ plot analizi ile değişken önemi 1’in üzerinde olan analitler seçilerek bunları kapsayan yeni modeller oluşturulmuştur (72). VIP-PLS-DA kemometrik model performans değerlendirmesi, CV-ANOVA (düşük p değerleri anlamlı) ve uyum derecesinin incelendiği (korelasyon katsayısı R^2 , çapraz validasyon katsayısı Q^2) permütasyon testleri ile ortaya konmuştur (216). VIP-PLS-DA modeline ait Receiver operating characteristic (ROC) analizinde eğri altında kalan alan (area under curve-AUC) değerleri hesaplanarak uygun tanısıl

modeller oluşturulmuştur. Bir sonraki basamakta anlamlı analitler ile yolak (pathway) analizi gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi deneyleri (HR-LCMS)

Deneyler BVÜ İlaç Araştırma Merkezi (İLMER) bünyesinde bulunan dinamik ölçüm aralığı geniş (femtogram-seviyesinde duyarlılık) yüksek rezolüsyonlu *Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher, Germany)* MS cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.7.4.1. Kalitatif HR-LCMS deney tasarımı

Serum ve lökosit izolatlarında uygulanan LC-MS deneyleri, ilgilenilen moleküllerin global taramasını gerçekleştirirken aynı zamanda kalite kontrol sağlamak adına hidrofilik molekül sınıfına ait internal standart karışımının da kullanıldığı analizleri içermektedir. HR-LCMS analizleri sonucunda, 1 ve 2 boyutlu NMR deneylerinde yüksek doğrulukta kantite edilen analitlerin çift validasyonu ile NMR metodunun kapsayamadığı piko-femtomolar konsantrasyondaki polar moleküllerin de analiz kapsamına alınması gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, spektrumda düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerin çoğunluğunu içeren molekül çeşitliliği elde edilerek serum ve hücre lizatlarının global metabolik profilleri ortaya konmuştur.

Lökosit izolatu numunelerinin hazırlanması: Homojenizasyon ve total protein ölçümü basamakları tamamlanan (*bkn.* ‘Numune Eldesi’) lökosit izolatlarında HR-LCMS analizleri, literatürde yer alan benzeri bir çalışmanın modifikasyonu ile aşağıda belirtilen akış içerisinde gerçekleştirilmiştir (181):

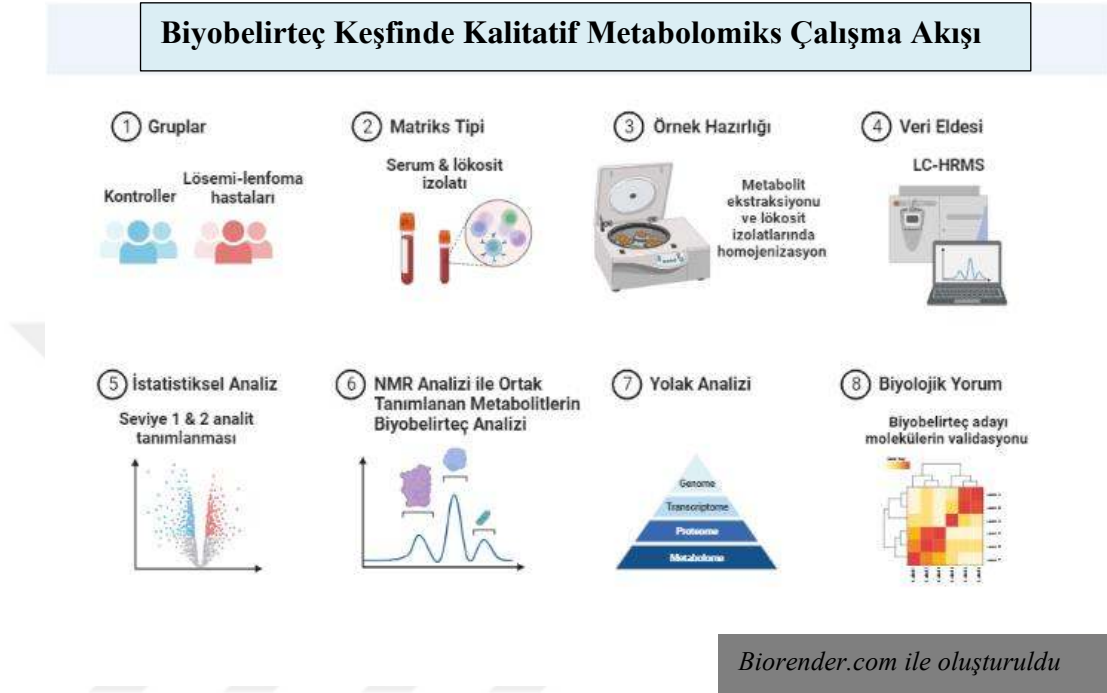
-500 µL homojenize edilmiş izolat ile 1 mL soğuk metanolün karıştırılması ve vortekslenmesi,

-10 dk ultrasonik homojenizasyon sonrası 10 dk 10 000 g santrifüj,

-190 µL süpernatant (metanol içeren) içerisine 10 µL hacimde 2000-kat dilüe edilmiş amino asit internal standart karışımının eklenmesi (AA-IS Mix, Cambridge Isotope Laboratories) ve son karışımın MS viallerine aktarılması aşamaları uygulanmıştır.

Serum numunelerinin hazırlanması: NMR analizi tamamlanan serum örnekleri BVÜ Merkez Araştırma Laboratuvarına soğuk zincir koşullarında transfer edildikten sonra,

0.45 µm selülöz asetat (hidrofilik membran) filtrelerden geçirilerek eppendorf tüplere aktarılmıştır. 190 µL filtre edilmiş örneğin içerisine 10 µL hacimde 2000-kat dilüe edilmiş amino asit internal standart karışımının eklenmesi (AA-IS Mix, Cambridge Isotope Laboratories) ile son karışım MS viallerine aktarılmıştır.



Şekil 3.4 Serum ve lökosit izolatlarında gerçekleştirilen LC-HRMS analizlerine ait genel akış.

3.7.4.2. HR-LCMS deney parametreleri

Çalışmada yer alan örnek matrisleri olan serum ve hücre izolatlarının kompleks analit karışımlarından oluşmaları sebebiyle, deneylerde bu tür matrislerde en sık kullanılan tarama modu olan ‘full scan mod’ kullanılarak önceki bir çalışmada tanıtılan metodun modifikasyonu ile HR-LCMS analizleri tamamlanmıştır (her iki örnek türü için aynı şekilde) (217):

LC sistemi: Dionex UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific).

Enjeksiyon modu ve hacmi: Loop enjeksiyon & 5 µl.

Kolon & guard: Fortis SpeedCore C18 1.7 µm (100x2.1 mm) & Troyasil Guard C18 TNE 3 µm (10x2.1 mm).

Akış hızı: 400 µl/dk.

Mobil fazlar: 1. elüent -mobil faz A- %60 ACN- %40 pürifiye su içerisinde %0.1 FA ile 10 mM amonyum format (AF) ve 2. elüent -mobil faz B- ise %90 2-propanol- %10 ACN içerisinde %0.1 FA ve 10 mM AF içermektedir. Çift kanallı gradient sisteminde 1. (A) ve 2. Elüentin (B) zamana bağlı değişimi Tablo 3.7’ de görülmektedir. Kolon ekilibrasyonu 2 dk süreyle sağlanmıştır (kolon fırını 40 °C).

Tablo 3.7 Çift Kanallı Gradient Programı.

HR-LCMS analizi	%60 ACN- %40 su (%0.1 FA, 10 mM AF)	%90 2-propanol- %10 ACN (%0.1 FA, 10 mM AF)	Akış (ml/ dk)
Zaman (dk)	A %	B %	
0	95	5	0,40
2	50	50	0,40
12	5	95	0,40
14	5	95	0,40
15	95	5	0,40
17	95	5	0,40

İyonizasyon: Çalışmada kullanılan iyonizasyon tekniği elektrosprey iyonizasyonu (Electrospray ionization-ESI) birçok biyomolekül grubunu kapsayarak yüksek doğruluk ve sensitiviteye sahip olması ve LC sistemlerine adapte olabilmesi yönüyle tercih edilmiştir. Negatif ESI modu (ESI-) asidik fonksiyonalite gösteren moleküllerin iyonizasyonunda başarıyla (örneğin lipit (177), flavonoid, oligosakkarit, karboksilik asit, oligonükleotit, sülfonamit (218)); bazik fonksiyonalite gösteren analitlerin iyonizasyonunda ise pozitif ESI (ESI+) modu tercih edilmektedir (makromoleküller). Bu amaçla deneylerdeki iyonize analit kapsamını ve çeşitliliğini artırmak adına her bir örnek türü için iki farklı mod (pozitif ve negatif) çalıştırılmıştır.

Veri eldesi (acquisition mode): Çalışmada her iki örnek türüne ait HR-LCMS deneyleri, iyon tuzağı analizörlerinde uygulanabilen konvansiyonel ‘data-dependent acquisition (DDA) full scan modu’ seçilerek gerçekleştirilmiştir (cihaz terminolojisi: Full MS/dd-MS² (219, 220)). Belirli prekürsörlerin seçilerek analiz edildiği DDA yöntemi, özellikle veri tabanı eşleştirmesi yoluyla analit kimlik tespitinde ve spektral kütüphane jenerasyonunda tercih edilmektedir. Çalışmada uygulanan DDA metodu ile bahsedilen molekül kimlik tespitinin yanı sıra polar-apolar moleküllere ait yarı-kantitasyon da her bir molekül sınıfına ait hidrofilik internal standartların kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde ‘full scan mod’ ile

150-1500 m/z kütle aralığında (scan range) taranan ve belirli bir eşik değeri üzerinde sinyal intensitesine sahip analitler (TopN:5) kolondan ayrıştığında, Q1 kuadropolünde seçilerek collision cell olarak bilinen girişim hücresine aktarılmıştır. Fragmentasyon sonrası Q3 kuadropolünde saptanan ürün iyonlara ait spektrumlar kaydedilmiş ve prekürsörü bilinen analitlere ait MS2 spektrum eldesi gerçekleştirilmiştir. MS/MS analizlerinde spektrumlara ait sinyal/ gürültü oranı (SNR) eşik değeri, 10^3 intensite olarak belirlenmiştir. Analitik kondisyon parametrelerinin özeti, Tablo 3.8' de görülmektedir.

Tablo 3.8 Analitik kondisyon parametreleri.

İyonizasyon	ESI (+) ve ESI (-)
Tarama aralığı (m/z scan range)	150-1.500 Da
Veri eldesi	Full MS/dd-MS ² (tüm tarama (100 ms) ve veri bağımlı MS/MS analizleri (50 ms))
Yük dışlama	4-8 ve >8 izotop dışlama
Kılıf gaz akış hızı	45
Aux gaz akış hızı	10
Otomatik kazanç kontrolü (AGC)	1×10^6
Maksimum enjekte süresi	100 ms
Sprey voltajı (kV)	3.80
Kapiller sıcaklık (°C)	320
Aux gaz ısıtıcı sıcaklık (°C)	320
S-lens RF düzeyi	50

3.7.4.3. Spektral işleme

HR-LCMS sistemiyle uyumlu Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific, USA) yazılımı ile kaydedilen ve görselleştirilen spektrumlarda öncelikle gürültü filtrasyonu ($S/N > 10$), pik hizalama (5 ppm) ve kör (blank) redüksiyonu uygulanmıştır. Tespit edilen m/z oranlarına ait intensite değerleri internal standartlar ile normalize edilerek istatistiksel analizlerde yalnızca kalite kontrol örneklerinde rölatif standart sapma (RSD, CV) değeri 25%' in altında olan analitler yer alacak şekilde pik listeleri hazırlanmıştır. Ham data (.RAW) açık erişimli Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platformunda yer alan MSConvert yazılımı ile mzXML formatına dönüştürülerek, m/z oranı ve intensite değerlerinin olduğu pik listesi dışarı aktarılmıştır (221). Spektrumlara ait ileri ön-işlem aşamaları (pik tespiti, dekonvolüsyon) MZmine 3 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (222). Ön-işlem aşamaları ile analit kimlik tespiti bir Phyton yazılımı olan TidyMass paketinde

farklı veri tabanları kullanılarak (Human Metabolome Database, MassBank of North America) valide edilmiştir (223).

3.7.4.4. Deney kalite kontrolü

Kalite kontrol numuneleri için; AML, KLL, NHL ve kontrol gruplarında yer alan her bir katılımcıdan 10 µl alınarak serum havuzu oluşturulmuştur. Kalite kontrol numuneleri LC-MS deneylerinde ‘deney-içi’ etkileri düzeltmek, arkaplan veya taşınma etkisiyle (carry-over) gözlenen molekülleri analizden çıkartarak yalnızca anlamlı analitleri ortaya koymak amacıyla ve ayrıca enstrümental stabilite monitorizasyonunda kullanılmıştır (224).

Kör (blank) örnekleri lökosit izolatlarında pürifiye su içerisinde %80 metanol ve serumda ise %100 metanol içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Örnek analizi: Sistem kondisyonlama amacıyla sırasıyla 2 kalite kontrol serum havuzu, 2 kör (blank) ve tekrar 3 kalite kontrol enjeksiyonu yapılmıştır (225).

Analitik kısımda ise 120 serum örneği, her 10 örnekte bir kalite kontrol enjeksiyonu (toplamda 12) verilecek şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Enstrümental stabilite, kalite kontrol materyallerinin deney başlangıcındaki çoklu enjeksiyonları ile değerlendirilmiştir (n=5). LCMS analizi sonuçları, TidyMass yazılımında kalite kontrol örneklerinin yüksek korelasyonları değerlendirildikten sonra teyit edilmiş ve sunulmuştur.

3.7.5. HR-LCMS Verilerinin İstatistiksel Analizi ve Yorumlanması

Normalizasyon sonrası (otomatik ölçeklendirme, log-transformasyon) tüm HR-LCMS veri matrisini ve analitlere ait intensite değerlerini kapsayacak şekilde uygulanan fonksiyonel analiz (‘Mummichog algoritması’ kullanılarak), temel bileşen analizi (PCA), ortogonal kısmi en küçük kareler regresyonu (KEKKR, Orthogonal Partial Least-Squares (OPLS)), anlamlı metabolik yolak analizi ve işlem karakteristik (receiver operating characteristic, ROC) eğrisi ile belirlenen biyobelirteç analizleri MetaboAnalyst (5.0) platformu kullanılarak tamamlanmıştır (226). OPLS analizi sonrası gruplar arası ayırım gücünü geliştirmek adına değişken önem projeksiyonu (variable importance projection (VIP)) analizi ile değişken önemi 1’in üzerinde olan analitler seçilmiş, bunları kapsayan yeni modeller oluşturulmuştur (72). VIP-PLS-DA kemometrik model performans değerlendirmesi CV-ANOVA ve receiver operating characteristic (ROC) curve analizinde area under curve (AUC) değerleri hesaplanarak test edilmiştir. TidyMass yazılımı ile kimliklendirilen metabolitler ise HM- kontrol

kıyaslamasında kat değişimi (fold-change, FC) ve student t-testi ile grup ayırımındaki anlamlılıkları açısından incelenmiş ve zenginleştirme analizi (enrichment analysis) ile anlamlı yollara ait p değerleri belirlenmiştir.f



4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Ve Klinik Özellikleri

Tek-değişkenli istatistiksel analizlerin tümü SPSS programı (Version 27.0., IBM) ile gerçekleştirilmiştir. Sosyo-demografik veri ve rutin biyokimya ölçüm sonuçları dağılım tipi açısından Shapiro-Wilk testi (grup örnekleme $n < 30$) ve varyansların homojenliği açısından ise Levene testi ile incelenmiştir. Normal dağılıma sahip parametrelerin gruplar arası ortalama farklılıkları, iki-yönlü varyans analizi (ANOVA, $p < 0.05$) ve çoklu karşılaştırma ayarlaması açısından post-hoc Tukey's testleri ile analiz edilmiştir. Parametrik olmayan ölçümlere ait gruplar arası ortanca değerleri, Kruskal-Wallis analizi ile karşılaştırılmıştır. Sürekli değişkenlere ait değerler ortalama $\pm$ standart sapma (İngilizce: standard deviation, SD) olarak ifade edilirken, süreksiz değişkenler ortanca (medyan) $\pm$ çeyrekler arası açıklık (İngilizce: interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur.

Tablo 4.1. Gruplara ait sosyo-demografik ve klinik parametreler. Değerler sürekli ve normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma ve süreksiz- normal dağılım göstermeyen değişkenler için ortanca (çeyrekler arası açıklık) olarak sunulmuştur (ns: nonsignificant, $*0.01 < p < 0.05$; $**0.001 < p < 0.01$; $***p < 0.001$ önem düzeyinde). η^2 , ANOVA testi etki büyüklüğü.

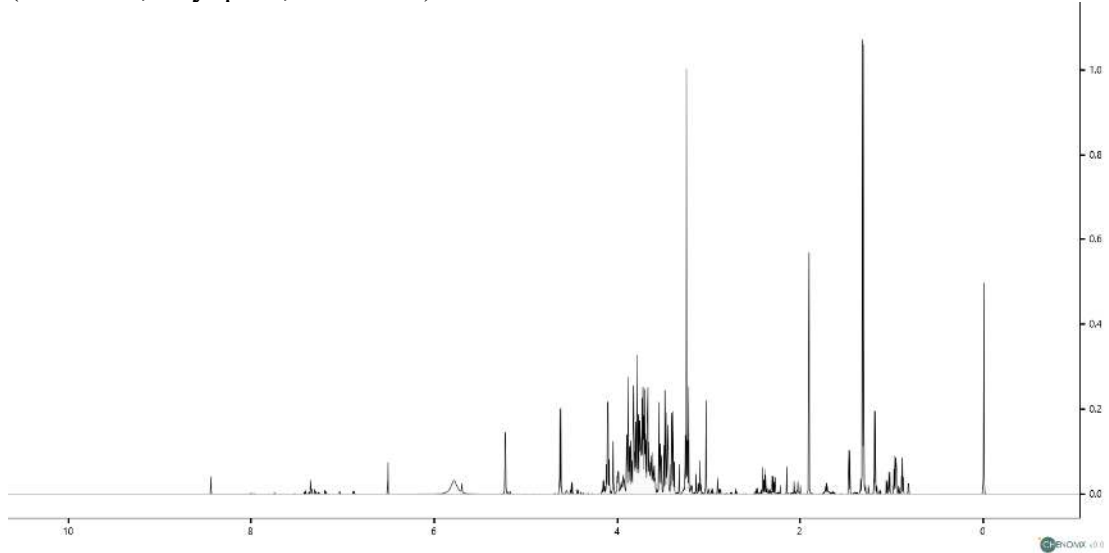
	NHL (n=30)	KLL (n=30)	AML (n=30)	Kontrol (n=30)	p değeri
Cinsiyet (erkek/kadın)	17/13	26/6	15/15	15/15	0.05*
Yaş (yıl)	70.5 (59.75-76)	71 (60.25-76)	56.5 (38.5- 78.25)	43 (38.75- 47.25)	0.001***
VKİ (kg/m²)	26.2 $\pm$ 2.3	26.8 $\pm$ 2.9	27.3 $\pm$ 2.6	25.8 $\pm$ 1.9	ns
RBC (10⁶/μL)	4.21 $\pm$ 0.77	4.26 $\pm$ 0.95	2.9 $\pm$ 0.45	4.83 $\pm$ 0.51	0.001*** ($\eta^2=0.51$)

Hb (g/dL)	12.4 (10.48- 13.83)	12.65 (9.98- 14.18)	8.85 (7.9- 9.65)	13.65 (12.93- 15.13)	0.001***
Hct (%)	39.3 (32.95- 42.43)	39.5 (31.95- 42.9)	25.25 (23.35-28.1)	41.6 (40.3- 44.8)	0.001***
MCV (fL)	89.04 ± 5.35	88.95 ± 7.13	89.37 ± 7.48	88.1 ± 7.43	ns
WBC (10³/μL)	16.3 ± 7.1	28.3 ± 15.31	10.32 ± 7.12	6.94 ± 1.83	0.001*** (η ² =0.46)
LYMPH (%)	66.57 ± 13.37	85.8 ± 7.68	22.37 ± 14.74	32.35 ± 5.93	0.001*** (η ² =0.85)
NEUT (%)	19.21 ± 9.19	15.22 ± 11.1	17.93 ± 11.15	56.69 ± 7.29	0.001*** (η ² =0.78)
MONO (%)	5.44 ± 3.31	1.82 ± 1.07	36.24 ± 19.85	8.28 ± 0.92	0.001*** (η ² =0.65)
N/ L mutlak değer oranı	0.29 (0.22- 0.79)	0.16 (0-0.335)	0.75 (0.5- 1.75)	1.78 (1.38- 2)	0.001***
PLT (10³/μL)	217.45 ± 94.86	172.53 ± 64.58	26.8 ± 20.19	247.78 ± 55.26	0.001*** (η ² =0.57)
Açlık glukozu (mg/dL)	116.69 ± 34.7	99 ± 13.36	120.64 ± 29.39	94.54 ± 9.79	0.001*** (η ² =0.21)
Üre (mg/dL)	33.4 ± 7.75	36.5 ± 8.1	36.9 ± 21.67	25.72 ± 7.35	0.05* (η ² =0.11)
Kreatinin (mg/dL)	0.98 ± 0.27	0.98 ± 0.19	0.85± 0.4	0.68 ± 0.06	0.01** (η ² =0.13)
AST (U/L)	17.28 ± 3.35	20.07 ± 5.52	20.87 ± 9.6	20.17 ± 5.41	ns
ALT (U/L)	15.48 ± 5.37	15.22 ± 5.05	17.57 ± 7.91	18 ± 4.88	ns
LDH (U/L)	223 (169- 326)	214 (186-265)	325 (252- 756)	150 ± 7.7	0.001***
Beta-2 Mikroglobulin (mg/L)	2.7 ± 0.73	3.22 ± 1.21	4.17 ± 1.06	4.58 ± 0.13	ns

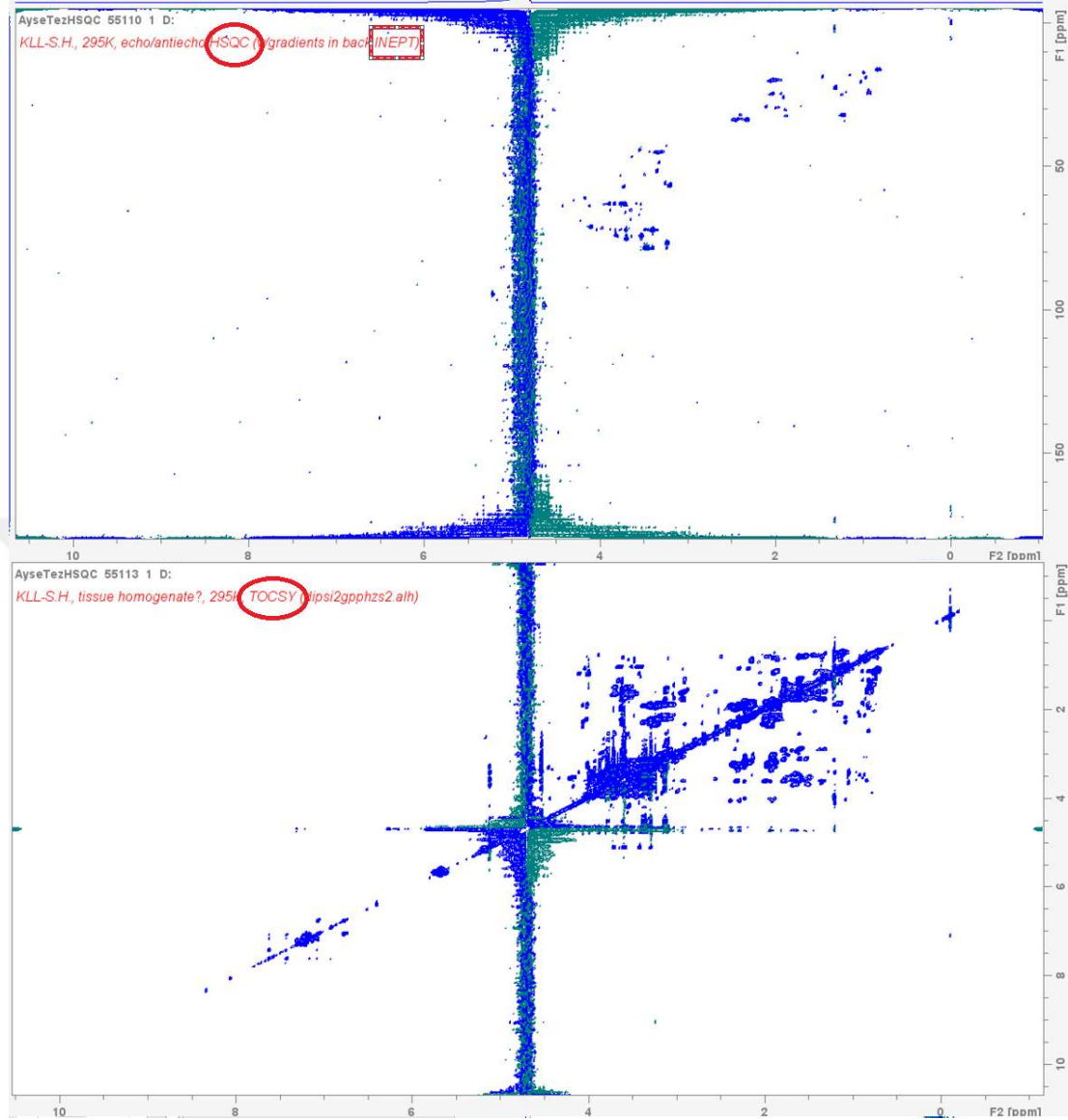
Albümün (g/dL)	4.24 ± 0.33	4.34 ± 0.49	3.65 ± 0.69	4.58 ± 0.13	0.001*** ($\eta^2=0.29$)
CRP (mg/L)	1.53 (0.2-8.2)	0.83 (0.23-2.17)	43 (14.32-150.77)	0.21 (0.2-1.22)	0.001***
eGFR (mL/dk/1.73 m²)	70.37 ± 23.94	81.27 ± 14.27	90.77 ± 17.22	101.93 ± 10.46	0.001*** ($\eta^2=0.33$)
TG (mg/dL)	130.7 ± 44.85	122.25 ± 55.92	129.53 ± 55.85	100.57 ± 30.72	ns
HDL (mg/dL)	40.22 ± 6.64	36.39 ± 13.09	31.37 ± 9.37	52.5 ± 8.01	0.001*** ($\eta^2=0.37$)
LDL (mg/dL)	117.62 ± 40.89	104.87 ± 31.74	91.89 ± 24.37	101.31 ± 30.85	ns
Ortanca Bazal Blast Seviyesi (%)	-	-	52.5 (40-70)	-	-

4.2. Serum NMR Analizlerine ait Sonuçlar

Şekil 4.1 Çalışmada yer alan bir AML hastasına ait örnek 1D ¹H NMR spektrumu (700 MHz, kriyoprob, Chenomx).



Şekil 4.2 Sırasıyla HSQC ve TOCSY 2D deneyleri ham verilerine ait örnekler (Topspin yazılımı, Bruker).



Tablo 4.2 Çalışmada yer alan 4 grupta ortak kimliklendirilen serum NMR (1D, 2D) metabolitleri.

Metabolit	HMDB Kimlik Kartı	Pubchem	KEGG
D-Glukoz	HMDB0000122	5793	C00221
L-Laktik asit	HMDB0000190	61503	C00186
Asetik asit	HMDB0000042	176	C00033
L-Glutamik asit	HMDB0000148	33032	C00025
Üre	HMDB0000294	2447	C00086
Piroglutamik asit	HMDB0000267	7405	C01879
L-Valin	HMDB0000883	6287	C00183
Eritritol	HMDB0002994	222285	C00503
L-Alanin	HMDB0000161	5950	C00041
L-Glutamin	HMDB0000641	5961	C00064
Fumarik asit	HMDB0000134	444972	C00122

Formik asit	HMDB0000142	284	C00058
L-Lösin	HMDB0000687	6106	C00123
Metilguanidin	HMDB0001522	10111	C02294
Kreatinin	HMDB0000562	588	C00791
D-Ksilitol	HMDB0002917	6912	C00379
L-Tirozin	HMDB0000158	6057	C00082
L-Karnitin	HMDB0000062	2724480	C00318
Kreatin	HMDB0000064	586	C00300
Sorbitol	HMDB0000247	5780	C00794
3-OH-metilglutarik asit	HMDB0000355	1662	C03761
Betain	HMDB0000043	247	C00719
1,3-Dimetilürük asit	HMDB0001857	70346	-
Asetoasetik asit	HMDB0000060	96	C00164
Trimetilamin N-oksit	HMDB0000925	1145	C01104
L-Fenilalanin	HMDB0000159	6140	C00079
3-OH-izovalerik asit	HMDB0000754	69362	C20827
Glisin	HMDB0000123	750	C00037
Guanidoasetik asit	HMDB0000128	763	C00581
Bütirik asit	HMDB0000039	264	C00246
2-OH-3-metillbütirik asit	HMDB0000407	99823	-
Galaktarik asit	HMDB0000639	3037582	C00879
3-Metillhistidin	HMDB0000479	64969	C01152
Glikolat	-	3460	C00160
Süksinik asit	HMDB0000254	1110	C00042
Malonat	-	3673	C00383
İzobütirik asit	HMDB0001873	6590	C02632
Anserin	HMDB0000194	112072	C01262
Aseton	HMDB0001659	180	C00207
Sitrakonik asit	HMDB0000634	643798	C02226
1-Metilhistidin	HMDB0000001	92105	C01152
Alfa-OH-izobütirik asit	HMDB0000729	11671	-
Paraksantin	HMDB0001860	4687	C13747
Fosfokreatin	HMDB0001511	587	C02305
4-Piridoksik asit	HMDB0000017	6723	C00847
Histamin	HMDB0000870	774	C00388
cis-Akonitik asit	HMDB0000072	643757	C00417
Asetilkolin	HMDB0000895	6060	C01996
D-Gliseraldehit 3-fosfat	-	3418	C00118
Dihidroksiaseton	HMDB0001882	670	C00184
Levulinik asit	HMDB0000720	11579	-
Trimetilamin	HMDB0000906	1146	C00565
Sirinjik asit	HMDB0002085	10742	C10833
O-Fosfoetanolamin	HMDB0000224	1015	C00346
Hidroksiaseton	HMDB0006961	8299	C05235
Dimetilglisin	HMDB0000092	673	C01026

Dimetilamin	HMDB0000087	674	C00543
1,3-Diaminopropan	HMDB0000002	428	C00986

Tablo 4.3 AML grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler ($p < 0.05$).

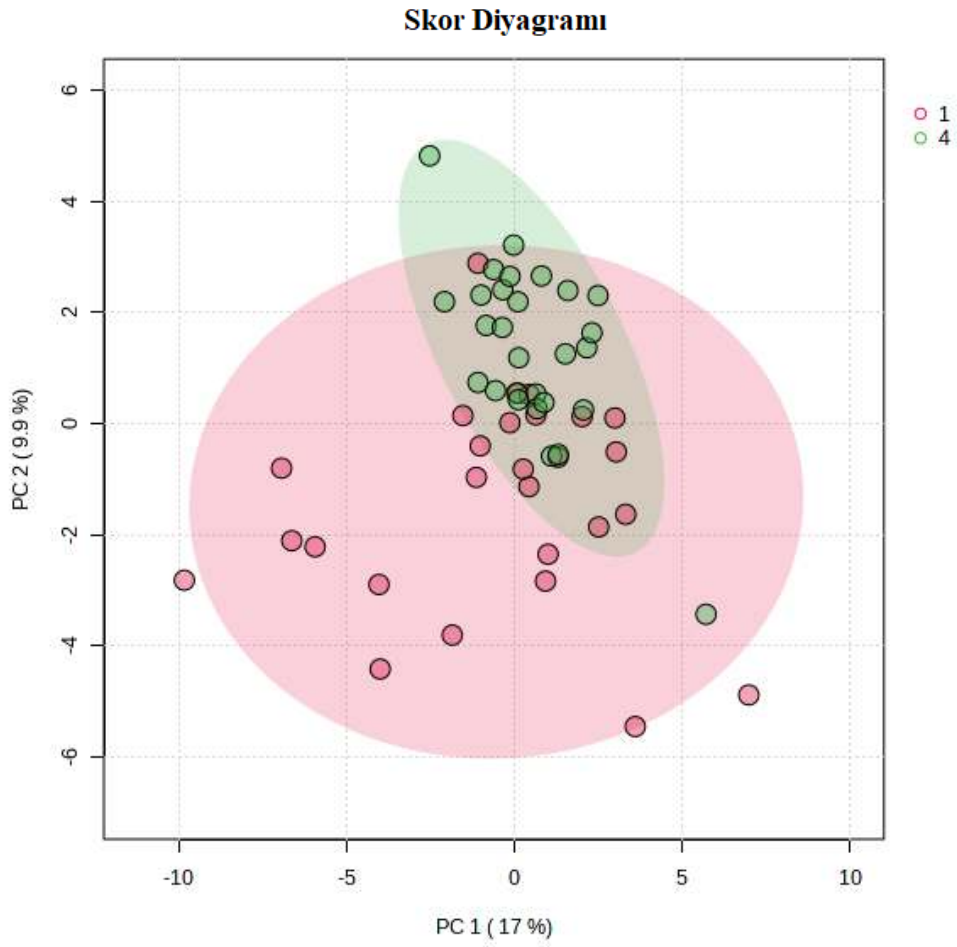
	t istatistiği	p değeri	-log₁₀(p)	Yanlış bulgu oranı (FDR)
Piroglutamat	-5.6974	5.46E-07	6.2626	2.68E-05
3-OH-izovalerat	-5.4709	1.24E-06	5.9066	3.04E-05
Alanin	-4.6229	2.47E-05	4.6081	0.000403
Metilguanidin	4.4097	5.09E-05	4.293	0.000624
3-H-3-metilglutarat	-4.0098	0.000191	3.7181	0.001876
İzobütirat	3.4213	0.001208	2.9181	0.009862
Glisin	2.9799	0.004345	2.362	0.029836
Laktat	-2.9388	0.004871	2.3124	0.029836
Üre	2.8205	0.006733	2.1718	0.036655

Tablo 4.4 AML grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

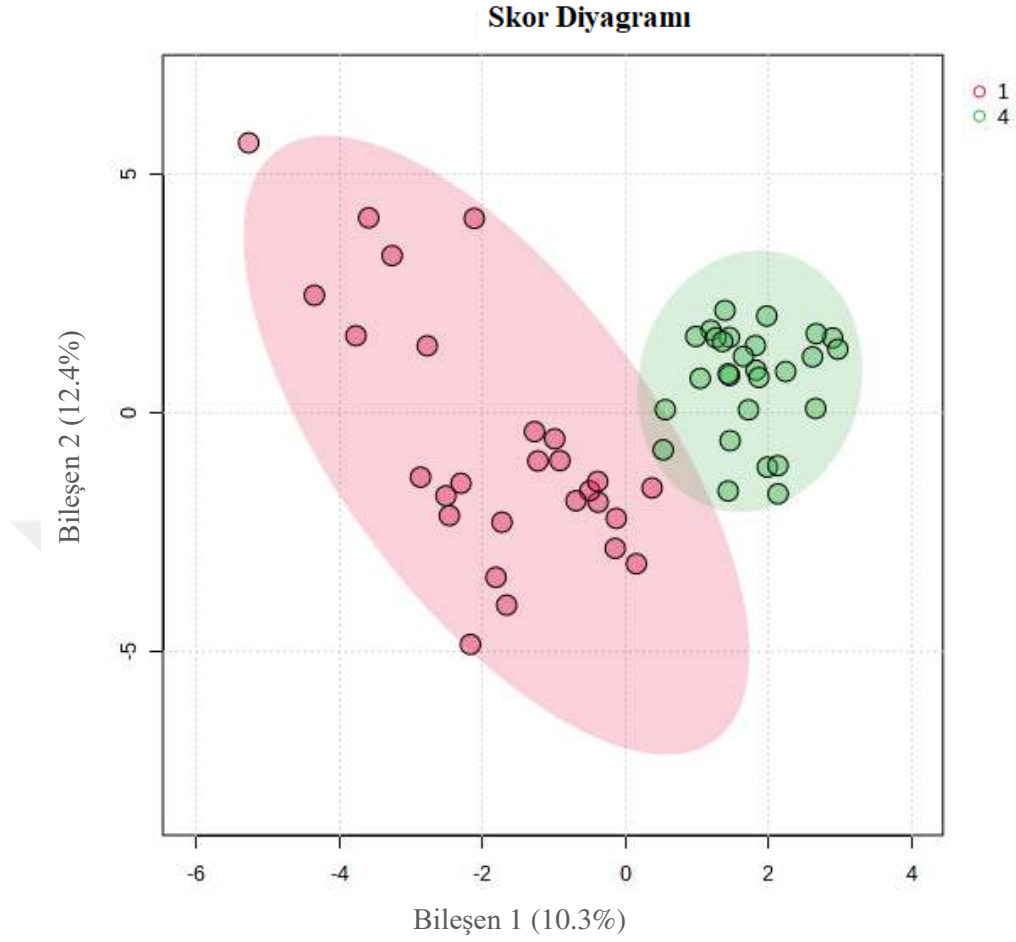
Yolak Adı	Eşleşme	p değeri	-log(p)	Holm p	Yanlış bulgu oranı (FDR)	Etki (impact)
Glutasyon metabolizması	3/28	4.9776E-7	6.303	1.8915E-5	1.8915E-5	0.11548
Selenobileşik metabolizması	1/20	2.4652E-5	4.6081	9.1212E-4	4.6839E-4	0.0
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	3/28	9.8214E-4	3.0078	0.035357	0.01244	0.19712
Aminoasıl-tRNA biyosentezi	7/48	0.0020814	2.6816	0.072849	0.019773	0.0
Glikoliz / Glukoneogenez	4/26	0.0030417	2.5169	0.10342	0.022742	0.11518
Glisin, serin ve treonin metabolizması	4/33	0.0035909	2.4448	0.1185	0.022742	0.32225
Primer safra asit biyosentezi	1/46	0.0043448	2.362	0.13903	0.023586	0.00758
Pürin metabolizması	1/65	0.0067326	2.1718	0.20871	0.03198	0.0
Pirüvat metabolizması	2/22	0.010014	1.9994	0.30041	0.042279	0.06065

Porfirin ve klorofil metabolizması	2/30	0.017968	1.7455	0.52107	0.068278	0.0
Arjinin biyosentezi	2/14	0.026779	1.5722	0.74982	0.092511	0.11675
Galaktoz metabolizması	1/27	0.038824	1.4109	1.0	0.12294	0.0

Şekil 4.3 AML ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi (PCA) skor grafiği. 1-AML, 4-Kontrol; en yüksek iki varyans açıklayıcı bileşenler PC1 ve PC2.



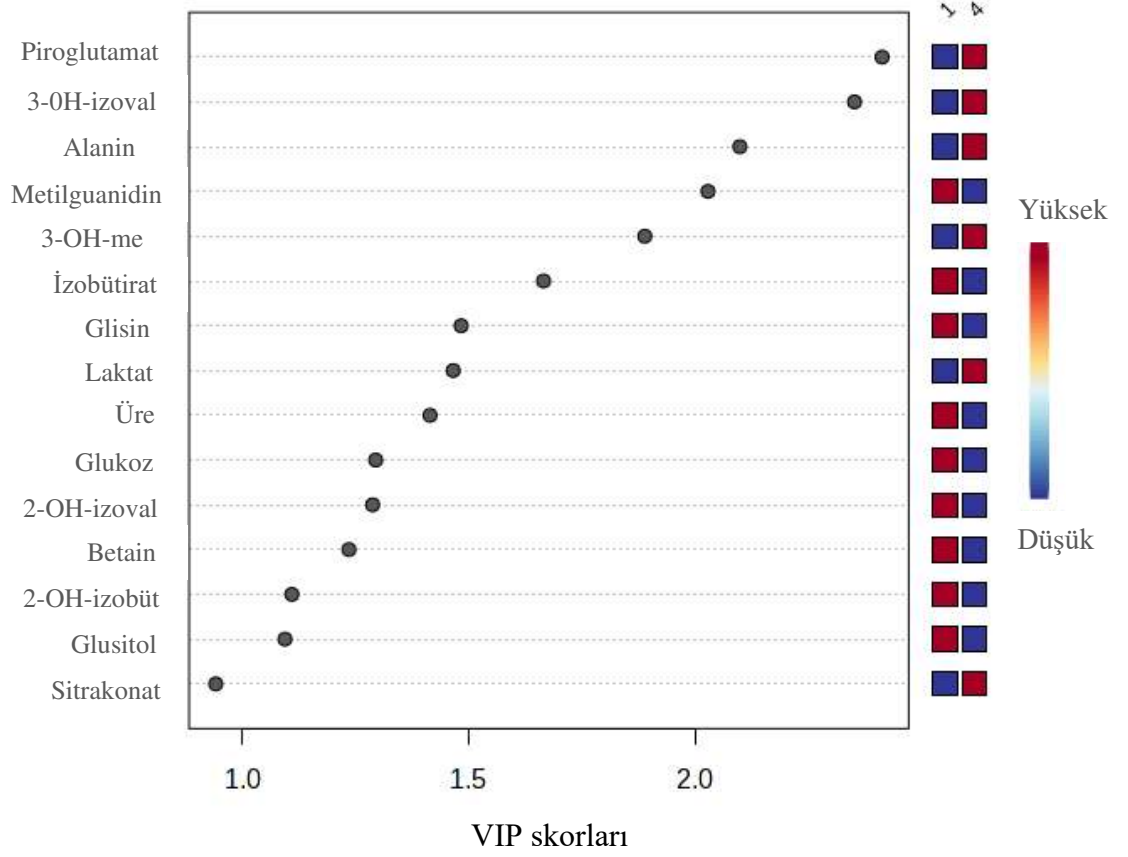
Şekil 4.4 AML ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği. 1-AML, 4-Kontrol.



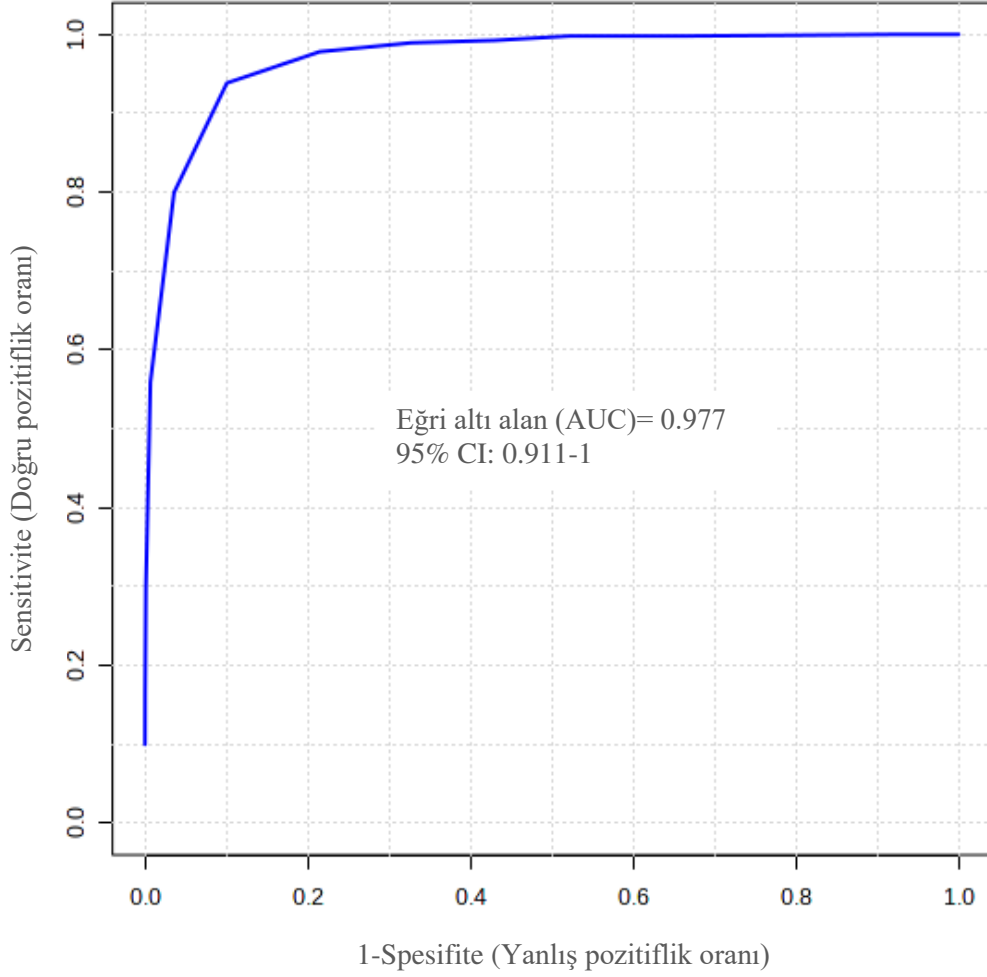
Tablo 4.5 AML-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları (*3 bileşenli modelde Q2 değeri ile belirlenen prediktif başarı en yüksek bulunmuştur).

	1 bileşen	2 bileşen	3 bileşen *	4 bileşen	5 bileşen
Doğruluk (Accuracy)	0.89061	0.92545	0.96182	0.98	0.8903
R ²	0.7251	0.8275	0.87648	0.89531	0.91007
Q ²	0.59071	0.66793	0.68163	0.64608	0.54521

Şekil 4.5 AML-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru>1 bulunan metabolitler. 1-AML, 4-Kontrol. Kırmızı renk, *p* anlamlılık değeri grupta yüksek olan metabolitleri ifade etmektedir.



Şekil 4.6 AML-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşılan 10 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli (MetaboAnalyst, ROC analizi).



Tablo 4.6 AML hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları (*0.05 önem düzeyinde, ** 0.01 önem düzeyinde, r_s : Spearman korelasyon katsayısı).

AML (r_s)	LY MP	MO NO	Karyotip	T G	LDH	C re	Glu	Ala	Val	Leu	Phe	Gly	O- AC
ELN-Risk			0.72**										
NEU	- 0.66 **			0.6 **									
MONO	- 0.74 **												
PLT			-0.52*										
N/L		0.42 *		0.7 **	0.41*								
WBC					0.6**								
LDH	- 0.51 **	0.4*											
TG	- 0.7* *		0.61*										
Egfr						- 0.78 **					- 0.59 *		- 0.47*
AST	- 0.42 *	0.55 **			0.59**								
PyrG			-0.51*				- 0.46*						
Phe						0.68 **			0.63 **	0.62* *		0.53 *	
O-PEA						0.82 *					1**		0.86*
LAK								0.62 **					
Fum		- 0.53 **											
Leu						0.51 **		0.4*	0.44 *				
Val							0.43*						
Metil-guanidin				- 0.5 *					0.55 **	0.62* *			
Tyr								0.41 *		0.67* *			
Tau-M-histidin						0.48 *					0.73 **	0.74 **	0.64**
O-AC						0.57 **					0.71 **	0.5*	

Tablo 4.7 KLL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler ($p < 0.05$).

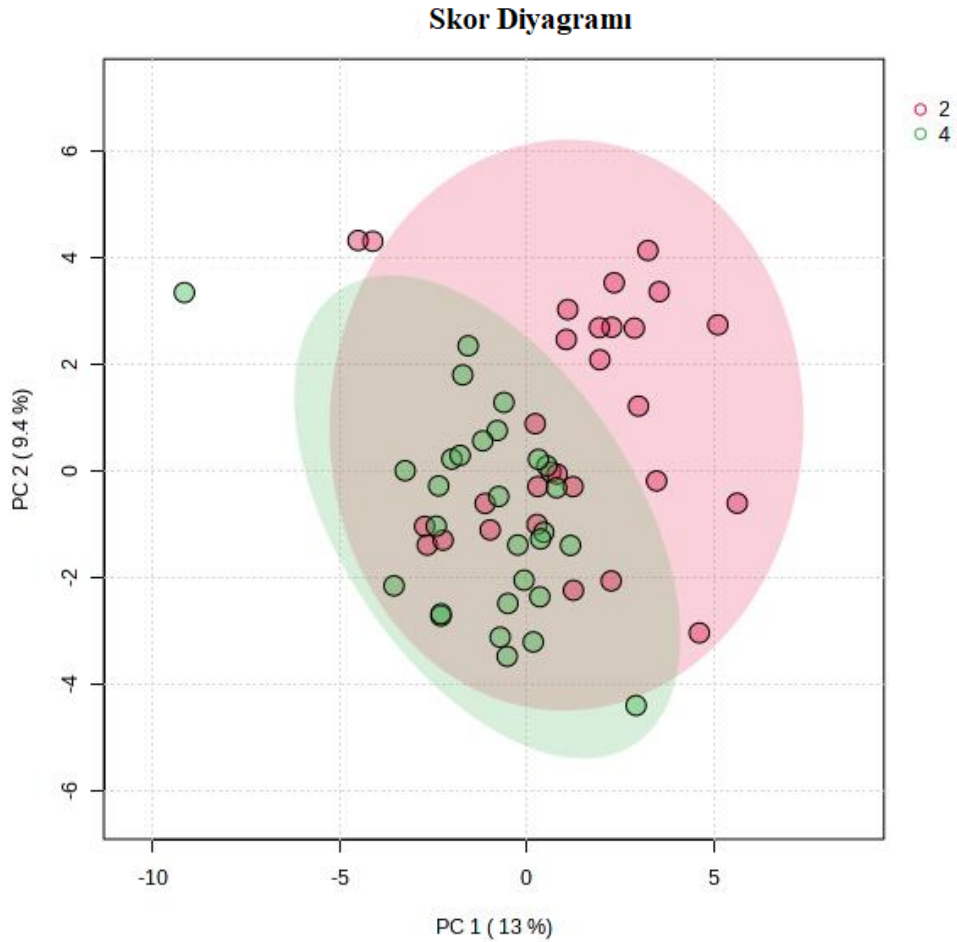
	t istatistiği	p değeri	$-\log_{10}(p)$	Yanlış bulgu oranı (FDR)
Fumarat	-8.9568	2.12E-12	11.674	1.08E-10
Piroglutamat	-4.4355	4.34E-05	4.362	0.000945
Betain	4.2895	7.15E-05	4.146	0.000945
Metilguanidin	4.2788	7.41E-05	4.1302	0.000945
Üre	4.1639	0.000109	3.9624	0.001112
Glisin	3.2232	0.002116	2.6746	0.017983
Kreatinin	2.8628	0.005898	2.2293	0.042913
Asetat	-2.8144	0.006732	2.1719	0.042913

Tablo 4.8 KLL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

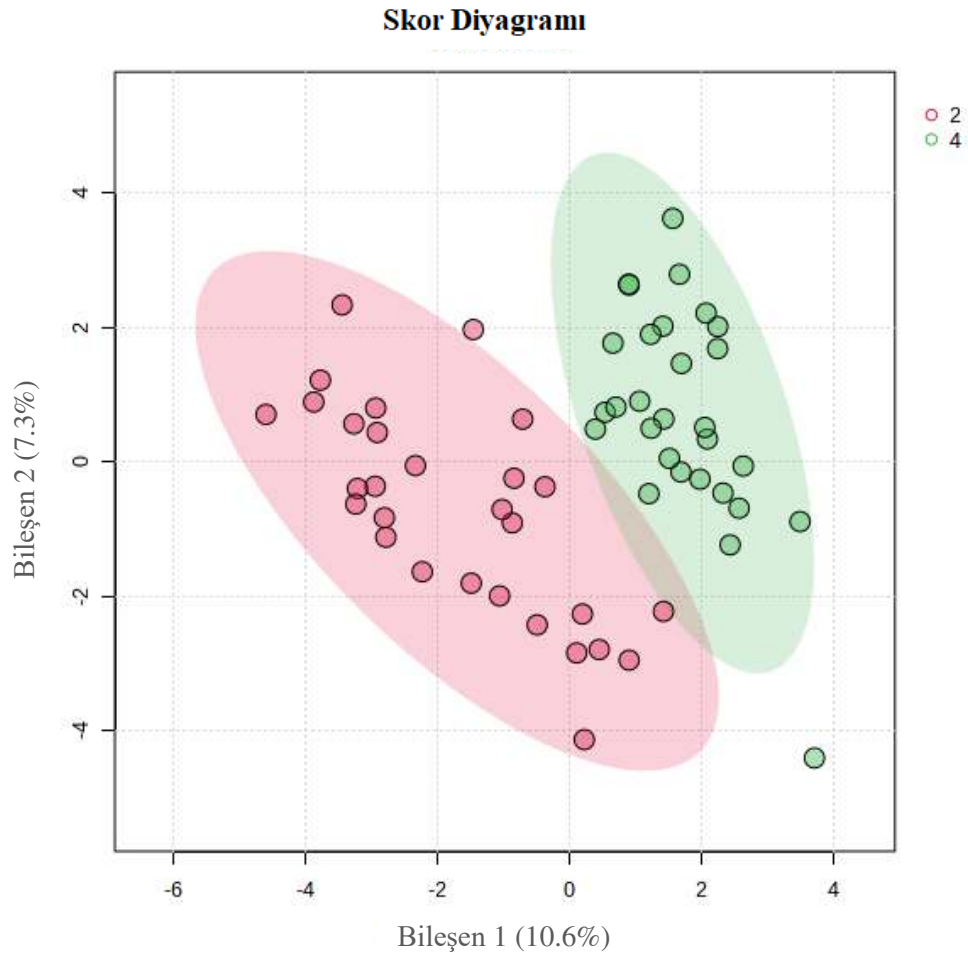
Yolak Adı	Eşleşme	p değeri	$-\log(p)$	Holm p	Yanlış bulgu oranı (FDR)	Etki (impact)
Tirozin metabolizması	3/42	1.3665E-10	9.8644	5.3295E-9	5.3295E-9	0.16435
Arjinin biyosentezi	3/14	6.5827E-10	9.1816	2.5014E-8	1.2836E-8	0.11675
Pirüvat metabolizması	3/22	2.1826E-9	8.661	8.0756E-8	2.8374E-8	0.06065
Sitrat siklusu (TCA)	3/20	7.0613E-9	8.1511	2.5421E-7	6.8847E-8	0.11257
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	4/28	1.3323E-7	6.8754	4.663E-6	1.0392E-6	0.19952
Glutasyon metabolizması	3/28	2.7219E-5	4.5651	9.2543E-4	1.7692E-4	0.11548
Glisin, serin ve treonin metabolizması	5/33	6.1316E-5	4.2124	0.0020234	3.4162E-4	0.39485
Pürin metabolizması	1/65	1.0904E-4	3.9624	0.0034892	5.3157E-4	0.0
Primer safra asiti biyosentezi	1/46	0.0021156	2.6746	0.065584	0.0091677	0.00758
Porfirin ve klorofil metabolizması	2/30	0.0078772	2.1036	0.23632	0.02875	0.0
Glikoliz / Glukoneogenez	4/26	0.0081091	2.091	0.23632	0.02875	0.11518
Gliokzalit ve dikarboksilat metabolizması	6/32	0.016359	1.7862	0.45805	0.053166	0.209

Ubikinin ve diğer terpenoid-kinon biyosentezi	1/9	0.022363	1.6505	0.60379	0.06536	0.0
Aminoasıl-tRNA biyosentezi	7/48	0.024599	1.6091	0.63958	0.06536	0.0
Fenilalanin, tiroin ve triptofan biyosentezi	2/4	0.026814	1.5716	0.67035	0.06536	1.0
Fenilalanin metabolizması	2/10	0.026814	1.5716	0.67035	0.06536	0.35714

Şekil 4.7 KLL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi (PCA) skor grafiği. 2-KLL, 4-Kontrol; en yüksek iki varyans açıklayıcı bileşenler PC1 ve PC2.



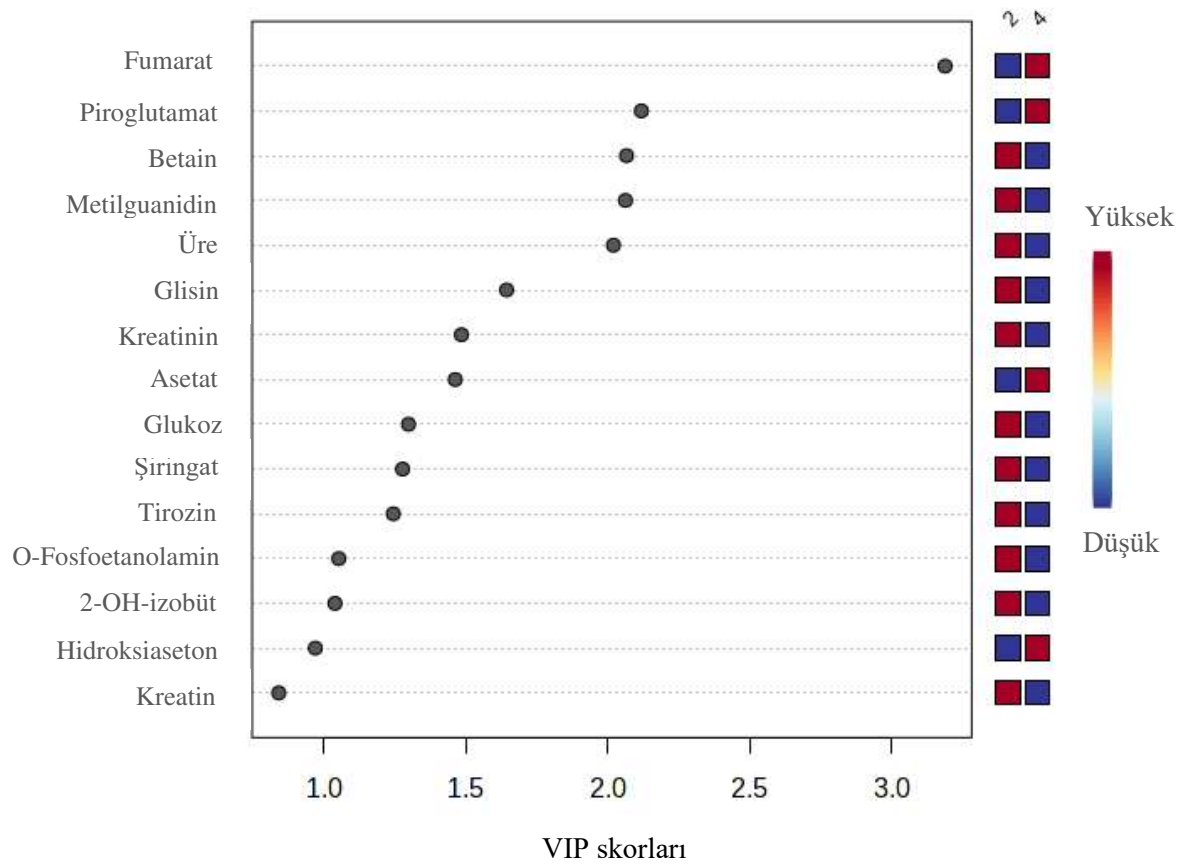
Şekil 4.8 KLL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği. 2-KLL, 4-Kontrol.



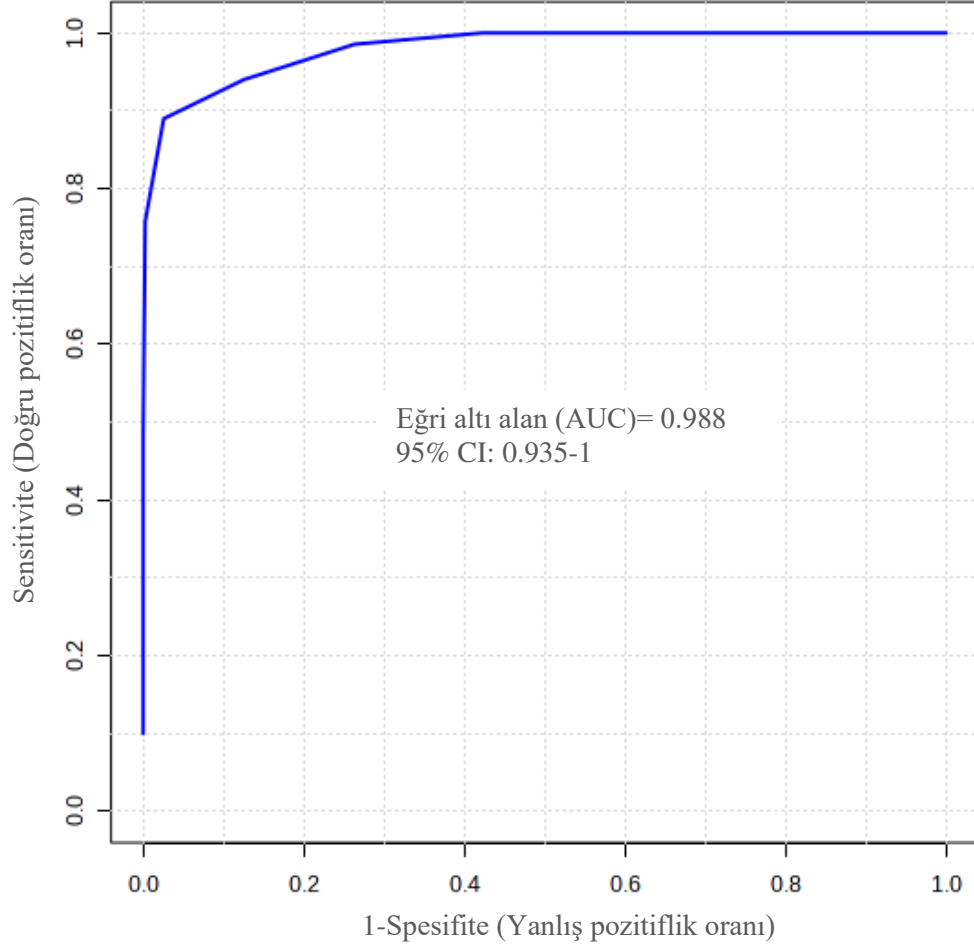
Tablo 4.9 KLL-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları (*3 bileşenli modelde Q2 değeri ile belirlenen prediktif başarı en yüksek bulunmuştur).

	1 bileşen	2 bileşen	3 bileşen *	4 bileşen	5 bileşen
Doğruluk (Accuracy)	0.84545	0.85909	0.91364	0.86061	0.87879
R2	0.64703	0.82696	0.87239	0.90932	0.928
Q2	0.46359	0.58883	0.61936	0.59525	0.54586

Şekil 4.9 KLL-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru>1 bulunan metabolitler. 2-KLL, 4-Kontrol. Kırmızı renk, p anlamlılık değeri grupta yüksek olan metabolitleri ifade etmektedir.



Şekil 4.10 KLL-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşan 3 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli (MetaboAnalyst, ROC analizi).



Tablo 4.10 KLL hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları (*0.05 önem düzeyinde, ** 0.01 önem düzeyinde, r_s : Spearman korelasyon katsayısı).

KLL (r_s)	Evre (Rai)	WBC	NEU	LYMP	N/L	LDH	Cre	PyrG	Ala	Val	Leu	Tyr	Fum
IPI-Risk	0.47*									-.46*			
FISH			-.48*		-.50*								
LYMP		.82**											
NEU		-.81**		-.99**									
MONO		-.78**		-.87**									
N/L		-.82**											
PLT	-.42**		.45*	-.43*	.46*			-.63**			.44*		
eGFR							-.86*						
LAK	-.44*	-.37*	.48**	-.43*	.50**				0.4*	.54**	.5**		
Glu		-.42*						-.41*				.46*	
AST						.68**							
Metil-Guanidin		-.053*	.51*	-.54**	.48*			-.52*					
Val									.51**		.67**		
Leu			.46*	-.45*	.47*								
Phe						.43*					.41*		.55**
Tau-M-H	-.42*							-.52*					-.45*
O-PEA												.73*	
O-AC			.41*	-.41*	0.41						.43*		

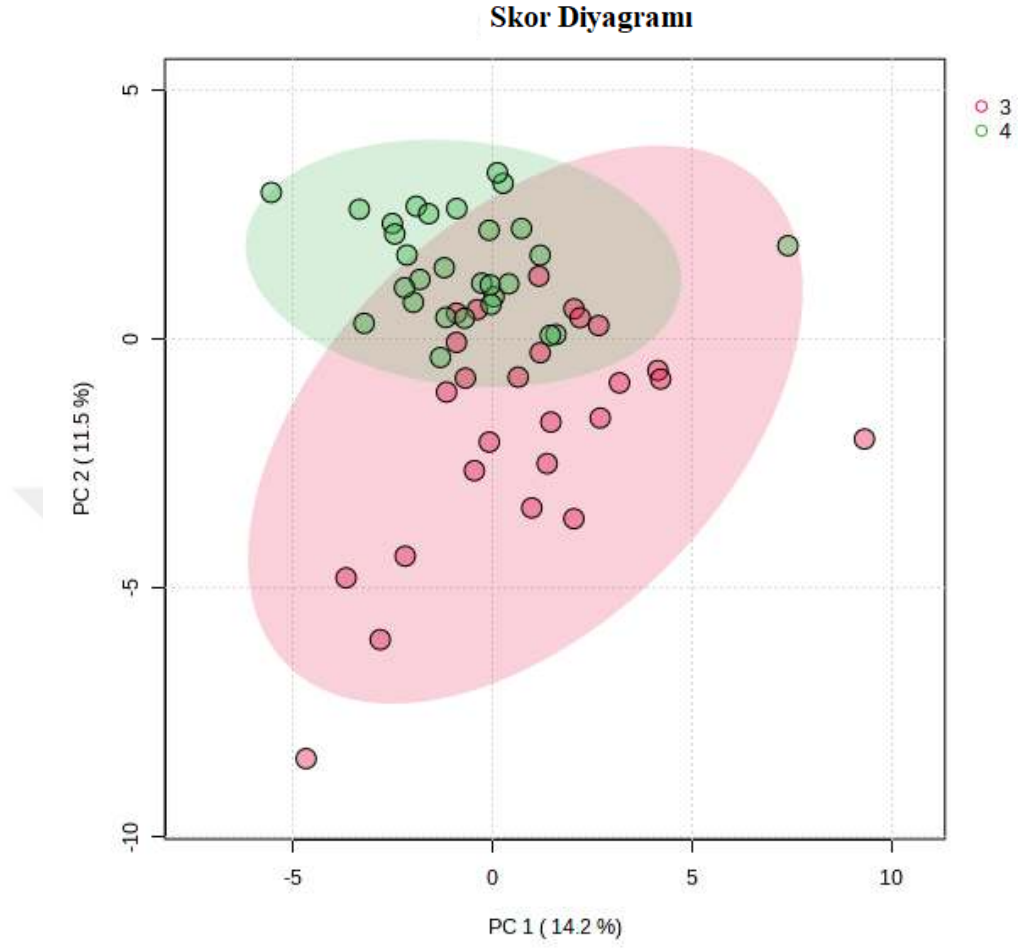
Tablo 4.11 NHL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan metabolitler ($p < 0.05$).

	t istatistiği	p değeri	-log10(p)	Yanlış bulgu oranı (FDR)
Asetat	-6.8869	6.86E-09	8.1638	3.98E-07
Fumarat	-5.1324	4.16E-06	5.381	0.000121
Asetoasetat	-4.7169	1.78E-05	4.7488	0.000345
Piroglutamat	-3.9941	0.000201	3.6959	0.002921
Glutamat	3.8912	0.000281	3.552	0.003254
O-fosfoetanolamin	-3.7974	0.000378	3.4224	0.003655
Glutamin	3.3583	0.001458	2.8362	0.012082
Eritritol	-3.2851	0.001811	2.7421	0.013129
Süksinat	2.9898	0.004227	2.374	0.02724
Kreatin	2.9003	0.005416	2.2663	0.031411
3-OH-3-metilglutarat	-2.766	0.007795	2.1082	0.037771
Betain	2.765	0.007815	2.1071	0.037771

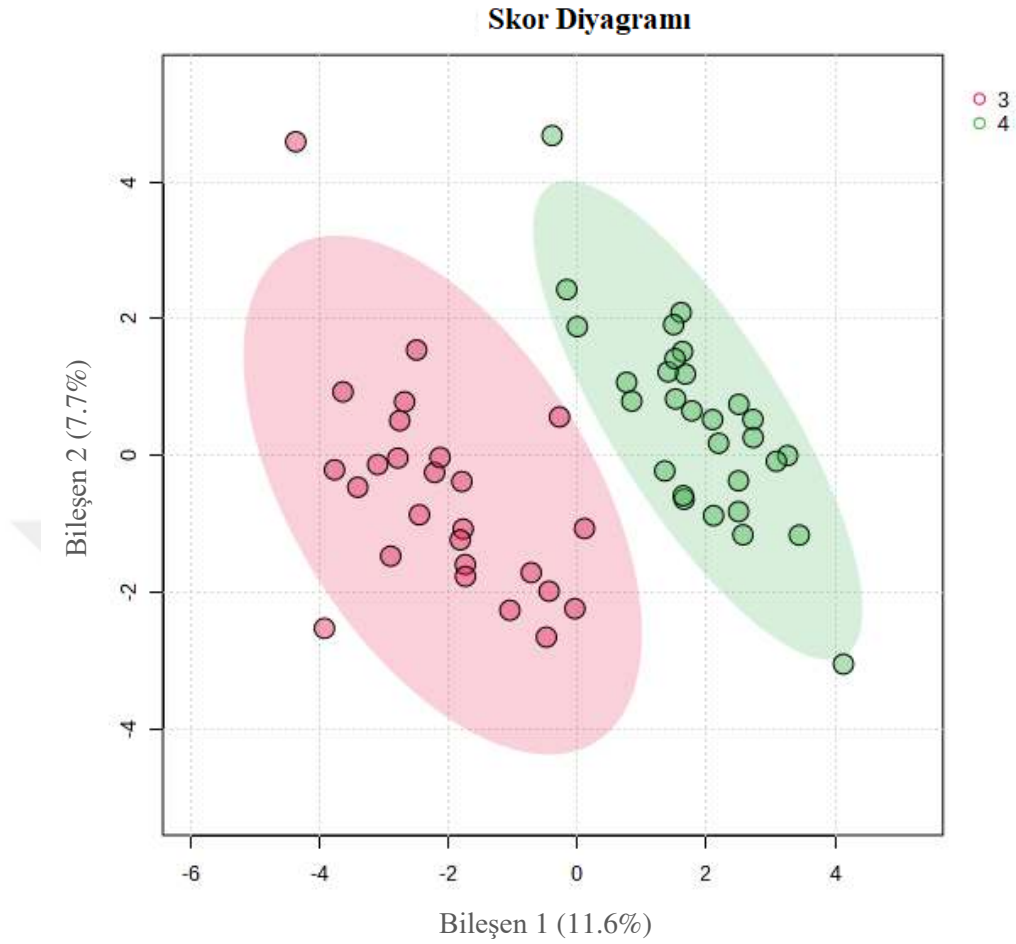
Tablo 4.12 NHL grubunda kontrollere göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

Yolak Adı	Eşleşme	<i>p</i> değeri	-log(p)	Holm <i>p</i>	Yanlış bulgu oranı (FDR)	Etki (impact)
Pirüvat metabolizması	3/22	1.0457E-11	10.981	4.0782E-10	4.0782E-10	0.06065
Tirozin metabolizması	3/42	2.4651E-11	10.608	9.3674E-10	4.807E-10	0.16435
Arjinin biyosentezi	3/14	1.5779E-10	9.8019	5.8381E-9	2.0512E-9	0.0
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	4/28	8.02E-10	9.0958	2.8872E-8	7.8195E-9	0.11618
Sitrat siklusu (TCA)	3/20	4.3663E-9	8.3599	1.5282E-7	3.4057E-8	0.11257
Glutasyon metabolizması	2/28	7.376E-7	6.1322	2.5079E-5	4.7944E-6	0.09582
Glikoliz / Glukoneogenez	4/26	2.5506E-6	5.5934	8.4169E-5	1.3276E-5	0.11518
Gliokzalat ve dikarboksilat metabolizması	6/32	2.7233E-6	5.5649	8.7147E-5	1.3276E-5	0.209
Glisin, serin ve treonin metabolizması	4/33	9.9577E-4	3.0018	0.030869	0.004315	0.32225
Pürin metabolizması	2/65	0.0077013	2.1134	0.23104	0.030035	0.0
Pentoz ve glukuronat ara-çevirimi	1/18	0.01635	1.7865	0.47415	0.057968	0.17188
Selenobileşik metabolizması	1/20	0.021795	1.6616	0.61027	0.070835	0.0
Arjinin ve prolin metabolizması	3/38	0.039339	1.4052	1.0	0.11802	0.03558
Galaktoz metabolizması	1/27	0.044664	1.35	1.0	0.12442	0.0

Şekil 4.11 NHL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan temel bileşen analizi (PCA) skor grafiği. 3-NHL, 4-Kontrol; en yüksek iki varyans açıklayıcı bileşenler PC1 ve PC2.



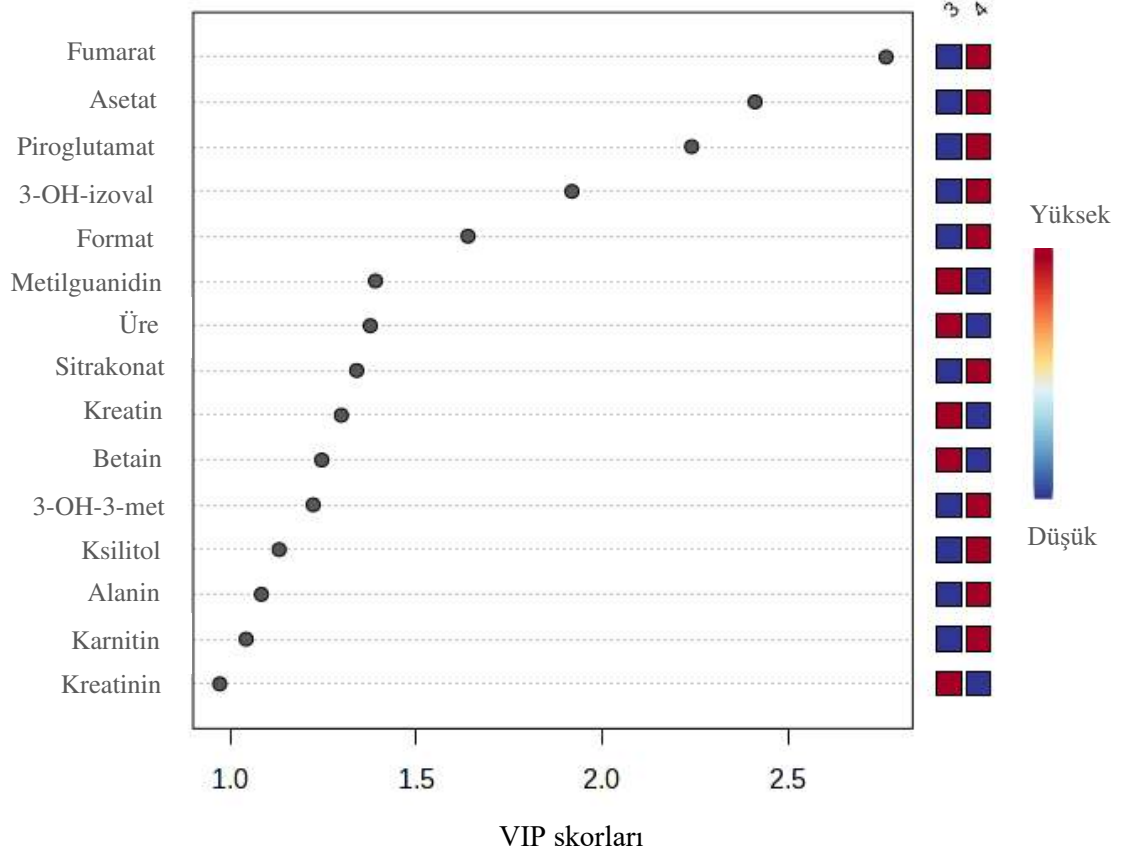
Şekil 4.12 NHL ve kontrol grubu karşılaştırmasında uygulanan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS-DA) skor grafiği. 3-NHL, 4-Kontrol.



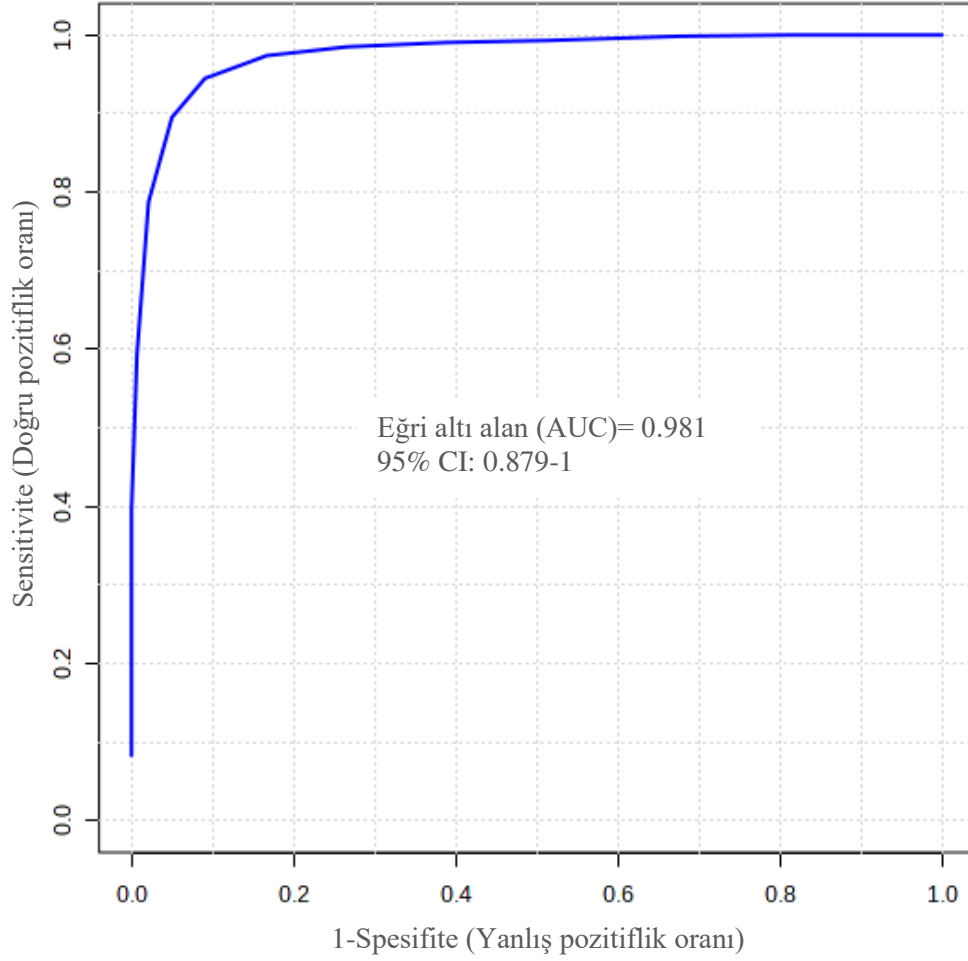
Tablo 4.13 NHL-kontrol karşılaştırmasında PLS-DA modeline ait çapraz-validasyon sonuçları (*5 bileşenli modelde Q2 değeri ile belirlenen prediktif başarı en yüksek bulunmuştur).

	1 bileşen	2 bileşen	3 bileşen	4 bileşen	5*bileşen
Doğruluk (Accuracy)	0.90909	0.94545	0.94545	0.96364	0.96364
R2	0.75318	0.87571	0.92303	0.94567	0.96366
Q2	0.62827	0.71205	0.70494	0.70118	0.73102

Şekil 4.13 NHL-kontrol karşılaştırmasındaki PLS-DA modelinde VIP skoru>1 bulunan metabolitler. 3-NHL, 4-Kontrol. Kırmızı renk, p anlamlılık değeri grupta yüksek olan metabolitleri ifade etmektedir.



Şekil 4.14 NHL-kontrol karşılaştırmasında en yüksek eğri altı alan (AUC) değerine ulaşılan 5 metabolit ile oluşturulmuş biyobelirteç modeli (MetaboAnalyst, ROC analizi).



Tablo 4.14 NHL hasta serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları (*0.05 önem düzeyinde, ** 0.01 önem düzeyinde, r_s : Spearman korelasyon katsayısı).

NHL (r_s)	Evre	LY MP	Car	LD H	LAK	PLT	Cre	Val	Leu	PyrG	Tau-M-H	Phe
---------------	------	-------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	------	---------	-----

IPI-Risk	0.55*			0.61*							
FISH									0.61*		
NEU		-0.73**				0.47*				-0.48*	
MONO		-0.52**									
N/L										-0.49*	
WBC		0.52**	-0.4*					0.4*			
LDH						-0.4*					
LAK						0.44*					
Glu		0.41*									
eGFR							-0.89**				
AST							0.44*				
Ala					0.48*	0.53**					0.5*
Leu											
Fum					0.61**			0.51*	0.65*		
Tyr					0.64**						
Gly			0.54*								
Metil-Guanidin		0.45*									
O-PEA							-0.9*				
O-AC		0.42*				-0.46*		0.46*	-0.47*		
PyrG						0.54**	-0.46*				-
Tyr			-0.52*	0.45*	0.65*						

Tablo 4.15 Kontrol serumlarında 1D NMR metoduyla kimliklendirilen metabolit konsantrasyonlarının (mM) serum rutin parametreleri ile korelasyonları (*0.05 önem düzeyinde, ** 0.01 önem düzeyinde, r_s : Spearman korelasyon katsayısı).

Kontrol (r_s)	WBC	N/L	LDH	Cre	eGFR	Leu	Ala	Fum	Phe	PyrG	Tyr
Car	0.45*	0.42*								0.42*	
PLT	0.51*		0.84**	-0.7**	0.5**						
eGFR				-0.6**							
AST				0.57**							
TG						-0.54*					
Glu							0.53**	0.5**	0.64**		
LAK							0.56**	0.49**			
Fum							0.5**			0.4*	
Tyr							0.51**	0.42*		0.53**	

Val								0.48**			0.41*
Phe						0.42*	0.5*				
O-AC								0.42*			
O-PEA			1**								

4.3. Serum LC-HRMS Analizi Sonuçları

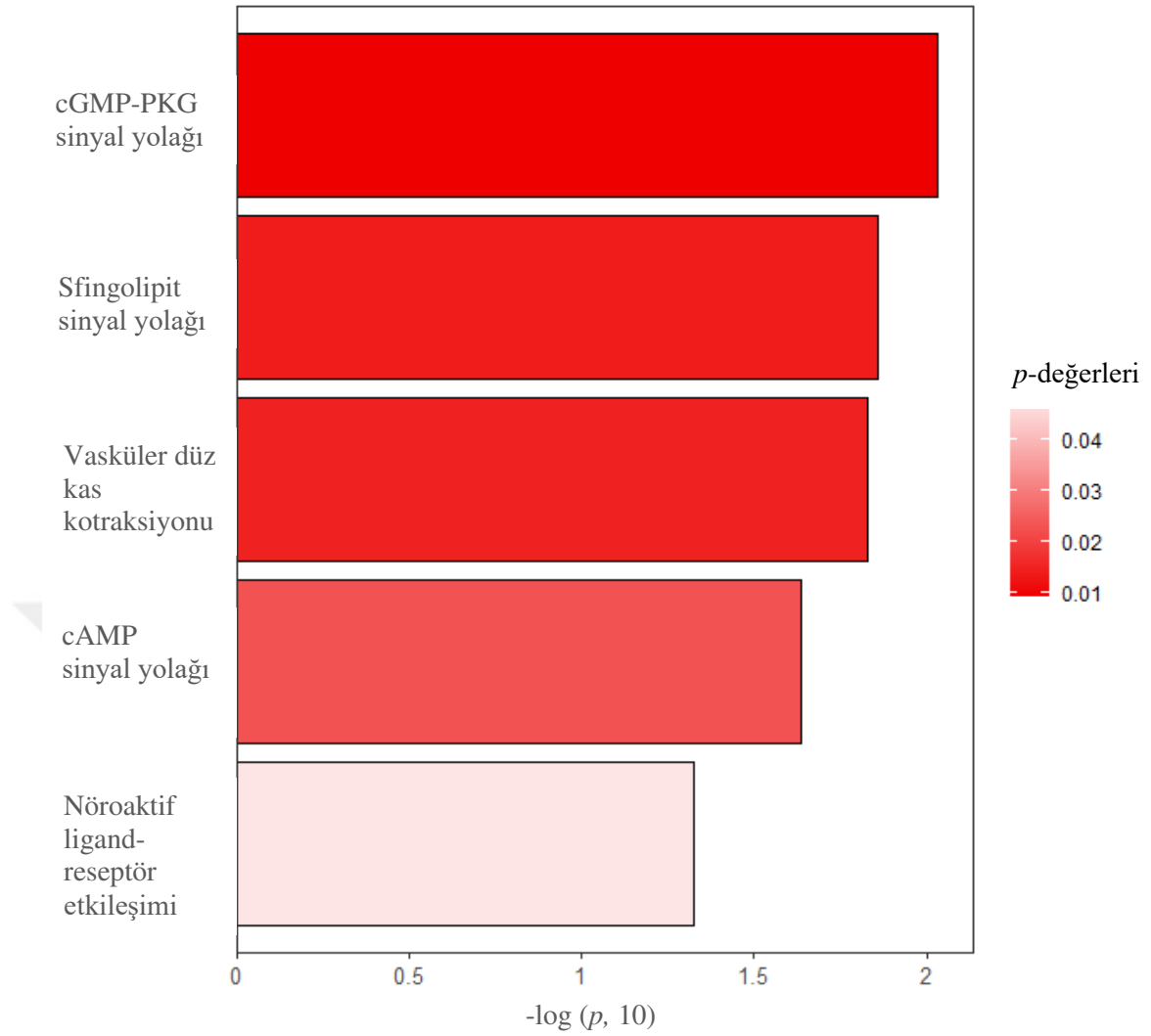
Tablo 4.16 AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	<i>p</i>	Ayarl. <i>p</i>	Bileşik	Eklenti (Adduct)
2,189637219	0,001640359	0,015861266	Pro-Phe	(M+H)+
1,549763155	0,008873707	0,046263518	1-Stearoil-2-dokosaheksaenoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
1,527767142	0,000880213	0,010522547	1-Palmitoil-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfoetanolamin	(M+H)+
1,457988689	0,006799821	0,040644383	C8:0 AC	(M+H)+
1,421737242	0,007816055	0,043736647	Asetil-L-karnitin	(M+H)+
1,364641709	0,006715678	0,040644383	C6:0 AC	(M+H)+
1,26471948	0,002754934	0,021310224	1-(1Z-Oktadesenil)-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
1,121084103	0,00845169	0,045816349	(2R)-3-Hidroksiizovaleroilkaritin	(M+H)+
1,059655865	0,008536126	0,045816349	1-(1Z-Oktadesenil)-2-(9Z-oktadesenil)-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+Na)+
1,030165249	0,001868295	0,015861266	Dokosatrienoik asit	(M+NH4)+
1,025132998	0,007044845	0,041173203	DL-İndol-3-laktik asit	(M+H)+
0,990504943	2,23891E-05	0,001472085	Oleamid	(M+H)+

0,91247667 3	0,003 1303 11	0,023522 054	Cis-13-Dokozenoik asit	(M+H- H ₂ O)+
0,90618100 5	0,007 5722 57	0,043293 557	8-Metil-2-(triflorometil)kinolin-4-ol	(M+H)+
0,83018364 7	0,005 4026 04	0,035522 122	Fenilalanin	(2M+H)+
0,81957815 8	0,001 8496 78	0,015861 266	Stearidonik asit etil ester	(M+H- 2H ₂ O)+
0,63620746	0,008 9712 53	0,046263 518	Hekzaetilen glikol	(M+H)+
0,57515150 5	0,006 4207 26	0,040644 383	MMV023985	(M+H)+
0,55070355 2	0,010 1171 8	0,049649 284	Etil pentadekanoat	(M+H)+
0,54407667 6	0,000 4795 14	0,007044 095	Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala	(M+H)+
0,53555192 4	0,010 1941 5	0,049649 284	14-Metilpentadekanoik asit	(M+H- H ₂ O)+
0,50885752 6	0,001 1103 21	0,012696 285	Dodeka-2(E),4(E)-dienoik asit	(M+NH ₄)+
0,48486950 2	0,000 5088 89	0,007044 095	Pentaetilen glikol	(M+H)+
0,45853252 7	0,002 3309 61	0,018577 054	Lökotrien D4 metil ester	(M+H)+
0,37518015 6	0,004 2390 13	0,028586 166	Palmitamid	(M+H)+
- 0,70626133 8	0,009 4836 95	0,047965 613	2-Araşidonil gliserol eter	(M+H)+
- 0,77751242 7	1,419 5E- 05	0,001244 429	Tetraglim	(M+NH ₄)+
- 0,93367892 2	0,001 1848 17	0,012983 618	Adenosin	(M+H)+
- 1,00122744 9	0,000 2386 23	0,004827 524	2-metilkinolin-8-ol	(M+H)+
- 1,22338639 1	0,003 4659 1	0,024636 063	Met(O)-Thr	(M+H)+

- 1,27839768 8	4,909 32E- 05	0,001912 907	Pro-Ala	(M+H)+
- 1,82510958 2	0,000 1958 68	0,004292 782	N-Oleoilglisin	(M+H)+
- 1,87572494 8	0,003 7162 54	0,025720 391	İnozin	(M+H)+
- 1,99567347 6	0,000 7749 77	0,009705 667	Tyr-Ala(Dstereo)-Phe(Amit)	(M+H)+
- 2,07343862 4	0,001 8695 79	0,015861 266	5-Kolanik asit-3-ol-6-7-dion	(M+H)+
- 2,09361595 6	6,615 93E- 05	0,002174 988	D-Piroglutamik asit	(2M+H)+
- 2,22272371 6	0,000 1030 26	0,002709 592	Androsta-1,4-dien-3-on, 4-kloro-6,17- dihidroksi-17-metil-, (6.beta.,17.beta.)-	(M+H)+
- 3,69876788 5	5,091 39E- 05	0,001912 907	2-Metil-N-(4-Metilfenil)alanin	(M+H)+

Şekil 4.15 AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).



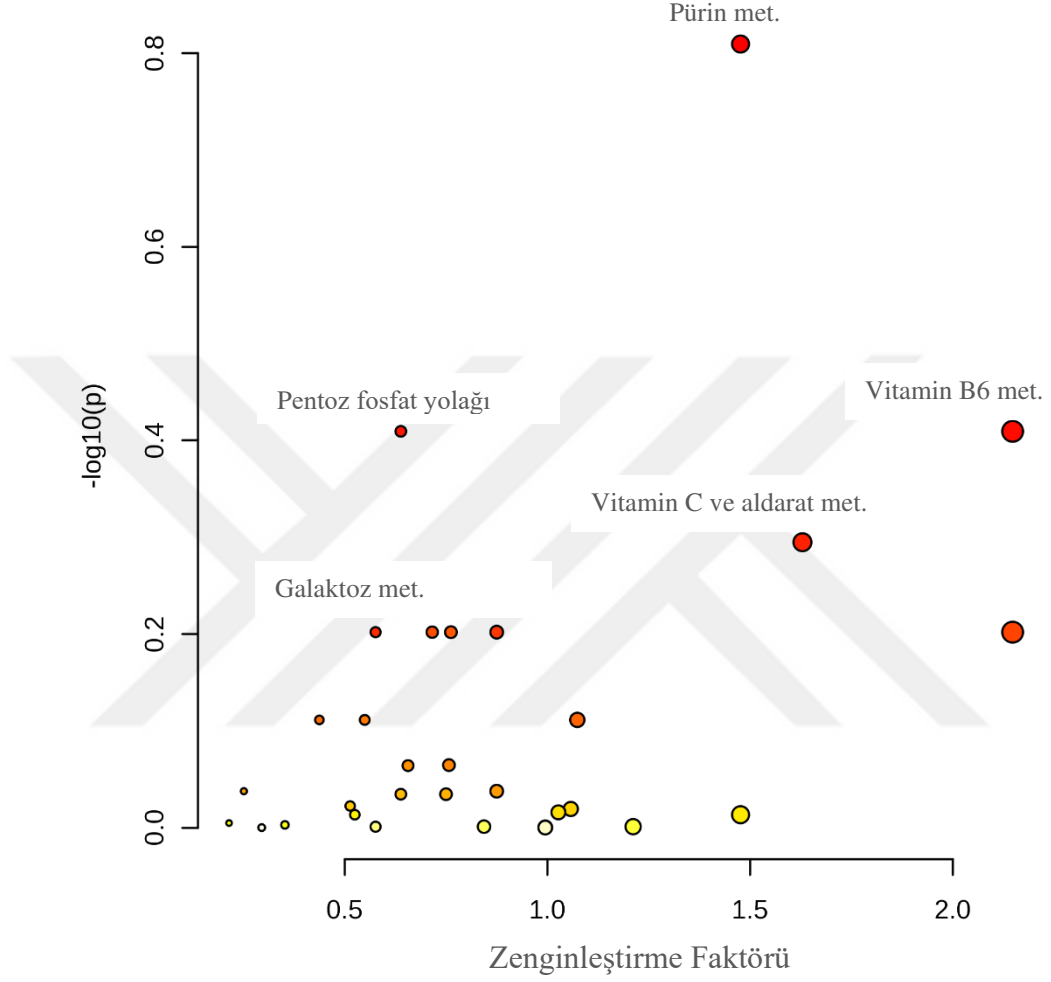
Tablo 4.17 AML-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0., Mummichog algoritması kullanılarak).

AML	Yolak (Total)	Total vuru (Hits)	Anlamalı vuru (Hits)	Beklenen	p (Fisher)	Ayarlı. p .Fisher
Pürin metabolizması	80	8	5	3.3855	0.15504	1
Askorbat (Vitamin C) ve aldarat metabolizması	29	4	2	1.2273	0.50716	1
Gliserofosfolipit metabolizması	156	17	5	6.6018	0.86174	1
Yağ asidi metabolizması	63	9	2	2.6661	0.92353	1
Yağ asidi aktivasyonu	74	9	2	3.1316	0.92353	1
Lökrien metabolizması	92	18	4	3.8934	0.96426	1
Vitamin A (retinol) metabolizması	67	14	3	2.8354	0.95654	1

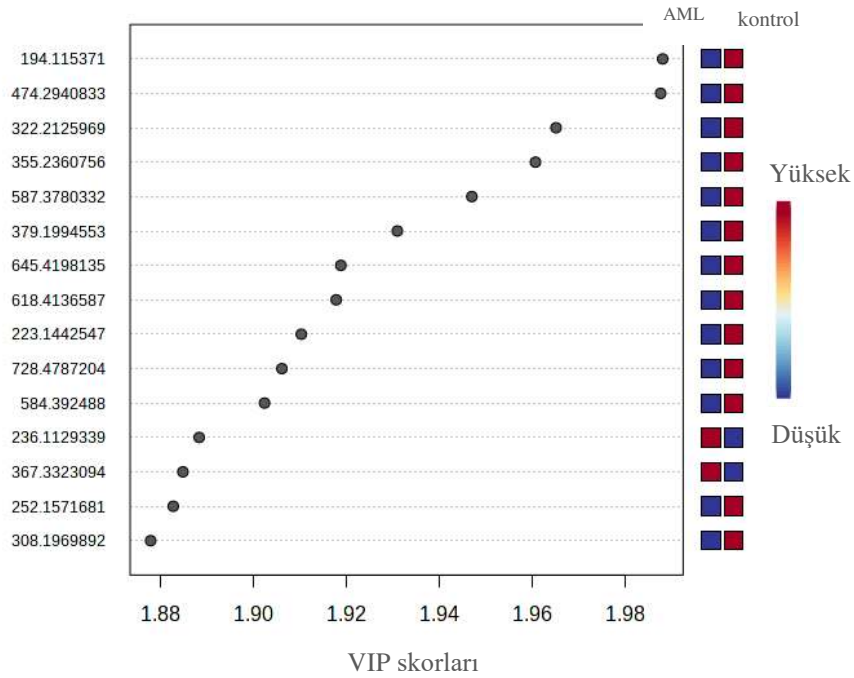
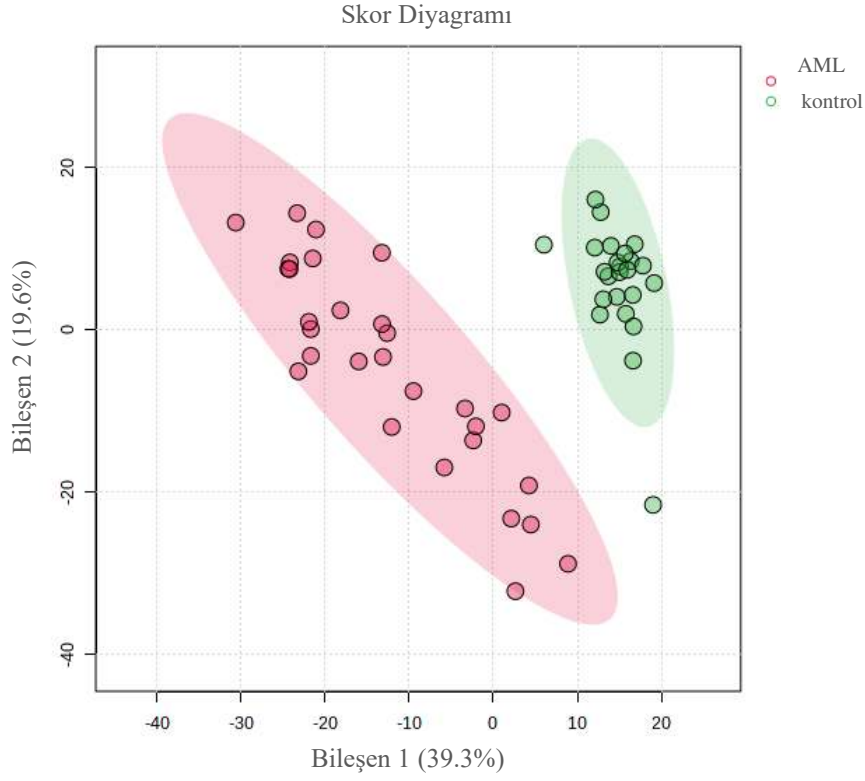
Araşidonattan prostaglandin formasyonu	78	25	4	3.3009	0.99762	1
C21-steroid hormon biyosentezi	112	25	4	4.7398	0.99762	1
Safra asidi biyosentezi	82	17	2	3.4702	0.9978	1
Androjen ve östrojen biyosentezi	95	28	4	4.0203	0.99933	1
Araşidonik asit metabolizması	95	31	4	4.0203	0.99982	1
Tirozin metabolizması	160	23	2	6.7711	0.99988	1
Vitamin D3 (kolekalsiferol) metabolizması	16	7	1	0.67711	0.96971	1
EPA kaynaklı anti-enflamatuvar metabolit formasyonu	27	5	1	1.1426	0.91691	1
Linoleat metabolizması	46	6	1	1.9467	0.94978	1
Galaktoz metabolizması	41	2	1	1.7351	0.62811	1
3-okzo-10R-oktadekatrienolat beta-oksidasyonu	27	2	1	1.1426	0.62811	1
Biopterin metabolizması	22	3	1	0.93102	0.77388	1
Vitamin E metabolism	54	3	1	2.2852	0.77388	1
Kafein metabolizması	11	2	1	0.46551	0.62811	1
Fruktoz ve mannoz metabolizması	33	2	1	1.3965	0.62811	1
Ksenobiyotik metabolizması	110	9	1	4.6551	0.98905	1
Doymuş yağ asidi beta-oksidasyonu	36	4	1	1.5235	0.86279	1
Gliserofingolipit metabolizması	67	10	1	2.8354	0.99344	1
Arjinin ve prolin metabolizması	45	7	1	1.9044	0.96971	1
Porfirin metabolizması	43	3	1	1.8197	0.77388	1
Vitamin B6 (piridoksin) metabolizması	11	1	1	0.46551	0.38957	1
İlaç metabolizması - diğer enzimler	31	2	1	1.3119	0.62811	1
Pentoz fosfat yolağı	37	1	1	1.5658	0.38957	1

Methiyonin ve sistein metabolizması	94	5	1	3.978	0.91691	1
-------------------------------------	----	---	---	-------	---------	---

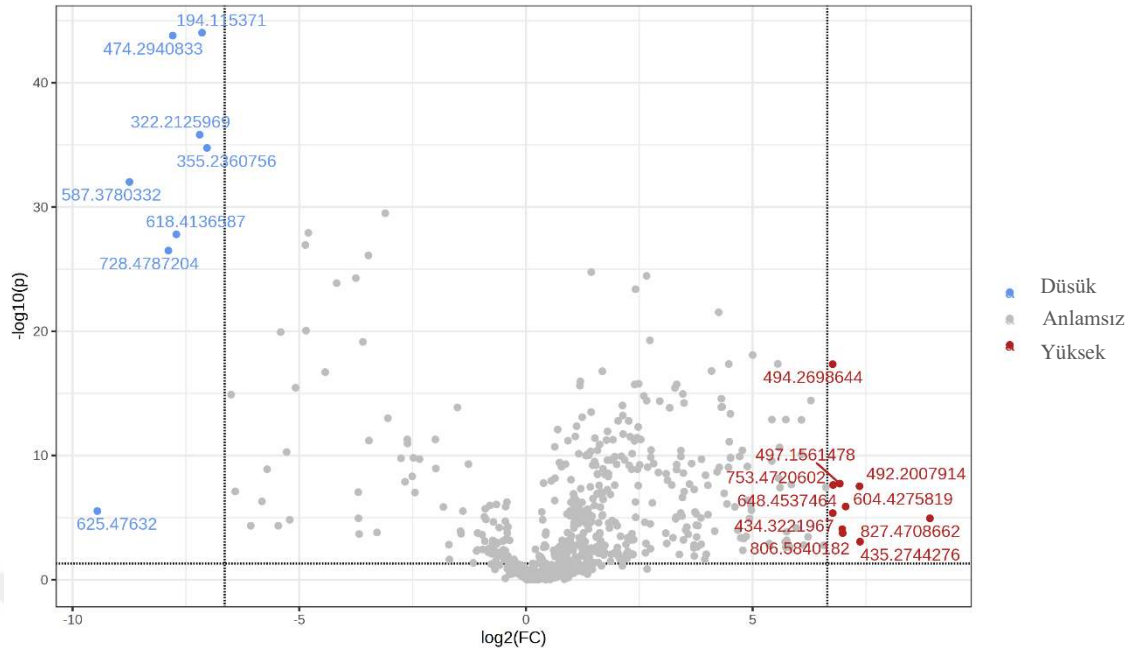
Şekil 4.16 AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç gösterimi.



Şekil 4.17 AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.



Şekil 4.18 AML-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Tablo 4.18 KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	<i>p</i>	Ayarlı <i>p</i>	Bileşik	Ekleni (Adduct)
1,737652756	0,000358699	0,003493992	1-Stearoil-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfokolin	(2M+H)+
1,714019031	0,000114723	0,001997646	Pro-Phe	(M+H)+
1,551347052	0,009111376	0,026721998	Gly-Phe	(M+H)+
1,418708447	0,002596671	0,011570815	13,14-Dihidro-15-ketoprotaglandin A2	(M+H)+
1,354112941	0,001573759	0,008622885	C8:0 AC	(M+H)+
1,345166885	0,003747715	0,014711178	C12:1 AC	(M+H)+
1,344248559	0,000400505	0,003511091	1-Palmitoil-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfoetanolin	(M+H)+

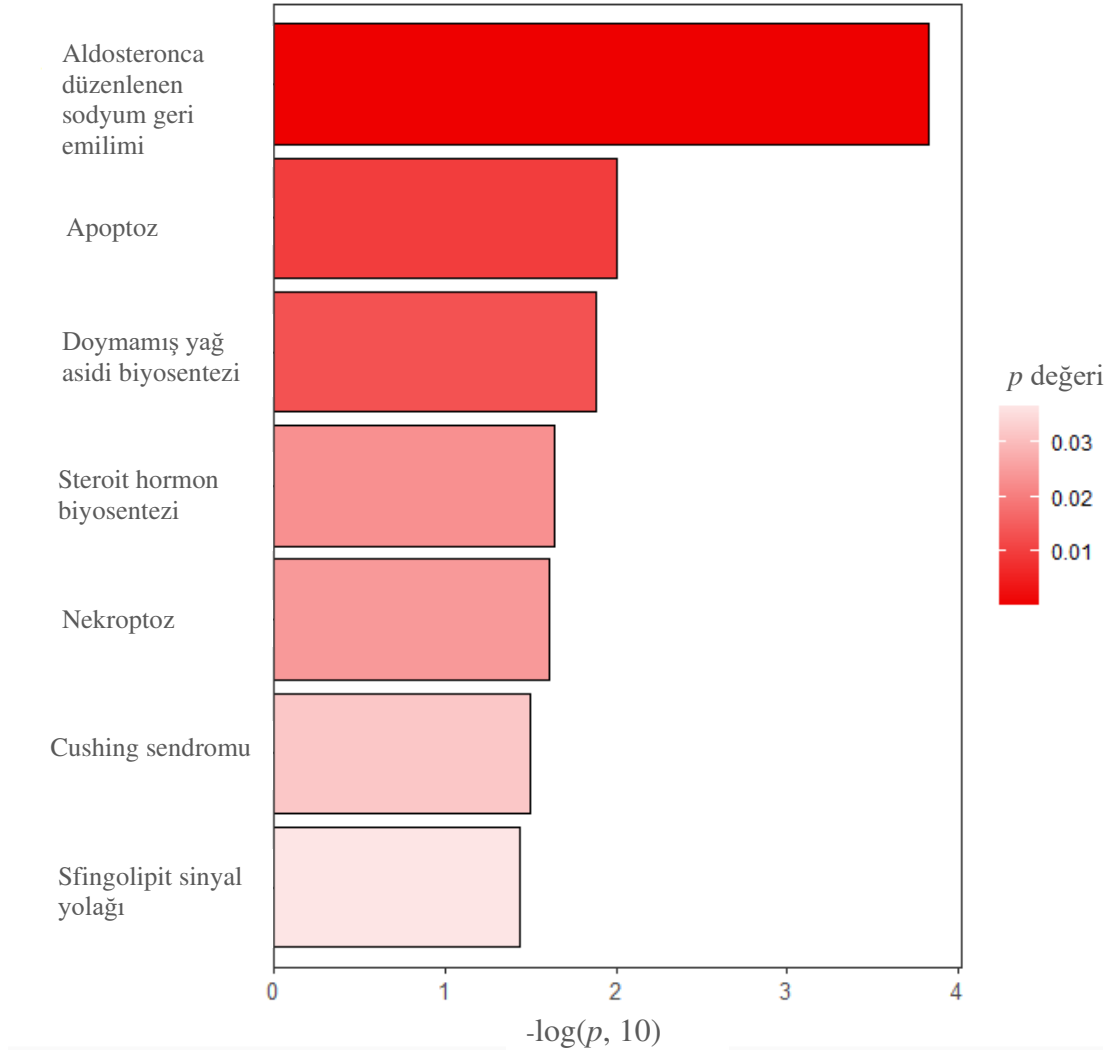
1,24098530 1	0,001 8356 43	0,009466 159	C10:1 AC	(M+H)+
1,23905933 7	0,017 2433 71	0,040554 098	cis-13-Dokozenoik asit	(M+H- H2O)+
1,19674854 6	0,000 3805 48	0,003494 832	C6:0 AC	(M+H)+
1,06530460 9	0,000 2932 34	0,003084 817	Phe-His	(M+H)+
1,03828126 2	0,001 5203 83	0,008622 885	1-pentadekanoil-2-hidroksi-sn-glisero- 3-fosfokolin	(M+H)+
1,01509525 6	2,067 12E- 06	0,000181 218	Oleamid	(M+H)+
0,95904593 7	0,008 5782 33	0,025987 994	Asetil-L-karnitin	(M+H)+
0,94255483 9	0,002 0166 14	0,010199 416	(S)-N-(1-Amino-3-metil-1-oksobutan- 2-il)-1-(5-floropentil)-3-(4-florofenil)- 1H-pirazol-5-karboksamid	(M+H)+
0,93163162 9	0,001 8141 21	0,009466 159	Palmitoil-L-karnitin	(M+H)+
0,92542917 9	0,004 8104 78	0,017330 9	2-Linoleilgliserol	(M+H- H2O)+
0,91618645 7	0,000 1443 17	0,001997 646	Stearidonik asit etil ester	(M+H- 2H2O)+
0,914323	0,005 1381 69	0,018017 845	Dokosatrienoik asit	(M+NH4)+
0,89696020 6	0,004 3581 82	0,016676 625	Tirozin	(M+H)+
0,84390756 9	0,003 3858 85	0,013492 237	Oleoil-L-karnitin	(M+H)+
0,81528369 7	0,008 1075 43	0,025395 497	Hidrokortizon	(M+H)+
0,80942365 8	0,001 4511 37	0,008622 885	Beta.-Estradiol 3-benzoat	(M+H)+
0,80526378 4	0,007 4923 37	0,024326 97	1-Heptadekanoil-sn-glisero-3- fosfokolin	(M+H)+
0,79517487 5	0,002 5228 93	0,011440 017	1-Stearoil-2-dokosaheksaenoil-sn- glisero-3-fosfokolin	(M+H)+

0,76844144 1	0,015 0816 7	0,037069 899	1,2-Dilinoileoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
0,75861099 3	0,006 0018 46	0,020236 993	Glu-Phe	(M+H)+
0,75525142 8	0,002 7329 57	0,011783 079	1-Stearoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
0,75430290 4	0,004 3752 36	0,016676 625	Arg-Gly-Asp	(M+H)+
0,74191427 7	2,151 95E- 05	0,000808 454	Lökotrien D4 metil ester	(M+H)+
0,73883451 4	0,010 3515 76	0,027580 808	C14:2 AC	(M+H)+
0,73327897	0,002 6397 3	0,011570 815	DL-İndol-3-laktik asit	(M+H)+
0,73145608 1	0,003 1879 06	0,013100 301	Asn-Arg	(M+H)+
0,72305404 8	0,003 0412 33	0,012695 942	1-(1Z-Oktadesenil)-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
0,69653104 4	0,001 3817 38	0,008489 62	1-(1Z-Oktadesenil)-2-(9Z-oktadesenil)-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+Na)+
0,68638606	0,009 3476 19	0,026721 998	Androstan-3,17-diol	(M+H- 2H ₂ O)+
0,67934428 1	0,019 5821 79	0,044783 592	Propiyonilkarnitin	(M+H)+
0,67619422	0,015 8285 04	0,038191 712	3-Hidroksioileilkarnitin	(M+H- H ₂ O)+
0,59613443 7	0,009 1662 81	0,026721 998	D-eritro-N-stearoilsfingosin	(M+H- H ₂ O)+
0,58686986	0,002 9893 17	0,012680 49	Fenilalanin	(2M+H)+
0,52239185 9	7,173 5E- 05	0,001838 233	Dodeka-2(E),4(E)-dienoik asit	(M+NH ₄)+
0,52059368 5	0,016 3339 66	0,039053 028	N-Asetildihidrosfingosin	(M+K)+
0,51119147 7	0,000 1415 02	0,001997 646	Palmitamid	(M+H)+

0,50222392 1	0,012 5194 71	0,031659 817	Alfa-Linolenoil Etanolamid	(M+H)+
0,48171104 2	0,007 6133 12	0,024418 304	14-Metilpentadekanoik asit	(M+H- H ₂ O)+
0,46238728	0,006 0871 59	0,020264 847	Fosfokolin	(M+H)+
0,41289727 9	0,008 5967 89	0,025987 994	4-Metilsikloheksanasetik asit	(M+H)+
0,38736312 5	0,000 8508 46	0,006047 904	Stearamid	(M+H)+
- 0,46814850 2	0,009 5448 4	0,026958 658	Bisiklo-prostaglandin E2	(M+H- H ₂ O)+
- 0,59139389 4	0,010 8674 02	0,028298 283	Butil 2-etilheksil ftalat	(M+CH ₃ CN +Na)+
- 0,61358751 2	0,002 1040 36	0,010247 435	Linoleilglisin	(M+H)+
- 0,66095835 3	0,000 7193 33	0,005417 389	Fitalik asit	(M+H)+
- 0,74935129 3	0,000 4890 74	0,004019 573	His-Trp	(M+H)+
- 0,84306069 5	0,010 3344 67	0,027580 808	cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaenoik asit	(M+H)+
- 1,08988769 5	0,000 1626 75	0,002067 211	Ile-Val	(M+H)+
- 1,17577009 5	0,001 1869 38	0,007804 116	Kortizon	(M+H)+
- 1,21130305 9	0,000 1650 62	0,002067 211	Pro-Ala	(M+H)+
- 1,36589560 4	0,018 6312 54	0,042982 63	Androsta-1,4-dien-3-on, 4-kloro-6,17-dihidroksi-17-metil-, (6.beta.,17.beta.)-	(M+H)+
- 1,65969173 1	0,000 6743 93	0,005374 704	Gliserofosfokolin	(M+H)+
- 1,87357084 6	0,000 1869 97	0,002235 461	N-Oleoilglisin	(M+H)+
- 1,89824527 1	0,000 1395 38	0,001997 646	D-Piroglütamik asit	(2M+H)+

- 2,04902785 2	0,002 4122 68	0,011130 288	5-Kolanik asit-3-ol-6-7-dion	(M+H)+
- 2,12237297 6	0,018 3399 72	0,042685 068	N-Asetiltriptofan	(M+H)+
- 2,42268557 4	0,001 2955 68	0,008310 597	2-Metil-N-(4-Metilfenil)alanin	(M+H)+
- 2,60945751 8	0,021 5317 82	0,048400 502	D-Sorbitol	(M+H)+
- 2,93593731 6	0,015 0065 15	0,037069 899	N-asetilsitin	(M+H)+

Şekil 4.19 KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).



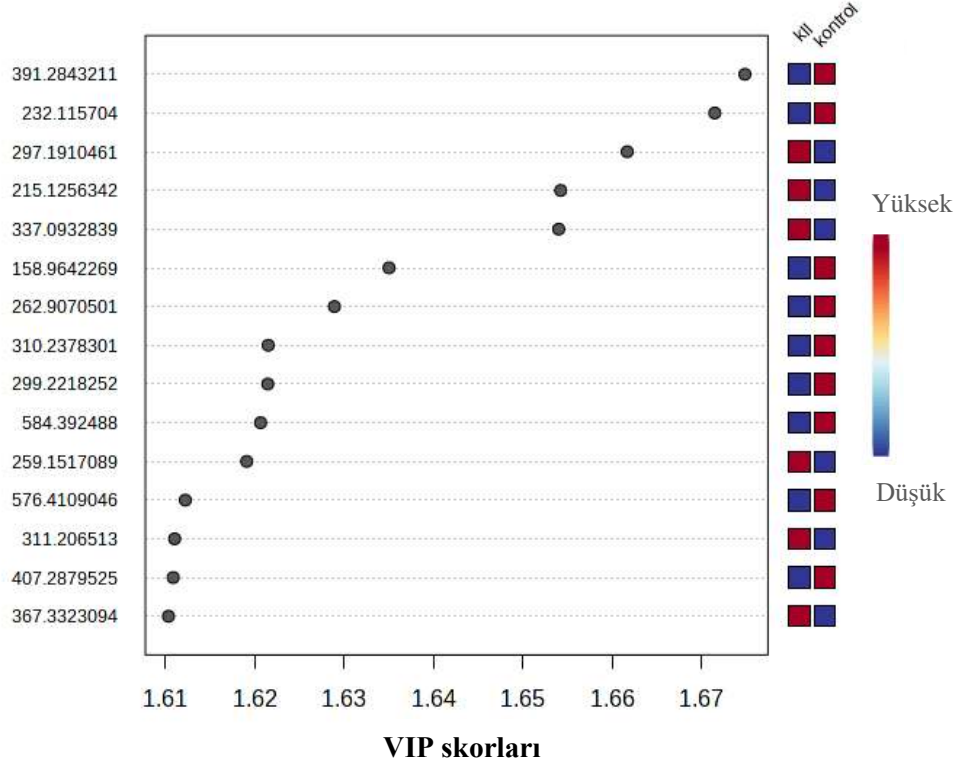
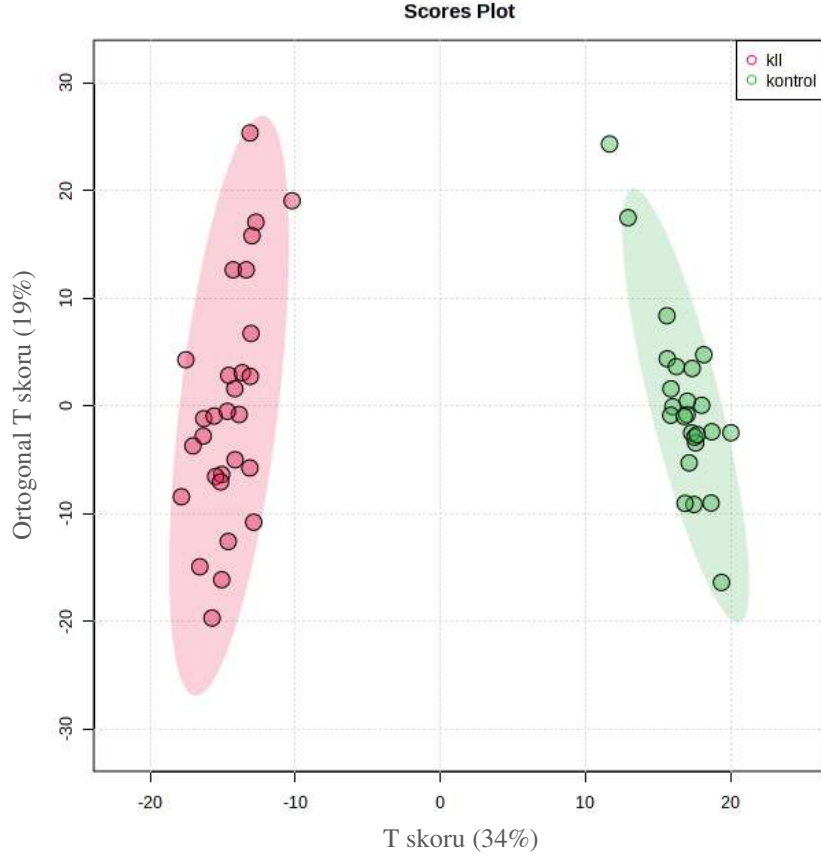
Tablo 4.19 KLL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0., Mummichog algoritması kullanılarak).

KLL	Yolak	Total vuru (Hit)	Anlamlı vuru (Hit)	Beklenen	<i>p</i> (Fisher)	Ayarlı. <i>p</i> .Fisher
Pürin metabolizması	80	8	5	4.3719	0.36837	1
Lizin metabolizması	52	9	5	2.8417	0.50764	1
Skualen ve kolesterol biyosentezi	55	2	2	3.0057	0.25231	1
Aminoşeker metabolizması	69	2	2	3.7707	0.25231	1
Gliserofosfolipit metabolizması	156	17	8	8.5252	0.6994	1
Ubikinon biyosentezi	10	3	2	0.54648	0.50462	1
Yağ asidi Metabolizması	63	9	4	3.4429	0.7552	1
Ksenobiyotik metabolizması	110	9	4	6.0113	0.7552	1
Doymuş yağ asitleri beta oksidasyonu	36	4	2	1.9673	0.69326	1
Glikosfingolipid metabolizması	67	10	4	3.6614	0.83694	1
TCA döngüsü	31	5	2	1.6941	0.81824	1
Yağ asidi aktivasyonu	74	9	3	4.044	0.91614	1
Linoleat metabolizması	46	6	2	2.5138	0.89563	1
D3 vitamini (kolekalsiferol) metabolizması	16	7	2	0.87438	0.94148	1
Üre döngüsü/amino grup metabolizması	85	7	2	4.6451	0.94148	1
Arginin ve prolin metabolizması	45	7	2	2.4592	0.94148	1
Karnitin mekiği	72	16	4	3.9347	0.99145	1
Tirozin metabolizması	160	23	6	8.7438	0.99629	1
Lökotrien metabolizması	92	18	4	5.0277	0.99721	1
Aspartat ve asparajin metabolizması	114	11	2	6.2299	0.99508	1
Safra asidi biyosentezi	82	17	3	4.4812	0.99917	1
Androjen ve östrojen biyosentezi ve metabolizması	95	28	6	5.1916	0.99976	1
A vitamini (retinol) metabolizması	67	14	2	3.6614	0.99932	1
Araşidonat kaynaklı prostaglandin oluşumu	78	25	5	4.2626	0.99974	1
C21-steroid hormon biyosentezi ve metabolizması	112	25	5	6.1206	0.99974	1
Araşidonik asit metabolizması	95	31	4	5.1916	1	1
Glikoliz ve Glukoneogenez	49	1	1	2.6778	0.50307	1
Sialik asit metabolizması	107	1	1	5.8474	0.50307	1

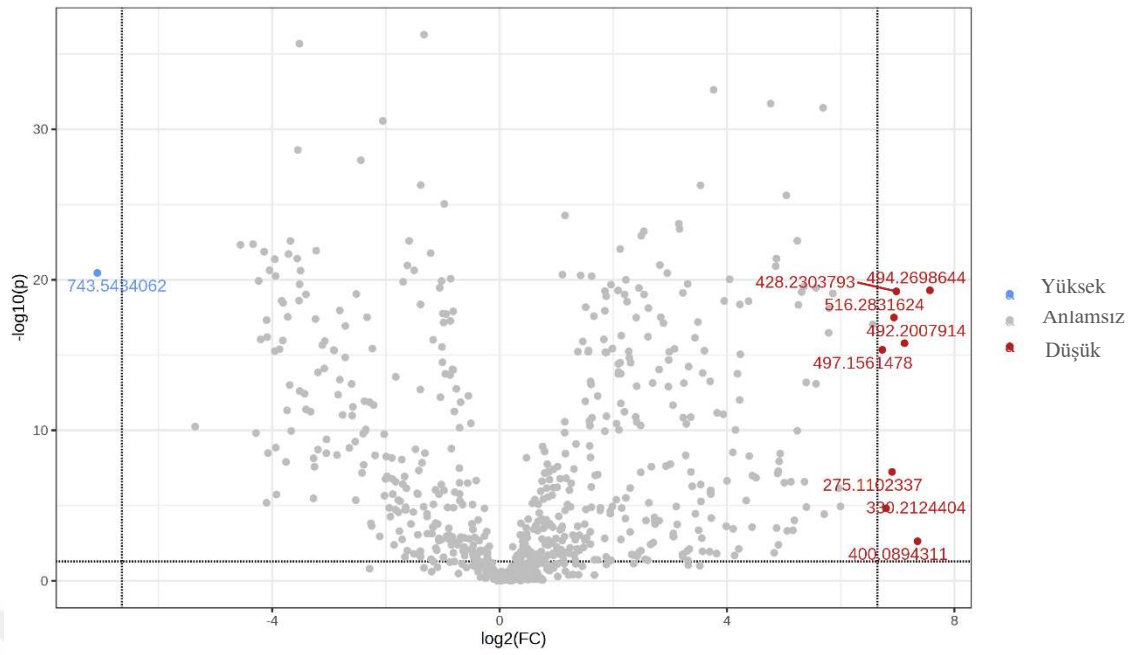
EPA kaynaklı anti-enflamatuvar metabolit oluşumu	27	5	1	1.4755	0.97064	1
Heksoz fosforilasyonu	20	2	1	1.093	0.75383	1
Galaktoz metabolizması	41	2	1	2.2406	0.75383	1
3-okso-10R-oktadekatrienoat beta oksidasyonu	27	2	1	1.4755	0.75383	1
Alkaloid biyosentezi	10	2	1	0.54648	0.75383	1
Histidin metabolizması	33	3	1	1.8034	0.87843	1
B5 Vitamini - pantotenattan CoA biyosentezi	12	2	1	0.65578	0.75383	1
Elektron taşıma zinciri	7	1	1	0.38254	0.50307	1
Biopterin metabolizması	22	3	1	1.2023	0.87843	1
E vitamini metabolizması	54	3	1	2.951	0.87843	1
Glisin, serin, alanin ve treonin metabolizması	88	4	1	4.8091	0.94016	1
Lipoat metabolizması	8	1	1	0.43719	0.50307	1
Triptofan metabolizması	94	4	1	5.137	0.94016	1
De novo yağ asidi biyosentezi	106	5	1	5.7927	0.97064	1
Yağ asidi oksidasyonu	35	1	1	1.9127	0.50307	1
Fruktoz ve mannoz metabolizması	33	2	1	1.8034	0.75383	1
Askorbat (C Vitamini) ve aldarat Metabolizması	29	4	1	1.5848	0.94016	1
Glutasyon Metabolizması	19	3	1	1.0383	0.87843	1
Porfirin metabolizması	43	3	1	2.3499	0.87843	1
B6 vitamini (piridoksin) metabolizması	11	1	1	0.60113	0.50307	1
Pirimidin metabolizması	70	3	1	3.8254	0.87843	1
İlaç metabolizması - diğer enzimler	31	2	1	1.6941	0.75383	1
Beta-Alanin metabolizması	20	3	1	1.093	0.87843	1
Fitanik asit peroksizomal oksidasyon	34	2	1	1.858	0.75383	1
Pentoz fosfat yolu	37	1	1	2.022	0.50307	1
Metiyonin ve sistein metabolizması	94	5	1	5.137	0.97064	1

Şekil 4.20 KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.

Skor diyagramı



Şekil 4.21 KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Tablo 4.20 NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	p	Ayarlı p	Bileşik	Ekleni (Adduct)
2,600332508	0,000836644	0,006667797	Pro-Phe	(M+H)+
1,642816343	0,003720524	0,018462224	1-Oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(2M+H)+
1,631267068	0,000155265	0,002462778	1-Palmitoil-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfoetanolamin	(M+H)+
1,617406043	0,004950089	0,022839882	C6:0 AC	(M+H)+
1,584829343	0,001911383	0,010928127	1-Stearoil-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfokolin	(2M+H)+
1,433440744	4,03078E-05	0,001603248	Oleamid	(M+H)+
1,350408063	0,000711501	0,00584765	Dokozatrienoik asit	(M+NH4)+
1,298180388	0,001999345	0,010954743	C8:0 AC	(M+H)+
1,286149951	0,001853979	0,010835478	Asetil-L-karnitin	(M+H)+

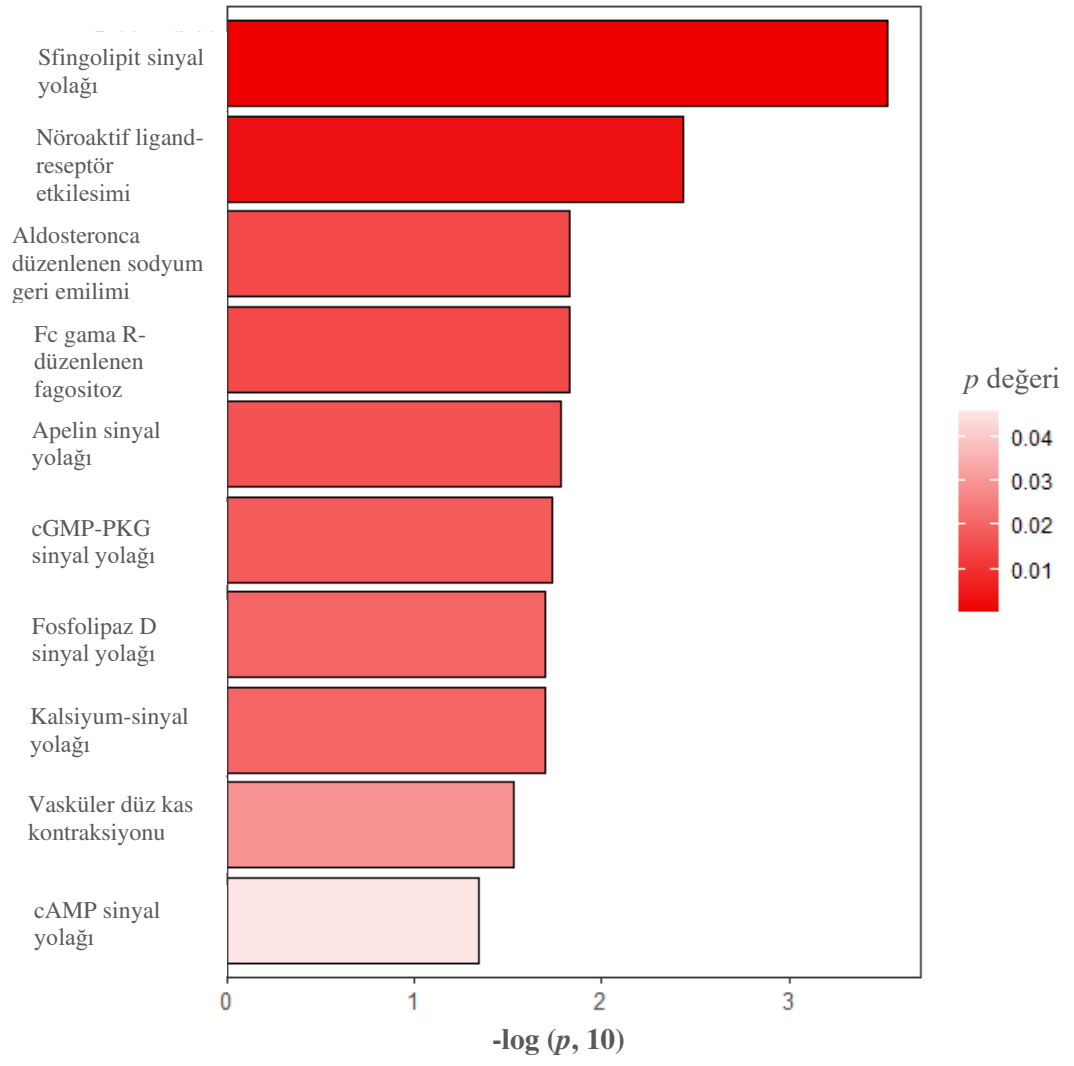
1,25515228 3	0,009 0322 58	0,035905 3	C10:1 AC	(M+H)+
1,20053579 6	0,009 6930 66	0,035905 3	cis-13-Dokozenoik asit	(M+H- H ₂ O)+
1,18256295 7	0,007 9745 08	0,032770 243	Araşidoil Etanolamid	(M+H)+
1,15699469 3	0,000 6408 53	0,005693 436	1-Pentadekanoil-2-hidroksi-sn-glisero- 3-fosfokolin	(M+H)+
1,15027485 7	0,004 8562 45	0,022807 008	N-Asetildihidrosfingosin	(M+K)+
1,10697929 7	0,001 4246 72	0,008846 599	Stearidonik asit etil ester	(M+H- 2H ₂ O)+
1,08675202	0,002 8855 17	0,014594 058	D-eritro-Sfingosin-1-fosfat	(M+H)+
1,07557898 5	0,001 2393 89	0,008148 984	1-Heptadekanoil-sn-glisero-3- fosfokolin	(M+H)+
0,93091660 7	0,000 6494 41	0,005693 436	1-Stearoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
0,92904266 1	0,000 3687 18	0,004848 635	1-(1Z-Oktadesenil)-sn-glisero-3- fosfokolin	(M+H)+
0,89707491 5	0,011 8393 26	0,041516 57	Monoelaidin	(M+H)+
0,89232691 3	0,010 5368 77	0,037448 63	DL-İndol-3-laktik asit	(M+H)+
0,87802018 3	0,007 5495 93	0,032549 883	Triptofan	(2M+H)+
0,77346811 9	0,009 1931 67	0,035905 3	C12:1 AC	(M+H)+
0,75347568 5	7,315 2E- 05	0,001603 248	Lökotrien D4 metil ester	(M+H)+
0,69952873 6	0,000 8629 76	0,006675 374	Stearamid	(M+H)+
0,68905231 2	0,002 5291 35	0,013170 794	Fenilalanin	(2M+H)+
0,68805826 9	0,000 1434 54	0,002462 778	Palmitamid	(M+H)+

0,66861829	0,011 9986 3	0,041521 576	7.alfa.-Hidroksi-3-okso-4-kolestenoik asit	(M+H)+
0,64552319 9	0,000 1799 31	0,002628 996	Etil pentadekanoat	(M+H)+
0,57632591 2	0,010 0963 88	0,036713 962	Glu-Phe	(M+H)+
0,57142713	0,005 2006 05	0,023205 702	1-(1Z-Oktadesenil)-2-(9Z- oktadesenil)-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+Na)+
0,51830420 9	0,000 4805 31	0,005367 731	Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala	(M+H)+
- 0,82715687 9	0,000 1421 37	0,002462 778	Fitalik asit	(M+H)+
- 1,13442340 5	0,001 1898 58	0,008023 914	Kortizon	(M+H)+
- 1,15143833 3	0,000 1591 91	0,002462 778	Adenozin	(M+H)+
- 1,15723999 1	0,006 7634 16	0,029646 305	Met(O)-Thr	(M+H)+
- 1,17705944	0,009 1788 66	0,035905 3	Estra-1,3,5(10),7-tetraen-3,17.beta.- diol	(M+H)+
- 1,40296168 8	0,007 8600 43	0,032770 243	Androsta-1,4-dien-3-on, 4-kloro-6,17- dihidroksi-17-metil-, (6.beta.,17.beta.)-	(M+H)+
- 1,54028260 4	0,001 0490 44	0,007260 488	Gliserofosfokolin	(M+H)+
- 1,54357817 9	7,592 E-06	0,001363 934	Pro-Ala	(M+H)+
- 1,59470687 8	0,000 4684 31	0,005367 731	N-Oleoilglisin	(M+H)+
- 1,86991081 9	0,010 1905 68	0,036713 962	Ser-Leu	(M+H)+
- 2,09121271 1	0,001 8438 67	0,010835 478	5-tarKolanik asit-3-ol-6-7-dion	(M+H)+
- 2,19783362 3	6,140 26E- 05	0,001603 248	D-Piroglutamik asit	(2M+H)+
- 2,19919123 3	0,000 5306 5	0,005367 731	Tyr-Ala(Dstereo)-Phe(Amit)	(M+H)+

- 3,04800750 5	0,014 0841 08	0,047488 723	N-asetilsitin	(M+H)+
- 3,62291382 7	6,000 78E- 05	0,001603 248	2-Metil-N-(4-Metilfenil)alanin	(M+H)+
- 4,12855991 1	0,002 3491 49	0,012608 698	N-Asetiltryptofan	(M+H)+



Şekil 4.22 NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).

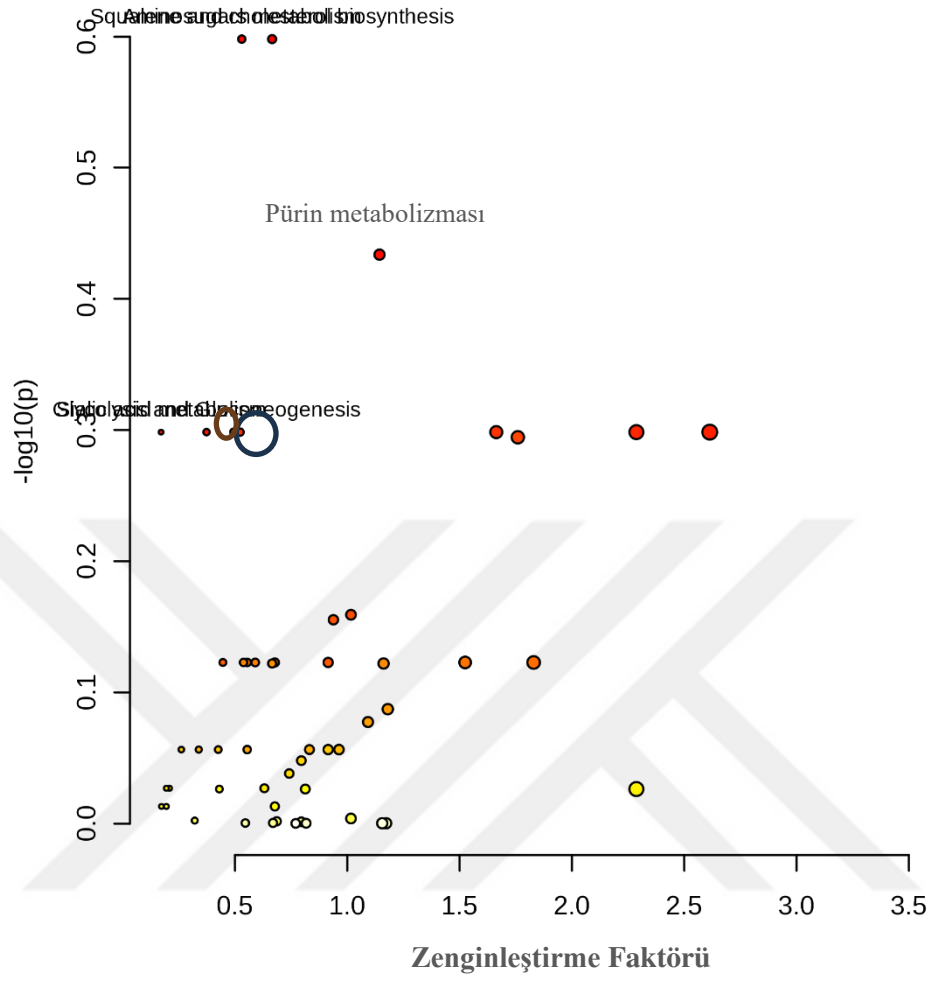


Tablo 4.21 NHL-kontrol karşılaştırmasında serum LC-HRMS pik intensite tablosuna ait fonksiyonel analiz sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0., Mummichog algoritması kullanılarak).

NHL	Yolak	Total vuru (Hits)	Anlamlı vuru (Hits)	Beklenen	<i>p</i> (Fisher)	Ayarlı. <i>p</i> .Fisher
Gliserofosfolipid metabolizması	156	17	9	7.3296	0.28029	1
Glisin, serin, alanin ve treonin metabolizması	88	4	3	4.1346	0.21727	1
Üre döngüsü/amino grup metabolizması	85	7	4	3.9937	0.35373	1
Metiyonin ve sistein metabolizması	94	5	3	4.4165	0.37424	1
Pürin metabolizması	80	8	4	3.7587	0.48216	1
E vitamini metabolizması	54	3	2	2.5372	0.39908	1
Porfirin metabolizması	43	3	2	2.0203	0.39908	1
Ubikinson Biyosentezi	10	3	2	0.46984	0.39908	1
Arginin ve Prolin Metabolizması	45	7	3	2.1143	0.65061	1
Doymuş yağ asitleri beta oksidasyonu	36	4	2	1.6914	0.58089	1
TCA döngüsü	31	5	2	1.4565	0.71865	1
Lizin metabolizması	52	9	3	2.4432	0.82796	1
Glikosfingolipid metabolizması	67	10	3	3.148	0.88334	1
D3 vitamini (kolekalsiferol) metabolizması	16	7	2	0.75175	0.88256	1
Androjen ve östrojen biyosentezi ve metabolizması	95	28	8	4.4635	0.96929	1
C21-steroid hormon biyosentezi ve metabolizması	112	25	7	5.2622	0.96745	1
Yağ asidi Metabolizması	63	9	2	2.96	0.95426	1
Ksenobiyotik metabolizması	110	9	2	5.1683	0.95426	1
Yağ asidi aktivasyonu	74	9	2	3.4768	0.95426	1
Lökotrien metabolizması	92	18	4	4.3226	0.98501	1
A vitamini (retinol) metabolizması	67	14	2	3.148	0.99641	1
Karnitin mekiği	72	16	2	3.3829	0.99877	1
Araşidonat kaynaklı prostaglandin oluşumu	78	25	4	3.6648	0.99942	1
Safra asidi biyosentezi	82	17	2	3.8527	0.99929	1
Tirozin metabolizması	160	23	3	7.5175	0.99976	1
Araşidonik asit metabolizması	95	31	3	4.4635	1	1
Glikoliz ve glukoneogenez	49	1	1	2.3022	0.43252	1

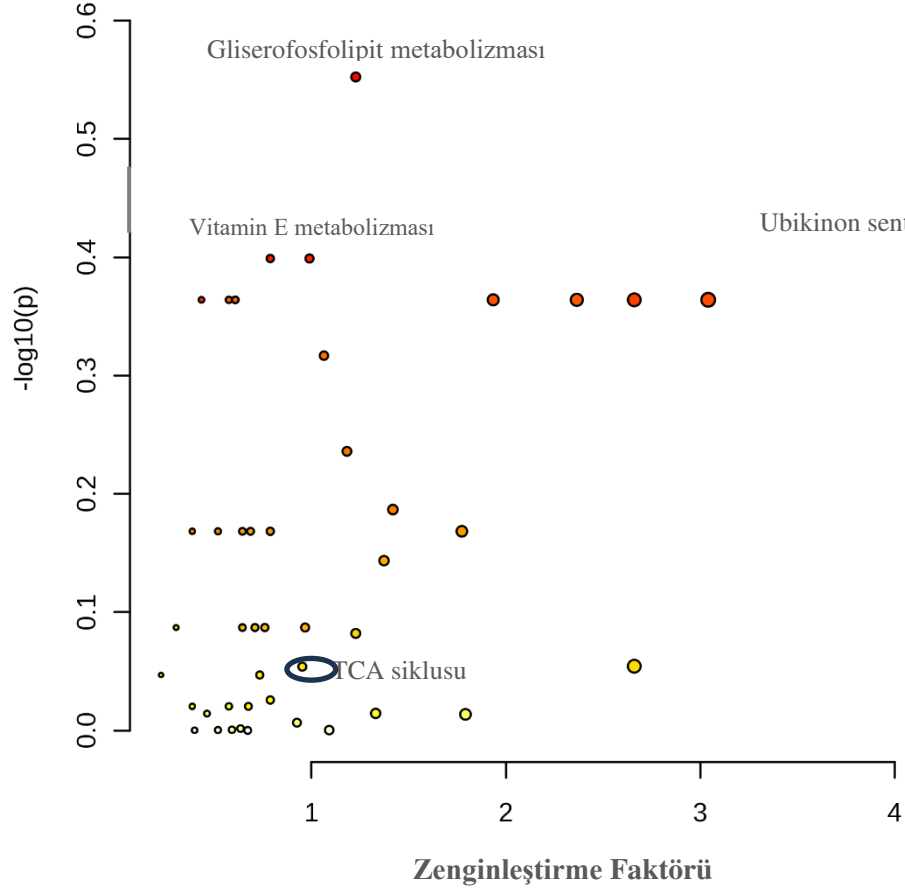
EPA kaynaklı anti-enflamatuvar metabolit oluşumu	27	5	1	1.2686	0.94252	1
Linoleat metabolizması	46	6	1	2.1613	0.96777	1
Skualen ve kolesterol biyosentezi	55	2	1	2.5841	0.67872	1
Galaktoz metabolizması	41	2	1	1.9264	0.67872	1
3-okso-10R-oktadekatrienoat beta oksidasyonu	27	2	1	1.2686	0.67872	1
Histidin metabolizması	33	3	1	1.5505	0.81853	1
B5 Vitamini - pantotenattan CoA biyosentezi	12	2	1	0.56381	0.67872	1
Elektron taşıma zinciri	7	1	1	0.32889	0.43252	1
Biopterin metabolizması	22	3	1	1.0337	0.81853	1
Lipoat metabolizması	8	1	1	0.37587	0.43252	1
Triptofan metabolizması	94	4	1	4.4165	0.89775	1
Yağ asidi oksidasyonu	35	1	1	1.6445	0.43252	1
Fruktoz ve mannoz metabolizması	33	2	1	1.5505	0.67872	1
CoA Katabolizması	7	1	1	0.32889	0.43252	1
B3 Vitamini (nikotinat ve nikotinamid) metabolizması	28	3	1	1.3156	0.81853	1
Askorbat (C Vitamini) ve aldarat Metabolizması	29	4	1	1.3625	0.89775	1
Alanin ve aspartat Metabolizması	30	3	1	1.4095	0.81853	1
B6 vitamini (piridoksin) metabolizması	11	1	1	0.51683	0.43252	1
B12 Vitamini (siyanokobalamin) metabolizması	9	1	1	0.42286	0.43252	1
Pirimidin metabolizması	70	3	1	3.2889	0.81853	1
İlaç metabolizması - diğer enzimler	31	2	1	1.4565	0.67872	1
Pentoz fosfat yolu	37	1	1	1.7384	0.43252	1
Selenoamino asit metabolizması	35	1	1	1.6445	0.43252	1

Şekil 4.23 KLL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç gösterimi.



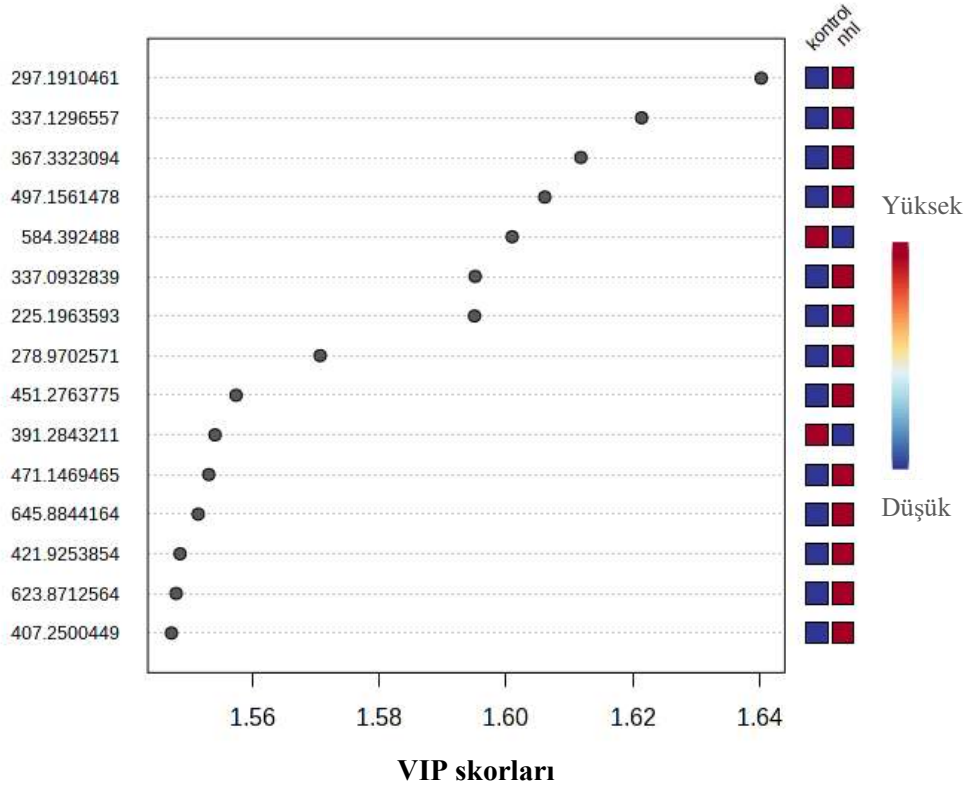
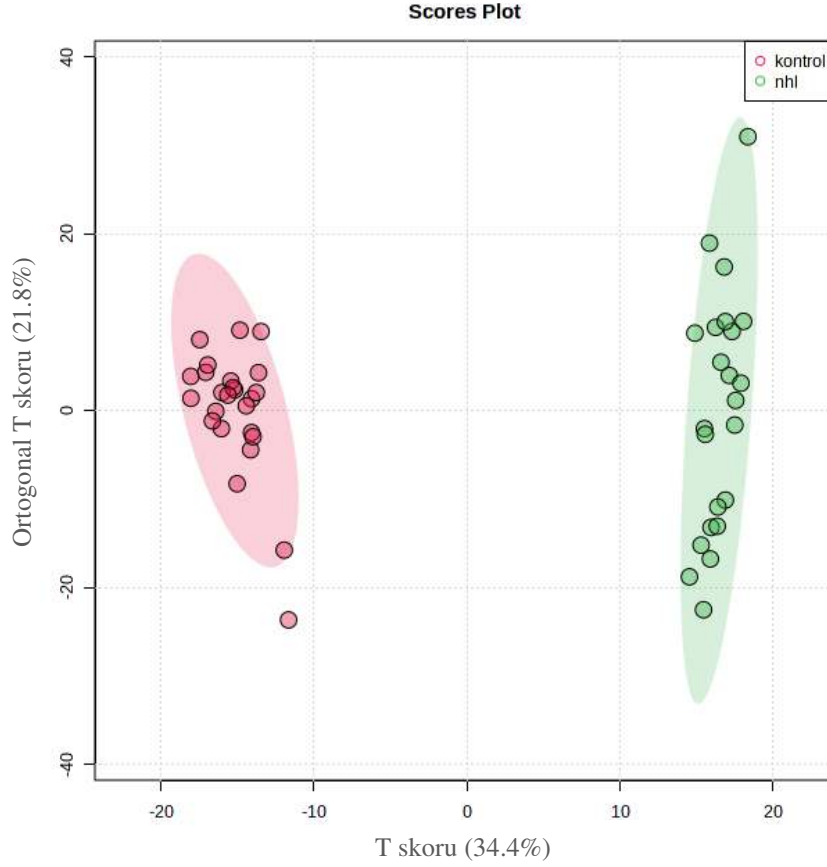
Şekil 4.24 NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç gösterimi.

Glisin, serin, alanin ve treonin metabolizması

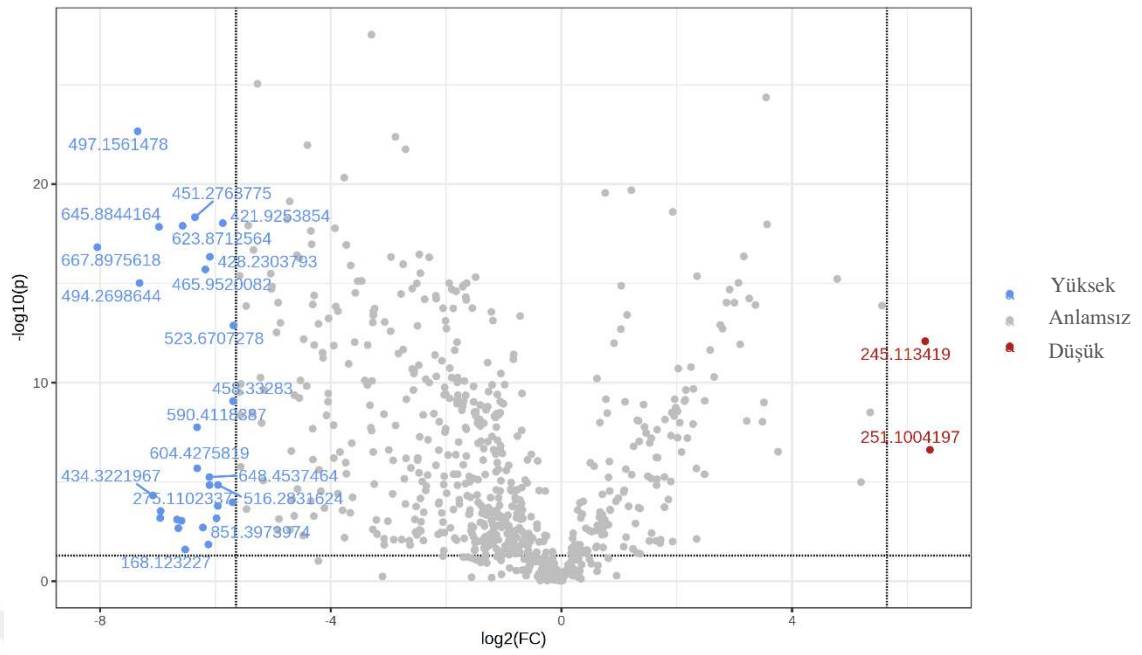


Şekil 4.25 NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS PLS-DA analizi sonuçları ve en yüksek VIP skoru alan m/z değerleri.

Skor Diyagramı



Şekil 4.26 NHL-kontrol karşılaştırmasına ait serum LC-HRMS volkan plot sonuçları (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



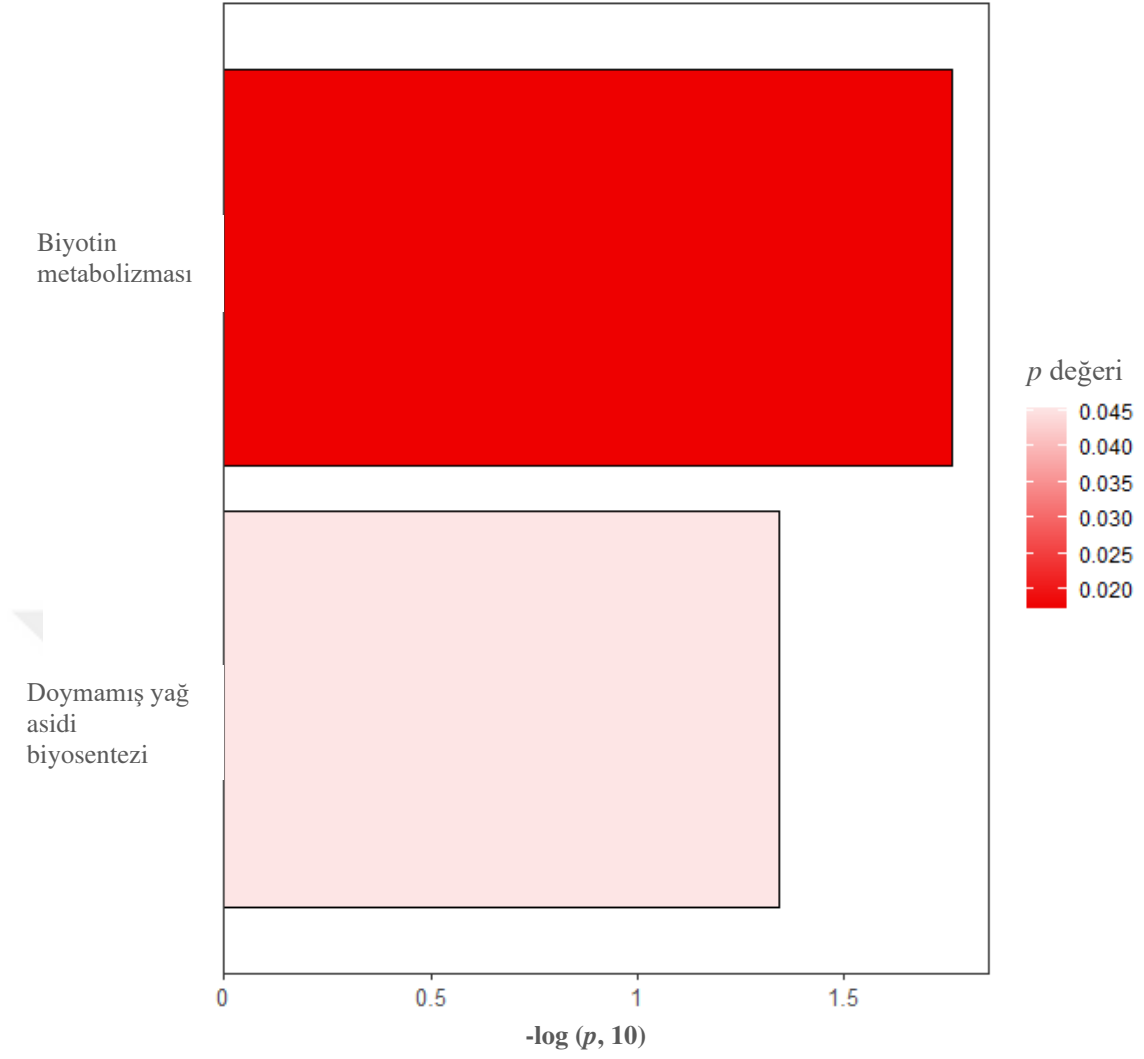
4.4. Lökosit İzolatları LC-HRMS Analizi Sonuçları

Tablo 4.22 AML-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	p	Ayarlı p	Bileşik	Eklenti (Adduct)
1,45194272 2	0,022 1003 84	0,038471 04	Spermin	(M+H)+
1,41527654 4	2,285 8E- 05	0,000146 748	Dokosatrienoik asit	(M+NH4)+
1,21449050 3	0,008 0757 13	0,016502 544	Lys-Leu	(M+H)+
1,19502408 7	0,001 2146 07	0,003004 553	cis-13-Dokozenoik asit	(M+H-H2O)+
0,97135850 7	4,263 31E- 05	0,000154 135	(+)-Kateşin	(M+H)+
0,92555496 8	0,000 5602 04	0,001645 6	(R)-(+)-Araşidonil-1'-hidroksi-2'-propilamit	(M+H)+
0,78958452 8	0,001 2127 6	0,003004 553	MMV020120	(M+H)+
0,40981383 2	0,004 8860 21	0,010438 318	DL-4-Hidroksifenillaktik asit	(M+H-H2O)+

0,31274805 4	0,019 2505 92	0,034799 147	3,6,9,12-Tetraoxatetracosan-1-ol	(M+NH ₄) ⁺
- 0,30496807 4	0,011 9369 15	0,022441 4	Biyotin	(M+H) ⁺
- 0,93870314	3,623 77E- 05	0,000149 998	Laurik asit dietanolamid	(M+H) ⁺
- 0,98002635 3	2,620 84E- 05	0,000146 748	5'-Floro-2'-hidroksi-4-metilkalkon	(M+H) ⁺
- 1,17671790 8	2,857 11E- 05	0,000146 748	Trietilen glikol monobütil eter	(M+HCOO+2 H) ⁺
- 1,41400884	3,829 73E- 05	0,000149 998	Arg-Gly-Asp	(M+H) ⁺
- 2,18501149 2	0,000 2259 26	0,000707 903	(S)-N-(1-Amino-3-metil-1-oksobutan- 2-il)-1-(5-floropentil)-3-(4-florofenil)- 1H-pirazol-5-karboksamid	(M+H) ⁺
- 2,24066550 5	3,122 31E- 05	0,000146 748	MMV085071	(M+H) ⁺
- 2,42028624 2	1,534 9E- 05	0,000146 748	Ile Met	(M+H-H ₂ O) ⁺
- 2,67248148 2	5,197 92E- 05	0,000174 502	Beta.-Estradiol 3-benzoat	(M+H) ⁺
- 2,71805473 9	1,831 27E- 05	0,000146 748	Asn-Arg	(M+H) ⁺

Şekil 4.27 AML-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).



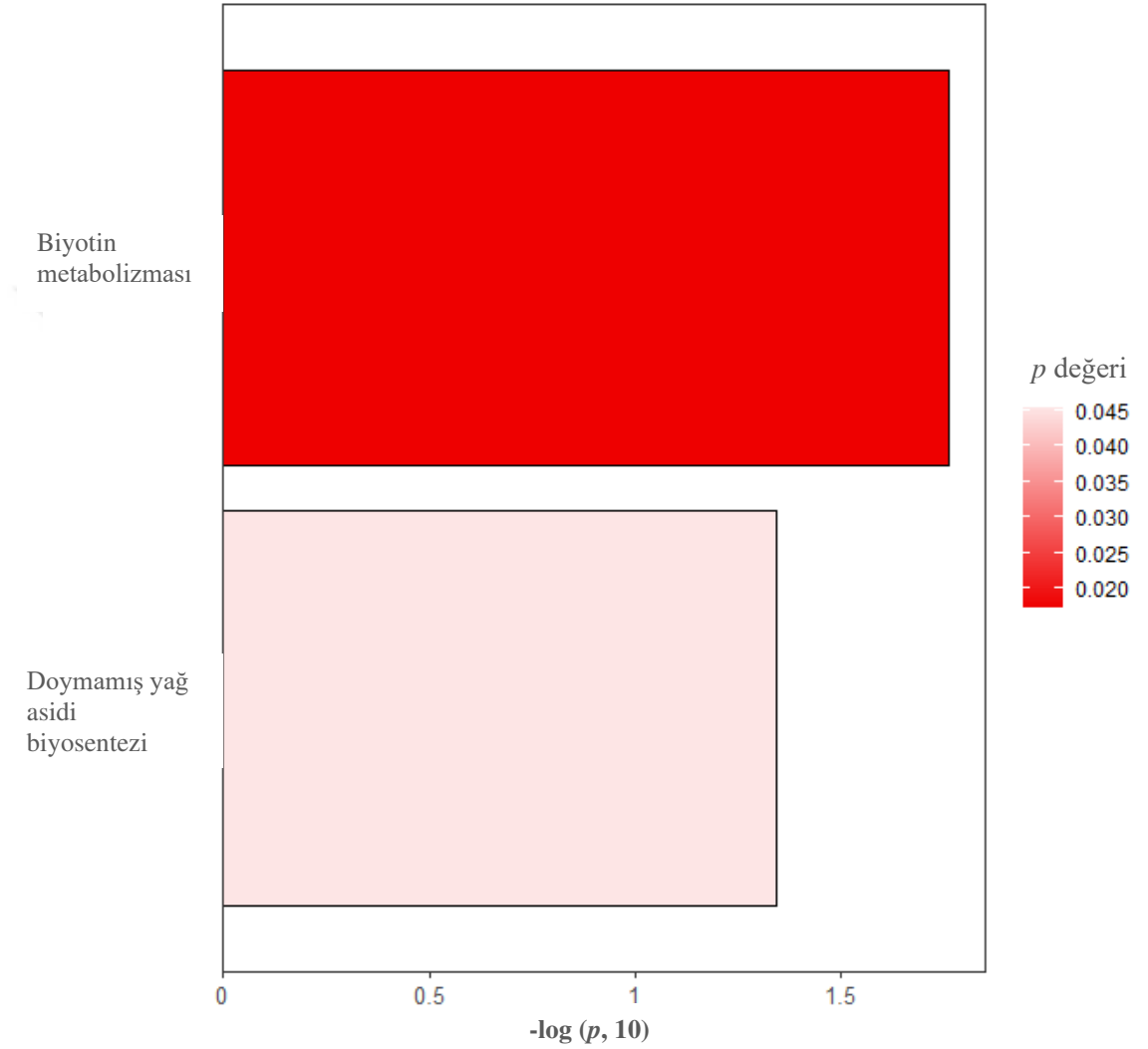
Tablo 4.23 KLL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	p	Ayarlı p	Bileşik	Eklenti (Adduct)
1,676335569	0,000751389	0,001358279	MMV023233	(M+H)+
1,600628094	0,009966031	0,015613449	1-Stearoil-sn-glisero-3-fosfokolin	(M+H)+
1,491838351	9,01938E-07	2,41813E-05	Dokosatrienoik asit	(M+NH4)+
1,461902027	0,000142866	0,000335735	cis-13-Dokozenoik asit	(M+H-H2O)+
1,351050361	5,45365E-05	0,000160201	Bisfenol S	(M+H)+

1,13795786 5	1,028 99E- 06	2,41813E -05	(+)-Kateşin	(M+H)+
1,02801166 2	0,002 2744 57	0,003959 24	Lys-Leu	(M+H)+
0,97397941 3	0,000 2277 82	0,000460 367	(R)-(+)-Araşidonil-1'-hidroksi-2'- propilamit	(M+H)+
0,92223330 5	9,952 98E- 05	0,000246 205	MMV020120	(M+H)+
0,66118741	0,026 8374 15	0,040688 985	Arg-Leu	(M+H)+
0,54116652 6	0,000 1585 71	0,000338 766	DL-4-Hidroksifenillaktik asit	(M+H-H ₂ O)+
0,45403552 3	7,187 83E- 06	5,34903E -05	3,6,9,12-Tetraoxatetracosan-1-ol	(M+NH ₄)+
- 0,23354653 2	0,033 8168 22	0,049668 457	Monoelaidin	(M+H)+
- 0,29277610 4	0,004 3217 78	0,007254 413	Pentaetilen glikol	(M+H)+
- 0,43229046 9	0,000 4227 14	0,000794 703	Biyotin	(M+H)+
- 1,02828842 4	1,640 8E- 05	5,93211E -05	Laurik asit dietanolamid	(M+H)+
- 1,11124703 7	8,935 53E- 06	5,34903E -05	5'-Floro-2'-hidroksi-4-metilkalkon	(M+H)+
- 1,30526771 3	1,251 9E- 05	5,34903E -05	Trietilen glikol monobütil eter	(M+HCOO+2 H)+
- 1,66806881 5	1,231 15E- 05	5,34903E -05	Arg-Gly-Asp	(M+H)+
- 2,38805304 7	0,000 1542 59	0,000338 766	(S)-N-(1-Amino-3-metil-1-oksobutan- 2-il)-1-(5-floropentil)-3-(4-florofenil)- 1H-pirazol-5-karboksamid	(M+H)+
- 2,51672534 1	1,802 25E- 05	6,0504E- 05	MMV085071	(M+H)+
- 2,64713768 1	1,021 23E- 05	5,34903E -05	Ile Met	(M+H-H ₂ O)+
- 3,00883016 6	1,233 81E- 05	5,34903E -05	Asn-Arg	(M+H)+

- 3,18044731 7	2,767 09E- 05	8,67022E -05	Beta.-Estradiol 3-benzoat	(M+H)+
----------------------	---------------------	-----------------	---------------------------	--------

Şekil 4.28 KLL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).

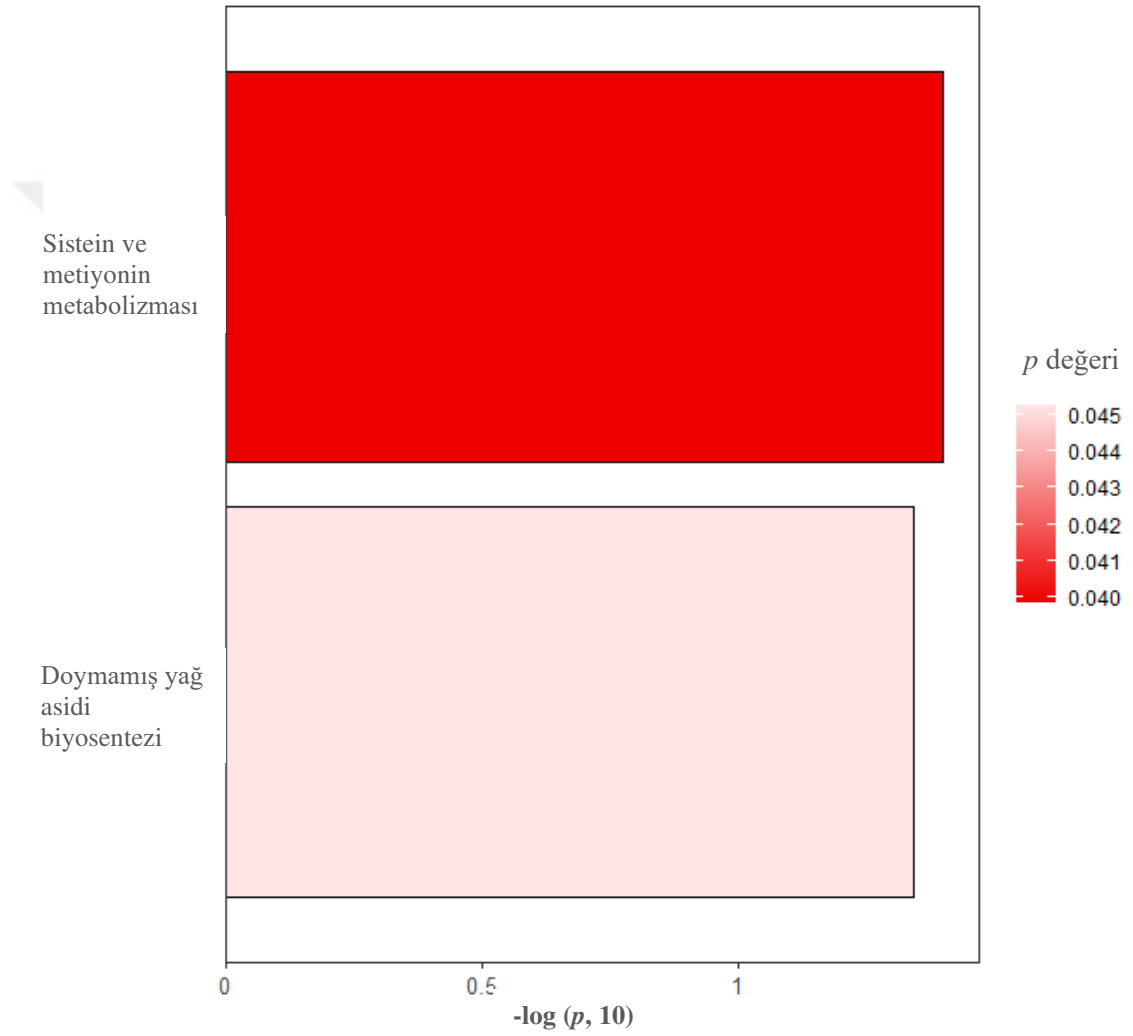


Tablo 4.24 NHL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu kimliklendirilen ve anlamlı bulunan metabolitler (Tidymass).

Log10(FC)	<i>p</i>	Ayarlı <i>p</i>	Bileşik	Eklenti (Adduct)
1,676436861	0,006055505	0,012374294	MMV020120	(M+H)+
1,481736924	3,13781E-05	0,000184346	cis-13-Dokozenoik asit	(M+H-H ₂ O)+
1,477553605	2,71261E-06	0,000127492	Dokosatrienoik asit	(M+NH ₄)+
1,067288576	2,11361E-05	0,000184346	(+)-Kateşin	(M+H)+
0,94221617	0,002589652	0,005795887	5'-Metiltiyoadenozin	(M+H)+
0,866159064	0,001251038	0,003145669	(R)-(+)-Araşidonil-1'-hidroksi-2'-propilamit	(M+H)+
0,661814814	0,004074066	0,008703687	Asetil-L-karnitin	(M+H)+
0,46027155	0,001271653	0,003145669	3,6,9,12-Tetraokzatetrakozan-1-ol	(M+NH ₄)+
0,359207261	0,012539353	0,024556233	DL-4-Hidroksifenillaktik asit	(M+H-H ₂ O)+
0,32306034	0,025222441	0,045594413	Tetradecilamin	(M+H)+
-0,810210616	0,000172216	0,000622627	5'-Floro-2'-hidroksi-4-metilkalkon	(M+H)+
-0,838737364	9,85116E-05	0,000385837	Laurik asit dietanolamid	(M+H)+
-0,956349412	0,000204935	0,000687996	Trietilen glikol monobütül eter	(M+HCOO+2H)+
-1,102884678	0,000627251	0,001842551	Arg-Gly-Asp	(M+H)+
-1,799458452	0,000585688	0,001835155	(S)-N-(1-Amino-3-metil-1-oksobutan-2-il)-1-(5-floropentil)-3-(4-florofenil)-1H-pirazol-5-karboksamid	(M+H)+
-1,926044711	6,90206E-05	0,000324397	MMV085071	(M+H)+
-2,142288611	2,78444E-05	0,000184346	Ile Met	(M+H-H ₂ O)+

- 2,32306774 5	9,550 09E- 05	0,000385 837	Beta.-Estradiol 3-benzoat	(M+H)+
- 2,48407965 8	2,660 42E- 05	0,000184 346	Asn-Arg	(M+H)+

Şekil 4. 29 NHL-kontrol karşılaştırmasında lökosit LC-HRMS analizi sonucu anlamlı bulunan metabolik yollar (Tidymass).



5. TARTIŞMA

Çalışmada yer alan AML, KLL ve NHL gibi hematolojik maligniteler oldukça kompleks alt grupları içermesi ve farklı tip hücrelerden köken alan heterojen kliniğe sahip bireyleri kapsamaları ile beraber, onkojenik blast/ beyaz kan hücrelerinin genel dinamiğini yansıtan vücut sıvılarında benzer metabolik sapmalar ve adaptasyon süreçleri sergilemektedir (227, 228). Kanseri hücrelerinde artan enerji ihtiyacı, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma mekanizmaları ve anjiyogenez indükleyici maddelerin üretimi gibi hücre bölünmesi ve yaşam devamlılığı için esansiyel metabolik işlevler ve analit bağımlılığı, çok çeşitli tümörlerde universal değişimler olarak değerlendirilmektedir (229, 230). Bu nedenle kanser hücrelerinde gözlenen tipik yolak aktivasyonları ve metabolit değişimleri, çalışmada yer alan HM alt tipleri için de geçerli olmaktadır (228, 231). Bu değişimler gruba özgü bulgular ve gruplar arası ortak değişimler olarak glukoz; amino asit; lipid-ilişkili metabolizma ve stres cevabı ilişkili değişimler genel başlıkları altında değerlendirilmiştir. Her bir HM grubuna özgü belirlenen ve kontrol bireylere kıyasla anlamlı değişim gösteren analit ve ilgili biyolojik fonksiyonu belirleyen yolakların tespiti serum ve lökosit hücrelerinde eş zamanlı araştırılarak analitik kimyanın iki ana enstrümanı olan NMR ve LCMS metodolojileri kullanılarak ortaya konmuştur.

Glukoz Metabolizması

Kanser hücrelerinde tarihsel olarak ilk ortaya konan ve ortak değişimlerde ilk sırayı alan aerobik glikoliz aktivasyonu, sıkça anılan diğer adıyla Warburg etkisi, artan glukoz alımının (uptake) oksidatif fosforilasyon yerine glikolitik yolların avantajına değerlendirilerek yüksek miktarda laktat üretimi ile sonuçlanan metabolik fenomeni ifade etmektedir (232). Glukozun glikolitik utilizasyonunda en önemli patogenetik mekanizmanın PI3K-AKT/mTOR sinyal yolağınca aktiflenen *GLUT1*, *HK2*, *PFKFB3*, *LDHA*, *PKM2* enzimlerince yürütüldüğü kaydedilmektedir. Aynı yolak tarafından indüklenen mitokondriyel *PDK* enzimi down-regülasyonu, TCA siklusunun yavaşlaması ve metabolizmik kayma anlamına gelmektedir. HM içerisinde özellikle normal sitogenetiğe sahip AML blastlarında prognostik değere sahip özgül glukoz metabolizma değişimleri kaydedilmiş (233) ve glikolitik bağımlılık gösterilmiştir (234). AML hasta serumlarında güncel NMR çalışma sonuçlarına göre glukoz yüksek anlamlılıkta artmış iken laktat yüksek anlamlılıkta azalmış gözlenmiştir. Hasta demografisi göz önüne alındığında AML grubunda yer alan yaşlı hastalarda kontrole kıyasla çok daha fazla glukoz metabolizması bozukluğu mevcut olduğundan artan glukoz seviyesi beklenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda bu bulguyu destekleyici biçimde AML ve insulin rezistansı ilişkili bulunarak (235) rezistan bireylerde salınımı artan enflamatuvar sitokinlerin ve ayrıca insulin-benzeri büyüme hormon etkisinin AML gelişiminde predispozisyon oluşturabileceği belirtilmiştir (236). Benzer şekilde KLL hasta serumlarında grup ayırıcı olarak ortaya konan artan glukoz seviyesi, patogenezele olası ilişkisi açısından incelenmesi değerli bir bulgu olarak sunulmaktadır. 2018 yılına ait ve güncel çalışmadaki HM gruplarını barındıran bir serum NMR çalışması da KLL hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla yüksek glukoz ortalaması kaydetmiş ve bu sonucun yaşa bağlı komorbite yerine KLL gelişim süreçleriyle ilişkili olduğunu belirtmiştir (72). Öte yandan NHL grubu demografik verilerinde glukoz ortalamasının KLL'ye oranla yüksek olmasına rağmen kontrol bireyler ile grup seperasyonunda değerli bulunmaması, NHL gelişiminden sorumlu lenfositlerde glukoz utilizasyonu ilişkili bir bozukluğun mevcut olmadığını düşündürmektedir.

Glikoliz sonucu üretilen laktat molekülü kanser hücrelerinde anjiyenezisi uyarması, mikroçevrede yol açtığı asidite ile enflamasyonu artırması gibi özellikleriyle

apoptozdan korunma ve metastatik süreçler için vazgeçilmez bir öge olarak karşımıza çıkmaktadır (228). Laktat ve pirüvat dönüşümünü katalizleyen laktat dehidrojenaz A (LDHA) enziminin hayvan modellerinde AML ve KML gelişiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiş ve inhibisyonu AML açısından yüksek latensi periyodu ile sonuçlanmıştır (237). Literatürde AML (238) ve NHL (239) gibi hematolojik malignitelerde laktatın ciddi miktarda artışına bağlı gözlenen laktik asidoz vakaları da bildirilmiştir. NMR analizi sonuçlarına göre güncel çalışmada yalnızca AML grubu hastaların serumlarında laktat metabolizması aberasyonu gözlenmiştir. AML grubunda düşük laktat seviyesi ile ilginç bir bulgu olarak laktik asidoz takibinde değerli 2-hidroksiizovalerat parametresinin yüksek seviyeleri anlamlı ve kontrole göre grup ayrımında değerli bulunmuştur. 2-hidroksiizovalerik asitin sağlıklı bireylerin serumunda gözlenmemesi ve diyabetik ketoasidoz ile asidoz durumlarında idrarda yükselen bir metabolit olması sebebiyle artan seviyesi, AML hasta serumlarını etkileyen asidoza işaret etmektedir. AML’de gözlenen düşük laktik asit seviyesi ise literatürde var olan yüksek laktat bulgularına ters düşmekle beraber, beraberinde düşüş gösteren alanin ve piroglutamat ile laktatın karaciğerde glukoneogenez için artan karbon iskeleti ihtiyacında kaynak olarak kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Amino Asit Metabolizması

Kanser hücrelerinde klasik Warburg etkisinden öte sıklıkla gözlenen TCA siklusu aktivasyonu ve siklusta karbon iskeleti kaynağı olarak kullanılan amino asit katabolizması ürünleri, artan proliferasyon ve yaşam devamlılığı için gerekli makromolekül biyosentezinde ve redoks dengesinin yanı sıra enerji üretimindeki rolü ile vazgeçilmez öneme sahiptir. Siklus içerisindeki enzimlerde görülen mutasyon veya epigenetik regülasyonlara bağlı metabolik kaymalar gerçekleşmesi ile gelişen mitokondriyel disfonksiyon, ilerleyen süreçte kansere dönüşümü hızlandırmaktadır. Örneğin siklus enzimlerinden izositrat dehidrojenaz (IDH 1 ve 2) mutasyonu AML hastalarının %17’sinde (240) ve T-hücreli anjiyoimmünoblastik lenfoma hastalarının %20’sinde pozitif saptanmıştır (241). Mutant enzim ürünü olan onkogenik R-2-hidroksiglutarat (R-2HG) metaboliti, α -ketoglutarata (α -KG) benzerliğiyle α -KG-bağımlı dioksijenaz enzimlerini inhibe etmekte, sonuçta DNA hipermetilasyonu ile lökomogenezi indüklemektedir. Bu durumda TCA siklusunda azalan α -KG’ı yerine koymak adına hızlanan glutamatın α -KG’a transformasyonu, glutamati tüketerek aynı zamanda redoks dengesini sağlayan glutatyon üretimini olumsuz etkilemektedir.

Güncel serum NMR analizinde AML, KLL ve NHL hastalarında ortak gözlenen piroglutamat düşüklüğü (glutamatın analiz süresince bekleyen örneklerde dönüştüğü siklik form (242)) üç grupta da VIP skoru en yüksek grup ayırıcı metabolitlerden olarak belki de kardinal bulgulardan birini temsil etmekte ve glutamat metabolizmasının HM patogenezinde primer etkilenen hücresel işlevlerde üst sırada olduğunu belirtmektedir. Çalışmaya dair eksik bir yan olarak AML grubunda glutamat düşüklüğü değerlendirilmesinde blast hücrelerindeki IDH mutasyon oranının da incelenmesinin gerekliliği açıktır. IDH mutasyonları HM hastalarında aynı zamanda alanin ve glisin amino asit seviyeleri ile de yakından ilişkili bulunmuştur (243). Örneğin glutaminaz inhibitörlerinin kullanıldığı hücre serilerinde downstream glutamat azalışının farklı mekanizmalarla kompanse edildiği raporlanmış ve bu mekanizmalardan birinin de alanin pirüvat dönüşümü ile beslenen TCA siklusunun devamlılığı olduğu belirtilmiştir (244). Ayrıca daha önce bahsedildiği üzere glutamat kıtlığı sebebiyle azalan glutatyon üretimine bağlı bir diğer yapıtaş amino asit olan glisin seviyesi artabilmektedir (243). Bu noktada çalışmanın diğer önemli bulguları olan ve her 3 grupta ortak kaydedilen düşük serum alanini ile AML ve KLL gruplarında artan glisin miktarı literatürü destekleyici durumdadır. Üç grupta yine ortak olarak VIP skoru 1'den büyük bulunan betain seviye artışının, glisin birikimine bağlı serine dönüşümün hızlanması ve sarkozin-glisin yolağının aktifleşmesi sebebiyle gözlenmiş olabileceği düşünülmektedir. HM içerisinde yalnızca KLL grubunda yakalanan fosfoetanolamin (PEA) düzeyi artışı da, yine bu yolda yer alan ve fosfotidilkolin (PC) biyosentezinde prekürsör olan EA molekülünün koline dönüşümü basamağının etkilenmesi ile açıklanabilir. Bu bulguyu destekleyen literatür sonuçları serumda yükselen PEA'yı daha çok AML'de kaydetmekle beraber, bir fosfor-NMR çalışmasında KLL hastalarına ait lenfositlerde de artan PEA seviyeleri gösterilmiştir (245). Aynı çalışmada serumda azalan EA seviyesi de tespit edildiğinden, PEA lehine bir üretim artışından bahsedilebilmektedir. Ayrıca artan PC ile PEA seviyelerinden sorumlu tutulan kolin kinaz veya EA kinaz enzimlerinde aktivasyon artışı çeşitli kanser türlerinde gösterilmiş ve yoğun selüler proliferasyon-kötü prognozla ilişkisi kaydedilmiştir (246). Sarkozin-glisin yolağına geri dönüldüğünde 2021 yılına ait ilginç bir çalışma bulgusu (247), benzen bağlı gelişen hematotoksitenin özellikle glisin-sarkozin aksını etkilediğini belirtmektedir. Benzen maruziyetince gelişen HM tabloları belki de bu aks üzerinden işlemekte ve bu hipotezin valide edilmesi halinde çalışmada belirtilen sarkozin/ glisin parametresi bireylerde HM taraması

envanterlerinde yerini alabilecektir. Tüm bu sonuçlar ışığında glisin-serin-PEA-kolin-betain (diğer adıyla trimetilglisin)-sarkozin moleküllerinin HM patogenezindeki rolünün ileriki çalışmalarla detaylandırılmasının önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Hematolojik malignitelerde valin, lösin ve izolösinden oluşan dallı zincirli amino asit (BCAA) metabolizması incelendiğinde her üç amino asit için belirlenen ortak mekanizma, kanser hücrelerinde artan TCA substrat ve non-esansiyel amino asit üretimi ihtiyacını karşılamak üzere BCAA utilizasyonunun artması şeklinde ifade edilmektedir (248). Literatürde BCAA ve kanser ilişkisini inceleyen hemen hemen tüm bulguların birbirini doğrular nitelikte olması ve ilgili yolakların inhibisyonunda ortaya konan üstün terapötik başarı (249), HM etyogenesinde BCAA metabolizmasının ayrıntılı araştırılması ve hedeflenmesi gerektiğinin altını çizmektedir. Literatür bulguları arasında dallı zincirli amino asit transaminaz (BCAT1) adlı enzimin artan ekspresyonu özellikle AML lösemik kök hücrelerinde (LSC) ve KML’de blast krizinde gösterilmiş; bu enzimin etkisiyle BCA amino asitlerden α -KG aminasyonu sonucu hücre içi glutamatın artırıldığı kaydedilmiştir (250). Aynı çalışmada BCAT1 enziminin artan ekspresyonu sonucu LSC’de gözlenen DNA metilasyon paterni IDH-mutant hücrelerdekine çok benzer bulunmuştur (251). HM grubu hastalıklarda BCAA’lara ait serum seviyeleri ise çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlanmıştır. Örneğin moleküler alt grup ayrımında değerlendirilen serum NMR sonuçlarına göre KLL serumlarında kontrol grubuna kıyasla azalan izolösün seviyeleri gösterilmiştir (252). Öte yandan sıkça bahsedilen 2018 yılına ait serum NMR çalışmasında BCAA seviyeleri arasında grup farklılığı tespit edilememiştir. Bu bulguyu doğrular biçimde güncel çalışmada da gruplar arası ayrımında BCAA seviyesi farklılığı kaydedilememiştir fakat her üç HM grubunda da tutarlı şekilde lösin yıkım ürünü olan 3-hidroksiizovalerik asit seviyeleri düşük bulunmuştur (VIP skoru >1). Lösin katabolizması sırasında meydana gelen 3-hidroksiizovalerik asitin asetoasetat ve asetil koenzim A (AcCoA)’ya dönüşerek TCA döngüsüne girmesi ile serum miktarının düşmüş olduğu düşünülmektedir. Burada bir diğer bulgu olarak KLL ile NHL gruplarında ortak olarak anlamlı düşük bulunan asetat seviyeleri, ketojenik amino asit yıkımı sonucu oluşan keton cisimciklerinin karaciğerde artan glukoneogezde substrat olarak veya ekstrahepatik dokuların AcCoA ihtiyacında kullanılması sebebiyle gözlenmiş olabilmektedir (253). Bu hipotezi destekleyen bir 2022 çalışmasında, AML hücrelerinin stromal hücrelerden asetat sekresyonunu

indükleyerek TCA siklusu ile lipid biyosentezi yollarını besledikleri gösterilmiştir (254).

BCAA metabolizması ile yakından ilişkisi bulunan fenilalanin ve tirozin metabolizmasına bakıldığında ise, fenilalaninden oluşan tirozin seviyesinin hem NMR hem LC-HRMS sonuçlarında yalnızca KLL grubunda arttığı görülmektedir ve benzer örnekleme sahip 2018 sonuçlarında da KLL grubunda artan seviyesi raporlanmıştır (72). Fenilalanin ise NMR bulgularında yer almamış fakat LC-HRMS serum analizi tarafından AML ve NHL gruplarında kontrole göre artan seviyede bulunmuştur. Bu bulguları destekleyici sonuçlar arasında 2021 yılına ait bir çalışmada AML hasta idrar ve serumunda kontrole göre ileri düzeyde anlamlı artan fenilalanin seviyesi yer almaktadır (255). Wang, D. tarafından 2019’da yayınlanan bir serum LCMS çalışmasında ise AML hastalarında güncel LCMS analizi ile artan fenilalanin, asetilkarnitin, oleamid ve azalan piroglutamat seviyesi gibi birçok metabolit açısından örtüşen sonuçlar kaydedilmiştir (256). Literatürde sık rapor edilmiş (257, 258) ve çalışmada da doğrulanan fenilalanin ile tirozin amino asitlerinin serumda yükselen seviyeleri, HM patogenezinde bu amino asitlerin tümör büyümesi ve artan enerji ihtiyacında kullanılmak üzere protein yıkımı ile artan düzeyde oluşturulduğunu düşündürmektedir (256).

Ek bulgu olarak NHL serum LCMS analizinde ortaya konan triptofan seviyesi yükselişinin de yine aktif protein katabolizması sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Fakat bu sonuç, 2018 NMR çalışmasında HM arasında en düşük triptofan seviyesinin NHL’de kaydedildiği ve grup ayrımında önemli bulunan triptofana dair bulgu ile örtüşmemektedir (56). Literatürde triptofan katabolizması artışı ve kinürenin yolağının kanser hücrelerinde ortak bir mekanizma olduğu çoğu çalışmada kanıtlanmış (259) ve HM araştırmalarında AML (260), T-hücreli (261), Hodgkin (262) ve NHL lenfoma (263) hastalarında artan katabolizmaya bağlı serumda seviyesi düşen triptofan seviyelerinin kötü prognozla ilişkisi ortaya konmuştur. Çalışmada yer alan NHL hastalarının neredeyse tümünü oluşturan popülasyonun indolan lenfoma hastaları (foliküler ve splenik marjinal zon alt tipleri) olması ve serum triptofan düşüklüğünün/ kinürenin artışının özellikle diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBHL) gibi agresif türlerde kaydedilmesi sebebiyle mevcut bulgu, NHL grubunda serum triptofan düzeyinin prognostik klinik belirteç olarak kullanımının önünü açmış ve ileriki çalışmalar için yol gösterici olmuştur.

Kanser hücrelerinin glutamine benzer şekilde universal olarak utilize ettiği ve esansiyel amino asit olarak eksternal alıma bağımlı olduğu (264) arjinine ait serum seviyeleri NMR analizinde her üç grupta da değişim göstermemekle beraber, arjinin metabolizması ürünleri olan üre, kreatinin (AML hariç) ve metilguanidin tüm gruplarda yüksek bulunmuştur (VIP skorları >1,5). Endojen protein katabolizması ara ürünü ve bir üremik toksin olan metilguanidin (MG) molekülünün nitrik oksit sentaz inhibitörü işlevi bilinmekte ve lökositlerdeki proenflamatuvar etkilerinden söz edilmektedir (265). MG temelde kreatinin oksidasyonu ve arjininden katabolizması sonucu meydana gelmektedir. Dolayısı ile tüm HM gruplarında yüksek grup ayırım gücü olan ve artan seviyede bulunan MG'nin, ortak olarak artmış arjinin turn-overı ile yükselen kreatinin düzeyi sonucu oksidasyon ürünü olarak serumda arttığını düşündürmektedir. Üremik bir toksin olarak artan seviyelerinin böbrek yetmezliği ile ilişkisi kaydedildiği ve güncel çalışmada yer alan AML başta olmak üzere akut ve kronik böbrek yetmezliğinin sık gözlemlendiği hasta popülasyonunda yüksek MG seviyeleri böbrek fonksiyonlarının bozulması ile de açıklanabilmektedir. Bu noktada rutin parametreler ile NMR konsantrasyonları arasında (mM) korelasyon analizine bakıldığında MG molekülünün üre, kreatinin ve arjinin ile kontroller de dahil olmak üzere hiçbir grupta anlamlı korelasyon göstermediği fakat AML hastalarında lösin ve valin; KLL'de ise CRP parametresi ile yüksek pozitif korelasyonu gösterilmiştir. Tüm bunlara dayanarak CRP ve dallı zincirli amino asit korelasyon bulgusunu da açıklayabilecek biçimde artan MG seviyelerinin sebebi böbrek disfonksiyonundan çok, kanser kaşeksisi tablosunda gözlenen sitokin fırtınası ve sonuçta artan protein katabolizmasını akla getirmektedir.

TCA ara ürünlerinden fumarat ile döngüye asetil-CoA üzerinden giren ve ROS varlığında pirüvattan oluşan asetat molekülünün düşüklüğü, serum NMR analizlerinde KLL ve NHL'de en yüksek VIP skora sahip (fumarat VIP> 3) grup ayırıcı moleküller olarak ortaya konmuş; kanser hücrelerinde gözlenen TCA siklusuna olan metabolik kayma hipotezini desteklemiştir (228). Yine NHL hasta serumlarında kaydedilen ve asetat metabolizması sırasında oluşan formata (VIP>1,5) ait düşüş, Warburg etkisinden öte proliferasyon için gerekli enerjinin eldesinde ve kemorezistansın oluşturulmasında ihtiyaç bulunan aktifleşmiş TCA yolağında bahsedilen ara metabolitlerin tükenen miktarlarına işaret etmektedir (266). Literatürde çalışma sonuçlarından fumarat bulgusunu destekleyici olarak, KLL grubunda düşük serum

düzeyi (252) anlamlılığı bildirmiştir. Ayrıca AML grubunda yapılan 2023' e ait güncel bir serum proteomiks çalışmasında artan fumarat hidrataz (fumarat-malat transformasyonunu gerçekleştiren enzim) konsantrasyonu tespit edilmiş ve bu bulgunun hastalarda kötü prognozla ilişkisi ortaya konmuştur (267). Harvard Üniversitesi'nde gerçekleştirilen ve ilginç sonuçları olan bir diğer çalışmada fumarat ara metabolitinin malik enzim 2 aracılığıyla mitokondriyel biyosentezi indüklediği gösterilmiş, biyosentezin sık gözlemlendiği ve OXPHOS sistemine bağımlı AML gibi malignansilerde terapötik yaklaşım olarak bu ilişkinin hedeflenmesi önerilmiştir (268).

Adenozin ve inozin nükleozitleri, düşük gözlenebilirlik sınırı (LOD) sebebiyle NMR sonuçlarında yer almamakla beraber AML ve NHL gruplarında anlamlı düşük seviyeleri açısından LC-HRMS analizi ile ortaya konmuştur. cGMP-AMP sinyal yolları ile ilişkili olan ve ATP molekülünün yapıtaşı olarak organizmalarda enerji statüsü değerlendirilmesinde kullanılan bu küçük nükleozitlerin kontrole göre azalmış seviyeleri, blast ve lenfositlerde oluşan enerji üretimi ihtiyacına bağlı olarak serumdan substrat olarak hücrelere taşınımının arttığını düşündürmektedir.

Lipit-İlişkili Metabolizma

Çalışma sonuçlarında göze çarpan en önemli ve ortak metabolitleri içeren lipit değişimleri, fosfolipit metabolizmasında kaydedilmiştir. Bu değişimler temel olarak serum ve lökosit izolatlarında oldukça düşük miktarda bulunan polar lipitleri dahi yüksek sensitivite ile yakalayabilen kalitatif LC-HRMS metodolojisi ile elde edilmiştir. AML ve NHL serumlarında kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren diferansiyel fosfolipitlerden çeşitli PEA ve PC türleri, serum NMR analizinde yalnızca KLL grubunda yakalanmakla beraber, bu lipitlere ait serum seviyelerinin önceki çalışmalarda özellikle AML grubunda arttığından bahsedilmiş ve 2021 yılına ait bir çalışmada kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (243). Daha önce HM'de anlamlılıklarına dair olası mekanizmaları ayrıntılarıyla tartışılan ve NMR metodolojisinin düşük gözlenebilirlik sınırı (LOD) sebebiyle tespit edilemeyen bu fosfolipit türleri, çalışmada komplementer olarak kullanılan ve metabolit spektrumunu genişleten LC-HRMS teknolojisi ile AML ve NHL hasta serumlarında artmış bulunarak literatür verileri doğrulanmıştır. KLL serum LCMS profili ise, NMR ile artmış bulunan PEA seviyelerini teyit etmektedir.

Fosfokolinden sonra en sık bulunan ikinci kolin rezervi ve hücre membranlarının vazgeçilmez yapıtaşı olan gliserofosfokoline (GFK) ait serum seviyeleri ise LCMS analizinde ortaya konduğu üzere KLL ve NHL gruplarında ileri düzeyde düşük bulunmuştur. GFK, özellikle beyin dokusunda asetilkolin prekürsörü olarak ve monoamin iletiminde görev alan, kognitif iyilik halinin sürdürülmesinde primer öneme sahip bir kolinerjik fosfolipittir (269). KLL lenfositlerini inceleyen bir çalışmada kontrole kıyasla artan hücre içi GFK seviyesi bildirilmiştir (270). Güncel çalışmada bu bulguyu doğrulayan biçimde yalnızca KLL lökosit izolatlarına ait LCMS sonuçlarında artan GFK anlamlı bulunmuştur. Prolifere olan hücrelerde yapıtaşı olarak kullanılan GFK molekülünün serumda düşen ve hücre içi artan seviyesi anabolik mekanizmalarda kullanılarak utilizasyonunun arttığını düşündürmektedir.

Hematolojik malignite gruplarında kontrole kıyasla ortak olarak artan çok uzun zincirli yağ asitleri dokozatrienoik ve dokozenoik asit, HM patogenezinde disregüle olan ve birçok çalışma tarafından aberasyonu ortaya konan yağ asidi metabolizması değişimlerine (271, 272) örnek teşkil etmektedir. Özellikle AML blastlarında ortaya konan oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) artışı, bu hücrelerin hipoksi ve besin yetersizliği gibi dış faktörlere karşı geliştirdiği kompensasyon mekanizması olarak değerlendirilmekte ve mitokondri kütlesinin ciddi artışı OXPHOS ve yağ asidi beta oksidasyonu gibi aktive olan mitokondri fonksiyonlarına işaret etmektedir (273). Bu noktada AML haricinde de çeşitli HM'de OXPHOS sistemini beslemek ve TCA siklusu üzerinden artan asetil-CoA ihtiyacını karşılamak üzere artan uzun-çok uzun zincirli yağ asidi oksidasyonu mekanizmaları bildirilmiştir (274, 275). Güncel çalışmada hem serum hem de lökosit izolatlarında artan çok uzun zincirli yağ asidi seviyeleri literatür bulguları ışığında (273, 276) bu moleküllerin artan oksidasyona yakıt sağlamak amacıyla çevre dokulardan (kemik iliği adipositleri veya adipoz doku) destek olarak plazmaya salınımının arttığını düşündürmektedir.

Hematolojik malignitelerde kanser hücresinin yaşam devamlılığı için anahtar rol oynayan beta oksidasyon artışı mekanizması ile uyumlu olarak beklenen bir sonuç da, mitokondri iç zarından orta-uzun zincirli yağ asidi taşınımı gerçekleştiren karnitin molekülü ihtiyacıdır (277). Karnitin molekülü karaciğer, böbrek ve beyinde lizin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenen bir türev olmak üzere %90'ından fazlası iskelet ve kalp kasında yerleşmiştir (278). Enerji metabolizmasındaki rolü yanı sıra mitokondride üretilen atık maddelerin sitoplazmaya aktarılması (fazlalık açıl

gruplarının) gibi farklı işlevleri de belirtilmiştir (279). Bu gibi kardinal fonksiyonlarından dolayı karnitin molekülünün endojen üretimi oldukça stabil tutulmakta ve serumda binde 5'lik kısmı yer almaktadır (280). Serum karnitin seviyeleri değerlendirilirken bir diğer önemli nokta, karnitinin serum/ plazmada en çok bulunduğu serbest formun yaklaşık seviyesi 50 μM iken, total karnitin seviyesinin yalnızca 60 μM seviyesinde bulunduğudır (281). Bu sebeple serumda karnitin eksikliği incelenirken önemli olan parametre, açıl karnitin/ serbest karnitin değeridir. Bu oran 0.4 seviyesinin üzerinde artarsa karnitin eksikliğinden bahsedilmektedir. Güncel çalışmada serum LCMS analizi sonuçlarına göre her üç HM grubunda da karnitinin ester formu (asetil-karnitin) artmış bulunmakta olup, NMR analizinde ise NHL grubunda serbest form düşüklüğü tespit edilmiştir. Bu durumda NHL grubunda ester form/ serbest form oranının artışından ve görece karnitin eksikliğinden bahsedilebilmektedir. Kilit role sahip karnitin molekülünün NMR metodolojisi ile NHL serumlarında tespit edilerek anlamlı bulunması, bu grup hastalarda kanser gelişiminden sorumlu lenfositlerde ciddi bir oksidasyon artışına işaret etmektedir. Literatürde NHL hastalarına ait serumlarda benzeri bir bulgu mevcut olmadığından güncel çalışma, özellikle NHL lenfositlerinde olası artan oksidasyon mekanizmalarının aydınlatılmasını gerekli kılmaktadır. Öte yandan lökosit LCMS analizlerinde ortaya konan ve yalnızca NHL grubunda kontrole göre yüksek bulunan hücre içi asetilkarnitin düzeyi mekanizmasının da, plazma esterazlarınca parçalanan asetilkarnitinden serbest hale gelen karnitinin serumda azalarak hücre içine girişi sonrası oksidasyon son ürünü ester formuna çevrilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada anlamlılık değeri NHL grubunda en yüksek olmak üzere her 3 grupta artan seviyeleri kaydedilen oleamid, omega-9 tekli doymamış yağ asidi olan oleik asidin amit formu olarak üretilen endojen bir moleküldür. Uyku fizyolojisi ve kannabinoid 1 (CB1) reseptör agonizması olarak işlevleri tanımlanmıştır (282). Çeşitli nörotransmitter maddeler ile olan etkileşimleri de kaydedilmiştir. HM'de oksidasyona olan dayanıklılığı ile serum LCMS analizlerinde genellikle tespit edilebilir bir molekül olan oleamidin artışı, güncel bulguları doğrulayacak şekilde gösterilmiştir. Örneğin AML hastalarında kontrole göre artan serum seviyesi ve yanı sıra prekürsörü olan oleik asit düşüklüğü bildirilmiştir (256). Benzer şekilde güncel sonuçlarda her üç HM grubunda da N-Oleoil glisin adlı molekül anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. N-Oleoil

glisin, insan plazmasında ‘human glycine N-acyltransferase-like 2 (hGLYATL2)’ adlı glisine tercihen oleik asitin konjuge edilmesini sağlayan enzim ile üretilmektedir. Çalışmada oleik asit yerine N-Oleoil glisinin düşüşü ise bir başka çalışmada ortaya atılan reaksiyon ile ilişkili olabilmektedir (283). *Biochemistry* dergisinde yayınlanan bu reaksiyon mekanizmasına göre oleamit molekülünün plazmada prekürsörü oleik asit ve ara metabolite de N-Oleoyl glisin olarak tariflenmiştir (oleik asit → oleoil-CoA → N-oleoilglisin → oleamit). Güncel sonuçlar 2004 yılında aydınlatılan bu mekanizmayı valide eder nitelikte olup, gruplarda ortak bulunan oleamit seviyelerindeki anlamlı artıştan N-oleoilglisin molekülünün yağ asidi amit yapısına dönüşümü sorumlu tutulmaktadır. Oleamit molekülünün güncel ve eski çalışmalarda raporlanan değişimi, HM’de artan yağ asidi oksidasyonu ile ilişkisi (256) ve patofizyolojideki rolü ise ileri araştırmaları gerekli kılan önemlilik arz etmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hedef hasta popülasyonunda metabolomiks çalışması gerçekleştirilirken; NMR’ ın mutlak kantitasyondaki başarısı ve MS’ in geniş biyolojik molekülleri kapsayacak şekilde sensitif oluşu bu metotların komplementer kullanımını değerli kılmaktadır. Her iki metodu kapsayacak şekilde tasarlanan çalışma prosedürü bu yönüyle literatürde bir ilk olarak incelenen patolojilere ait kapsamlı bilgiler sunmaktadır. NMR ve MS analizleri ile ortaya konan, çift valide edilmiş sonuçlarda gruplar arası ayırmada anlamlı bulunan metabolitler ve metabolik yollar lenfoma/ lösemi patogenezinin ait bilgi birikimine katkıda bulunmakta ve gelecekte bireysel tedavilerin geliştirilmesi adına hedef bir platform oluşturmaktadır.

Çalışma sonuçlarına göre hematolojik malignitelere öne çıkan metabolit ve yollar glukoz ile amino asit metabolizması, lipid-ilişkili metabolizma ve strese bağlı indüklenen değişimlerini kapsamaktadır. HM gruplarında gerçekleştirilen metabolik profillemeye çalışması ilgili bulgularda keskin sonuçlara varmak yerine metabolizma araştırmalarına kestirme hedefler sunan bir ön çalışma niteliğindedir. Bir diğer anlamda disregüle olan biyokimyasal yolların araştırıldığı trend araştırmasına örnek teşkil etmektedir. AML grubunda öne çıkan dallı zincirli amino asit ve sarkozin-glisin

yolağı; KLLve NHL gruplarında öne çıkan TCA siklusu ilişkili değişimler ve tüm gruplarda kaydedilen lipit-ilişkili metabolizmaya ait ortak aberasyonlar gelecekteki ayrıntılı analizler (örneğin single cell/ fluksomiks çalışmaları) için literatüre bilgi sunarak araştırmacılara yol göstermektedir.

Bir diğer pratik çıktı ise gelecekte tüm rutin laboratuvarlara girmesi oldukça muhtemel görünen LCMS teknolojisi ile kolay numune hazırlığı içeren metodoloji kullanılarak hasta bazlı (personalized medicine) tanı ve tedavi uygulamalarının gerçekleştirilebileceğinin gösterilmesidir. Bu noktada kişisel tarama ve bireye yönelik yaklaşım, hematolojik kanserler gibi oldukça heterojen alt gruplar ile genomik alt yapıları barındıran kompleks hastalıklarda büyük zaman kazancı ve tedavi başarısı sağlamaktadır. Öncelikle insan vücudunun sağlıklı dinamik fizyolojisinin sirkadyen ve çevresel değişimleri de göz önüne alarak ortaya konması ile, hastalığa özgü analit sınır-değerleri belirlenebilecek ve bundan olası sapmalar kişisel değerlendirme bazında yapılabilecektir. Ayrıca karşılaşılan bir handikap olarak incelenen hasta popülasyonunun yalnızca küçük bir kısmının çalışmada yer almasına bağlı gelişen bias da ortadan kaldırılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. J. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(10), 673-694.
- [2] Rennie, R., & Law, J. (Eds.). (2019). *A dictionary of physics*. Oxford University Press.
- [3] ASTM (2016). *Standard Guide for Sampling Seized Drugs for Qualitative and Quantitative Analysis* (ASTM E2548-16). Retrieved from <https://www.astm.org/Standards/E2548.htm>.
- [4] **Bilim etiği ve bilimde sahtekarlık.** (t.y.). Erişim: 04 Nisan 2006, <http://www.aek.yildiz.edu.tr/bilim.htm>
- [5] Misra, A., & Shahiwala, A. (2019). *Novel Drug Delivery Technologies: Innovative Strategies for Drug Re-positioning*. Springer.
- [6] Başer, M. Ö., Bilber, O. ve Bektaş, N. (2020). Aktif farmasötik bileşenler analizi (Rapor No. TAG002). Ankara: UGRL YT Raporu.
- [7] Kokaz, S. F., Deb, P. K., Abed, S. N., Al-Aboudi, A., Das, N., Younes, F. A., ... & Mailavaram, R. P. (2020). Pharmacology of Acetylcholine and Cholinergic Receptors. In *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters* (pp. 69-105). Springer, Singapore.
- [8] **Devlet Planlama Teşkilatı.** (2004). *Devlet Yardımlarını Değerlendirme Özel İhtisas Komisyonu Raporu* (Rapor No: DPT: 2681). Ankara: Devlet Planlama Teşkilatı.
- [9] Mai, Q. N. (2019). *Intracellular drug delivery: a route to more selective and effective treatments for disease* (Doctoral dissertation, University of Nottingham).
- [10] Hekel, B. E. (2017). *Influence of Expectations of Aging on Older Women's Use of Dietary Supplements Using the Health Promotion Theory* (PhD thesis). Available from ProQuest Dissertations and Theses database (publication No. 10604917).
- [11] Ozcan, A., & Wei, Q. (2019). *U.S. Patent No. 10,365,214*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [12] Moore, C. (1991). Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of chemical technology* (4th ed.) (Vol 15, pp. 1071-1094). New York, NY: Wiley.
- [13] *New child vaccine gets funding boost.* (2001). Retrieved March 21, 2001, from http://news.ninemsn.com.au/health/story_13178.asp
- [14] **6197 Sayılı Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Kanun.** (1953). *T. C. Resmi Gazete*, 8591, 24 Aralık 1953.
- [15] **Url-3** <<http://www.mohid.com>>, date retrieved 29.06.2006.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2022;72(1):7-33.
2. Ries L, Eisner M, Kosary C, Hankey B, Miller B, Clegg L, et al. SEER (surveillance, epidemiology and end results) Cancer Statistics Review, 1973–1999, National Cancer Institute. Bethesda, Maryland. 2002.
3. Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2020;10(6):a034819.
4. Guillerman RP, Voss SD, Parker BR. Leukemia and lymphoma. *Radiologic Clinics*. 2011;49(4):767-97.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
6. de Haas V, Ismaila N, Advani A, Arber DA, Dabney RS, Patel-Donnelly D, et al. Initial Diagnostic Work-Up of Acute Leukemia: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists and American Society of Hematology Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(3):239-53.
7. Lewis WD, Lilly SM, Jones KL. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *American family physician*. 2020;101 1:34-41.
8. Gill H, Kwong Y-L, Ravandi F. Acute Promyelocytic Leukemia—Towards A Chemotherapy-Free Approach to Cure in All Patients. *Frontiers Media SA*; 2022. p. 831308.
9. Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: diagnosis and treatment. *American family physician*. 2020;101(1):34-41.
10. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, MacLennan KA, Müller-Hermelink HK, Bast M, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 2016;101(10):1244.
11. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 2012;380(9844):848-57.
12. Singh R, Shaik S, Negi BS, Rajguru JP, Patil PB, Parihar AS, et al. Non-Hodgkin's lymphoma: a review. *Journal of family medicine and primary care*. 2020;9(4):1834.
13. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):760-9.
14. Grossmann V, Haferlach C, Weissmann S, Roller A, Schindela S, Poetzinger F, et al. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2013;52(4):410-22.
15. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;126(4):445-53.

16. Cai SF, Levine RL, editors. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Seminars in hematology*; 2019: Elsevier.
17. Bakhshi TJ, Georgel PTJBCJ. Genetic and epigenetic determinants of diffuse large B-cell lymphoma. 2020;10(12):123.
18. Sender R, Milo RJNm. The distribution of cellular turnover in the human body. 2021;27(1):45-8.
19. Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Pelayo R, Schnoor MJBr. T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): new insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. 2018;32(1):36-51.
20. Ball M, List AF, Padron EJB, The Journal of the American Society of Hematology. When clinical heterogeneity exceeds genetic heterogeneity: thinking outside the genomic box in chronic myelomonocytic leukemia. 2016;128(20):2381-7.
21. Letai AJCC. Precision medicine in AML: Function plus-omics is better than either alone. 2022;40(8):804-6.
22. Dai X, Shen LJFiM. Advances and trends in omics technology development. 2022;9:1546.
23. Karr JR, Sanghvi JC, Macklin DN, Gutschow MV, Jacobs JM, Bolival B, et al. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. 2012;150(2):389-401.
24. Beneyto-Calabuig S, Merbach AK, Kniffka J-A, Antes M, Szu-Tu C, Rohde C, et al. Clonally resolved single-cell multi-omics identifies routes of cellular differentiation in acute myeloid leukemia. 2023;30(5):706-21. e8.
25. Caplan M, Wittorf KJ, Weber KK, Swenson SA, Gilbreath TJ, Willow Hynes-Smith R, et al. Multi-omics reveals mitochondrial metabolism proteins susceptible for drug discovery in AML. 2022;36(5):1296-305.
26. Panuzzo C, Jovanovski A, Ali MS, Cilloni D, Pergolizzi B. Revealing the mysteries of acute myeloid leukemia: from quantitative PCR through next-generation sequencing and systemic metabolomic profiling. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(3):483.
27. Dai X, Shen L. Advances and trends in omics technology development. *Frontiers in Medicine*. 2022;9:1546.
28. Veenstra TD. Omics in systems biology: current progress and future outlook. *Proteomics*. 2021;21(3-4):2000235.
29. Manzoni C, Kia DA, Vandrovcova J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief Bioinform*. 2018;19(2):286-302.
30. Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015;3.
31. Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015;3:23.
32. Wishart DS. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiological Reviews*. 2019;99(4):1819-75.
33. Rahman MM, Mim SA, Islam M, Sultana N, Ahmed M, Kamal MA. Role of G-proteins and GPCR-mediated signalling in neuropathophysiology. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2023;22(1):2-5.
34. Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, Spilker ME, Siuzdak G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nat Biotechnol*. 2018;36(4):316-20.

35. Muthubharathi BC, Gowripriya T, Balamurugan K. Metabolomics: small molecules that matter more. *Molecular omics*. 2021;17(2):210-29.
36. Emwas A-H, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda G, et al. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*. 2019;9(7):123.
37. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems biology and multi-omics integration: viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites*. 2019;9(4):76.
38. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(7):451-9.
39. Emwas A-H, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GN, et al. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*. 2019;9(7):123.
40. Günther H. NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry: John Wiley & Sons; 2013.
41. Wilson D, Burlingame A, Cronholm T, Sjövall J. Deuterium and carbon-13 tracer studies of ethanol metabolism in the rat by ²H, ¹H-decoupled ¹³C nuclear magnetic resonance. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974;56(3):828-35.
42. Emwas A-HM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Metabonomics*: Springer; 2015. p. 161-93.
43. Embade N, Cannet C, Diercks T, Gil-Redondo R, Bruzzone C, Ansó S, et al. NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-9.
44. Emwas A-HM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban JJM. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. 2013;9(5):1048-72.
45. Gebregiorgis T, Powers RJCc, screening ht. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers. 2012;15(8):595-610.
46. Fonville JM, Maher AD, Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JKJAC. Evaluation of full-resolution J-resolved ¹H NMR projections of biofluids for metabonomics information retrieval and biomarker identification. 2010;82(5):1811-21.
47. Miccheli A, Tomassini A, Puccetti C, Valerio M, Peluso G, Tuccillo F, et al. Metabolic profiling by ¹³C-NMR spectroscopy:[1, 2-¹³C₂] glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells. 2006;88(5):437-48.
48. Rainaldi G, Romano R, Indovina P, Ferrante A, Motta A, Indovina PL, et al. Metabolomics using ¹H-NMR of apoptosis and Necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. 2008;169(2):170-80.
49. Morad HM, Abou-Elzahab MM, Aref S, El-Sokkary AM. Diagnostic value of ¹H NMR-based metabolomics in acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, and breast cancer. *ACS omega*. 2022;7(9):8128-40.
50. MacIntyre D, Jimenez B, Lewintre EJ, Martin CR, Schäfer H, Ballesteros CG, et al. Serum metabolome analysis by ¹H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. 2010;24(4):788-97.
51. Koczula K, Ludwig C, Hayden R, Cronin L, Pratt G, Parry H, et al. Metabolic plasticity in CLL: adaptation to the hypoxic niche. 2016;30(1):65-73.
52. Stenson M, Pedersen A, Hasselblom S, Nilsson-Ehle H, Karlsson BG, Pinto R, et al. Serum nuclear magnetic resonance-based metabolomics and outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients—a pilot study. 2016;57(8):1814-22.

53. Graça G, Desterro J, Sousa J, Fonseca C, Silveira M, Serpa J, et al. Identification of putative biomarkers for leptomeningeal invasion in B-cell non-Hodgkin lymphoma by NMR metabolomics. 2017;13(11):1-11.
54. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, Wang J-H, Li N, Li J-M, et al. Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabolomic analysis. *Journal of proteome research*. 2013;12(10):4393-401.
55. Cano KE, Li L, Bhatia S, Bhatia R, Forman SJ, Chen YJJopr. NMR-based metabolomic analysis of the molecular pathogenesis of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia. 2011;10(6):2873-81.
56. Wojtowicz W, Chachaj A, Olczak A, Ząbek A, Piątkowska E, Rybka J, et al. Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. 2018;9(36):24414.
57. Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: A guide for annotation, quantification and best reporting practices. 2021;18(7):747-56.
58. Wishart DSJB. Advances in metabolite identification. 2011;3(15):1769-82.
59. Soldin SJ, Soldin OPJCC. Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. 2009;55(6):1061-6.
60. Bakhtiar R, Lohne J, Ramos L, Khemani L, Hayes M, Tse FJJCB. High-throughput quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec™) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. 2002;768(2):325-40.
61. Boddy AV, Sludden J, Griffin MJ, Garner C, Kendrick J, Mistry P, et al. Pharmacokinetic investigation of imatinib using accelerator mass spectrometry in patients with chronic myeloid leukemia. 2007;13(14):4164-9.
62. Awidi A, Salem II, Najib N, Mefleh R, Tarawneh BJLr. Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: methods' comparison. 2010;34(6):714-7.
63. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. 2007;109(8):3496-9.
64. Ramandi NF, Faranoush M, Ghassempour A, Aboul-Enein HYJCRiAC. Mass Spectrometry: A Powerful Method for Monitoring Various Type of Leukemia, Especially MALDI-TOF in Leukemia's Proteomics Studies Review. 2021:1-28.
65. Roy S, Josephson SA, Fridlyand J, Karch J, Kadoch C, Karrim J, et al. Protein biomarker identification in the CSF of patients with CNS lymphoma. 2008;26(1):96.
66. Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells*. 2021;10(5):1056.
67. Stuani L, Sabatier M, Sarry JE. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol*. 2019;17(1):57.
68. Willems L, Jacque N, Jacquel A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(20):3521-32.
69. Southam AD, Khanim FL, Hayden RE, Constantinou JK, Koczula KM, Mitchell RH, et al. Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids. *Cancer Research*. 2015;75(12):2530-40.
70. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(5):325-37.

71. Liu F, Kalpage HA, Wang D, Edwards H, Hüttemann M, Ma J, et al. Cotargeting of Mitochondrial Complex I and Bcl-2 Shows Antileukemic Activity against Acute Myeloid Leukemia Cells Reliant on Oxidative Phosphorylation. *Cancers*. 2020;12(9):2400.
72. Wojtowicz W, Chachaj A, Olczak A, Ząbek A, Piątkowska E, Rybka J, et al. Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. *Oncotarget*. 2018;9(36):24414-27.
73. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *ASH Education Program Book*. 2004;2004(1):80-97.
74. Forthun RB, Hinrichs C, Dowling TH, Bruserud Ø, Selheim F. The Past, Present and Future Subclassification of Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(1):6-19.
75. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
76. Hasserjian RP. Controversies in the recent (2016) World Health Organization classification of acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2021;34(1):101249.
77. Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, Sanders MA, Hricik T, Rapaport F, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nature Medicine*. 2016;22(7):792-9.
78. Wojcicki AV, Kasowski MM, Sakamoto KM, Lacayo N. Metabolomics in acute myeloid leukemia. *Mol Genet Metab*. 2020;130(4):230-8.
79. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, et al. AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2005;43(2):113-27.
80. Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *British Journal of Haematology*. 2002;118(2):426-31.
81. Romer-Seibert JS, Meyer SE. Genetic heterogeneity and clonal evolution in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*. 2021;28(1):64-70.
82. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay MJBcj. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. 2016;6(7):e441-e.
83. Blackburn LM, Bender S, Brown S. Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(6):150950.
84. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. 2022;140(12):1345-77.
85. Song Z, Wang H, Yin X, Deng P, Jiang WJCC, Medicine L. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers in blood. 2019;57(4):417-41.
86. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
87. DE GROOT PM. 24 Non-Hodgkin Lymphoma. *Muller's Imaging of the Chest E-Book: Expert Radiology Series*. 2018:401.
88. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. *Hematological oncology*. 2017;35:37-45.

89. Sapkota S, Shaikh H. Non-Hodgkin Lymphoma. 2020.
90. Al-Naeeb AB, Ajithkumar T, Behan S, Hodson DJ. Non-Hodgkin lymphoma. *Bmj*. 2018;362.
91. Sun R, Medeiros LJ, Young KH. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Modern Pathology*. 2016;29(10):1118-42.
92. de Jong D, Fest TJP, Haematology RC. The microenvironment in follicular lymphoma. 2011;24(2):135-46.
93. Esmeray E, Küçük C. Genetic alterations in B cell lymphoma subtypes as potential biomarkers for noninvasive diagnosis, prognosis, therapy, and disease monitoring. *Turkish journal of biology*. 2020;44(1):1-14.
94. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(15):1396-407.
95. Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-Garcia D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(45):18250-5.
96. Iqbal J, Shen Y, Huang X, Liu Y, Wake L, Liu C, et al. Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma. 2015;125(7):1137-45.
97. Sun R, Medeiros LJ, Young KHJMP. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. 2016;29(10):1118-42.
98. Ricard F, Cheson B, Barrington S, Trotman J, Schmid A, Brueggenwerth G, et al. Application of the Lugano Classification for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The PRoLoG Consensus Initiative (Part 1—Clinical). *Journal of Nuclear Medicine*. 2023;64(1):102-8.
99. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American journal of hematology*. 2021;96(12):1679-705.
100. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16(11):684-701.
101. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2023;73(1):17-48.
102. Strati P, Jain N, O'Brien S, editors. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*; 2018: Elsevier.
103. Wu AH. *Tietz clinical guide to laboratory tests-E-book*: Elsevier Health Sciences; 2006.
104. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*. 2019;94(11):1266-87.
105. Lazarian G, Guïèze R, Wu CJ. Clinical implications of novel genomic discoveries in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(9):984.
106. Mayer RL, Schwarzmeier JD, Gerner MC, Bileck A, Mader JC, Meier-Menches SM, et al. Proteomics and metabolomics identify molecular mechanisms of aging potentially predisposing for chronic lymphocytic leukemia. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(2):290-303.

107. Li N, Kuo C-L, Paniagua G, Van Den Elst H, Verdoes M, Willems LI, et al. Relative quantification of proteasome activity by activity-based protein profiling and LC-MS/MS. 2013;8(6):1155-68.
108. Oncology IC-IWGJTL. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. 2016;17(6):779-90.
109. Rai K. A critical analysis of staging in CLL. Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions. 1987:253-64.
110. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. Nature reviews Molecular cell biology. 2012;13(4):263-9.
111. Letertre MPM, Giraudeau P, de Tullio P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current Challenges and Perspectives. Frontiers in Molecular Biosciences. 2021;8.
112. Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. Mass Spectrometry Reviews. 2019;38(3):221-38.
113. Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, Spilker ME, Siuzdak G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. Nature biotechnology. 2018;36(4):316-20.
114. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. Nucleic acids research. 2022;50(D1):D622-D31.
115. Sindelar M, Patti GJ. Chemical discovery in the era of metabolomics. Journal of the American Chemical Society. 2020;142(20):9097-105.
116. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. Current protocols in molecular biology. 2012;98(1):30.2. 1-.2. 24.
117. Blaise BJ, Correia GD, Haggart GA, Surowiec I, Sands C, Lewis MR, et al. Statistical analysis in metabolic phenotyping. Nature protocols. 2021;16(9):4299-326.
118. Dr. Ozdogan Web Page [Available from: <https://www.drozdogan.com/nukleer-manyetik-rezonans-metabolomik-testi-ile-kandan-erken-kanser-tanisi/>].
119. Reddy R. Introduction to NMR. Brief History of NMR. 2004;6(2):1-7.
120. Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science. 1971;171(3976):1151-3.
121. Uehara M, Chiba H, Mogi H, Suzuki K, Goto SJTJonb. Induction of increased phosphatidylcholine hydroperoxide by an iron-deficient diet in rats. 1997;8(7):385-91.
122. Shampo MA, Kyle RA, editors. Edward M. Purcell—Nobel Prize for Magnetic Resonance Imaging. Mayo Clinic Proceedings; 1997: Elsevier.
123. Guisasola J, Almudí JM, Salinas J, Zuza K, Ceberio M. The Gauss and Ampere laws: different laws but similar difficulties for student learning. European Journal of Physics. 2008;29(5):1005.
124. Atkins P, Atkins PW, de Paula J. Atkins' physical chemistry: Oxford university press; 2014.
125. hope chem- nmr interpretation [Available from: http://www.chem.hope.edu/~krieg/Chem348_2002/NMR/Principles_of_NMR_Spectroscopy.html].
126. Balci M. Basic ¹H-and ¹³C-NMR spectroscopy: Elsevier; 2005.
127. Jacobsen NE. NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology: John Wiley & Sons; 2007.
128. Seo YJ. LibreTexts-NMR Interpretation. Available from: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textb

- ook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR%3A_A_Experimental/NMR_-_Interpretation.
129. Seger C, Salzmänn L. After another decade: LC–MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clinical biochemistry*. 2020;82:2-11.
 130. Karch KR, Snyder DT, Harvey SR, Wysocki VH. Native mass spectrometry: recent progress and remaining challenges. *Annual review of biophysics*. 2022;51:157-79.
 131. Eliuk S, Makarov A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2015;8(1):61-80.
 132. Postigo C, Richardson SD. Non-target screening and novel methods based on mass spectrometry detection for identification of unknown disinfection byproducts. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2021;92:1-29.
 133. Märk TD, Dunn GH. *Electron impact ionization*: Springer Science & Business Media; 2013.
 134. Lorenzo M, Pico Y. Gas chromatography and mass spectroscopy techniques for the detection of chemical contaminants and residues in foods. *Chemical Contaminants and Residues in Food*: Elsevier; 2017. p. 15-50.
 135. Medhe S. Ionization techniques in mass spectrometry: a review. *Mass Spectrom Purif Tech*. 2018;4(126):2.
 136. Lange M, Lee H, Dallas D, Le Parc A, de Moura Bell J, Barile D. Determining functional properties and sources of recently identified bioactive food components: oligosaccharides, glycolipids, glycoproteins, and peptides. 2014.
 137. Ruth G, editor *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements* 2013.
 138. Hou T-Y, Chiang-Ni C, Teng S-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of food and drug analysis*. 2019;27(2):404-14.
 139. Clarke W. Mass spectrometry in the clinical laboratory: Determining the need and avoiding pitfalls. *Mass spectrometry for the clinical laboratory*: Elsevier; 2017. p. 1-15.
 140. Johnson GJJRR. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2005.
 141. Worsfold P, Townshend A, Poole CF, Miró M. *Encyclopedia of analytical science*: Elsevier; 2019.
 142. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*. 1998;17(1):1-35.
 143. Hocart CH. 9.10 Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification. *Comprehensive Natural Products II*. 2010:327-88.
 144. Sousa BC, Wakelam MJ, Lopez-Clavijo AF. Methods of lipid analysis. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*: Elsevier; 2021. p. 53-83.
 145. Koppenaal DW, Barinaga CJ, Denton MB, Sperline RP, Hieftje GM, Schilling GD, et al. *MS detectors*. ACS Publications; 2005.
 146. Allen JS. An improved electron multiplier particle counter. *Review of Scientific Instruments*. 1947;18(10):739-49.
 147. Brown K, Tautfest G. Faraday-cup monitors for high-energy electron beams. *Review of Scientific Instruments*. 1956;27(9):696-702.
 148. Dubois F, Knochenmuss R, Zenobi R. An ion-to-photon conversion detector for mass spectrometry. *International journal of mass spectrometry and ion processes*. 1997;169:89-98.

149. Barnes IV JH, Hieftje GM. Recent advances in detector-array technology for mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004;238(1):33-46.
150. Sinha MP, Wadsworth M. Miniature focal plane mass spectrometer with 1000-pixel modified-CCD detector array for direct ion measurement. *Review of scientific instruments*. 2005;76(2):025103.
151. Gross ML. Focus in honor of Fred McLafferty, 2003 Distinguished Contribution Awardee, for the discovery of the "McLafferty Rearrangement". ACS Publications; 2004. p. 951-5.
152. Fenn JB. Elektrospray: molekulare elefanten lernen das fliegen (nobel-vortrag). *Angewandte Chemie*. 2003;115(33):3999-4024.
153. Hillenkamp F, Karas M, Rosmarinowsky J. Processes of laser-induced ion formation in mass spectrometry. ACS Publications; 1985.
154. Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier J-P, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert review of Proteomics*. 2019;16(8):695-710.
155. Zhang J, Sans M, Garza KY, Eberlin LS. Mass spectrometry technologies to advance care for cancer patients in clinical and intraoperative use. *Mass Spectrometry Reviews*. 2021;40(5):692-720.
156. Scientific CJe-LftACC, LC/GC, Chromacademy. The theory of HPLC. Chromatographic parameters. 2014:1-21.
157. Foley JPJA. Resolution equations for column chromatography. 1991;116(12):1275-9.
158. Gritti F, Guiochon GJJCA. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. 2013;1302:1-13.
159. Durakovic BJPoE, Sciences N. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. 2017;5(3).
160. Anderson MJ, Whitcomb PJ. DOE simplified: practical tools for effective experimentation: CRC press; 2017.
161. Fisher RA. Design of experiments. *British Medical Journal*. 1936;1(3923):554.
162. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(6):889-901.
163. Kowang TO, Long CS, editors. Design of Experiment—An Integration of Fisher, Taguchi and Shainin DOE Methodology. *Applied Mechanics and Materials*; 2015: Trans Tech Publ.
164. Durakovic B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*. 2017;5(3).
165. Beg S, Swain S, Rahman M, Hasnain MS, Imam SS. Application of design of experiments (DoE) in pharmaceutical product and process optimization. *Pharmaceutical quality by design: Elsevier*; 2019. p. 43-64.
166. Bland M. An introduction to medical statistics: Oxford university press; 2015.
167. Antony J. Design of experiments for engineers and scientists: Elsevier; 2014.
168. DeVilbiss AW, Zhao Z, Martin-Sandoval MS, Ubellacker JM, Tasdogan A, Agathocleous M, et al. Metabolomic profiling of rare cell populations isolated by flow cytometry from tissues. 2021;10:e61980.
169. Dagur PK, McCoy Jr JP. Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Current protocols in cytometry*. 2015;73(1):5.1. -5.1. 16.
170. Nouroozi RV, Noroozi MV, Ahmadizadeh M. Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *Disease and Diagnosis*. 2015;4(1):11-7.

171. Lodge S, Nitschke P, Loo RL, Kimhofer T, Bong S-H, Richards T, et al. Low volume in vitro diagnostic proton NMR spectroscopy of human blood plasma for lipoprotein and metabolite analysis: application to SARS-CoV-2 biomarkers. *Journal of Proteome Research*. 2021;20(2):1415-23.
172. Madji Hounoum B, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Diémé B, Montigny F, Andres CR, et al. Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407:8861-72.
173. Giskeødegård GF, Madssen TS, Euceda LR, Tessem MB, Moestue SA, Bathen TF. NMR-based metabolomics of biofluids in cancer. *NMR in Biomedicine*. 2019;32(10):e3927.
174. Wojtowicz W, Chachaj A, Olczak A, Ząbek A, Piątkowska E, Rybka J, et al. Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. *Oncotarget*. 2018;9(36):24414.
175. Martineau E, Dumez JN, Giraudeau P. Fast quantitative 2D NMR for metabolomics and lipidomics: A tutorial. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2020;58(5):390-403.
176. Bingol K, Li DW, Zhang B, Brüschweiler R. Comprehensive Metabolite Identification Strategy Using Multiple Two-Dimensional NMR Spectra of a Complex Mixture Implemented in the COLMARm Web Server. *Anal Chem*. 2016;88(24):12411-8.
177. Kortz L, Dorow J, Becker S, Thiery J, Ceglarek U. Fast liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2013;927:209-13.
178. Muschet C, Möller G, Prehn C, de Angelis MH, Adamski J, Tokarz J. Removing the bottlenecks of cell culture metabolomics: fast normalization procedure, correlation of metabolites to cell number, and impact of the cell harvesting method. *Metabolomics*. 2016;12(10):151.
179. Chong J, Xia J. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*. 2018;34(24):4313-4.
180. Mogensen K, Cantell K. Production and preparation of human leukocyte interferon. *Pharmacology & Therapeutics Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors*. 1977;1(4):369-81.
181. Park SJ, Park MJ, Park S, Lee E-S, Lee DY. Integrative metabolomics of plasma and PBMCs identifies distinctive metabolic signatures in Behçet's disease. *Arthritis Research & Therapy*. 2023;25(1):1-13.
182. Maciejewski MW, Schuyler AD, Gryk MR, Moraru II, Romero PR, Ulrich EL, et al. NMRbox: a resource for biomolecular NMR computation. *Biophysical journal*. 2017;112(8):1529-34.
183. Wishart DS, Cheng LL, Copié V, Edison AS, Eghbalnia HR, Hoch JC, et al. NMR and Metabolomics—A Roadmap for the Future. *Metabolites*. 2022;12(8):678.
184. Wishart DS, Cheng LL, Copié V, Edison AS, Eghbalnia HR, Hoch JC, et al. NMR and Metabolomics—A Roadmap for the Future. *Metabolites*. 2022;12(8):678.
185. Theis T, Truong ML, Coffey AM, Shchepin RV, Waddell KW, Shi F, et al. Microtesla SABRE enables 10% nitrogen-15 nuclear spin polarization. *Journal of the American Chemical Society*. 2015;137(4):1404-7.

186. Adams RW, Aguilar JA, Atkinson KD, Cowley MJ, Elliott PI, Duckett SB, et al. Reversible interactions with para-hydrogen enhance NMR sensitivity by polarization transfer. *Science*. 2009;323(5922):1708-11.
187. Dona AC, Jiménez B, Schäfer H, Humpfer E, Spraul M, Lewis MR, et al. Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. 2014;86(19):9887-94.
188. Gowda GN, Raftery D. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *Analytical chemistry*. 2014;86(11):5433-40.
189. Nagana Gowda GA, Hong NN, Raftery D. Evaluation of Fumaric Acid and Maleic Acid as Internal Standards for NMR Analysis of Protein Precipitated Plasma, Serum, and Whole Blood. *Analytical Chemistry*. 2021;93(6):3233-40.
190. Dona AC, Jiménez B, Schäfer H, Humpfer E, Spraul M, Lewis MR, et al. Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. *Analytical chemistry*. 2014;86(19):9887-94.
191. Martineau E, Dumez JN, Giraudeau PJMRiC. Fast quantitative 2D NMR for metabolomics and lipidomics: A tutorial. 2020;58(5):390-403.
192. Joseph D, Sukumaran S, Chandra K, Pudakalakatti SM, Dubey A, Singh A, et al. Rapid nuclear magnetic resonance data acquisition with improved resolution and sensitivity for high-throughput metabolomic analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2021;59(3):300-14.
193. Rinaldi PLJA. Three-dimensional solution NMR spectroscopy of complex structures and mixtures. 2004;129(8):687-99.
194. Gu IY, Billeter M, Sharafy MR, Sorkhabi VA, Fredriksson J, Staykova DK, editors. Parameter estimation of multidimensional NMR signals based on high-resolution subband analysis of 2D NMR projections. 2009 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing; 2009: IEEE.
195. Dey A, Charrier B, Martineau E, Deborde C, Gandriaux E, Moing A, et al. Hyperpolarized NMR metabolomics at natural ^{13}C abundance. 2020;92(22):14867-71.
196. Choudhary MI. Solving problems with NMR spectroscopy: Academic Press; 2015.
197. Claridge TD. High-resolution NMR techniques in organic chemistry: Elsevier; 2016.
198. Marchand J, Martineau E, Guitton Y, Dervilly-Pinel G, Giraudeau P. Multidimensional NMR approaches towards highly resolved, sensitive and high-throughput quantitative metabolomics. *Current opinion in biotechnology*. 2017;43:49-55.
199. Barna J, Laue E, Mayger MR, Skilling J, Worrall S. Exponential sampling, an alternative method for sampling in two-dimensional NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance* (1969). 1987;73(1):69-77.
200. Le Guennec A, Dumez JN, Giraudeau P, Caldarelli S. Resolution-enhanced 2D NMR of complex mixtures by non-uniform sampling. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2015;53(11):913-20.
201. Giraudeau P, Frydman L. Ultrafast 2D NMR: an emerging tool in analytical spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2014;7:129-61.
202. Akoka S, Giraudeau P. Fast hybrid multi-dimensional NMR methods based on ultrafast 2D NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2015;53(11):986-94.
203. Le Guennec A, Tea I, Antheaume I, Martineau E, Charrier B, Pathan M, et al. Fast determination of absolute metabolite concentrations by spatially encoded 2D

- NMR: application to breast cancer cell extracts. *Analytical chemistry*. 2012;84(24):10831-7.
204. Guennec AL, Giraudeau P, Caldarelli S. Evaluation of fast 2D NMR for metabolomics. *Analytical chemistry*. 2014;86(12):5946-54.
 205. Kruk J, Doskocz M, Jodłowska E, Zacharzewska A, Łakomiec J, Czaja K, et al. NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Applied Magnetic Resonance*. 2017;48(1):1-21.
 206. Bingol K, Li D-W, Zhang B, Brüschweiler R. Comprehensive metabolite identification strategy using multiple two-dimensional NMR spectra of a complex mixture implemented in the COLMARm web server. *Analytical chemistry*. 2016;88(24):12411-8.
 207. Hansen AL, Kupče Er, Li D-W, Bruschweiler-Li L, Wang C, Brüschweiler R. 2D NMR-based metabolomics with HSQC/TOCSY NOAH supersequences. *Analytical Chemistry*. 2021;93(15):6112-9.
 208. Bastawrous M, Tabatabaei-Anaraki M, Soong R, Bermel W, Gundy M, Boenisch H, et al. Inverse or direct detect experiments and probes: Which are "best" for in-vivo NMR research of (^{13}C) enriched organisms? *Analytica chimica acta*. 2020;1138:168-80.
 209. Meusinger RJA, Chemistry B. NMR hide-and-seek challenge. 2016;408(27):7537.
 210. Bingol K, Li D-W, Zhang B, Brüschweiler RJA. Comprehensive metabolite identification strategy using multiple two-dimensional NMR spectra of a complex mixture implemented in the COLMARm web server. 2016;88(24):12411-8.
 211. Joseph D, Sukumaran S, Chandra K, Pudakalakatti SM, Dubey A, Singh A, et al. Rapid nuclear magnetic resonance data acquisition with improved resolution and sensitivity for high-throughput metabolomic analysis. 2021;59(3):300-14.
 212. Bingol K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. *High-throughput*. 2018;7(2):9.
 213. Bingol K, Li D-W, Bruschweiler-Li L, Cabrera OA, Megraw T, Zhang F, et al. Unified and isomer-specific NMR metabolomics database for the accurate analysis of ^{13}C – ^1H HSQC spectra. *ACS chemical biology*. 2015;10(2):452-9.
 214. Bingol K, Bruschweiler-Li L, Li D-W, Brüschweiler R. Customized metabolomics database for the analysis of NMR ^1H – ^1H TOCSY and ^{13}C – ^1H HSQC-TOCSY spectra of complex mixtures. *Analytical chemistry*. 2014;86(11):5494-501.
 215. Chenomx N. Suite. Chenomx Inc, Edmonton, Alberta, Canada. 2015.
 216. Musharraf SG, Siddiqui AJ, Shamsi T, Choudhary MI, Rahman A-u. Serum metabonomics of acute leukemia using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Scientific reports*. 2016;6(1):30693.
 217. Nie X, Xia L, Gao F, Liu L, Yang Y, Chen Y, et al. Serum metabolite biomarkers predictive of response to PD-1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:678753.
 218. Steckel A, Schlosser G. An organic chemist's guide to electrospray mass spectrometric structure elucidation. *Molecules*. 2019;24(3):611.
 219. Davies V, Wandy J, Weidt S, Van Der Hooft JJ, Miller A, Daly R, et al. Rapid Development of Improved Data-Dependent Acquisition Strategies. *Analytical chemistry*. 2021;93(14):5676-83.
 220. López Ruiz R, Romero González R, Garrido Frenich A. AIF, dd-MS2 or DIA, which acquisition mode is the best for untargeted screening? 2021.
 221. Dunn WB, Broadhurst D, Brown M, Baker PN, Redman CW, Kenny LC, et al. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the

- LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *Journal of Chromatography B*. 2008;871(2):288-98.
222. Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, Smirnov A, Myers O, Dyrland TS, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. 2023;1-3.
 223. Riquelme G, Zabalegui N, Marchi P, Jones CM, Monge ME. A python-based pipeline for preprocessing LC-MS data for untargeted metabolomics workflows. *Metabolites*. 2020;10(10):416.
 224. Martínez-Sena T, Luongo G, Sanjuan-Herráez D, Castell JV, Vento M, Quintás G, et al. Monitoring of system conditioning after blank injections in untargeted UPLC-MS metabolomic analysis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):9822.
 225. Ten-Doménech I, Martínez-Sena T, Moreno-Torres M, Sanjuan-Herráez JD, Castell JV, Parra-Llorca A, et al. Comparing Targeted vs. Untargeted MS(2) Data-Dependent Acquisition for Peak Annotation in LC-MS Metabolomics. *Metabolites*. 2020;10(4).
 226. Pang Z, Zhou G, Ewald J, Chang L, Hacariz O, Basu N, et al. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature Protocols*. 2022;17(8):1735-61.
 227. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011;144(5):646-74.
 228. Zuo F, Yu J, He XJ. Single-cell metabolomics in hematopoiesis and hematological malignancies. 2022;12:931393.
 229. Komura D, Kawabe A, Fukuta K, Sano K, Umezaki T, Koda H, et al. Universal encoding of pan-cancer histology by deep texture representations. 2022;38(9).
 230. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. 2020;52(9):1496-516.
 231. Stuani L, Sabatier M, Sarry J-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. 2019;17:1-17.
 232. Potter M, Newport E, Morten K. The Warburg effect: 80 years on. 2016;44(5):1499-505.
 233. Chen W-L, Wang J-H, Zhao A-H, Xu X, Wang Y-H, Chen T-L, et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. 2014;124(10):1645-54.
 234. Ju H, Zhan G, Huang A, Sun Y, Wen S, Yang J, et al. ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes Warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition. 2017;31(10):2143-50.
 235. Rao UK, Chen H, Gatwood KS, Byrne MT, Sengsayadeth SM, Goodman SA, et al. Reduced Insulin Sensitivity in Patients with Myeloid Malignancies and Clonal Hematopoiesis Mutations. 2020;136:27-8.
 236. Herschbein L, Liesveld LJ. Dueling for dual inhibition: Means to enhance effectiveness of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in AML. 2018;32(3):235-48.
 237. Wang Y-H, Israelsen WJ, Lee D, Vionnie W, Jeanson NT, Clish CB, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. 2014;158(6):1309-23.
 238. Sillos EM, Shenep JL, Burghen GA, Pui CH, Behm FG, Sandlund JT. Lactic acidosis: a metabolic complication of hematologic malignancies: case report and review of the literature. 2001;92(9):2237-46.
 239. Chan FH, Carl D, Lyckholm LJ. Severe lactic acidosis in a patient with B-cell lymphoma: a case report and review of the literature. 2009;2009.

240. Medeiros B, Fathi A, DiNardo C, Pollyea D, Chan S, Swords RJL. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. 2017;31(2):272-81.
241. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, De Leval L, Jais J-P, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 2012;119(8):1901-3.
242. Gowda GN, Raftery DJAc. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. 2014;86(11):5433-40.
243. Lo Presti C, Fauvelle F, Jacob MC, Mondet J, Mossuz P. The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker. *Blood advances*. 2021;5(1):156-66.
244. Ruiz-Rodado V, Lita A, Dowdy T, Celiku O, Saldana AC, Wang H, et al. Metabolic plasticity of IDH1-mutant glioma cell lines is responsible for low sensitivity to glutaminase inhibition. *Cancer & Metabolism*. 2020;8(1):23.
245. Franks SE, Smith MR, Arias-Mendoza F, Shaller C, Padavic-Shaller K, Kappler F, et al. Phosphomonoester concentrations differ between chronic lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. 2002;26(10):919-26.
246. Gibellini F, Smith TKJII. The Kennedy pathway—de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. 2010;62(6):414-28.
247. Zhang W, Guo X, Ren J, Chen Y, Wang J, Gao AJT, et al. Glycine/glycine N-methyltransferase/sarcosine axis mediates benzene-induced hematotoxicity. 2021;428:115682.
248. Sivanand S, Vander Heiden MGJCC. Emerging roles for branched-chain amino acid metabolism in cancer. 2020;37(2):147-56.
249. Kikushige Y, Miyamoto T, Kochi Y, Semba Y, Ohishi M, Irifune H, et al. Human acute leukemia utilizes branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function. *Blood advances*. 2022.
250. Tabe Y, Lorenzi PL, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood*. 2019;134(13):1014-23.
251. Raffel S, Falcone M, Kneisel N, Hansson J, Wang W, Lutz C, et al. BCAT1 restricts α KG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. 2017;551(7680):384-8.
252. MacIntyre DA, Jiménez B, Lewintre EJ, Martín CR, Schäfer H, Ballesteros CG, et al. Serum metabolome analysis by 1H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. *Leukemia*. 2010;24(4):788-97.
253. Puchalska P, Crawford PAJCM. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. 2017;25(2):262-84.
254. Vilaplana-Lopera N, Cuminetti V, Almaghrabi R, Papatzikas G, Rout AK, Jeeves M, et al. Crosstalk between AML and stromal cells triggers acetate secretion through the metabolic rewiring of stromal cells. 2022;11:e75908.
255. Simonetti G, Mengucci C, Padella A, Fonzi E, Picone G, Delpino C, et al. Integrated genomic-metabolic classification of acute myeloid leukemia defines a subgroup with NPM1 and cohesin/DNA damage mutations. *Leukemia*. 2021;35(10):2813-26.
256. Wang D, Tan G, Wang H, Chen P, Hao J, Wang Y. Identification of novel serum biomarker for the detection of acute myeloid leukemia based on liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;166:357-63.
257. Musharraf SG, Siddiqui AJ, Shamsi T, Choudhary MI, Rahman A-uJSr. Serum metabonomics of acute leukemia using nuclear magnetic resonance spectroscopy. 2016;6(1):30693.

258. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, Wang J-H, Li N, Li J-M, et al. Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabonomic analysis. 2013;12(10):4393-401.
259. Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019;18(5):379-401.
260. Curti A, Aluigi M, Pandolfi S, Ferri E, Isidori A, Salvestrini V, et al. Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2, 3-dioxygenase. 2007;21(2):353-5.
261. Masaki A, Ishida T, Maeda Y, Suzuki S, Ito A, Takino H, et al. Prognostic significance of tryptophan catabolism in adult T-cell leukemia/lymphoma. 2015;21(12):2830-9.
262. Masaki A, Ishida T, Maeda Y, Ito A, Suzuki S, Narita T, et al. Clinical significance of tryptophan catabolism in Hodgkin lymphoma. *Cancer science*. 2018;109(1):74-83.
263. Ninomiya S, Tsurumi H, Hara T, Hoshi M, Goto N, Kanemura N, et al. Tryptophan Catabolism Is Associated with Clinical Outcome of Patients with Malignant Lymphoma. *Blood*. 2010;116:4146-.
264. Mussai F, Egan S, Higginbotham-Jones J, Perry T, Beggs A, Odintsova E, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. 2015;125(15):2386-96.
265. Glorieux GL, Dhondt AW, Jacobs P, Van Langeraert J, Lameire NH, De Deyn PP, et al. In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection. 2004;65(6):2184-92.
266. De Mets F, Van Melderden L, Gottesman SJPotNAoS. Regulation of acetate metabolism and coordination with the TCA cycle via a processed small RNA. 2019;116(3):1043-52.
267. Zhang W, Liu B, Wu S, Zhao L. TMT-based comprehensive proteomic profiling identifies serum prognostic signatures of acute myeloid leukemia. *Open medicine (Warsaw, Poland)*. 2023;18(1):20220602.
268. Wang Y-P, Sharda A, Xu S-N, Van Gastel N, Man CH, Choi U, et al. Malic enzyme 2 connects the Krebs cycle intermediate fumarate to mitochondrial biogenesis. 2021;33(5):1027-41. e8.
269. Tamura Y, Takata K, Matsubara K, Kataoka Y. Alpha-Glycerolphosphorylcholine Increases Motivation in Healthy Volunteers: A Single-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Human Study. *Nutrients*. 2021;13(6).
270. Franks SE, Smith MR, Arias-Mendoza F, Shaller C, Padavic-Shaller K, Kappler F, et al. Phosphomonoester concentrations differ between chronic lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia Research*. 2002;26(10):919-26.
271. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Ferrajoli A, et al. Ibrutinib inhibits free fatty acid metabolism in chronic lymphocytic leukemia. 2018;59(11):2686-91.
272. Tucci J, Chen T, Margulis K, Orgel E, Paszkiewicz RL, Cohen MD, et al. Adipocytes provide fatty acids to acute lymphoblastic leukemia cells. 2021;11:665763.
273. Tabe Y, Konopleva M, Andreeff MJFio. Fatty acid metabolism, bone marrow adipocytes, and AML. 2020;10:155.
274. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic stem cells evade chemotherapy by metabolic adaptation to an adipose tissue niche. 2016;19(1):23-37.

275. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Ferrajoli A, et al. STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. 2018;9(30):21268.
276. Beloribi-Djefafli S, Vasseur S, Guillaumond FJO. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. 2016;5(1):e189-e.
277. Allegra A, Innao V, Gerace D, Bianco O, Musolino CJLR. The metabolomic signature of hematologic malignancies. 2016;49:22-35.
278. Montesano A, Senesi P, Luzi L, Benedini S, Terruzzi I. Potential therapeutic role of L-carnitine in skeletal muscle oxidative stress and atrophy conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:646171.
279. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003;41:S4-S12.
280. Opalka JR, Gellerich F, Zierz S. Age and Sex Dependency of Carnitine Concentration in Human Serum and Skeletal Muscle. *Clinical chemistry*. 2002;47:2150-3.
281. Coulter DL. Carnitine Deficiency. In: Aminoff MJ, Daroff RB, editors. *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2014. p. 597-9.
282. Yerlikaya S, Djamgoz MBA. Oleamide, a Sleep-Inducing Compound: Effects on Ion Channels and Cancer. *Bioelectricity*. 2022;4(3):136-44.
283. Merkler DJ, Chew GH, Gee AJ, Merkler KA, Sorondo J-PO, Johnson MEJB. Oleic acid derived metabolites in mouse neuroblastoma N18TG2 cells. 2004;43(39):12667-74.

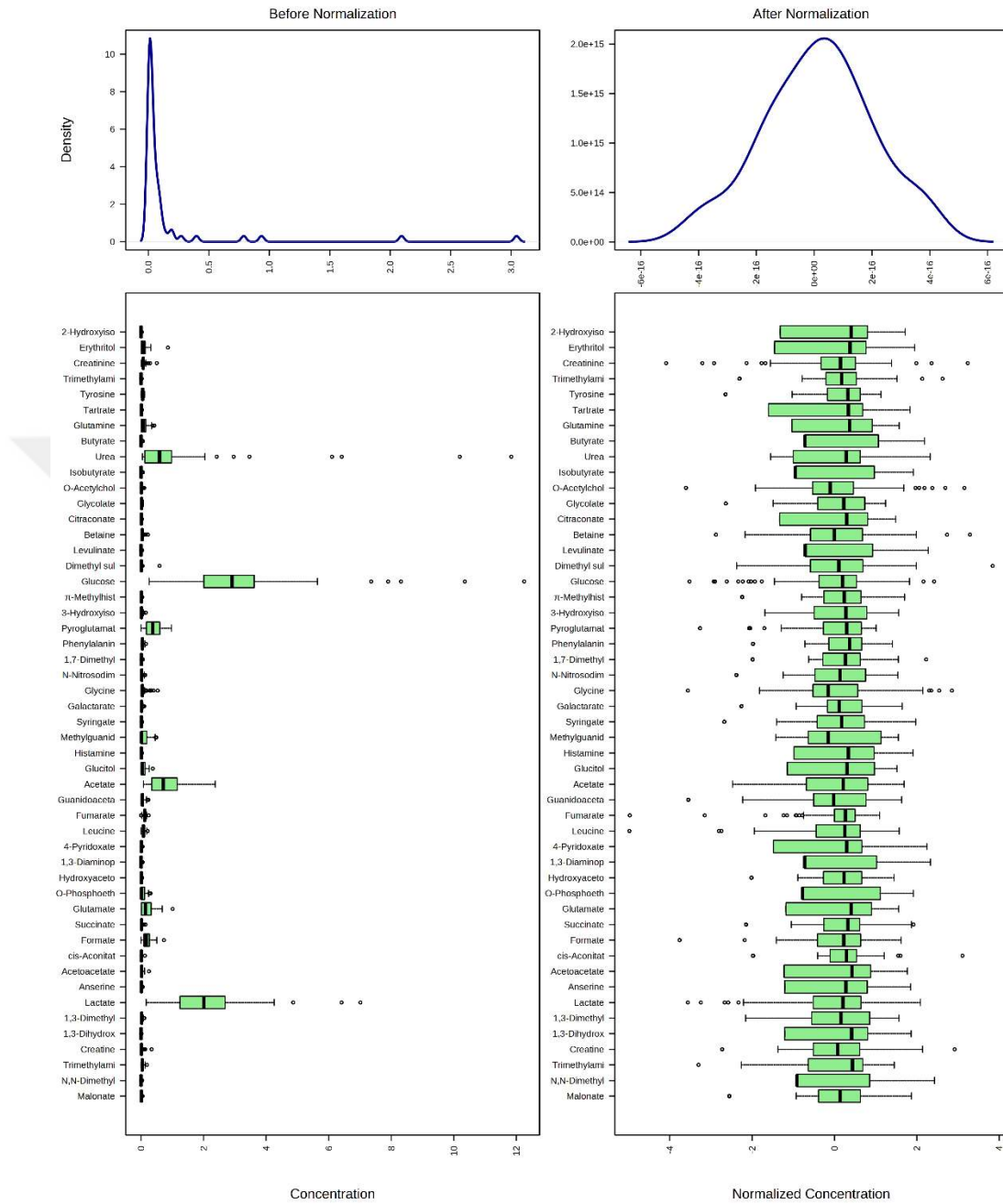
EKLER

EK A: Şekil

EK B: Etik kurul onayı



EK A



Şekil A.1 : 4 grubu içeren (116 serum) NMR verileri, a) normalizasyon öncesi ve b) sonrası.

EK B

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.08.2022-74326



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Teknoloji Transfer Ofisi
Etik Kurullar Birimi

Sayı : E-54022451-050.05.04-74326
Konu : Etik Kurul Kararı - Şahabettin SELEK

15.08.2022

Sayın Prof.Dr. Şahabettin SELEK

İlgi : E-54022451-050.05.04-41880.pdf

2021/391 numaralı "Farklı Lösemi Tiplerinde Nükleer Manyetik Rezonans Tabanlı Metabolomik Profillemeye" başlıklı başvurunuz Üniversitemiz Etik Kurullar Birimi' nin 30.11.2021 tarihli, 25 sayılı Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş olup, mevcudun oybirliğiyle onaylanmasına karar verilmiştir.

Gereğini ve bilgilerinizi arz/rica ederim.

Sorumlu Araştırmacı;
Prof. Dr. Şahabettin SELEK

Yardımcı Araştırmacılar;
Prof. Dr. Fatma Betül ÇAKIR
Dr. Ayşe Zehra GÜL
Dr. Somer BEKİROĞLU

Prof.Dr. Binnur TEMEL
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı V.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSA40HNTL3 Pin Kodu :58762 Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSA40HNTL3&eS=74326>
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi)
Fatih/İstanbul Bilgi için: Gönlü EZGİ
Telefon No:0 (212) 523 22 88 Faks No:0 (212) 533 23 36 Unvan: Uzman Yardımcısı
e-Posta:info@bezmialem.edu.tr İnternet Adresi:www.bezmialem.edu.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.