

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DİYET YAĞ ASİTLERİNİN METABOLİK ETKİLERİNİN METABOLOMİK
YÖNTEMİYLE ÇALIŞILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ece KILIÇ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

OCAK 2026

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DİYET YAĞ ASİTLERİNİN METABOLİK ETKİLERİNİN METABOLOMİK
YÖNTEMİYLE ÇALIŞILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Ece KILIÇ
(506202501)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin BAŞARAN
Eş Danışmanı: Prof. Dr. Kıvanç BİRİSOY**

OCAK 2026

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

**INVESTIGATION OF THE METABOLIC EFFECTS OF DIETARY FATTY
ACIDS USING A METABOLOMICS APPROACH**

Ph.D. THESIS

**Ece KILIÇ
(506202501)**

Department of Food Engineering

Food Engineering Programme

**Thesis Advisor: Prof. Dr. Pervin BAŞARAN
Thesis Co-Advisor: Prof. Dr. Kıvanç BİRİSOY**

JANUARY 2026

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 506202501 numaralı Doktora Öğrencisi Ece KILIÇ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “DİYET YAĞ ASİTLERİNİN METABOLİK ETKİLERİNİN METABOLOMİKS YÖNTEMİYLE ÇALIŞILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Pervin BAŞARAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Prof. Dr. Kıvanç BİRİSOY**
The Rockefeller University

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Semir BEYAZ**
Cold Spring Harbor Laboratory

Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Celale KIRKIN GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gülay ÖZKAN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU
Sakarya Üniversitesi

Teslim Tarihi : 14 Aralık 2025
Savunma Tarihi : 6 Ocak 2026



Yolculuğun varış noktasından ziyade süreciyle ilgili olduğuna inanmamı sağlayan herkese,



ÖNSÖZ

Öncelikle, doktora danışmanım Prof. Dr. Pervin BAŞARAN'a bana duyduğu güven ve bu süreçte tez konumu keşfetme özgürlüğü tanıdığı için; eş danışmanım Prof. Dr. Kıvanç BİRİSOY'a beni araştırma grubuna davet ettiği ve alışılmış sınırlarımın ötesine geçmem için beni cesaretlendirdiği için; jüri üyem Dr. Semir BEYAZ'a ilgi alanımla ilgili projesine katkıda bulunma fırsatı sunduğu için derin minnettarlığımı ifade etmek isterim. Ayrıca, değerli görüş ve katkılarıyla bu çalışmayı zenginleştiren meslektaşlarıma ve diğer jüri üyelerine, son olarak da her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2026

Ece KILIÇ





İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Özeti	2
1.2.1 Yağ asitleri	2
1.2.2 Trimetilamin N-oksit.....	3
1.2.3 Metabolomiks.....	4
1.2.4 Kütle spektrometresi	6
1.2.5 Veri toplama modları	11
1.3 Hipotez	12
2. METOD.....	13
2.1 Örnek Hazırlama	14
2.2 LC-MS Metabolomiks Analizi.....	14
2.3 Kalite Kontrol.....	15
2.4 Hedefsiz Metabolomiks.....	16
2.4.1 Compound Discoverer	16
2.4.2 MassBank of North America	16
2.4.3 Kimliklendirme ve güven seviyeleri	18
2.5 Doğrusal Karma Etkili Modelleme İle Veri Analizi	23
3. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	25
3.1 Hedefsiz Metabolomiks.....	25
3.2 Hedefli Metabolomiks.....	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	53



KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans analizi
DDA	: Veriye bağılı edinim (data dependent acquisition)
FDR	: Yanlış keşif oranı (false discovery rate)
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LMM	: Doğrusal karma etkili modeller (linear mixed models)
MS	: Kütle spektrometrisi
m/z	: Kütle-yük oranına
TMAO	: Trimetilamin N-oksit
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Diyetlerin toplam yağın yüzdesi cinsinden doygunluk derecesine göre yağ asidi profili (Envigo).....	13
Çizelge 2.2 : UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.....	19
Çizelge 3.1 : MetaboAnalyst 6.0’da doğrusal karma modeller (cinsiyet ve parti kontrolü), diyet–kontrol karşılaştırmalarında anlamlı metabolitlerin log2 kat değişimleri (kırmızı: azalma, mavi: artış; $p < 0.05$, FDR düzeltilmiş, tek yönlü ANOVA).....	26
Çizelge 3.2 : Her bir diyet için, kontrol diyetine kıyasla zamanla TMAO seviyelerinde gözlenen değişimi yansıtan p-değerleri (İstatistiksel analiz ANOVA modeli ile yapıldı, Tukey post-hoc testi uygulandı ve p-değerleri Benjamini-Hochberg ile düzeltildi).....	31
Çizelge 3.3 : TMAO ve öncülleri arasındaki korelasyon için Pearson korelasyon katsayıları (r) ve ilgili FDR ile düzeltilmiş p-değerleri.	33
Çizelge 3.4 : Her bir diyet için, kontrol diyetine kıyasla zamanla L-karnitin seviyelerinde gözlenen değişimi yansıtan p-değerleri (İstatistiksel analiz ANOVA modeli ile yapıldı, Tukey post-hoc testi uygulandı ve p-değerleri Benjamini-Hochberg ile düzeltildi).....	34
Çizelge 3.5 : TMAO, L-karnitin ve kolin için diyet, cinsiyet ve etkileşim etkilerine ait iki yönlü ANOVA (FDR-düzeltilmiş p-değerleri).	36



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Bir kütle spektrometresinin genel bileşenleri.....	7
Şekil 1.2 : Pozitif iyon modunda çalışan bir ESI kaynağının şematik tasviri (Konermann ve diğ, 2013).....	8
Şekil 1.3 : Kuadropol analizörünün yapı diyagramı (Han ve Li, 2023).	8
Şekil 1.4 : Orbitrap kütle analizörünün yapı diyagramı (Makarov, 2000).	10
Şekil 2.1 : A. Sadece yağ asidi türü farklı olan izokalorik diyet modeli (%45 kcal yağ). B. Deney tasarımı.	14
Şekil 2.2 : Toplamda 169 kimlik mzCloud ve MoNA tarafından tanımlanmıştır. mzCloud tarafından 146 metabolit tanımlanırken, MoNA tarafından 134 metabolit tanımlanmıştır ve bunların 111 tanesi (%65.7) ortaktır.....	17
Şekil 3.1 : Yüksek yağlı diyet müdahalesi sonrası LC-MS analiziyle plazma örneklerinde gözlemlenen, diyet gruplarındaki TMAO seviyelerindeki anlamli değişiklikler (cinsiyet ve parti etkisi kontrol edildi).....	29
Şekil 3.2 : Yüksek yağlı diyet müdahalesi sonrası LC-MS analiziyle plazma örneklerinde gözlemlenen, diyet gruplarındaki TMAO seviyelerinde göreceli daha az değişim olan ya da olmayan gruplar (cinsiyet ve parti etkisi kontrol edildi).....	30
Şekil 3.3 : TMAO biyosentezi (Kilic ve Basaran, 2025).....	33
Şekil 3.4 : Her bir zaman noktasında cinsiyetin TMAO düzeyleri üzerindeki etkisi. A: Yüksek yağlı diyet uygulanan dönemler (6. ve 11. ay). B: Başlangıç dönemi ve kontrol diyetle geçiş yapılan zaman noktaları (4. ve 9. ay).	37
Şekil 3.5 : MS/MS parçalanma ayna grafiği A: Plazmadaki (üstte) ve mzVault (MoNA) kütüphanesin MS/MS deki TMAO referansı (altta), 76.0756 m/z @ 8.132 dakika öncü iyonu için ddMS parçalanma desenleri ile eşıleşen parçacıklar: 58.06528 ve 59.07309 m/z. B: Plazmadaki (üstte) ve mzCloud kütüphanesindeki (S)-(+)-2-Amino-1-propanol referansı (altta), 76.0756 m/z @ 8.132 dakika öncü iyonu için ddMS parçalanma desenleri ile eşıleşen tek parçacık: 58.06528 m/z.	43
Şekil 3.6 : TMAO ile zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş örneklerin üst üste bindirilmiş iyon kromatogramları, doğru kütle ve kromatografik profil uyumuyla bilinmeyen bileşeni TMAO olarak tanımlamaktadır.....	44
Şekil 3.7 : 76.0756m/z @8.33 dakika öncü iyonunun plazma örneğindeki (üstte) ve saf TMAO standardının (altta) paralel reaksiyon izleme (PRM) MS/MS parçalanma ayna grafiğinin uyumu bilinmeyen bileşiğin TMAO olduğunu doğrulamış oldu.	45



DİYET YAĞ ASİTLERİNİN METABOLİK ETKİLERİNİN METABOLOMİKS YÖNTEMİYLE ÇALIŞILMASI

ÖZET

Obezite, başta bağırsak olmak üzere çeşitli dokularda işlev bozukluklarına yol açarak metabolik bozukluklar, kanser ve bağışıklık sistemi hastalıkları riskini artıran küresel bir sağlık sorunudur. Yaşam tarzı faktörleri, özellikle yüksek yağlı beslenme alışkanlıkları, bu riski artırmada önemli rol oynamaktadır. Diyet değiştirilebilir bir risk faktörü olmasına karşın, obeziteye yol açan beslenme düzenlerinin bu hastalıkların gelişimine nasıl katkıda bulunduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürdeki bulgular, doymuş yağ oranı yüksek diyetlerin mikrobiyom üzerinden obezite, kalp-damar hastalıkları ve bağırsak kanseri gibi metabolik bozuklukların riskini artırdığını göstermektedir. Genel eğilim, doymuş yağ asitleri bakımından zengin diyetlerin obeziteyle karakterize edilen tipik yüksek yağlı diyet fenotipine yol açtığını; buna karşılık Akdeniz tipi beslenme gibi çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin diyetlerin ise koruyucu ve yararlı etkiler sağladığını ortaya koymaktadır. Bu etkileri daha ayrıntılı incelemek amacıyla, bu çalışma farklı yağ asidi bileşimlerine sahip yüksek yağlı diyetleri sistematik olarak karşılaştırmış ve spesifik yağ asitlerinin temel metabolik yolları nasıl etkilediğini araştırmıştır. Çalışma, bu diyetlerin metabolik sonuçlarını karakterize etmenin yanı sıra, gözlenen değişikliklerin geri dönüşümlülüğünü de değerlendirerek, diyet müdahalelerinin metabolik homeostazı yeniden sağlama potansiyeline ilişkin önemli bir bakış açısı sunmuştur. Sonuçlar, hindistancevizi, balık veya süt yağı ile zenginleştirilmiş yüksek yağlı diyetin, kontrol diyetiyle karşılaştırıldığında, kardiyovasküler hastalık riskiyle güçlü bir şekilde ilişkilendirilen bağırsak mikrobiyotası kaynaklı bir metabolit olan trimetilamin N-oksit (TMAO) düzeylerinde belirgin bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Buna karşılık, domuz yağı, hurma yağı, zeytinyağı ve ketojenik diyet dahil olmak üzere diğer yüksek yağlı diyet gruplarında TMAO düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular, diyet yağının türünün, bağırsak mikrobiyotası kaynaklı metabolitlerin düzenlenmesinde ve bunların kardiyovasküler sağlık üzerindeki potansiyel etkisinde kritik bir rol oynadığını vurgulamaktadır. TMAO öncülleri olan kolin ve L-karnitin seviyeleri incelendiğinde, diyetler arasında yalnızca balık yağı grubunda, kontrol grubuna kıyasla L-karnitin seviyelerinde azalma gözlenmiş; diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Balık yağı grubunda gözlenen TMAO seviyesindeki azalmanın, öncülü L-karnitin ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Öte yandan, hindistancevizi ve süt yağı diyetleri sonrasında gözlenen TMAO düşüşü, TMAO üreten bağırsak mikroorganizmalarının sayısındaki azalma veya hepatik flavin monooksijenaz enzimlerinin baskılanması sonucunda ortaya çıkmış olabilir. Bu bulgular, farklı yağ türlerinin TMAO metabolizması üzerindeki etkilerinin mekanizmalarını anlamak açısından önemli ipuçları sunmaktadır. Süt yağı ve hindistancevizi yağı gruplarının yağ asidi kompozisyonundaki belirleyici özellik, diğer gruplara kıyasla sırasıyla kısa ve orta

zincirli yağ asitleri açısından zengin olmalarıdır. Bu nedenle, TMAO seviyelerini düşürme potansiyellerinin, bu kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin içerikleriyle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Beslenmenin çeşitli metabolik bozuklukların patogenezindeki rolü göz önüne alındığında, diyet yağ asitlerinin optimize edilmesinin, kalp hastalıkları da dahil olmak üzere metabolik bozuklukların önlenmesinde değerli bir terapötik strateji olabileceği düşünülmektedir.



INVESTIGATION OF THE METABOLIC EFFECTS OF DIETARY FATTY ACIDS USING A METABOLOMICS APPROACH

SUMMARY

Obesity is a worldwide epidemic that leads to functional impairments in various tissues, including the gut, and increases the risk of conditions such as metabolic disorders, cancer, and immune-related diseases. Lifestyle factors, particularly high-fat diets, play a significant role in increasing this risk. Although diet is recognized as a modifiable risk factor, the mechanisms through which obesity-inducing diets contribute to these diseases remain poorly understood. Previous data show that diets high in saturated fat increases the risk of metabolic disorders, including obesity and heart disease, as well as colorectal cancer through the microbiome.

The general trend in the literature suggests that diets rich in saturated fatty acids lead to the typical high-fat diet (HFD) phenotype characterized by obesity, whereas diets rich in polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects. HFDs elevate cardiovascular disease risk in part through gut microbial generation of trimethylamine (TMA), the precursor to trimethylamine-N-oxide (TMAO). This gut microbiota-derived metabolite is associated with increased cardiovascular disease risk and may serve as a biomarker for heart failure. TMAO formation represents a host-microbiome interaction wherein intestinal bacteria transform dietary substrates into TMA, which subsequently undergoes hepatic oxidation to TMAO through flavin monooxygenase (FMO) enzyme activity. Choline and carnitine constitute the primary dietary substrates for microbiota-mediated TMAO production. These TMA-generating bacteria possess genes that encode key enzymes required for TMA biosynthesis, such as choline-TMA lyase (CutC), carnitine monooxygenase (CntAB), glycine betaine reductase (GrdH), and TMAO reductases (collectively designated as TorA). Although genes for choline breakdown are common across intestinal bacteria, facultative anaerobes preferentially expand in hosts consuming HFDs. Comparative dietary studies revealed that when mice received HFDs supplemented with choline, *Escherichia coli* gained a CutC-mediated competitive advantage, an effect not observed under low-fat feeding conditions. This indicates that *E. coli* strains possessing the cut operon utilize choline specifically under intestinal conditions created by HFD consumption. In contrast to Western high-fat diets, the Mediterranean diet offers protective mechanisms against TMAO-driven atherosclerosis and intestinal barrier dysfunction. This dietary pattern is characterized by two components that collectively promote cardiovascular health. One key element is the intake of omega-3 fatty acids, which are derived from regular fish consumption. The other essential component is the abundant dietary fiber provided by diverse plant-based foods such as vegetables, fruits, legumes, whole grains, and nuts. These dietary fibers increase fecal short-chain fatty acid levels through bacterial fermentation of carbohydrates that humans cannot digest. The produced short-chain fatty acids play a crucial role in maintaining gut health by strengthening the intestinal barrier and reducing systemic inflammatory responses. To examine these effects in greater detail, this study systematically compared HFDs with different fatty acid

compositions, investigating how specific fatty acids influence key metabolic pathways. In addition to characterizing the metabolic consequences of these diets, the study also evaluated the reversibility of the observed changes, providing insight into the potential for dietary interventions to restore metabolic homeostasis. The results demonstrated that a HFD enriched with coconut, fish, or milk fat led to a significant reduction in TMAO levels, a gut microbiota-derived metabolite strongly associated with cardiovascular disease risk, compared to the control diet. In contrast, the other high-fat diet groups including lard, palm oil, olive oil, and a ketogenic diet showed no significant changes in TMAO levels, highlighting that the type of dietary fat plays a critical role in modulating gut microbiota-derived metabolites and their potential impact on cardiovascular health.

When examining the levels of choline and L-carnitine precursors, a decrease in L-carnitine was observed only in the fish oil group, while no significant changes were detected in the other groups. The observed decrease in TMAO levels following fish oil supplementation is most likely attributable to reduced dietary precursor availability. In contrast, the reductions observed with coconut oil and milk fat diets may result from either decreased abundance of TMAO-producing microorganisms or inhibition of hepatic flavin monooxygenases responsible for converting TMA to TMAO.

A distinguishing characteristic of the milk fat and coconut oil groups is their substantially higher content of short- and medium-chain fatty acids compared to other dietary groups. This enrichment likely underlies their TMAO-lowering effects, as these fatty acid classes differentially influence gut microbial ecology.

Although most fatty acids are absorbed in the upper digestive tract, excessive intake allows residual amounts to reach the colon, where they can alter intestinal microbiota composition. Unlike long-chain fatty acids (LCFAs), short- and medium-chain fatty acids (SCFAs and MCFAs) are mostly absorbed by intestinal epithelial cells through passive diffusion due to their shorter chain length and greater water solubility. This efficient proximal absorption minimizes their colonic accumulation and subsequent microbial disruption.

Conversely, HFDs rich in LCFAs induce gut dysbiosis primarily by altering colonic oxygen tension and microbial energy substrate availability. The colon's characteristically low-oxygen environment typically supports beneficial anaerobic bacteria while restricting facultative anaerobes like *Enterobacteriaceae*. HFDs compromise enterocyte mitochondrial activity and oxygen utilization, resulting in elevated luminal oxygen and nitrate concentrations. This environmental change promotes facultative anaerobes such as *E. coli* while suppressing strict anaerobes, thereby increasing the Gram-negative to Gram-positive bacterial ratio. Lipopolysaccharide (LPS) release from Gram-negative bacteria triggers inflammatory responses that further propagate proinflammatory microbial communities. This dysbiotic pattern is characterized by reduced obligate anaerobic Firmicutes and expanded facultative anaerobic *Enterobacteriaceae* populations. Certain commensal species, including *E. coli*, thrive under inflammatory conditions by utilizing nitric oxides for energy, conferring a survival advantage. Saturated fat-rich HFDs may additionally facilitate TMAO generation by providing organic sulfur to sulfate-reducing bacteria such as *Desulfovibrionaceae*, including *Desulfovibrio* species. Dietary fat consumption stimulates hepatic bile acid synthesis, producing taurine- or glycine-conjugated bile acids that enter the duodenum to aid small intestinal lipid absorption. During intestinal passage, most bile acids are deconjugated, liberating taurine and thus increasing sulfur availability for sulfate-reducing microorganisms.

Additionally, hydrophobic bile acids disrupt intestinal barrier function, potentially enabling microbial metabolites like TMA to enter systemic circulation.

FAs may also modulate gut microbiota through their antimicrobial characteristics, with effectiveness determined by chain length, saturation degree, and double bond positioning. Saturated FAs demonstrate maximal antimicrobial activity at shorter chain lengths, whereas monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated FAs (PUFAs) show enhanced activity at longer chain lengths. SCFAs exhibit pH-dependent antimicrobial effects, primarily disrupting energy metabolism in Gram-negative bacteria. Elevated SCFA concentrations lower pH, promoting *Bifidobacteriaceae* and *Lactobacillaceae* while inhibiting *Enterobacteriaceae*. SCFAs inhibit pathogenic bacteria, thereby preventing dysbiosis and inflammation, while simultaneously reducing nitric oxide production that stimulates TMA lyase activity.

The literature demonstrates that saturated long-chain fatty acids promote the production of trimethylamine (TMA), a precursor of TMAO, through multiple mechanisms. These include elevated colonic oxygen levels and increased taurine-conjugated bile acids, which favor the proliferation of TMA-producing bacteria. Conversely, short-chain fatty acids (SCFAs) and omega-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects by modulating intestinal pH and supporting SCFA-producing bacteria, thereby suppressing TMA-producing bacterial populations.

Our findings partially align with these established mechanisms. Diets containing short-chain and omega-3 fatty acids resulted in reduced TMAO levels, consistent with literature predictions. Unexpectedly, however, long-chain fatty acid-containing diets did not elicit the anticipated increase in TMAO levels. This difference likely reflects the complex composition of whole food oil sources, which contain various bioactive compounds beyond their fatty acid profiles. For instance, olive oil naturally contains 3,3-dimethyl-1-butanol, a choline analog that suppresses TMA production by inhibiting microbial TMA lyase activity. Similarly, various oils are rich in polyphenolic compounds that modulate intestinal microbial communities independent of their fatty acid composition. These observations highlight a critical limitation in attributing metabolic effects solely to fatty acid content when whole food sources are used. A notable strength of our study is its examination of MCFAs and their effects on TMAO levels, an area that remains significantly underexplored despite the growing popularity of ketogenic diets and medium-chain triglyceride (MCT) supplementation. However, our findings also underscore the need for more refined experimental approaches to fully elucidate fatty acid-specific mechanisms.

Advancing our mechanistic understanding of how dietary fatty acids shape gut microbiota and TMAO metabolism requires future investigations that address several critical methodological gaps. First, controlled experimental designs are essential, wherein all dietary variables remain constant except for the specific fatty acid under investigation. This can be achieved by supplementing diets with purified fatty acids rather than whole oils or fat sources containing diverse bioactive constituents. Such a reductionist approach would eliminate confounding variables from the food matrix, enabling precise determination of how individual fatty acids influence gut microbial TMAO production and establishing definitive cause-and-effect relationships necessary for targeted dietary recommendations. Second, establishing dose-response relationships through well-designed human clinical trials is imperative to characterize the concentration-dependent effects of distinct fatty acids on TMAO generation and to delineate thresholds distinguishing beneficial from detrimental outcomes. Addressing these research gaps is fundamental to formulating evidence-based dietary guidelines

and therapeutic interventions. Given the established role of nutrition in the pathogenesis of various metabolic disorders, optimizing dietary fatty acid composition represents a promising therapeutic strategy for preventing metabolic diseases, including cardiovascular disorders.



1. GİRİŞ

Mikrobiyota, diyet başta olmak üzere birçok çevresel faktörle etkileşim halindedir ve hem bağırsakta lokal hem de vücut genelinde sistemik etkiler gösterebilir. Mikrobiyota kaynaklı metabolitlerin insan sağlığı ve hastalıklarındaki rollerinin ortaya konmasıyla, bu metabolitlerin önemi giderek daha fazla anlaşılmaktadır (Rooks ve Garrett, 2016). Diyetin içeriği, bağırsak mikrobiyotasının metabolik çıktısını belirlemede merkezi bir role sahiptir; çünkü mikrobiyota besinleri metabolize ederek biyolojik olarak aktif metabolitlere dönüştürür ve diyet, mikrobiyota kompozisyonunu ve metabolik potansiyelini şekillendirerek konak fizyolojisi ve sağlığını etkiler (Schoeler ve Caesar, 2019; Beyaz ve diğ., 2021). Metabolomiks ve gelişmiş veri analiz yaklaşımları sayesinde, mikrobiyota dengesizlikleriyle ilişkili metabolitlerin sistematik olarak tanımlanması ve metabolik hastalıklar için biyobelirteçlerin belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (Rooks ve Garrett, 2016; Peng ve diğ., 2015).

Yüksek yağlı diyetlerin metabolik etkilerini karşılaştıran sınırlı sayıdaki çalışmadan elde edilen bulgular, genellikle doymuş yağ asitlerince zengin diyetlerin yüksek yağlı diyetlerle ilişkilendirilen tipik metabolik fenotipe yol açtığını, buna karşılık çoklu doymamış yağ asitleri içeren diyetlerin daha faydalı metabolik etkiler gösterdiğini düşündürmektedir (Buettner ve diğ., 2006). Bu doğrultuda, bu çalışmanın amacı, ana yağ asidi türleri farklı olan yüksek yağlı diyetleri karşılaştırarak, yağ asitlerinin metabolik etkilerini hedefsiz metabolomiks yaklaşımı ile incelemektir. Ayrıca, gözlenen metabolik adaptasyonların zaman içerisindeki kalıcılığı da değerlendirilmiştir. Yalnızca yağ asidi kompozisyonunun etkisini izole edebilmek amacıyla, ana yağ asidi türü dışında içerikleri aynı olan izokalorik diyetler tasarlanmış ve doymuşluk derecesi ile yağ asidi zincir uzunluğu bakımından farklı karakteristiklere sahip bu diyetler fareler üzerinde uygulanmıştır.

1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmada, yüksek yağ içerikli diyetler bağlamında, yağ asidi çeşitliliğinin metabolizma üzerindeki etkileri, hedefsiz metabolomiks yaklaşımı ile incelenmiştir. Ayrıca, değişen metabolik özelliklerin adaptasyon sürekliliği de değerlendirilmiştir.

1.2 Literatür Özeti

1.2.1 Yağ asitleri

Yağ asitleri, trigliseridler, fosfolipitler ve diğer kompleks lipidlerin temel bileşenleridir. Trigliseridler ve yağ asitleri, insanlardaki besinsel yağın ana kaynakları olmakla birlikte, farklı gıdalarda değişik miktarlarda ve türlerde bulunurlar. Besin kaynaklarının dışında, yağ asitleri insan vücudunda glikoz gibi lipid olmayan öncüllerden veya diğer yağ asitlerinden de sentezlenebilir. Sadece esansiyel yağ asitleri, diyetle alınması gereken yağ asitleridir.

Yağ asitleri, biyolojik sistemlerde önemli metabolik ve işlevsel rollere sahiptir. Başlıca metabolik işlevleri, oksidasyonları sonucunda enerji kaynağı olmalarıdır. Çoğu aerobik doku tarafından enerji üretiminde kullanılabilirler ve glikozun sınırlı olduğu durumlarda önem kazanırlar. Önemli işlevsel rolleri arasında, hücre zarının ana bileşeni olan fosfolipitlerin yapısında yer almaları bulunur. Hücre zarının yağ asidi kompozisyonu, diyet, metabolizma, hormonal ortam ve genetik faktörlerden etkilenebilir. Bu durum, zarın fiziksel doğasını (akışkanlığını) etkileyerek zar proteinlerinin işlevini değiştirebilir (Calder, 2015).

Hücre içindeki serbest yağ asitleri ve onların metabolitleri, peroksizom proliferatör aktive reseptörlerle (PPAR'lar) etkileşim yoluyla gen ekspresyonunu etkileyebilir. Uzun zincirli serbest yağ asitleri, enerji homeostazını dolaylı olarak etkileyen FFA1 reseptörüne (GPR40 olarak da bilinir) ve FFA4 reseptörüne (GPR120 olarak da bilinir) bağlanır; böylece yağ asitleri ve diyet, metabolik bozukluklar ve tip 2 diyabet (T2D) ile ilişkilendirilebilir. Kısa zincirli yağ asitleri ise, bağırsak mikrobiyomu aracılığıyla sağlık üzerinde etkili olan FFA2 (GPR41 olarak da bilinir) ve FFA3 (GPR43 olarak da bilinir) reseptörlerine bağlanır (Bolognini ve diğ., 2021). Sonuç olarak, yağ asitlerinin hücre ve doku metabolizmasını ve işlevini etkileyen önemli biyolojik aktiviteleri vardır (Calder, 2015).

Yağ asitleri, genel olarak doymunluk düzeyi ve karbon zinciri uzunluğu olmak üzere iki farklı özellik gösterir. Doymunluk düzeylerine göre, doymuş, tekli doymamış ve

çoklu doymamış yağ asitleri olarak sınıflandırılırlar. Doymuş yağ asitleri, karbon zincirinin hidrojen ile tamamen doymuş olduğu yağ asitleridir. Bu yağlar, et, tavuk, süt ürünleri ve yumurta gibi hayvansal kaynaklı gıdalarda yanı sıra hindistancevizi ve palmiye çekirdeği gibi bitkisel kaynaklarda da bulunur. Tekli doymamış yağ asitleri, karbon zincirlerinde bir çift hidrojen atomu eksik olan yağ asitleridir. Bu tür yağ asitleri açısından zengin gıdalar arasında kanola, fındık ve zeytinyağı yer alır. Çoklu doymamış yağ asitleri ise, karbon zincirlerinde iki veya daha fazla çift hidrojen atomu eksik olan yağ asitleridir (Boateng ve diğ., 2016). Özellikle omega-3 ve omega-6 serileri, soğuk su balıklarında, keten tohumu ve cevizde bulunur (da Silva ve diğ., 2014). Karbon zincirinin uzunluğuna göre ise, yağ asitleri üç sınıfa ayrılır: kısa zincirli (C2'den C4'e), orta zincirli (C6:0'dan C12:0'a) ve uzun zincirli (C14:0'dan C18:0'a) (Dayrit, 2023).

1.2.2 Trimetilamin N-oksit

Bağırsak mikrobiyotası, konakçıya kompleks besinlerin sindirimi, vitamin üretimi, patojenlere karşı savunma ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi çeşitli hayati işlevler sağlar (Koh, 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun metabolik bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalıkla yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Mikrobiyotanın insan sağlığını etkileyen temel mekanizmalardan biri, hastalık gelişimini tetikleyebilen zararlı metabolitler veya koruyucu etki gösteren faydalı metabolitler üretme kapasitesidir (Koh & Bäckhed, 2020). Bu bağlamda, trimetilamin-N-oksit (TMAO) kardiyovasküler hastalık patogeneze önemli katkıda bulunan zararlı bir metabolit olarak öne çıkmaktadır (Spivak ve diğ., 2022).

Hazen ve ekibi, metabolomiks yaklaşımını kullanarak plazma TMAO seviyeleri ile kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişkiyi ilk kez ortaya koymuştur (Wang ve diğ., 2011). Bu öncü çalışmadan bu yana gerçekleştirilen çok sayıda araştırma, TMAO yolağının kardiyovasküler hastalık riskleriyle güçlü bir ilişki içinde olduğunu desteklemiştir (Le Bras, 2018).

TMAO'nun kardiyovasküler hastalıklardaki rolü, özellikle yüksek yağlı diyetler bağlamında büyük önem taşımaktadır. Yüksek yağlı diyetler, bağırsak mikrobiyotasının TMAO'nun öncüsü olan trimetilamin (TMA) üretmesini teşvik ederek kardiyovasküler hastalık riskini artırır (Yoo ve diğ., 2021). Bu bağırsak mikrobiyotası kaynaklı metabolit, artmış kardiyovasküler hastalık riski ile

ilişkilendirilmiş ve kalp hastalıkları için potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (Koeth ve diğ., 2013).

TMAO oluşum mekanizması, metaorganizmal bir süreci yansıtmaktadır; bu süreçte hem bağırsak bakterilerinin enzimleri hem de konak sistemin enzimleri arasında bir iş birliği söz konusudur. İlk aşamada, bağırsak bakterileri diyetle alınan substratları TMA'ya dönüştürür; ardından TMA, karaciğerde flavin monooksijenaz (FMO) enzim aktivitesi aracılığıyla TMAO'ya oksitlenir. Kolin ve karnitin, bu mikrobiyota aracılı TMAO üretimi için başlıca diyetik substratları oluşturur (Wang ve diğ, 2011; Le Bras, 2018).

TMA üretiminden sorumlu bakteriler, bu dönüşüm için gerekli anahtar enzimleri kodlayan spesifik genlere sahiptir. Bu enzimler arasında kolin-TMA liyaz (CutC), karnitin monooksijenaz (CntAB), glisin betain redüktaz (GrdH) ve TMAO redüktazlar (toplu olarak TorA) bulunur (Jameson ve diğ, 2016).

Batı tarzı yüksek yağlı diyetlerin aksine, Akdeniz diyeti TMAO kaynaklı ateroskleroz ve bağırsak bariyer bozukluğuna karşı çeşitli koruyucu mekanizmalar sunmaktadır. Bu diyet yaklaşımı, kardiyovasküler ve sindirim sağlığını birlikte destekleyen iki tamamlayıcı bileşene dayanır: sık balık tüketimi yoluyla alınan omega-3 yağ asitleri ve sebzeler, meyveler, baklagiller, tam tahıllar ile kuruyemişler gibi bitkisel kaynaklardan sağlanan yüksek lif içeriği (De Filippis ve diğ, 2016).

Bu diyet liflerinin sağlık etkileri, insanın sindiremediği karbonhidratların bakteriyel fermantasyonu yoluyla gerçekleşir. Fermantasyon sonucunda üretilen kısa zincirli yağ asitleri, dışkıda yüksek düzeylere ulaşarak iki kritik işlevi yerine getirir: bağırsak epitel bariyerini güçlendirir ve sistemik inflamatuvar yanıtları azaltır. Bu mekanizmalar sayesinde, Akdeniz diyeti yüksek yağlı diyetlerin tetiklediği zararlı metabolik süreçlere doğrudan karşı koyar (Anto & Blesso, 2022).

1.2.3 Metabolomiks

Metabolomiks, biyolojik bir sistemde (hücre, doku, organ veya organizmada) bulunan metabolitlerin (<1500 Da) analizi ile ilgilenen bir tekniktir. Son yıllarda temel ve uygulamalı araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve yavaş yavaş genomiks, transkriptomiks ve proteomiks için tamamlayıcı bir teknik haline gelmiştir (Wishart, 2008). Metabolomiks hücrelerin fizyolojik durumunun anlık bir görüntüsünü sağladığından biyolojik sistemdeki metabolik profilini etkileyen faktörlerin (örneğin

diyet değişikliği) fizyolojik yanıtlarını inceler. Metabolomiks, metabolik mekanizmaların aydınlatılmasını ve metabolik biyobelirteçlerin tanımlanmasını hızlandırır. Diğer ‘omiks’ çalışmalarına kıyasla metabolomiks iç ve dış ortamdaki değişikliklere hücresele yanıt hakkında doğrudan bilgi sağlar (Peng ve diğ, 2015).

Metabolomikte uygulanan deneysel stratejiler üç sınıfa ayrılabilir: hedefli analiz, yarı hedefli analiz ve hedefsiz analiz. Bu stratejiler, kantitasyon düzeyi (bağlı ve mutlak), numune hazırlama tekniği, deneysel doğruluk ve kesinlik, saptanabilen metabolitlerin sayısı ve çalışmanın amacı (hipotez oluşturma/keşif çalışması/hipotezi test etme) dahil olmak üzere birçok yönden farklılık gösterir. Hedefli ve yarı hedefli analizlerde analiz edilecek metabolitlerin kimyasal kimlikleri veri toplama başlamadan önce bilinir ve yüksek doğruluk, kesinlik ve seçicilik sağlamak için analitik metotlar geliştirilir. Bu yöntemler, otantik kimyasal standartların uygulanması ile geliştirilmiştir. Analiz sonrası elde edilen verilerden biyolojik bilgi elde etmeye yönelik süreç veri analizinin ardından başlatılabilir. Belirli metabolitlerin analizine uygun analitik metotların oluşturulması ile biyolojik bilgiye ulaşabilmek hedefli ve yarı hedefli metabolomiks analizlerin bir avantajı olurken hedefsiz analize kıyasla daha az sayıda metabolitlerin analizi mümkündür. Diğer yandan hedefsiz analizlerde, çeşitli metabolik sınıflara ait birçok sayıda metabolitlerin analizine izin vermesine rağmen veri toplamadan önce hangi metabolitlerin uygulanan analitik metodla saptanılabilieceğine ilişkin kesin bilgi sınırlıdır. Deney grupları arasında farklılık göstererek biyolojik açıdan önemli olabilecek metabolitlerin kimyasal olarak tanımlanması ve yapısal olarak aydınlatılması, veri toplama ve veri analizi sürecini takip eden yoğun emek gerektiren bir adımdır. Farklılık gösteren metabolitlerin biyolojik anlamını yorumlayabilmek ancak bu metabolitlerin tanımlanması sonucu mümkün olmaktadır (Dunn ve diğ, 2013).

Diğer ‘omiks’ çalışmalarında olduğu gibi, metabolomiks çalışmalarda da büyük miktarda veri elde edilir (Wishart, 2008). Biyolojik sistemdeki tüm metabolitlerin anlık görüntüsünü sağlamak için, özel veri analiz metodları gereklidir. Ek bir alan olarak gelişen kemometri, metabolit ve biyolojik yolak keşiflerini anlamak için geliştirilmiştir (Worley ve Powers, 2015). Bu istatistiksel teknikler, tek değişkenli (univariate) ve çok değişkenli (multivariate) data analiz tekniklerinden oluşmaktadır. t testi ve varyans analizi (ANOVA) tek değişkenli data analizi olmakla birlikte metabolitlerin istatistiksel önemini ($p < 0.05$) araştırır (Saccenti ve diğ, 2013). Çoklu değişken istatistiksel teknikler ise, denetimsiz (unsupervised) method olan Ana

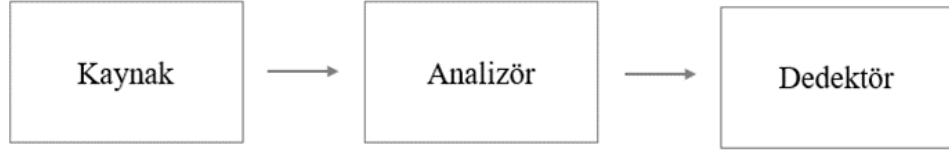
Bileşen Analizi (PCA) veya denetimli (supervised) sınıflandırma olan Kısmi En Küçük Kareler Ayrım Analizini (PLS-DA) içerir. PCA doğrusal cebire dayalı veri noktalarının görselleştirilmesini sağlayan bir boyut azaltma yöntemidir. PCA'nın yaptığı şey, bir örnek grubunun diğerlerinden nasıl farklı olduğunu, hangi değişkenlerin farklılığa neden olduğunu göstermektir. PLS-DA ise en iyi ayrılmanın gerçekleşeceği şekilde temel bileşenlerin dönüşü ile deney grupları arasında ayırma yardımcı olan denetimli bir sınıflandırma yöntemidir. Kemometrik yöntemler (PCA ve PLS-DA), bileşiklerin doğrudan tanımlanmasını veya miktarının belirlenmesini sağlamamasına rağmen farklı numuneler arasında bir karşılaştırma yapmayı mümkün kılmaktadır (Wishart, 2008).

Metabolomiks çalışmalarda, metabolitlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için iki ana analitik platform, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrometrisidir (MS) kullanılmaktadır. Yüksek çözünürlüklü H-NMR spektroskopisi, biyoakışkanları, hücreleri ve dokuları neredeyse hiç numune hazırlama işlemi ve önyargı olmadan (unbiased) incelemek için tercih edilirken, metabolik profillemeye uygulamalarında hassasiyet (sensitivity) gerektiğinde kütle spektrometresi tercih edilir (Worley ve Powers, 2015).

MS ile birçok maddenin moleküler ağırlıkları ve miktarları hızlı ve doğru bir şekilde ölçülebilir. Ancak, MS tek başına uygulandığında aynı moleküler ağırlığa sahip iki veya daha fazla maddeyi ayırt edemez. Bu nedenle, numunenin kütle spektrometresine enjekte edilmesinden önce, kromatografi gibi bir ayırma yöntemiyle maddelerin ayrılması gerekmektedir. Kromatografi, bir numunenin bir kolondan geçirilmesiyle içeriğindeki maddelerin kimyasal özelliklerine göre ayrılmasını sağlar. Böylece, aynı moleküler ağırlığa sahip ancak kimyasal olarak farklı olan iki maddenin ayrı ayrı ölçülmesi mümkün olur (Tomita ve Nishioka, 2005).

1.2.4 Kütle spektrometresi

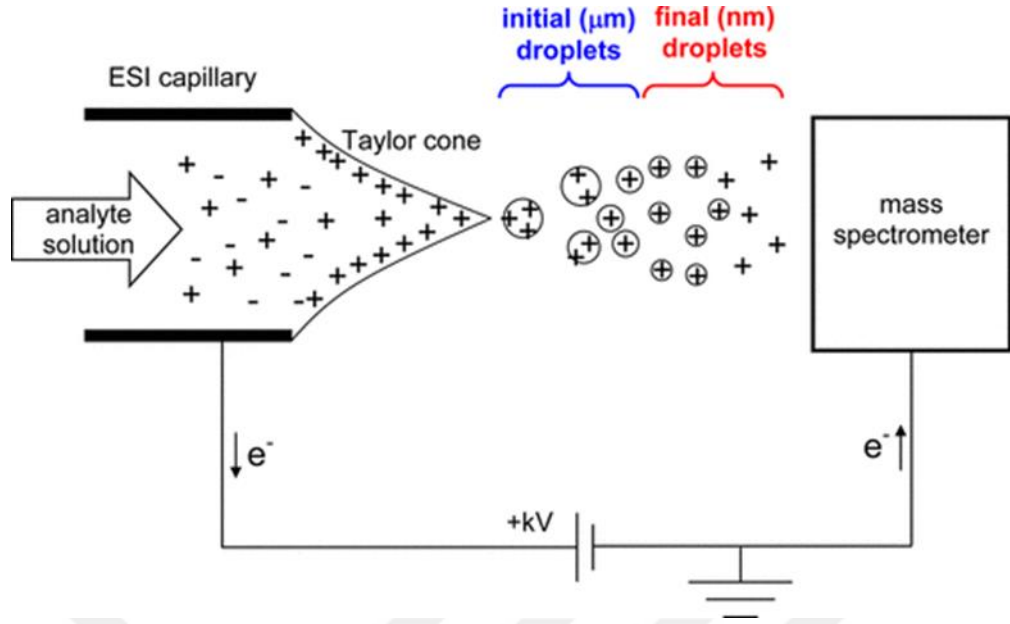
Kütle spektrometrisi, gaz fazındaki iyonların kütle-yük oranına (m/z) dayalı olarak moleküler kütlelerini ölçmek için kullanılan analitik bir tekniktir. Çözünürlük, izotopları ayırt edecek kadar yüksekse, bir analitin yük durumu ve dolayısıyla kesin kütlesi belirlenebilir. Bir kütle spektrometresi üç ana bileşenden oluşur: iyonların oluşturulduğu bir iyonizasyon kaynağı, kütle ayırma ve olası fragmentasyondan sorumlu bir veya birkaç kütle analizörü ve bir dedektör (Şekil 1.2) (Suizdak, 2004).



Şekil 1.1 : Bir kütle spektrometresinin genel bileşenleri.

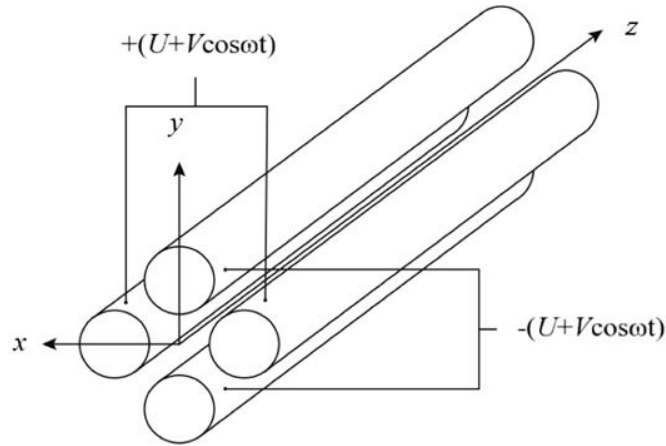
İyonizasyon süreci, kütle spektrometresinin ilk adımıdır. Bu aşamada analitlerin, kütle analizörlerinin kullandığı elektrostatik veya manyetik alanlar tarafından manipüle edilebilmeleri için pozitif veya negatif yüklenmeleri sağlanır. İyonizasyon için birçok kaynak (atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI), matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) gibi) mevcut olmakla birlikte, metabolitlerin incelenmesinde hem yumuşak bir teknik (iyonların parçalanmalarına neden olmayacak koşullarda oluşturulmaları) hem de sıvı kromatografi sistemleriyle uyumlu bir yöntem olduğu için en yaygın olarak elektrospray iyonizasyonu (ESI) kullanılmaktadır (Hollerbach ve diğ., 2017; Suizdak, 2004).

ESI, sıvı bir çözeltiden doğrudan gaz halinde iyonlaşmış moleküller üretir. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi, numune çözeltisi metal bir nozulun (veya iğnenin) ucunda yüksek bir potansiyele sahip güçlü bir elektrik alanı bölgesinden püskürtülür. Potansiyelin uygulandığı nozul, çözeltinin ince bir spreyci şeklinde dağılmasını ve yüklü damlacıklar oluşturmasını sağlar. Damlacıklara atmosfer basıncında kuru gaz, ısı veya her ikisi birden uygulanarak çözücünün buharlaşması sağlanır. Yüklü damlacığın boyutu küçüldükçe, yüzeyindeki yük yoğunluğu artar. Yüzeydeki benzer yükler arasındaki Coulomb itmesi, yüzey gerilimi kuvvetlerini aşacak kadar büyük hale gelir ve "Taylor konisi" olarak bilinen bir yapıdan iyonlar fırlatılır. İyonları oluşturan bir diğer olasılık ise damlacığın patlayarak iyonları serbest bırakmasıdır. Her iki durumda da, ortaya çıkan iyonlar, kütle analizörünün vakumuna götüren elektrostatik lensler aracılığıyla bir orificeye yönlendirilir (Suizdak, 2004).



Şekil 1.2 : Pozitif iyon modunda çalışan bir ESI kaynağının şematik tasviri (Konermann ve diğ, 2013).

İyonlaşma kaynağından sonra yer alan kuadropol (Q) kütle analizörleri, iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırmak için kullanılan cihazlardır. Şekil 1.3'de gösterildiği gibi, paralel yerleştirilmiş dört metal çubuktan oluşur. Her bir çubuğa DC voltajı (U) ve radyo frekansı (RF) voltajı (V) uygulanır. RF voltajları iyonları gaz fazında askıda tutmak için uygulanırken, DC voltajları iyonları cihaz içinde hareket ettirmek için uygulanır. İyonlar z yönünde hareket ederken x - y düzleminde salınım yaparlar. Bu salınım, her bir çubuk çiftine uygulanan DC (U) ve RF (V) potansiyelleri ile kontrol edilir. Sadece seçilen U ve V değerlerinde kararlı yörüngelere sahip iyonlar kuadropol kütle filtresinin uzunluğu boyunca ilerleyerek bir sonraki kısma ulaşır (March ve Todd, 2015).



Şekil 1.3 : Kuadropol analizörünün yapı diyagramı (Han ve Li, 2023).

İyonların kuadropolde hissettiği ivme, Mathieu denklemleri (denklem 1.1) kullanılarak tanımlanır. Bu denklemler, uygulanan DC voltajından kaynaklanan iyon hareketini 'a' bileşenine ve RF voltajından kaynaklanan hareketi 'q' bileşenine indirger (Raymond, 1999). Başka bir deyişle, belirli DC ve RF voltajları bir kuadropole uygulandığında, kuadropoldaki bir iyonun DC voltajından kaynaklanan bir 'a' değeri ve RF voltajından kaynaklanan bir 'q' değeri olacaktır. Bu 'a' ve 'q' değerleri, iyonların kuadropoldeki hareketini belirler. Dolayısıyla aynı DC veya RF alanlarına maruz kalan farklı iyonlar, farklı 'a' ve 'q' değerlerine sahip olmaktadır. Bu da kuadropollerin belirli m/z iyonlarını izole etmek için kullanılmasını sağlar (Savaryn ve diğ, 2016).

$$\text{DC kaynaklı:} \quad a_x = -a_y = \frac{4qU}{m_i r_0^2 \omega^2} \quad (1.1)$$

$$\text{RF kaynaklı:} \quad q_x = -q_y = \frac{2qV}{m_i r_0^2 \omega^2}$$

U : DC gerilimi

V : RF genliği

q : iyon yükü

m_i : iyonik kütle

r_0 : kuadropol yarıçapı

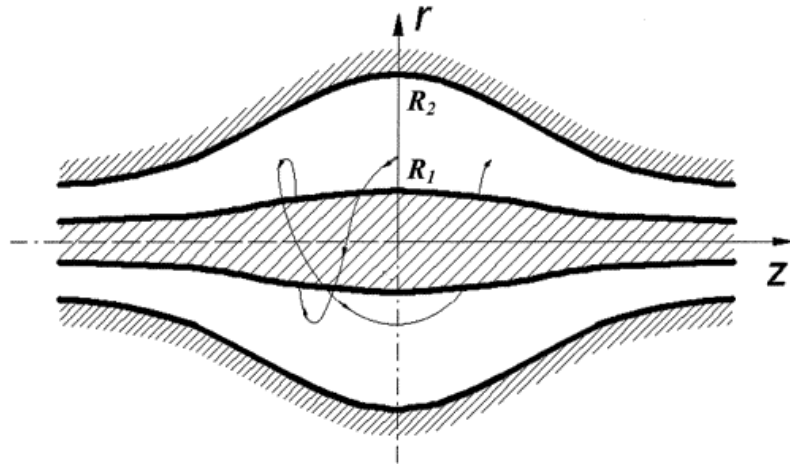
ω : RF frekansı

İyonizasyon yöntemleri, maddeleri ölçüm için uygun hale getirirken, analiz kalitesini ve güvenilirliğini nihai olarak belirleyen kütle analizörü ile dedektörün birleşimidir. Kütle analizi fiziğine bağlı olarak, analizörler kuadropol (quadrupole), iyon tuzağı (ion trap), uçuş zamanı (time of flight - TOF) veya Fourier dönüşümü (Fourier transform - FT) genel türlerinden birine ait olabilir. Analitlerin ve parçalarının (MS/MS) analizine olanak sağlamak için birden fazla analizör birleştirilebilir. En popüler kombinasyonlar ise üçlü kuadropol (QqQ) ve kuadropol/TOF (QToF) hibritleridir.

On yıl öncesine kadar FTMS (Fourier Transform Mass Spectrometry), sadece Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonansı (FTICR) kütle spektrometrisi için kullanılan bir terimdi. Bu tür cihazlarda, iyonlar güçlü bir manyetik alan ve zayıf bir elektrik alan kombinasyonu altında iyon tuzağında (ion trap) tutulur ve kütle spektrumları ölçülür. Bunun için öncelikle iyonların oluşturduğu görüntü akımı, Fourier dönüşümü kullanılarak ilk olarak frekans alanına, ardından kütle spektrumuna dönüştürülerek sayısallaştırılır. Süperiletken mıknatısların doğası gereği stabil olması ve frekans ölçümlerinin yüksek doğruluğu, bu tekniği yüksek çözünürlük ve doğru kütle ölçüm

gücü açısından benzersiz kılınıştır. Yüksek çözünürlük sayesinde iyonların izotopik piklerini ayırt etme, dolayısıyla yüklerini (z) belirleme ve kütlelerini (m) $<10^{-7}$ - 10^{-6} düzeyinde görelî hassasiyetlerle ölçme imkânı sağlar. FTMS'in bu benzersiz özellikleri, ailesinin yeni bir üyesi olan Orbitrap analizörünün ortaya çıkması ve büyümesi için verimli zeminler yarattı. İlk olarak 1999 yılında Makarov ve meslektaşları tarafından Amerikan Kütle Spektrometrisi Derneği'nin (American Society for Mass Spectrometry) konferansında patenti sunulan Orbitrap, 2005 yılında üreticisi olan Thermo Scientific tarafından bir kütle dedektörü olarak ilk kez sahneye çıktı. İlk ticari uygulaması, doğrusal iyon tuzağı (linear ion trap) ile hibrit bir cihazda (LTQ Orbitrap) gerçekleştirildi. O zamandan bu yana binlerce Orbitrap tasarımı cihaz üretildi ve dünya çapındaki analitik laboratuvarlar ve tesislerde yaygın olarak kullanılan bir cihaz haline geldi (Zubarev and Makarov, 2013).

Orbitrap, birbirine bakan iki dış elektrot ve ortasında bir iç elektrottan oluşur (Şekil 1.4). İyonlar, C-tuzak (harici bir iyon depolama cihazı) aracılığıyla Orbitrap'a, merkezi elektrodun z -düzlemine teğet olarak enjekte edilir. İyonların merkezi elektrotta çekimi, enjeksiyon sırasında oluşan merkezkaç kuvveti ile dengelenir; bu da iyonların merkezi elektrot etrafında dönerken z -düzleminde salınmasına neden olur. m/z değeri, z -düzlemindeki salınımların frekansına bağlıdır ve bu frekans, dış elektrotlar tarafından kaydedilir. İyonlar ileri geri salınırken, stabilize olmadan önce genellikle birkaç kilometre yol kat ederler. Tuzaktaki iyonlar için harmonik salınımların frekansı (ω), denklem 1.2'de ifade edilmiştir. Fourier dönüşümü kullanılarak elde edilen veriler, Fourier Dönüşüm İyon Siklotron Rezonansı (FT ICR)'de uygulanan aynı prensiplerle kütle spektrumlarına dönüştürülebilir (Makarov, 2000).



Şekil 1.4 : Orbitrap kütle analizörünün yapı diyagramı (Makarov, 2000).

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m} * k} \quad (1.2)$$

q : iyon yükü

m : iyon kütlesi

k : orbitrap kütle spektrometrelerinde m/z belirlemesi için kullanılan bir sabit

ω : harmonik salınımların frekansı

Kütle spektrometrisinde çözünürlük, birbirine çok yakın iki farklı kütle-yük (m/z) oranına sahip iyonları ayırt etme kapasitesinin bir ölçüsüdür. Düşük çözünürlüklü bir cihaz olan QqQ, genellikle sadece nominal (tam sayı) kütleleri rapor ederken, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi birkaç ondalık basamağa kadar doğru kütleyi ölçmeyi sağlar. Doğru kütleyi kullanarak, bilinen metabolitlerin çok spesifik iyon kromatogramları (extracted ion chromatography - EIC) tanımlanabilir ve kantitatif analiz yapılabilir. Ayrıca, doğru kütle ve ilgili izotopik dağılım ölçümleri, bilinmeyen metabolitlerin kimliklerinin tanımlanmasında da kullanılabilir (Zubarev ve Makarov, 2013).

1.2.5 Veri toplama modları

Bir kütle spektrometresi birçok farklı modda çalışabilir. Bazı modlar keşif çalışmaları ve yeni bileşiklerin tanımlanması için daha uygunken, diğer modlar nicel amaçlar için uygulanır. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisine dayalı hedefsiz metabolomikte, tam tarama (full scan), veriye bağlı edinim (data dependent acquisition - DDA) ve veriye bağımsız edinim (data independent acquisition - DIA) olmak üzere üç yaygın veri toplama modu kullanılmaktadır. Tam tarama modunda, iyonların MS1 spektrumları ölçülürken, DDA modunda tam taramanın hemen ardından, elde edilen MS spektrumundan bolluklarına göre seçilen öncü iyon listesinde MS/MS analizi gerçekleştirilir. Böylece, tam tarama ile nicel, MS/MS spektrumlarından elde edilen bilgi ile de yapısal veri elde edilir. Bu yaklaşım, metabolitlerin relatif konsantrasyonlarını ölçme ve kimliklerini tanımlama imkanı sağlar. MS/MS analizinin öncü iyon yoğunluğuna bağlı olması nedeniyle, DDA modunun düşük yoğunluğa sahip ama belki de ilgi çekici olan metabolik özelliklerin hiçbir zaman parçalanmak üzere seçilmemesi ve dolayısıyla bu özelliklerle ilgili MS/MS verisinin elde edilememesi DDA modunun potansiyel bir kısıtlaması olmaktadır.

DIA modu ise belirli bir kütle aralığında döngü yaparak tüm öncü iyonların aynı anda parçalanmasını sağlar. Bu, düşük konsantrasyonlardaki metabolitleri tespit ve

tanımlamayı mümkün kılarken, birçok metabolitten elde edilen MS/MS spektrumlarını çözümlmek büyük bir veri işleme zorluğu yaratır. Teorik olarak DIA, cazip bir metabolomik profillemeye stratejisi olsa da, öncü iyonlarla onların fragman iyonları arasındaki bağlantının karmaşıklığı nedeniyle pratikte hedefsiz metabolomik çalışmalarında uygulanması sınırlıdır. Metabolik kimlik aydınlatması büyük ölçüde MS/MS spektrumunun kalitesine bağlı olduğundan, hedefsiz metabolomik çalışmalarda daha yüksek spektral kalite tercih edilir. Bu nedenle, yanlış pozitif kimlik tanımlama olasılığını azaltmak için DDA tercih edilir. Özetle, her bir veri toplama modunun kendine özgü avantajları ve kısıtlamaları vardır. Veri toplama modunun seçimi, yapılan çalışmanın amacına (hipotez testi veya keşif) göre yapılmalıdır. MS/MS veri toplama yaklaşımının yanı sıra, hedefli çalışmalar söz konusu olduğunda örnek hazırlığını ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) koşullarını optimize ederek analizin duyarlılığını artırmak mümkündür. Hedefsiz analizlerde ise metabolitlerin çeşitli kimyasal özellikleri ve konsantrasyonlarına bağlı olarak bu optimizasyonu yapmak çok daha zordur. Bu nedenle, hedefsiz metabolomikte daha iyi analitik performans elde etmek için en uygun veri toplama modunu seçmek daha pratik olacaktır (Guo ve Huan, 2020).

1.3 Hipotez

Mevcut literatür ışığında, bu çalışmanın temel hipotezi doymuş yağ asitleri açısından zengin diyet tüketen grupta, serum metabolik sağlık belirteçlerinin, doymamış yağ asitleri açısından zengin diyet tüketen gruba kıyasla olumsuz yönde değişim göstereceği öngörülmektedir.

Bu çalışma, farklı yağ asidi kompozisyonlarına sahip yüksek yağlı diyetlerin bağırsak mikrobiyotası ve konak metabolizması arasındaki etkileşimleri kapsamlı bir şekilde inceleyerek, literatürdeki mevcut boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır. Elde edilecek bulgular, beslenme-mikrobiyota-metabolizma üçgenindeki karmaşık ilişkilerin anlaşılmasına özgün bir katkı sağlayacak ve metabolik sağlık üzerindeki diyet yağ asidi profilinin rolünün aydınlatılmasında önemli bir kaynak teşkil edecektir.

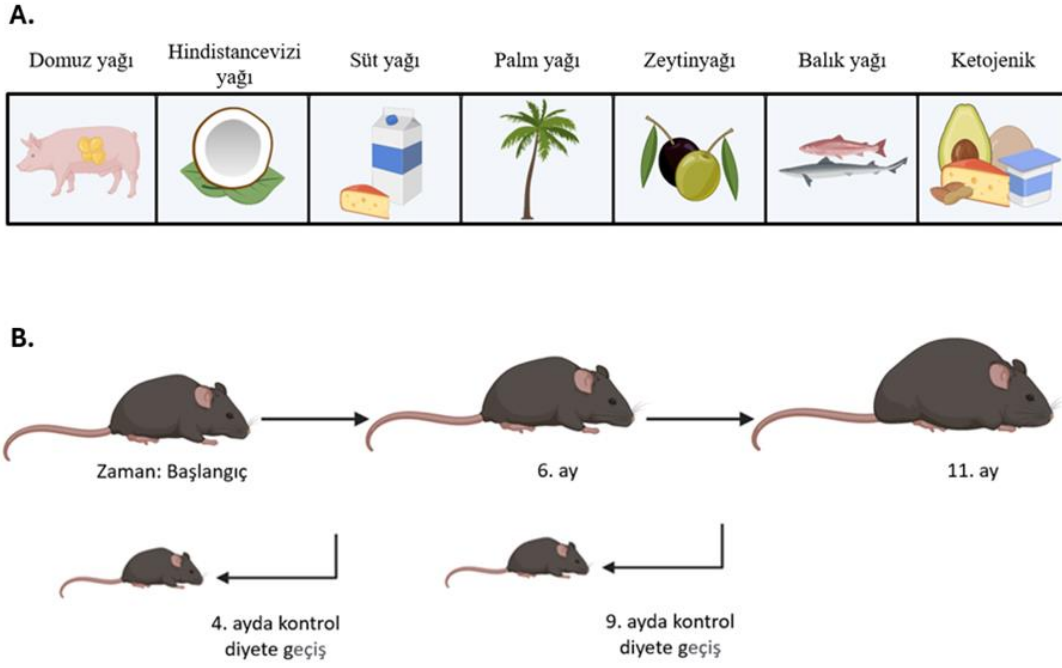
2. METOD

Bu çalışma, yağ asidi kompozisyonunun metabolik sağlık üzerindeki etkilerini sistematik olarak incelemek amacıyla fare modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yalnızca yağ asidi kompozisyonunun etkisini izole edebilmek için, ana yağ asidi türü dışında besin içerikleri özdeş olan izokalorik diyetler (%45 kkal yağ, Envigo) tasarlanmıştır. Diyetlerin toplam yağın yüzdesi cinsinden doygunluk derecesine göre yağ asidi profilleri Çizelge 2.1'de sunulmuştur. Yağ kaynakları bakımından farklılık gösteren toplam yedi ayrı yüksek yağlı diyet grubu oluşturulmuş olup, bu diyetler doygunluk derecesi ve yağ asidi zincir uzunluğu açısından belirgin farklılıklar gösterecek şekilde formüle edilmiştir (Şekil 2.1A).

Metabolik değişimlerin zaman içindeki seyrini izlemek amacıyla, çalışma başlangıcında (0. ay), 6. ayda ve 11. ayda farelerden kan örnekleri alınmıştır. Yüksek yağlı diyetlerin indüklediği metabolik değişikliklerin kalıcılığını ve geri dönüşümlülüğünü değerlendirmek üzere, deney gruplarının bir kısmı 4. ayda, diğer kısmı ise 9. ayda yüksek yağlı diyetlerden standart kontrol diyetine geçirilmiştir. Bu geçiş döneminde fareler iki ay boyunca kontrol diyetiyle beslendikten sonra yeniden kan örnekleri alınmıştır (Şekil 2.1B).

Çizelge 2.1 : Diyetlerin toplam yağın yüzdesi cinsinden doygunluk derecesine göre yağ asidi profili (Envigo).

Doygunluk derecesi	Hindistan cevizi	Balık	Süt	Domuz	Zeytinyağı	Palm	Keto
Doymuş	89	28	58	36	17	53	42
Tekli doymamış	3	24	30	47	66	32	39
Çoklu doymamış	8	48	11	17	17	15	19



Şekil 2.1 : A. Sadece yağ asidi türü farklı olan izokalorik diyet modeli (%45 kcal yağ). B. Deney tasarımı.

2.1 Örnek Hazırlama

Kan örnekleri, lityum heparin içeren tüplere alındıktan hemen sonra vorteks yardımıyla antikoagülan ile iyice karıştırıldı. Ardından, örnekler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle 1000g hızında santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj tamamlandıktan sonra, elde edilen süpernatant, 2 mL'lik Eppendorf tüplerine iki alikot olacak şekilde aktarılıp analiz edilene kadar -80°C'de saklandı. Analiz öncesinde, örnekler 4°C'de 16000g hızında 15 dakika süreyle mikrosantrifüjde santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sırasında oluşabilecek kalıntıları bozmamaya özen gösterilerek, 10 µL süpernatant, 90 µL ekstraksiyon solüsyonu (asetonitril: metanol: formik asit, 75:25:0.2) içeren 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine aktarıldı ve vortekslendi. Daha sonra, hazırlanan ekstraktlar önceden 4°C'de bekletilmiş otomatik örnekleyici şişelerine aktarılıp, analiz için otomatik örnekleyiciye yerleştirildi.

2.2 LC-MS Metabolomiks Analizi

Analitik teknik olarak, tespit ve göreceli kantifikasyon için sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) ve kimyasal yapıları tanımlamak için sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanıldı. LC-MS metabolomik analizi, Vanquish Horizon UHPLC sistemi (Thermo Fisher Scientific) ile birleştirilmiş Orbitrap Q Exactive™ Plus cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin kromatografik ayrımı, 40°C'de

SeQuant ZIC-pHILIC kolonunda (150 × 2.1 mm, 5 µm polimerik) ve SeQuant ZIC-pHILIC Guard Kit (20 x 2.1 mm) ile sağlandı. Elüsyon, mobil faz A olarak suda 20 mM amonyum karbonat + %0.1 amonyum hidroksit (pH 9.3) ve mobil faz B olarak %100 asetonitrilden oluşan bir mobil faz ile gerçekleştirildi. Kullanılan gradyan, 150 µL/dakika akış hızında şu şekildeydi: 0-22 dakika: %90'dan %40 B'ye lineer gradyan; 22-24 dakika: %40 B'de sabit; 24-24.1 dakika: %90 B'ye geri dönüş; 24.1-30 dakika: %90 B'de dengeleme. Enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlendi ve örnekler 4°C'de muhafaza edildi. MS analizi için, bir HESI probu polarite değiştirme modunda çalıştırıldı ve kaynak koşulları şu şekildeydi: sprej voltajı, 3.0 kV; kılıf gazı, 40 au; yardımcı gaz, 15 au; iyon transfer tüpü sıcaklığı, 275°C; ve prob sıcaklığı, 250°C. Tam tarama analizi parametreleri ise şu şekildeydi: çözünürlük, 70,000; AGC hedefi, 1e6; maksimum enjeksiyon süresi, 80 ms; m/z aralığı, 55-825 Th. Veriye bağlı tarama (DDA) parametreleri: çözünürlük, 17,500; AGC hedefi, 1e5; maksimum enjeksiyon süresi, 50 ms; m/z aralığı, 55-825 Th. Cihaz, Pierce ESI Positive / Negative Kalibrasyon Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak dıştan kalibre edildi.

2.3 Kalite Kontrol

Analizin kalite kontrolünü sağlamak için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Analiz listesi, öncelikle amino asit standart karışımıyla başlatıldı ve kromatografik kolonun kararlılığı, alınma süresi (retention time) ve pik eğrileri altında kalan alanın (peak area) tutarlılığı karşılaştırılarak sistemin performansı test edildi.
2. Kararlı (ağır) izotop etiketli amino asit karışımı (CIL MSK-A2-1.2), son konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde iç standart olarak ekstraksiyon çözeltisine eklendi.
3. Analiz edilecek örnekler, çalışma listesi sırasına rastgele yerleştirilerek (randomized), önceki örnekten gelebilecek kontaminasyonun etkisi (carry-over) engellendi.
4. Tüm örneklerin analizi boyunca oluşan karşı basınç eğrileri üst üste konulup karşılaştırılarak olası bir mekanik arıza (örneğin sızıntı veya tıkanma) olmadığı kontrol edildi.
5. Numunelerin analizi, önce pooled QC örneğiyle (her örnekten eşit miktarda alınıp oluşturulmuş havuzlanmış kalite kontrol örneği) başlatıldı ve her sekiz örnek diziliminden sonra tekrar bir pooled QC örneği listeye eklendi. Böylece analiz listesinin başında, ortalarında ve sonunda analiz edilen aynı kalite kontrol örneğinin aynı sonucu verip vermediği incelenerek cihazın kararlılığı gözlemlendi.

2.4 Hedefsiz Metabolomiks

2.4.1 Compound Discoverer

Hedefsiz metabolomiks veri analizi, Compound Discoverer 3.3 (Thermo Scientific) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz için ham dosyalar, her bir zaman noktasında kontrol diyetiyle karşılaştırılacak şekilde gruplandırıldı. İstatistiksel analizde ANOVA modeli ile Tukey post-hoc testi kullanıldı ve p-değerleri Benjamini-Hochberg düzeltmesiyle ayarlandı. Gruplar belirlendikten sonra, ham dosyalar şu adımlarla işlendi: minimum pik yoğunluğu 10,000 birim, kütle toleransı 5 ppm, sinyal/gürültü oranı eşiği 1.5 ve tutulma süresi toleransı 0.2 dakika. Bazı dosyalarda eksik olan kromatografik pik alanları, yazılımın algoritması kullanılarak minimum bir değere atandı.

Metabolit kimlik tanımlama işlemi farklı türdeki veritabanları kullanılarak gerçekleştirildi. mzCloud (<https://www.mzcloud.org>) ve Kuzey Amerika Kütle Bankası (MassBank of North America - MoNA (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>)), MS/MS düzeyinde bileşikleri tanımlamak için kullanılırken, MS1 spektrumunun tam m/z'si Human Metabolome Database (Wishart et al., 2013) ve KEGG veritabanını (Kanehisa et al., 2016) içeren Chemspider (<http://www.chemspider.com>) uygulanarak yapıldı. Ayrıca, bilinmeyen metabolitlerin izotop deseni eşleştirme yoluyla elementel kompozisyonunu tahmin etmek için yazılımın Tahmin Edilen Kompozisyon özelliği kullanıldı. Ek olarak, yerel veritabanımızdaki saf referans standartlardan elde edilen yüksek kaliteli tutulma süresi verileri sağlandı. Son olarak, blank örneklerden 5 kat daha düşük yoğunluğa sahip olan pikler kaldırıldı. Bu işlemlerin sonucunda, her biri benzersiz bir kimlikle tanımlanan metabolitlerin bulunduğu bir liste elde edildi.

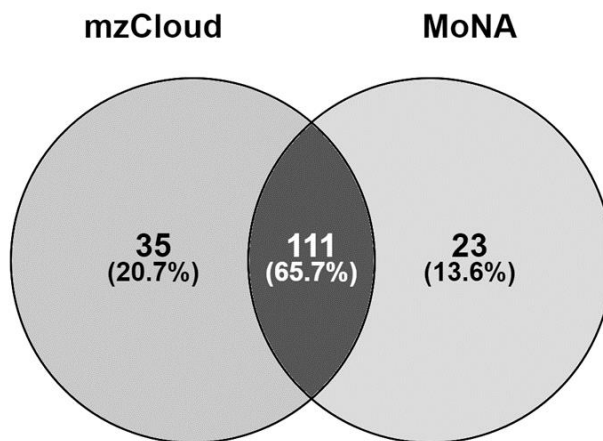
2.4.2 MassBank of North America

Compound Discoverer, Thermo Scientific tarafından üretilmiş yüksek kaliteli bir MS/MS kütüphanesi olan mzCloud ile hedefsiz metabolomiks uygulamalarında kimliklendirme yapmaktadır (Ding ve diğ., 2020). Daha fazla kimliklendirme sağlamak amacıyla, Compound Discoverer yazılımına, Kuzey Amerika Kütle Bankası (MassBank of North America - MoNA) spektral kütüphanesi eklendi. MoNA'nın Orbitrap ile üretilmiş olan All LC-MS/MS Orbitrap (66.201 spektrum) kütüphanesi, 21 Mayıs 2024 tarihinde <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads> adresinden indirilmiş ve mzVault ile Compound Discoverer'a uyumlu hale getirilerek entegrasyonu sağlanmıştır.

MS/MS kütüphaneleri kullanılarak gerçekleştirilen kimlik eşleştirmelerinin güvenilirliğini değerlendirmek için bir skorumla yaklaşımı kullanılır. Bu eşleşme skorları, veritabanındaki

spektrum ile sorgu spektrumu arasındaki fragment iyon eşleşmelerinin kalitesine dayanarak hesaplanır (örneğin, fragment iyonlarının kütleleri ve göreceli yoğunluklarının aynı olup olmadığı). Parçalanma modeli, moleküle uygulanan aktivasyon enerjisine bağlı olarak değişiklik gösterebilir; daha yüksek enerjiye maruz kalan bir molekül, öncü iyonun daha fazla parçalanmasına neden olur, dolayısıyla öncü iyonun göreceli yoğunluğu fragment iyonlarına göre daha düşük olur. Aktivasyon enerjisi ve göreceli yoğunluklar aramaya dahil edildiğinde, daha spesifik sonuçlar elde edilir. Ancak, her MS/MS kütüphanesi aynı kütle analizörü ile üretilmediğinden, belirli bir enerji seviyesinde bir analizörde oluşan fragmentasyon modeli, başka bir analizörde farklı sonuçlar verebilir (Bittremieux ve diğerleri, 2022).

MzCloud, yüksek çözünürlüklü doğru kütle (High Resolution Accurate Mass - HRAM) fragmentasyon spektrumlarını içeren bir kütüphane olup, ayarlanabilir iyon aktivasyon enerjisi tolerans penceresi ile daha spesifik aramalar yapılmasına olanak tanır. Bu gelişmiş arama algoritması, moleküllerin güvenilir bir şekilde tanımlanmasına katkı sağlar. Çalışmada, yüksek kaliteli daha fazla kimliklendirme elde etmek için mzCloud'a ek olarak Orbitrap cihazı ile üretilmiş MoNA spektral kütüphaneleri de kullanılmıştır. Her iki spektral kütüphane için 70 puanlık eşik skoru uygulanmıştır (Assress ve diğerleri, 2023). MzCloud ve MoNA, hem ortak kimliklendirmeler hem de tek başlarına ek kimlikler sağlayarak analizde önemli bir katkı sunmuştur (Şekil 2.1). Bu sayede, bu çalışmada daha geniş bir kimyasal bileşen yelpazesi tanımlanabilmiş ve yeni metabolitler yüksek güvenilirlik ile eklenmiştir. Bu da analizin doğruluğunu artırarak, metabolomiks profilin daha kapsamlı bir şekilde ortaya konmasını sağlamıştır.



Şekil 2.2 : Toplamda 169 kimlik mzCloud ve MoNA tarafından tanımlanmıştır. mzCloud tarafından 146 metabolit tanımlanırken, MoNA tarafından 134 metabolit tanımlanmıştır ve bunların 111 tanesi (%65.7) ortaktır.

2.4.3 Kimliklendirme ve güven seviyeleri

Hedefsiz metabolomiksin en önemli avantajlarından biri, belirli bir varsayıma dayanmadan veri toplama olanağı sunmasıdır. Bu yaklaşım, hipotez üretimi gibi değerli bir özellik sergilerken, LC-MS tabanlı hedefsiz metabolomiks çalışmalarında kimliklendirme sürecinde çeşitli zorluklar mevcuttur. Hedefsiz metabolomiks veri işleme iş akışları, gürültü filtreleme, pik tespiti, tutunma süresi hizalama ve nihayetinde metabolitin kimliğinin belirlenmesi gibi tanımlanmış adımları içermektedir. Önemli bir nokta, tespit edilen her bir kimlik her zaman metabolitlere karşılık gelmeyebileceğidir. Metabolit atamalarının güvenilirliğinde şeffaflığın önemli olması nedeniyle, Metabolomiks Standartları İnisiyatifi'nin (Metabolomics Standards Initiative - MSI) Kimyasal Analiz Çalışma Grubu (Chemical Analysis Working Group), metabolit kimliklendirilmesine dair raporlanması gereken minimum metaveriler için belirli yönergeler geliştirmiştir. En yüksek güven seviyesindeki kimliklendirme 'doğrulanmış bir kimlik' (Seviye 1) olarak adlandırılır ve bu, aynı analitik koşullar altında elde edilen en az iki ortogonal özelliği (örneğin, tutunma süresi, MS/MS verileri, doğru kütle) içeren saf referans standart ile doğrulanan metabolitleri ifade eder. Eğer referans standardı mevcut değilse, ancak tahmini MS/MS verileri mevcutsa, bu durum 'olasılı bir kimlik' (Seviye 2) olarak kategorize edilir. Daha az kesinlik içeren ön kimliklendirmeler (Seviye 3), doğru kütle ve izotop dağılım desenleriyle yapılan veritabanı aramaları sonucunda geçici kimlik atamalarıdır. Tek bir moleküler formül genellikle birden fazla aday yapıya yol açabilir. Bu durum, 'moleküler formül adayları' (Seviye 4) veya sadece deneysel m/z verisine dayalı 'Seviye 5' ile sonuçlanır ve bunlar daha düşük güven seviyeli kimlik atamalarını ifade eder (Schrimpe-Rutledge ve diğ., 2016). Bu raporda, bulguların güvenilirliğini artırmak amacıyla MSI Seviye 1 ve 2 kimliklendirme seviyelerine karşılık gelen özelliklere vurgu yapılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 : UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.

mzCloud ve MoNA'da ortak olan metabolitler	Formül	Eklenti	m/z	TS* (dk)	Kütle hatası (ppm)
1- (Karboksimetil)sikloheksankarboksilik asit	C9H14O4	M-H	185.0820	4.10	0.14
1,5-Anhidro-D-glukitol	C6H12O5	M-H	163.0613	9.48	0.45
11,12-Epoksi-(5Z,8Z,11Z)-ikosatrienoik asit	C20H32O3	M-H	319.2279	2.19	0.07
1-Metilhistidin	C7H11N3O2	M+H	170.0925	12.39	0.77
2-(asetilamino)-3-(1H-indol-3-il)propanoik asit	C13H14N2O3	M+H	247.1079	7.07	0.63
2-Aminoadipik asit	C6H11NO4	M+H	162.0762	15.06	0.78
2-Hidroksivaldik asit	C5H10O3	M-H	117.0558	5.68	0.94
2-Oksoglutarik asit	C5H6O5	M-H	145.0143	16.19	0.50
3,4-Dihidroksifenilpropiyonik asit	C9H10O4	M-H	181.0507	9.62	0.39
3-Hidroksi-3-metilglutarik asit	C6H10O5	M-H	161.0456	14.88	0.34
3-Hidroksibutirik asit	C4H8O3	M-H	103.0402	7.24	1.51
3-Hidroksifenilasetik asit	C8H8O3	M-H	151.0402	4.58	0.64
3-Hidroksivalerik asit	C5H10O3	M-H	117.0559	6.91	1.32
3-İndoksil sülfat	C8H7NO4S	M-H	212.0024	6.92	0.45
3-Metoksibenzaldehit	C8H8O2	M+H	137.0599	5.70	1.03
3-Metilhistidin	C7H11N3O2	M+H	170.0925	12.04	0.73
3-tert-Bütiladipik asit	C10H18O4	M-H	201.1133	11.26	0.54
4-Asetamidobenzoik asit	C9H9NO3	M+H	180.0657	6.46	0.53
4-Metoksibenzaldehit	C8H8O2	M+H	137.0598	6.08	0.97
4-Oksoprolin	C5H7NO3	M-H	128.0354	11.25	0.88
4-Fenilbutirik asit	C10H12O2	M+H	165.0912	4.60	0.88
4-Piridoksik asit	C8H9NO4	M+H	184.0606	4.16	0.59
5-Hidroksiindol	C8H7NO	M+H	134.0601	6.93	0.59
6-Aminokaproik asit	C6H13NO2	M+H	132.1020	11.62	0.83
6-Hidroksikaproik asit	C6H12O3	M-H	131.0715	4.58	0.69
Asetilkolin	C7H15NO2	M+H	146.1177	11.25	0.84
Asetil-L-karnitin	C9H17NO4	M+H	204.1232	8.75	0.55
Adenozin	C10H13N5O4	M+H	268.1042	6.89	0.56
Adipik asit	C6H10O4	M-H	145.0507	14.63	0.52
Allopurinol	C5H4N4O	M+H	137.0459	9.21	0.96
Araşidonik asit	C20H32O2	M-H	303.2330	2.07	0.15
Askorbik asit	C6H8O6	M-H	175.0248	14.39	0.15
Asparagin	C4H8N2O3	M-H	131.0463	13.94	0.59
Azelaik asit	C9H16O4	M-H	187.0976	12.47	0.29
Betain	C5H11NO2	M+H	118.0862	8.80	-0.88
Kolik asit	C24H40O5	M-H	407.2805	5.26	0.55
Kolin	C5H13NO	M+H	104.1069	10.68	-0.62
Sitrakonik asit	C5H6O4	M-H	129.0195	8.74	0.95

Çizelge 2.3 (devam): UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.

mzCloud ve MoNA'da ortak olan metabolitler	Formül	Eklenti	m/z	TS* (dk)	Kütle hatası (ppm)
Sitrik asit	C6H8O7	M-H	191.0198	18.19	0.53
Kreatin	C4H9N3O2	M-H	130.0623	12.71	0.44
Kreatinin	C4H7N3O	M+H	114.0662	7.08	-0.29
Sitarabin	C9H13N3O5	M+H	244.0930	9.81	0.93
D-(-)-Früktoz	C6H12O6	M-H	179.0562	11.14	0.48
D-(+)-Glikoz	C6H12O6	M-H	179.0562	12.61	0.45
D-(+)-Malik asit	C4H6O5	M-H	133.0143	16.57	0.72
D-(+)-Mannoz	C6H12O6	M-H	179.0562	11.94	0.30
D-(+)-Prolin	C5H9NO2	M+H	116.0706	10.78	-0.51
D-(+)-Tryptofan	C11H12N2O2	M-H	203.0827	10.08	0.47
DL-Arjinin	C6H14N4O2	M+H	175.1191	18.70	0.79
DL-Glutamin	C5H10N2O3	M-H	145.0619	13.57	0.46
DL-Lizin	C6H14N2O2	M-H	145.0983	18.27	0.43
Dokosaheksaenoik Asit	C22H32O2	M-H	327.2331	2.03	0.51
Dodekandioyik asit	C12H22O4	M-H	229.1446	8.59	0.11
D-Serin	C3H7NO3	M+H	106.0499	14.21	0.72
D-α-Hidroksiglutarik asit	C5H8O5	M-H	147.0300	15.87	0.65
Fumarik asit	C4H4O4	M-H	115.0038	16.63	0.81
Glutarik asit	C5H8O4	M-H	131.0351	15.17	0.62
Guanidinoasetik asit	C3H7N3O2	M+H	118.0610	13.81	-0.56
Hipoksantin	C5H4N4O	M+H	137.0459	7.99	1.08
İndol-3-laktik asit	C11H11NO3	M-H	204.0666	7.96	0.18
İndol-3-pirüvik asit	C11H9NO3	M-H	202.0511	6.61	0.53
İnozin	C10H12N4O5	M+H	269.0882	9.21	0.56
İzositozin	C4H5N3O	M+H	112.0505	8.37	-0.08
L-(-)-Karnitin	C7H15NO3	M+H	162.1126	11.18	0.53
L-(-)-Metiyonin	C5H11NO2S	M-H	148.0439	10.05	0.78
L-(+)-Sitrülin	C6H13N3O3	M-H	174.0884	14.27	0.29
L-(+)-Laktik asit	C3H6O3	M-H	89.0245	9.83	1.30
Lösin	C6H13NO2	M+H	132.1020	8.13	0.77
L-Glutamik asit	C5H9NO4	M+H	148.0606	14.88	0.76
L-Histidin	C6H9N3O2	M+H	156.0770	14.83	1.26
Linoleik asit	C18H32O2	M-H	279.2330	2.11	0.27
L-İzolösin	C6H13NO2	M-H	130.0874	9.42	0.58
L-Fenilalanin	C9H11NO2	M-H	164.0718	8.70	0.64
L-Piroglutamik asit	C5H7NO3	M+H	130.0500	13.56	0.71
L-Treonin	C4H9NO3	M+H	120.0656	13.44	0.21
L-Tirozin	C9H11NO3	M-H	180.0667	11.71	0.58
L-Valin	C5H11NO2	M+H	118.0861	10.61	-1.35
Monometil ftalat	C9H8O4	M-H	179.0351	8.33	0.39

Çizelge 2.4 (devam): UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.

mzCloud ve MoNA'da ortak olan metabolitler	Formül	Eklenti	m/z	TS* (dk)	Kütle hatası (ppm)
N1-4-hidroksi-6-(metoksimetil)pirimidin-2-il]asetamid	C8H11N3O3	M+H	198.0875	11.09	0.69
N3,N4-Dimetil-L-arjinin	C8H18N4O2	M+H	203.1505	15.26	1.16
N6,N6,N6-Trimetil-L-lizin	C9H20N2O2	M+H	189.1599	16.15	0.95
N-Asetil-D-alloizolösin	C8H15NO3	M+H	174.1126	5.27	0.71
Nikotinamid	C6H6N2O	M+H	123.0553	4.57	-0.29
Nikotinamid 1-oksit	C6H6N2O2	M+H	139.0503	6.59	1.00
N-İzovalerilglisin	C7H13NO3	M-H	158.0823	5.63	0.45
NP-003459	C9H14O4	M+H	187.0967	13.82	1.38
NP-008309	C11H13NO3	M-H	206.0823	5.21	0.35
NP-018716	C11H20O4	M-H	215.1289	9.95	0.12
Ornitin	C5H12N2O2	M-H	131.0827	17.63	0.58
Orotik asit	C5H4N2O4	M-H	155.0099	11.24	0.65
Perflooro-1-bütansülfonik asit (PFBS)	C4HF9O3S	M-H	298.9430	1.93	0.14
Fenilasetilglisin	C10H11NO3	M+H	194.0813	5.93	0.62
Fenilpirüvik asit	C9H8O3	M-H	163.0402	4.55	0.65
Pimelik asit	C7H12O4	M-H	159.0663	13.85	0.36
Pipekolik asit	C6H11NO2	M+H	130.0864	10.33	0.86
Prolinamid	C5H10N2O	M+H	115.0866	6.68	0.04
Propionilkarnitin	C10H19NO4	M+H	218.1389	7.66	0.75
Psödoüridin	C9H12N2O6	M-H	243.0622	10.04	-0.06
Suberik asit	C8H14O4	M-H	173.0819	13.00	0.10
Süksinik asit	C4H6O4	M-H	117.0195	15.73	0.96
Süksinik semialdehit	C4H6O3	M-H	101.0245	16.19	1.22
Taurin	C2H7NO3S	M+H	126.0220	13.53	0.56
trans-3-İndolakrilik asit	C11H9NO2	M+H	188.0707	10.08	0.77
trans-Akonitik asit	C6H6O6	M-H	173.0092	17.98	0.09
Tris(2-bütoksietil) fosfat	C18H39O7P	M+H	399.2509	1.96	0.71
Ürik asit	C5H4N4O3	M+H	169.0358	13.30	0.23
Üridin	C9H12N2O6	M-H	243.0622	7.65	0.04
Urokanik asit	C6H6N2O2	M+H	139.0504	11.84	1.00
Ksantin	C5H4N4O2	M-H	151.0262	10.38	0.34
α -Metilhistamin	C6H11N3	M+H	126.1026	10.87	-0.21
β -Murikolik asit	C24H40O5	M-H	407.2804	5.84	0.35

Çizelge 2.5 (devam): UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.

Yalnızca mzCloud ile tanımlanan metabolitler	Formül	Eklenti	m/z	TS (dk)	Kütle hatası (ppm)
(S)-(+)-2-Amino-1-propanol	C3H9NO	M+H	76.0757	8.11	-0.10
1-Aminosikloheksankarboksilik asit	C7H13NO2	M+H	144.1021	8.09	0.99
1-Metil-3,6-(1H,2H)-piridazindion	C5H6N2O2	M-H	125.0357	4.69	0.60
1-Metilnikotinamid	C7H8N2O	M+H	137.0711	11.13	1.13
4-İndolkarbaldehit	C9H7NO	M-H	144.0456	2.63	0.52
4-metil-5-okso-2-pentil-2,5-dihidrofuran-3-karboksilik asit	C11H16O4	M+H	213.1123	5.99	0.58
4-Fenolsülfonik asit	C6H6O4S	M-H	172.9914	3.86	0.08
5-(3-sikloheksilprop-1-inil)nikotinik asit	C15H17NO2	M-H	242.1188	4.58	0.50
Asetohidroksamik asit	C2H5NO2	M+H	76.0393	13.95	0.06
Akrilik asit	C3H4O2	M-H	71.0139	12.62	-0.01
Kaprolaktam	C6H11NO	M+H	114.0913	5.75	-0.23
Siklopentilasetik asit	C7H12O2	M-H	127.0766	5.70	0.90
D-(+)-Ksiloz	C5H10O5	M-H	149.0456	8.89	0.14
Dekanoik asit	C10H20O2	M-H	171.1392	2.46	0.64
Dimetil fosfat	C2H7O4P	M+H	127.0155	2.21	0.49
DL-Alanin	C3H7NO2	M-H	88.0405	12.67	1.35
DL-Dipalmitoilfosfatidilkolin	C40H80NO8P	M+H	734.5697	2.16	0.39
İmidazollaktik asit	C6H8N2O3	M+H	157.0609	11.95	1.08
İzobutirik asit	C4H8O2	M-H	87.0453	5.73	1.08
Laktamid	C3H7NO2	M+H	90.0549	12.90	-0.10
L-Askorbik asit 2-sülfat	C6H8O9S	M-H	254.9817	16.64	0.36
Laurik asit	C12H24O2	M-H	199.1705	2.31	0.53
Metilimidazolasetik asit	C6H8N2O2	M+H	141.0660	9.70	0.81
Miristik asit	C14H28O2	M-H	227.2018	2.23	0.64
Nonanoik asit	C9H18O2	M-H	157.1234	2.58	0.29
NP-001596	C16H30O4	M-H	285.2072	5.15	0.25
NP-022068	C8H12O5	M-H	187.0612	7.79	0.25
Oleik asit	C18H34O2	M-H	281.2486	2.09	0.11
Palmitoleik asit	C16H30O2	M-H	253.2174	2.16	0.36
Palmitoil sfingomiyelin	C39H79N2O6P	M+H	703.5752	2.38	0.44
Pirüvik asit	C3H4O3	M-H	87.0089	7.94	1.07
Tetradekandiyoyik asit	C14H26O4	M-H	257.1760	5.94	0.55
Trietanolamin	C6H15NO3	M+H	150.1126	5.80	1.01
Trimetil fosfat	C3H9O4P	M+H	141.0313	2.34	1.13
Üre	CH4N2O	M+H	61.0398	7.64	2.67

Çizelge 2.6 (devam): UHPLC-Orbitrap ile elde edilen spektral verinin, mzCloud ve MoNA kütle spektral kütüphaneleri kullanılarak tanımlanan metabolitlerin listesi.

Yalnızca MoNA ile tanımlanan metabolitler	Formül	Eklenti	m/z	TS (dk)	Kütle hatası (ppm)
1,6-Anhidro-β-D-glikoz	C6H10O5	M-H	161.0456	12.63	0.43
2-Hidroksioktanoik asit	C8H16O3	M-H	159.1027	5.05	0.39
3-Hidroksiizobütirik asit	C4H8O3	M-H	103.0402	9.66	1.41
Allantoin	C4H6N4O3	M-H	157.0367	11.38	0.20
Alfa-N-Asetil-glutamin	C7H12N2O4	M+H	189.0872	11.46	0.83
Deoksisitidin	C9H13N3O4	M+H	228.0980	8.37	0.47
Deoksiüridin	C9H12N2O5	M-H	227.0675	5.81	0.47
Dietiloksalpropiyonat	C9H14O5	M+H	203.0915	7.97	0.78
Glukozamin	C6H13NO5	M-H	178.0722	8.80	0.39
Lizopc(0:0/18:0)	C26H54NO7P	M+H	524.3715	4.23	0.73
Malonik asit	C3H4O4	M-H	103.0038	15.94	1.21
N6,N6-dimetillizin	C8H18N2O2	M+H	175.1443	15.30	1.11
N-Asetilglisin	C4H7NO3	M-H	116.0354	10.88	0.77
N-Asetil-serin	C5H9NO4	M-H	146.0460	11.59	0.67
N-Metillizin	C7H16N2O2	M+H	161.1286	17.23	0.95
Pantothenat	C9H17NO5	M+H	220.1181	8.68	0.61
p-Krezol glukuronid	C13H16O7	M-H	283.0824	8.29	0.07
p-Krezol sülfat	C7H8O4S	M-H	187.0071	3.05	0.19
Piperidin	C5H11N	M+H	86.0964	9.43	-0.28
Sarkosin	C3H7NO2	M+H	90.0550	13.49	-0.10
sn-Glisero-3-fosfokolin	C8H20NO6P	M+H	258.1103	12.59	0.67
Trimetilamin N-oksit (TMAO)	C3H9NO	M+H	76.0757	8.11	-0.10
Tridekandiyolik asit	C13H24O4	M-H	243.1601	7.31	-0.26

*TS= Tutunma süresi

2.5 Doğrusal Karma Etkili Modelleme İle Veri Analizi

Biyolojik örneklerden elde edilen metabolit profilleri, teknik faktörler ve bireylere özgü biyolojik farklılıklar olmak üzere iki temel kaynaklı varyasyondan etkilenmektedir. Teknik kaynaklı sinyal kontaminasyonunun başlıca nedenleri arasında operatör hataları, parti etkileri (batch effect), kütle spektrometresi (MS) cihaz duyarlılığındaki dalgalanmalar sayılabilir. Bu sorunların giderilmesine yönelik medyan normalizasyonu gibi çeşitli yöntemler önerilmiş olup istatistiksel analizler öncesinde metabolit bolluklarına uygulanan bu stratejiler, metabolomik veri kalitesini önemli ölçüde artırmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik kaynaklı varyasyon veri analizinde ciddi bir zorluk olmayı sürdürmekte ve fenotipik tespiti yanıltıcı biçimde etkileyebilmektedir.

Doğrusal karma etkili modeller (LMM), bireysel ölçümlerdeki istenmeyen varyasyon kaynaklarını açıkça modelleyerek çok değişkenli veri analizinde güçlü bir yaklaşım sunmaktadır. Bu modelde her parametre ya sabit bir etkiyi ya da rastgele bir etkiyi temsil eder. Sabit etkiler, belirli bir deneysel faktörün tüm popülasyon genelindeki ortalama etkisini yansıtırken; rastgele etkiler, popülasyondan rastgele örneklenen bireylerle ilişkili gözlemlenemeyen varyasyonu ifade etmektedir. Her iki etki türünü birlikte modelleyebilmesi, LMM'yi karmaşık biyolojik veri yapılarında sistematik hataların kontrolü için özellikle uygun kılmaktadır (Wanichthanarak ve ark., 2019).

Bu çalışmada, Compound Discoverer (CD) yazılımından elde edilen ham sinyal yoğunluğu verileri MetaboAnalyst 6.0 platformunda doğrusal karma etkili model (LMM) ile işlenmiştir. LMM, parti etkisini kovaryant olarak modele dahil ederek her bir diyet grubunda kontrol diyetine kıyasla metabolit düzeyindeki değişimlerin belirlenmesini sağlamıştır. Ön işlem adımında verilere önce log dönüşümü, ardından oto-ölçeklendirme (auto-scaling; her değişkenin kendi standart sapmasına bölünmesi) uygulanmış; istatistiksel değerlendirme ise ANOVA çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalardan kaynaklanan tip I hata riskini azaltmak amacıyla ham p-değerleri, yanlış keşif oranı (FDR) düzeltilmesiyle yeniden hesaplanmıştır.

Yalnızca diyetle bağlı değişimleri izole edebilmek amacıyla diğer faktörlerin etkisi LMM aracılığıyla kontrol altına alınmış ve her bir diyet grubunun kontrol grubuna göre metabolit düzeyindeki farklılıkları incelenmiştir. Bu analizden elde edilen sonuçlar, deneysel gruplar arasındaki örüntülerin görsel olarak değerlendirilebilmesi için öncelikle ısı haritası (heatmap) ile sunulmuştur. Zamana bağlı metabolit değişimlerini incelemek amacıyla keman grafikleri (violin plot) kullanılmış; bu grafik türü hem dağılım yapısını hem de zamansal eğilimleri aynı anda görselleştirme imkânı sunmaktadır. Metabolitler arasındaki doğrusal ilişkilerin belirlenmesi için Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır. Diyet ve zaman faktörleri arasındaki olası etkileşimlerin araştırılması amacıyla ise MetaboAnalyst 6.0 üzerinde iki yönlü ANOVA (two-way ANOVA) analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca belirtmek gerekir ki MetaboAnalyst 6.0'da uygulanan LMM tabanlı modelleme ve normalizasyon işlemleri, R programlama ortamında limma paketi aracılığıyla bağımsız biçimde yeniden üretilebilir niteliktedir.

3. SONUÇ VE ÖNERİLER

3.1 Hedefsiz Metabolomiks

Hedefsiz metabolomiks analiz sonucu keşfedilen metabolitlerin ve bunların göreceli konsantrasyonlarının deney grupları arasındaki değişimlerini görsel olarak keşfetmek amacıyla öncelikle ısı haritaları oluşturuldu (Çizelge 3.1). Isı haritasında metabolitler, en fazla değişim gösterenden en az değişim gösterene doğru sıralandığında, diyetler arasındaki en belirgin değişiklik laurik asit seviyelerinde gözlemlenmiştir ($p=1.50E-36$). Laurik asit seviyesinin özellikle hindistancevizi yağı diyetinde diğer gruplara kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Benzer şekilde, hindistancevizi yağına özgü diğer yağ asitleri olan miristik asit ve dekanolik asit (kaprik asit) de bu diyetle artış göstermiştir. Literatüre göre, hindistancevizi yağının yağ asidi içeriği şu şekildedir: laurik asit C12:0 (%49), miristik asit C14:0 (%8), palmitik asit C16:0 (%8), kaprilik asit C8:0 (%8), kaprik asit C10:0 (%7), oleik asit C18:1 (%6), stearik asit C18:0 (%2) ve linoleik asit C18:2 (%2) (Boateng ve diğ, 2016). Bu nedenle, hindistancevizi yağı diyetinde bu yağ asitlerinin artışının, diyetin içeriğiyle tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.1 : MetaboAnalyst 6.0’da doğrusal karma modeller (cinsiyet ve parti kontrolü), diyet–kontrol karşılaştırmalarında anlamlı metabolitlerin log2 kat değişimleri (kırmızı: azalma, mavi: artış; $p < 0.05$, FDR düzeltilmiş, tek yönlü ANOVA).

Metabolit	H.cevizi	Balık	Keto	Domuz	Süt	Zeytin	Palm	P-değerleri
Laurik asit								1.50E-36
Miristik asit								1.60E-26
1,5-Anhidro-D-glukitol								5.72E-22
Asetil-L-karnitin								1.33E-21
Oleik asit								3.27E-21
L(-)-Karnitin								2.95E-18
Palmitoleik asit								2.81E-14
Propionilkarnitin								7.05E-14
2-(asetilamino)-3-(1H-indol-3-il)propanoik asit								7.05E-14
Araşidonik asit								2.97E-12
3-Hidroksibutirik asit								5.17E-11
3-Hidroksiizobütirik asit								3.17E-10
Dokosaheksaenoik Asit								4.16E-10
NP-001596								4.86E-10
N-Asetilglisin								1.03E-09
DL-Dipalmitoilfosfatidilkolin								3.50E-09
trans-3-İndolakrilik asit								1.31E-08
Dekanoik asit								2.93E-08
NP-008309								1.98E-07
Urokanik asit								2.41E-07
D-(+)-Tryptofan								3.04E-07
Linoleik asit								3.39E-07
D-(+)-Ksiloz								3.25E-06
DL-Arjinin								2.15E-05
Betain								2.37E-05
2-Hidroksivalidik asit								3.53E-05
İndol-3-laktik asit								7.29E-05
β-Murikolik asit								8.27E-05
TMAO								1.60E-04
4-İndolkarbaldehit								1.74E-04
Piperidin								2.28E-04
Fenilpirüvik asit								2.28E-04
Asetohidroksamik asit								3.52E-04
N1-[4-hidroksi-6-(metoksimetil)pirimidin-2-il]asetamid								3.52E-04
Ürik asit								5.19E-04
Üre								5.39E-04
L-(+)-Laktik asit								7.78E-04
Alfa-N-Asetil-glutamin								7.97E-04
Glukozamin								1.13E-03
Guanidinoasetik asit								1.13E-03
L-Valin								1.61E-03
Pipekolik asit								1.98E-03
Kolin								2.13E-03
Ornitin								3.86E-03
Monometil ftalat								3.93E-03
DL-Lizin								4.18E-03
3-Metilhistidin								4.35E-03
sn-Glisero-3-fosfokolin								5.35E-03
L-İzolösin								5.35E-03
Laktamid								5.46E-03
Orotik asit								8.64E-03

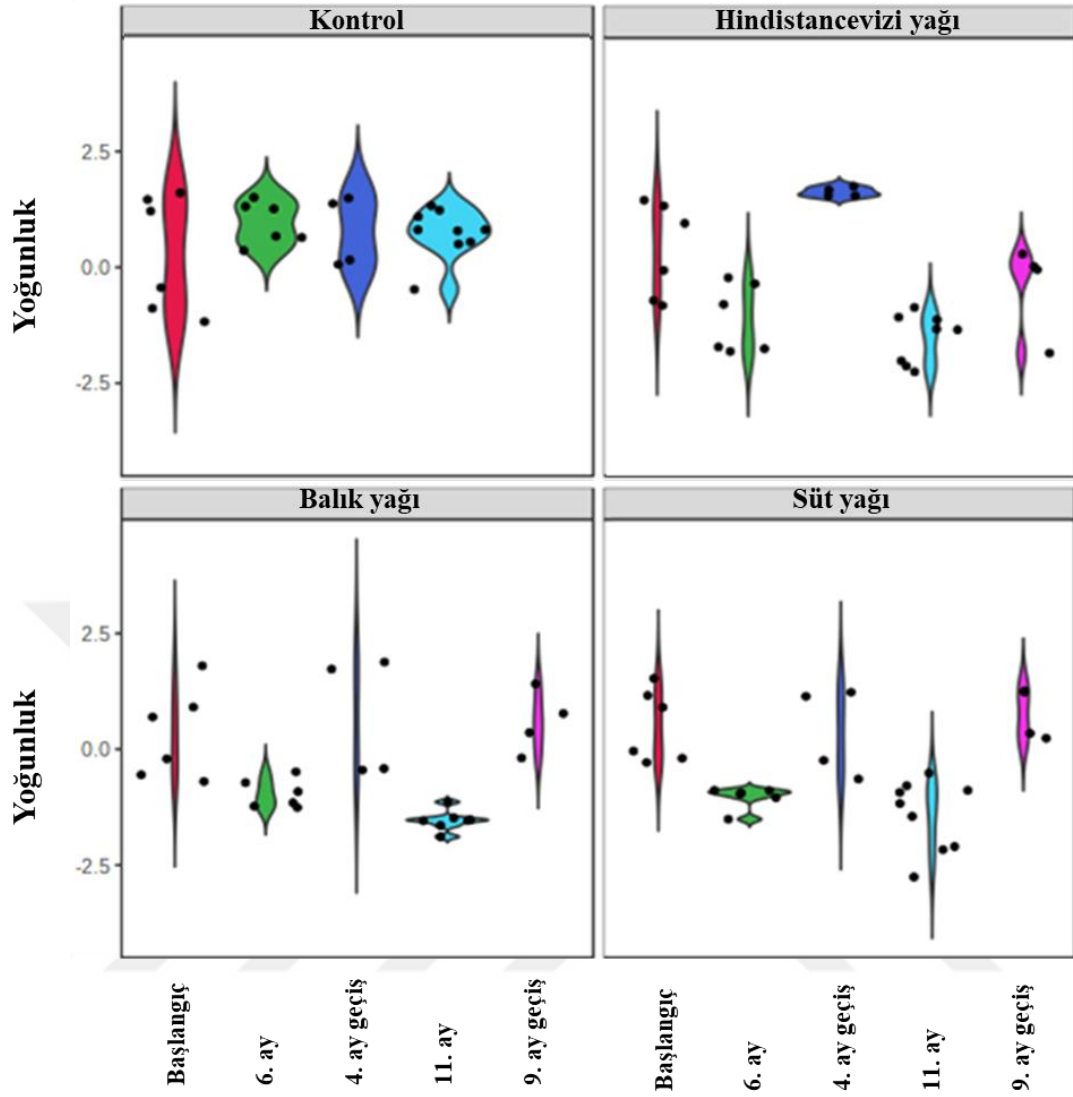
Çizelge 3.2 (devam): MetaboAnalyst 6.0’da doğrusal karma modelle (cinsiyet ve parti kontrolü), diyet–kontrol karşılaştırmalarında anlamlı metabolitlerin log2 kat değişimleri (kırmızı: azalma, mavi: artış; $p < 0.05$, FDR düzeltilmiş, tek yönlü ANOVA).

Metabolit	H.cevizi	Balık	Keto	Domuz	Süt	Zeytin	Palm	P-değerleri
Malonik asit								9.60E-03
LizoPC(0:0/18:0)								1.00E-02
D-(-)-Früktöz								1.00E-02
Nikotinamid 1-oksit								1.22E-02
1-Metilnikotinamid								1.22E-02
6-Hidroksikaproik asit								1.25E-02
L-Fenilalanin								1.25E-02
N-Asetil-D-alloizolösin								1.38E-02
Asetilkolin								1.44E-02
Sarkosin								1.47E-02
L-Tirozin								1.47E-02
4-Piridoksik asit								1.77E-02
3-Hidroksifenilasetik asit								2.20E-02
p-Krezol glukuronid								2.21E-02
4-Fenolsülfonik asit								2.24E-02
D-(+)-Prolin								2.69E-02
Sitrik asit								3.00E-02
Palmitoil sfingomiyelin								3.00E-02
N-Asetil-serin								3.05E-02
3-İndoksil sülfat								3.10E-02
Kolik asit								3.10E-02
Nikotinamid								3.33E-02
α -Metilhistamin								4.37E-02
5-Hidroksiindol								4.85E-02
2-Aminoadipik asit								4.95E-02
D-(+)-Mannoz								4.95E-02

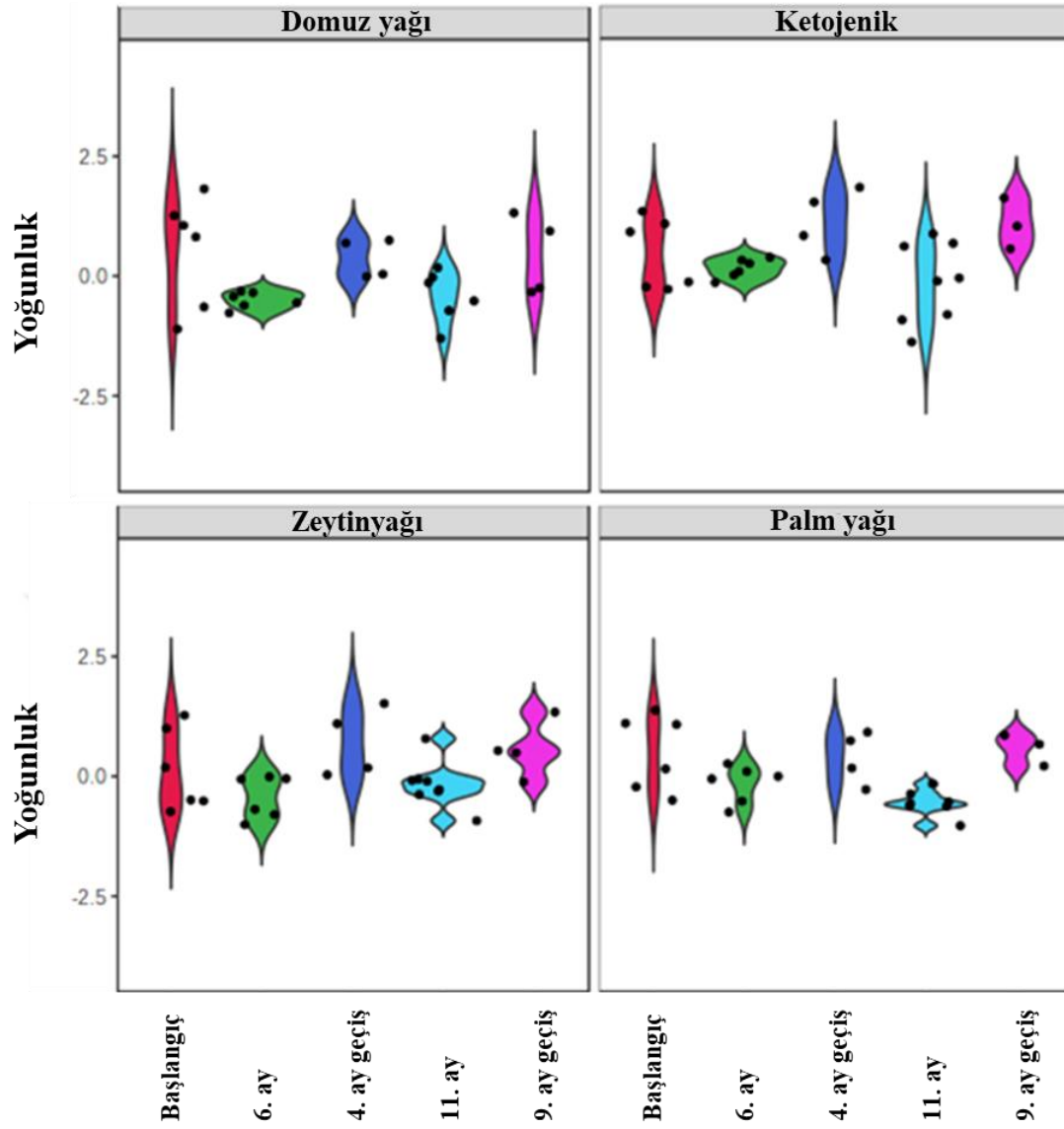
Elde edilen veride dikkat çeken en güçlü değişimlerden biri L-karnitin seviyelerinde gözlemlenmiştir ($p = 2.95E-18$). L-Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınarak β -oksidasyonun gerçekleşmesini sağlayan ve hücrel enerji metabolizmasında önemli rol oynayan bir moleküldür. L-Karnitin hem diyetten elde edilebilir hem de karaciğer ve böbreklerde sentezlenebilir (Choi ve diğ., 2018). L-Karnitin seviyelerinin her bir diyet grubundaki kontrol grubuna kıyasla değişimlerine bakıldığında, en belirgin azalma balık yağı diyetinde tespit edilmiştir. Ayrıca, asetil-karnitin ve propionil-karnitin gibi asil-karnitinlerin de balık yağı diyetinde, L-karnitin ile benzer bir düşüş eğilimi gösterdiği görülmektedir (Çizelge 3.1). Literatürde, L-karnitin kalp sağlığıyla ilişkilendirilmiş ve L-karnitin takviyesinin aterosklerozun hızlanmış ilerlemesiyle bağlantılı olabileceği tespit edilmiştir (Vilskersts ve diğ., 2015). Ateroskleroz fare modeli üzerinde yapılan bir çalışmada (apoE/LDLR $-/-$), L-karnitin biyosentezi ve emilimini inhibe eden ilacın (mildronate) uygulanması, vasküler dokulardaki L-karnitin seviyelerini azaltmış ve aterosklerozun ilerlemesini yavaşlatmıştır. Ayrıca,

ateroskleroz geliştiren deney hayvanlarında plazmadaki L-karnitin artışı, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi diğerk metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Vilskersts ve diğ., 2015). Bu sonuçları destekleyen bir diğerk araştırma ise, diyetle alınan L-karnitin takviyesinin apolipoprotein E eksikliği olan (apoE^{-/-}) farelerde ateroskleroz gelişimini hızlandırdığını ve bu pro-aterojenik etkinin, trimetilamin N-oksit (TMAO) üretimindeki artışla ilişkili olduğunu göstermiştir (Koeth ve diğ., 2013).

Benzer şekilde, bu çalışmada da TMAO seviyelerindeki değışime baktığımızda, L-karnitinle uyumlu olarak balık yağı grubunda azalma gösterdiği gözlemlenmiştir. Mikrobiyom kaynaklı bir metabolit olan TMAO'nun seviyesi, yalnızca balık yağı grubunda değil, aynı zamanda hindistancevizi yağı ve süt yağı diyetini takip eden gruplarda da kontrole kıyasla azalma göstermiştir (Çizelge 3.1, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Bu metabolitin bazı diyetlerde ortak bir eğilim gösterdiğinden daha yakından incelemek amacıyla post-hoc analizi sonuçlarına baktığımızda, balık yağı, hindistancevizi yağı ve süt yağı diyetlerinin, 6 ve 11 aylık takip süreçlerinde, kontrol grubuna kıyasla TMAO seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Çizelge 3.2). Diyetler kontrol diyetine geri döndüğünde, bu azalma tersine dönmüş ve bu da TMAO seviyelerindeki değışikliklerin diyetle geri döndürülebilir olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Yüksek yağlı diyet müdahalesi sonrası LC-MS analiziyle plazma örneklerinde gözlemlenen, diyet gruplarındaki TMAO seviyelerindeki anlamlı değişiklikler (cinsiyet ve parti etkisi kontrol edildi).

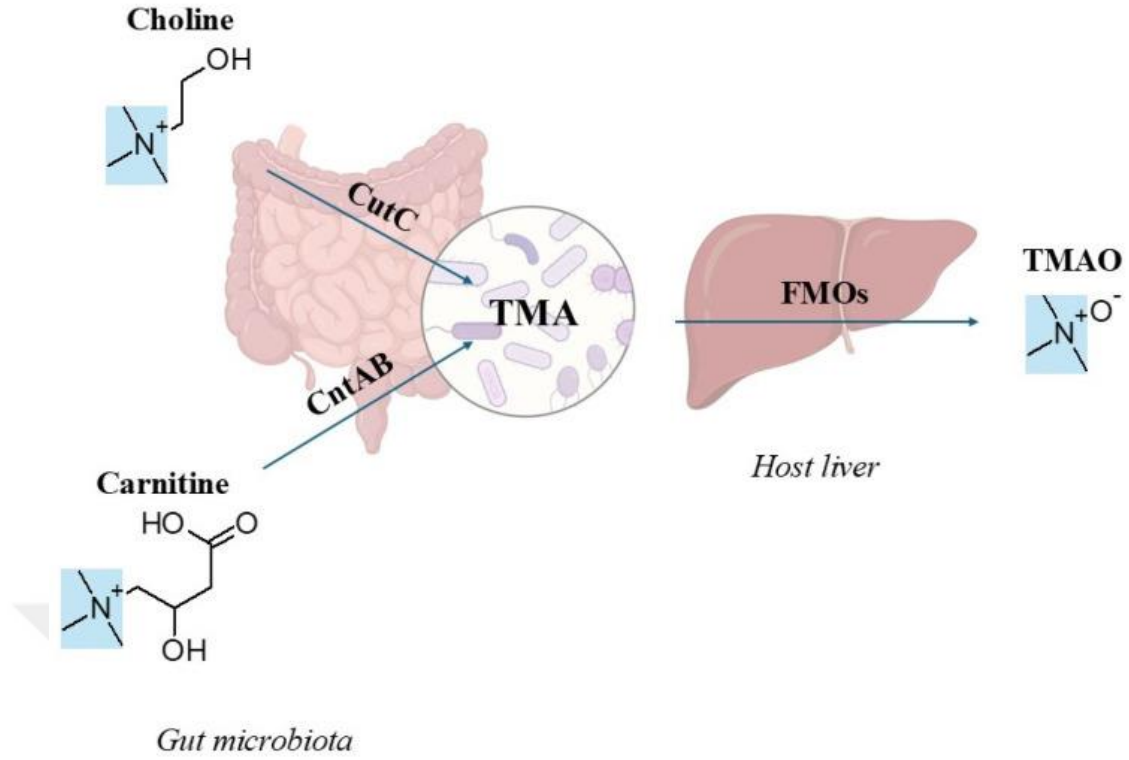


Şekil 3.2 : Yüksek yağlı diyet müdahalesi sonrası LC-MS analiziyle plazma örneklerinde gözlemlenen, diyet gruplarındaki TMAO seviyelerinde göreceli daha az değişim olan ya da olmayan gruplar (cinsiyet ve parti etkisi kontrol edildi).

Çizelge 3.3 : Her bir diyet için, kontrol diyetine kıyasla zamanla TMAO seviyelerinde gözlenen değişimi yansıtan p-değerleri (İstatistiksel analiz ANOVA modeli ile yapıldı, Tukey post-hoc testi uygulandı ve p-değerleri Benjamini-Hochberg ile düzeltildi).

Diyet	Dişi					Erkek				
	Başlangıç	6. ay	4.ay geçiş	11. ay	9. ay geçiş	Başlangıç	6. ay	4.ay geçiş	11. ay	9. ay geçiş
H. cevizi	NS	0.02	NS	4.95E-05	NS	NS	1.89E-05	NS	1.80E-10	NS
Balık	NS	6.31E-07	NS	8.71E-10	NS	NS	NS	NS	5.74E-06	NS
Keto	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.01	-
Süt	NS	3.45E-06	NS	2.77E-06	NS	NS	NS	NS	6.59E-08	NS
Zeytin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Domuz	NS	0.03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Palm	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS

TMAO, kimyasal formülü $(CH_3)_3NO$ olan küçük bir organik bileşiktir ve amin oksit olarak sınıflandırılır. Son zamanlarda, kardiyovasküler hastalık, obezite, kolorektal kanser, diyabet ve böbrek hastalığı gibi çeşitli kronik hastalıklarda bir biyobelirteç olarak dikkat çekmiştir (Costabile ve diğ, 2021). TMAO'nun biyosentezi, Şekil 3.3'de özetlendiği gibi, üç farklı şekilde etkilenebilir: gıda öncülleri, bağırsak mikrobiyal aktivitesi ve FMO3 ifadesi. TMAO'nun öncüsü olan L-karnitin ve kolin hem diyetten alınabilir hem de endojen olarak sentezlenebilir. Kolin ve karnitin, bağırsak mikrobiyotasına bağımlı TMAO sentezinin başlıca diyet öncülleri. Kolinin birincil diyet kaynağı olan fosfatidilkolin, hem bitkisel hem de hayvansal kökenli besinlerde bol miktarda bulunurken karnitin ağırlıklı olarak kırmızı ette yer almaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının bu metabolitleri TMA'ya dönüştürmedeki kritik rolü iyi bilinmektedir; nitekim mikrobiyotadan yoksun gnotobiyotik fareler TMA üretememektedir. Buna ek olarak, konvansiyonel farelere antibiyotik uygulanması TMA oluşumunu belirgin biçimde azaltmaktadır. Gnotobiyotik fareler kolin metabolize eden bakterilerle kolonize edildiğinde ise çekum kaynaklı TMA üretiminin arttığı gözlemlenmektedir. TMA üreten bu bakteriler, kolin-TMA liyaz (CutC), karnitin monooksijenaz (CntAB), glisin betain redüktaz (GrdH) ve TMAO redüktazlar (genel adıyla TorA) dahil olmak üzere TMA sentezi için gerekli enzimleri kodlayan genleri barındırmaktadır (Kilic ve Basaran, 2025; van der Laan ve diğ, 2019).



Şekil 3.3 : TMAO biyosentezi (Kilic ve Basaran, 2025).

Dolaşımdaki TMAO seviyelerini etkileyen gıda kaynakları, TMAO'nun ya doğrudan formunu ya da öncüllerini içerebilir. TMAO'nun doğrudan formunu içeren en önemli besin kaynağı deniz ürünleridir. L-karnitin, kolin ve diğer kolin içeren diyet öncülleri ise yumurta, kırmızı et, kümes hayvanları ve bazı süt ürünlerinde bol miktarda bulunur. Ayrıca, daha küçük miktarlarda buğday kepeği, buğday tohumu ve ıspanakta bulunan betainden de TMAO üretiminde rol oynayabilir (Costabile ve diğ, 2021).

Bu çalışmada elde edilen verilere göre, Çizelge 3.3'te görüldüğü gibi, TMAO yalnızca L-karnitin ile pozitif korelasyon göstermektedir (FDR düzeltilmiş $p=2.20E-08$). L-karnitin seviyelerinin istatistiksel olarak yalnızca balık yağı diyetinde kontrol grubuna göre azalma gösterdiği (Çizelge 3.4) göz önüne alındığında, TMAO'daki azalmanın yalnızca balık yağı diyetinde öncülü ile ilişkili olduğu; hindistancevizi yağı ve süt yağı diyetlerindeki azalmada ise farklı faktörlerin etkili olabileceği söylenebilir.

Çizelge 3.4 : TMAO ve öncülleri arasındaki korelasyon için Pearson korelasyon katsayıları (r) ve ilgili FDR ile düzeltilmiş p-değerleri.

Metabolit	r	p-değerleri
L-karnitin	0.39	2.20E-08
Kolin	0.06	0.55

Çizelge 3.5 : Her bir diyet için, kontrol diyetine kıyasla zamanla L-karnitin seviyelerinde gözlenen değişimi yansıtan p-değerleri (İstatistiksel analiz ANOVA modeli ile yapıldı, Tukey post-hoc testi uygulandı ve p-değerleri Benjamini-Hochberg ile düzeltildi).

Diyet	Dişi					Erkek				
	Başlangıç	6. ay	4.ay geçiş	11. ay	9. ay geçiş	Başlangıç	6. ay	4.ay geçiş	11. ay	9. ay geçiş
H. cevizi	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Balık	NS	3.09E-11	NS	6.46E-12	NS	NS	2.25E-11	NS	1.46E-11	NS
Keto	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-
Süt	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Zeytin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Domuz	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Palm	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

TMAO'nun biyosentezini etkileyen bir diğer önemli faktör bağırsak mikrobiyal aktivitesidir. Araştırmalar, steril farelerin TMA üretmediğini ve antibiyotik tedavisi görmüş farelerde de TMA üretiminin azaldığını göstermektedir. Ayrıca, kolin dönüştüren bakterilerin gnotobiotik farelere nakledilmesi, TMA üretimini artırarak serum kolin seviyelerini düşürmekte ve bu da bağırsak mikrobiyomunun TMAO biyosentezindeki kritik rolünü vurgulamaktadır (Schugar ve diğ, 2017). TMA üretiminden sorumlu gen kümeleri, genellikle zorunlu anaerob Clostridia (phylum Firmicutes) ve fakültatif anaerob Enterobacteriaceae (phylum Proteobacteria) içerisinde bulunur, ancak sadece ikinci takson, yüksek yağlı diyet uygulayan bireylerin dışkısında belirgin bir artış gösterir (Yoo ve diğ, 2021). Dolayısıyla, bu çalışmada bazı yüksek yağlı diyetlerde gözlenen TMAO değerlerindeki düşüş, bu bakteri türlerinin popülasyonundaki azalmanın bir sonucu olabilir.

Son olarak, TMAO oluşumu flavin içeren monooksijenazlar (FMO'lar) tarafından da düzenlenir. Bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen TMA, karaciğere taşınarak flavin içeren monooksijenazlar (FMO'lar) aracılığıyla TMAO'ya okside edilir. TMA'yı okside edebilen üç FMO ailesi üyesi arasında en yüksek aktiviteye sahip olan FMO3'tür. Karaciğer FMO3'ü baskılanan farelerde, dolaşımda daha düşük TMAO seviyeleri gözlemlenmiş olup, bu durum FMO3'ün TMAO oluşumundaki kritik rolünü ortaya koymaktadır. Ayrıca, FMO3'ün genetik olarak silinmesi (knockout) veya baskılanması (knockdown), beyaz yağ dokusunun bejleşmesini teşvik ederek yüksek yağlı diyetle tetiklenen obeziteden fareleri koruduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, TMAO metabolik yolunun obezite ve obezite kaynaklı diğer metabolik hastalıklar üzerindeki potansiyel etkilerine dikkat çekmektedir (Schugar ve diğ, 2017).

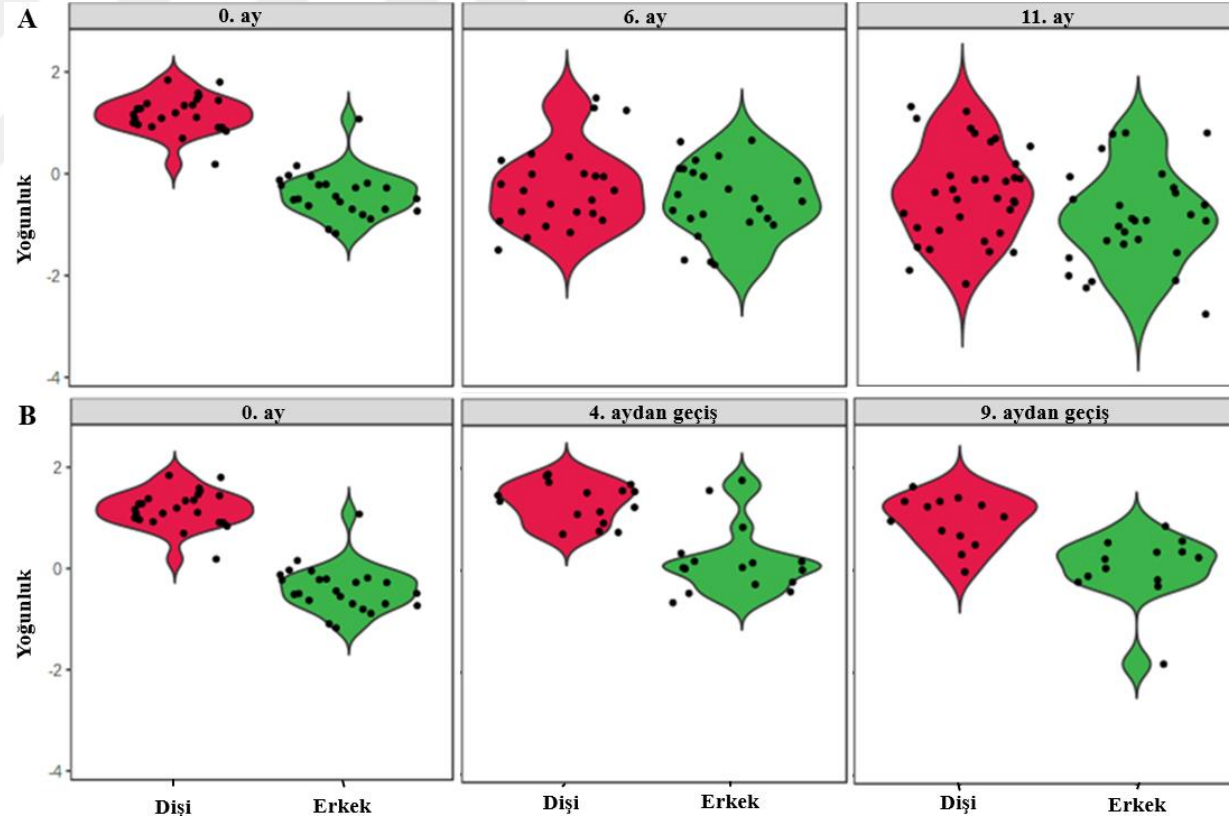
FMO3 ekspresyonunun cinsiyete bağlı farklılıklar gösterdiği daha önce tespit edilmiştir (Liu ve Dai, 2020). Bu farklılıkları daha ayrıntılı incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada (Bennett ve diğ, 2013), kolin açısından zengin bir diyetin erkek ve dişi farelerde karaciğer FMO3 gen ekspresyonu, enzimatik aktivitesi ve plazma TMA ile TMAO seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bağırsak florası tarafından TMA üretimini önemli ölçüde artıran %1 oranındaki kolin ilavesinin, hem dişi hem de erkek farelerde karaciğer FMO3 ekspresyonunu etkilemediği, ancak standart diyetle kıyasla kolin takviyesinin her iki cinsiyette de plazma TMAO seviyelerinde önemli bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Bu artışın dişi farelerde daha belirgin olduğu ve bunun, dişilerde erkeklere kıyasla daha yüksek karaciğer FMO3 ekspresyonu ile ilişkili

olduğu saptanmıştır. Farelerde gözlenen bu cinsiyet farkının nedenini araştırmak için, çalışmada daha sonra cinsiyet hormonlarının karaciğer FMO3 ekspresyonu üzerindeki etkisine bakılmıştır. Testis ve over hormonlarının FMO3 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, testosteronun erkeklerde gözlemlenen düşük FMO3 ekspresyonundan büyük ölçüde sorumlu olduğu ve östrojen bağımlı FMO3 indüksiyonunun cinsiyet farklarını daha da artırabileceği ortaya konmuştur. İnsanlar üzerinde yapılan deneylerde de erkeklerin FMO3 ekspresyon seviyelerinin dişilere kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiş, ancak bu farkın farelere göre çok daha mütevazı olduğu gözlemlenmiştir. Farelerin aksine, insan popülasyonunda cinsiyetler arasında dolaşımdaki TMAO seviyelerinde belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Bu farklılığın, insanların tükettiği diyetin çeşitliliğine bağlı olduğu düşünülmektedir (Bennett ve diğ., 2013).

Sonuç olarak, hem insanlarda hem de farelerde FMO3'ün, TMA'dan TMAO sentezinde en aktif FMO ailesi üyesi olduğu, karaciğerde yüksek düzeyde ifade edildiği ve cinsiyete bağlı farklılıklar gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu tez çalışmasında, TMAO seviyelerinde cinsiyetler arasındaki farklılıklara bakıldığında, cinsiyete bağlı belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir ($p=3.28E-09$, Çizelge 3.5 ve Şekil 3.4). Her bir zaman noktasında cinsiyetin TMAO üzerindeki etkisi incelendiğinde, Şekil 3.4'de gösterildiği gibi, dişilerde başlangıçta ve kontrol diyetle geçiş yapan gruplarda TMAO seviyelerinin erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yüksek yağlı diyeti takip eden dönemlerde (6. ve 11. ay) ise dişilerde TMAO seviyelerinin azaldığı, erkeklerde ise değişmediği gözlemlenmiş ve cinsiyetler arasındaki farkın azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak, yüksek yağlı diyetin, kadın ve erkeklerde görülen kalp hastalıkları biyobelirteci olarak kabul edilen TMAO'nun plazma seviyelerindeki farkı azalttığı görülmüştür. Post-hoc analiz, balık yağı ve süt yağı gruplarında değişimlerin kadınlarda erkeklere göre daha belirgin olduğunu, hindistancevizi grubunda ise TMAO seviyelerindeki azalmanın erkeklerde kadınlara göre daha belirgin olduğunu gösterdi.

Çizelge 3.6 : TMAO, L-karnitin ve kolin için diyet, cinsiyet ve etkileşim etkilerine ait iki yönlü ANOVA (FDR-düzeltilmiş p-değerleri).

Metabolit	Diyet	Cinsiyet	Diyet x Cinsiyet
TMAO	1.51E-04	3.28E-09	1.00
L-karnitin	8.37E-18	0.97	1.00
Kolin	7.64E-04	0.09	1.00



Şekil 3.4 : Her bir zaman noktasında cinsiyetin TMAO düzeyleri üzerindeki etkisi. A: Yüksek yağlı diyet uygulanan dönemler (6. ve 11. ay). B: Başlangıç dönemi ve kontrol diyetle geçiş yapılan zaman noktaları (4. ve 9. ay).

Enerji metabolizmasındaki cinsiyet farklılıkları, üreme döneminin başlangıcından itibaren kendini gösterir ve evrimsel süreç bu farklılıkları daha belirgin hale getirmiştir (Mauvais-Jarvis, 2015; Link ve Reue, 2017). Üreme açısından bakıldığında, erkekler küçük, fazla sayıda ve tek kullanımlık spermler üretirken, dişiler az sayıda, büyük ve hareketsiz yumurtalar üretir. Erkekler yalnızca gen aktarırken, dişiler döllenmiş yumurtaya genlerin yanı sıra embriyonun gelişimi için gerekli enerji ve besin kaynaklarını sağlar. Ayrıca, mitokondrilerin yalnızca dişi tarafından aktarılması, cinsiyetler arasındaki biyolojik farkları derinleştirir. Gametlerdeki bu farklılıkların yanı sıra, evrimsel süreçler de enerji metabolizmasında belirleyici bir rol oynar. Dişi memeliler, gebelik ve laktasyonun yüksek enerji maliyetleri nedeniyle enerji depolarını koruma eğilimindeyken, erkekler avlanma ve korunma ihtiyaçlarına hızlı cevap verebilmek için daha az enerji depolama stratejisi geliştirir. Bu nedenle, metabolizmadaki cinsiyet farklılıklarını anlamak, tedavi ve teşhis yöntemlerini iyileştirmek açısından büyük öneme sahiptir. Ancak, birçok ön klinik araştırmacı dişi farelerin çalışmalara dahil edilmesinin getirdiği karmaşıklıkları göz önünde bulundurarak genellikle dişi farelerle çalışmaktan kaçınmaktadır. Oysa araştırmaların amacı sağlığı iyileştirmek olduğundan, tedavilerin kadınlar ve erkekler üzerindeki farklı etkilerini belirlemek kritik önem taşır (Link ve Reue, 2017). Bu çalışmada gözlemlenen cinsiyete bağlı TMAO farklılıkları, araştırmanın en çarpıcı bulgularından biri olarak öne çıkmakta ve yüksek yağlı diyetin kadınlarda erkeklere göre TMAO seviyelerini daha düşük seviyelere çektiği ortaya konmuştur.

Özetle, TMAO seviyeleri diyet, bağırsak mikrobiyotası ve FMO3 enzim aktivitesine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu çalışmada diyetteki kolin ve karnitin gibi öncül maddelerin içerikleri doğrudan farklılık göstermese de, TMAO'nun karnitin seviyeleriyle olan pozitif korelasyonu (Çizelge 3.4) nedeniyle, TMAO seviyelerindeki azalmanın endojen L-karnitin seviyesine bağlı olabileceği söylenebilir. Ancak, L-karnitin yalnızca balık yağı diyetinde azalma gösterdiğinden (Çizelge 3.3), TMAO üretiminde rol oynayan bakterilerin, hindistancevizi ve süt yağı gruplarında gözlemlenen TMAO seviyelerindeki azalmaya katkıda bulunan etken olduğu düşünülmektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının, diyetle alınan öncül maddelerden TMAO oluşumunda doğrudan bir bağlantı olduğuna dair ilk kanıt, 2011 yılında yayımlanan bir çalışma ile ortaya konulmuştur (Wang ve diğ., 2011). Çalışmada fareler, izotopik olarak

etiketlenmiş ağır fosfokolin (d9-PC) ile beslendiğinde, plazmada zamana bağlı olarak d9 izotopomerinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, bağırsak florasını baskılamak amacıyla farelere üç hafta boyunca geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi uygulandığında, oral d9-PC uygulamasının ardından plazmada d9-TMAO'nun ortaya çıkışı tamamen engellenmiştir. Benzer bir durum, farelere oral d9-kolin uygulandıktan sonra da gözlemlenmiş; antibiyotik tedavisi edilmemiş farelerde d9-TMAO üretimi gerçekleşirken, antibiyotik tedavisi sonrası veya mikroptan arındırılmış (sezaryenle steril doğmuş) farelerde bu üretim gözlemlenmemiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, bağırsak mikroflorası antibiyotiklerle baskılanmış fareler, mikroplarla yeniden kolonize olmalarına izin vermek için normal (mikroptan arındırılmamış) farelerle aynı kafese yerleştirilmiştir. Dört hafta sonra, 'konvansiyonelleşmiş' fareler tekrar oral d9-PC ile beslendiğinde, plazmada kolayca tespit edilebilen d9-TMAO seviyeleri gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar, mikroptan arındırılmış farelerin konvansiyonelleştirilmesi ve oral d9-kolin takviyesi sonrası da görülmüştür. Bu bulgular, diyetle alınan öncül maddelerin TMAO'ya dönüşmesinde bağırsak mikrobiyotasının zorunlu bir rol oynadığını açıkça göstermektedir (Wang ve diğ., 2011).

Bu çalışmada uygulanan diyetler arasında TMAO veya öncülleri bakımından doğrudan bir farklılık bulunmamaktadır. Ancak, diyet gruplarında yer alan yağ asidi çeşitlerinin dolaylı olarak TMAO seviyelerindeki düşüşe yol açabileceği gözlemlenmiştir. Çizelge 3.6'da diyetlerin yağ asidi doymunluk içerikleri yüzde olarak gösterilmektedir. Balık yağı, çoklu doymuş yağ asitleri bakımından zengin olurken, hindistancevizi yağı ve süt yağı ise doymuş yağ içeriği bakımından zengindir. Doymuş yağ asitleri, yalnızca zincir uzunluğu ile ayrılan, tek bağlarla bağlı karbon atomlarının basit doğrusal zincirleridir. Doymuş yağ asitleri, zincir uzunluğuna göre kısa zincirli (C2'den C4'e), orta zincirli (C6:0'dan C12:0'a) ve uzun zincirli (C14:0'dan C18:0'a) olarak üç gruba ayrılır (Dayrit, 2023). Hindistan cevizi yağı, orta zincirli yağ asitleri açısından zengin olup (Boateng ve diğ., 2016), süt yağı hem orta zincirli hem de kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) bakımından zengindir (Lindmark Månsson, 2008). Araştırmalar, KZYA'larının ve KZYA üreten bakterilerin bağırsak mikrobiyotasının dengesini koruyarak iltihabı ve ateroskleroz gelişme riskini düşürebileceğini göstermiştir (Cheng ve diğ., 2024; Marques ve diğ., 2017). Ayrıca, orta zincirli yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalık riskini ve oksidatif stresi azaltabileceği tespit

edilmiştir (Zhao ve diğ., 2023). Hem kısa zincirli yağ asitlerinin hem de orta zincirli yağ asitlerinin literatürde görülen bu kalp sağlığına olumlu etkilerinin mekanizmalarından biri, TMAO seviyelerini düşürmeleri olabilir.

Özetle, bu çalışma diyet ile bağırsak mikrobiyomu arasındaki ilişkiyi konak metabolizması üzerinden inceleyerek, diyet yağlarının bağırsak mikrobiyomu aracılığıyla konak metabolizmasına olan rolünü göstermiştir. Hedefsiz metabolomiks yaklaşımıyla, yüksek yağlı diyetlerin yağ asidi çeşitliliği farkının, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bir metabolit olan dolaşımdaki trimetilamin N-oksit (TMAO) seviyelerini farklı etkilediği keşfedilmiştir.

Yağ asidi doygunluk derecesi ve zincir uzunluğu, bağırsak mikrobiyotası üzerindeki modülatör etkilerin temel belirleyicileri olarak görünmektedir. Bu bağlamda verilerimiz, kısa ve orta zincirli yağ asitleri ile n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zengin süt yağı, hindistan cevizi yağı ve balık yağı gruplarında TMAO seviyelerinin belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuştur. Daha da önemlisi, kontrol diyetle geçişle bu azalmanın ortadan kalkması, söz konusu etkinin diyetle bağlı ve geri döndürülebilir olduğunu göstermiştir.

Genel olarak, yüksek yağlı diyetler bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu önemli ölçüde değiştirerek sıklıkla obezite, diyabet, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ve kardiyovasküler hastalık gibi metabolik bozukluklara yol açar. Bu nedenle, çeşitli metabolik bozuklukların patogeneğinde bağırsak mikrobiyotası ve metabolitlerinin düzensizliğinin rol oynaması nedeniyle, bağırsak mikrobiyotası ve mikrobiyal metabolitleri hedef almak, kalp hastalıkları dahil olmak üzere metabolik bozuklukları geciktirmek veya önlemek için değerli bir terapötik strateji olabilir.

Ancak bu sonuçlar, birkaç temel alana odaklanan gelecekteki çalışmaları gerektirmektedir. İlk olarak, incelenen yağ asidi türü dışında diyet kompozisyonunun tutarlı kaldığı daha kontrollü deneysel tasarımlara ihtiyaç vardır. Bu kontrol, yağların elde edildiği doğal kaynakları doğrudan kullanmak yerine, saflaştırılmış yağ asidi takviyesi yoluyla sağlanabilir; çünkü doğal yağ kaynakları birden fazla biyoaktif bileşen içermektedir. Örneğin, zeytinyağı hem kolinin yapısal bir analogu olan 3,3-dimetil-1-butanol hem de bağırsak mikrobiyotasını bağımsız olarak etkileyen polifenoller içermektedir. Bu durum, yağ asitlerinin spesifik etkilerini izole etmek için söz konusu ek değişkenleri kontrol etme ihtiyacını vurgulamaktadır. İkinci olarak,

farklı yağ asitlerinin TMAO üretimi üzerindeki doza bağımlı etkilerini karakterize etmek ve faydalı veya zararlı etkilerin eşik değerlerini belirlemek için iyi tasarlanmış insan çalışmaları aracılığıyla doz-yanıt ilişkileri oluşturulmalıdır.

Sonuç olarak, bu bulgular diyet yağ asidi kompozisyonunun bağırsak mikrobiyotası aracılığıyla kardiyovasküler sağlığı etkileyebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, yağ asidi profilinin optimize edilmesi ve bağırsak mikrobiyotasının hedeflenmesi, kardiyovasküler hastalıkları geciktirmek veya önlemek için umut verici terapötik stratejiler olabilir.



3.2 Hedefli Metabolomiks

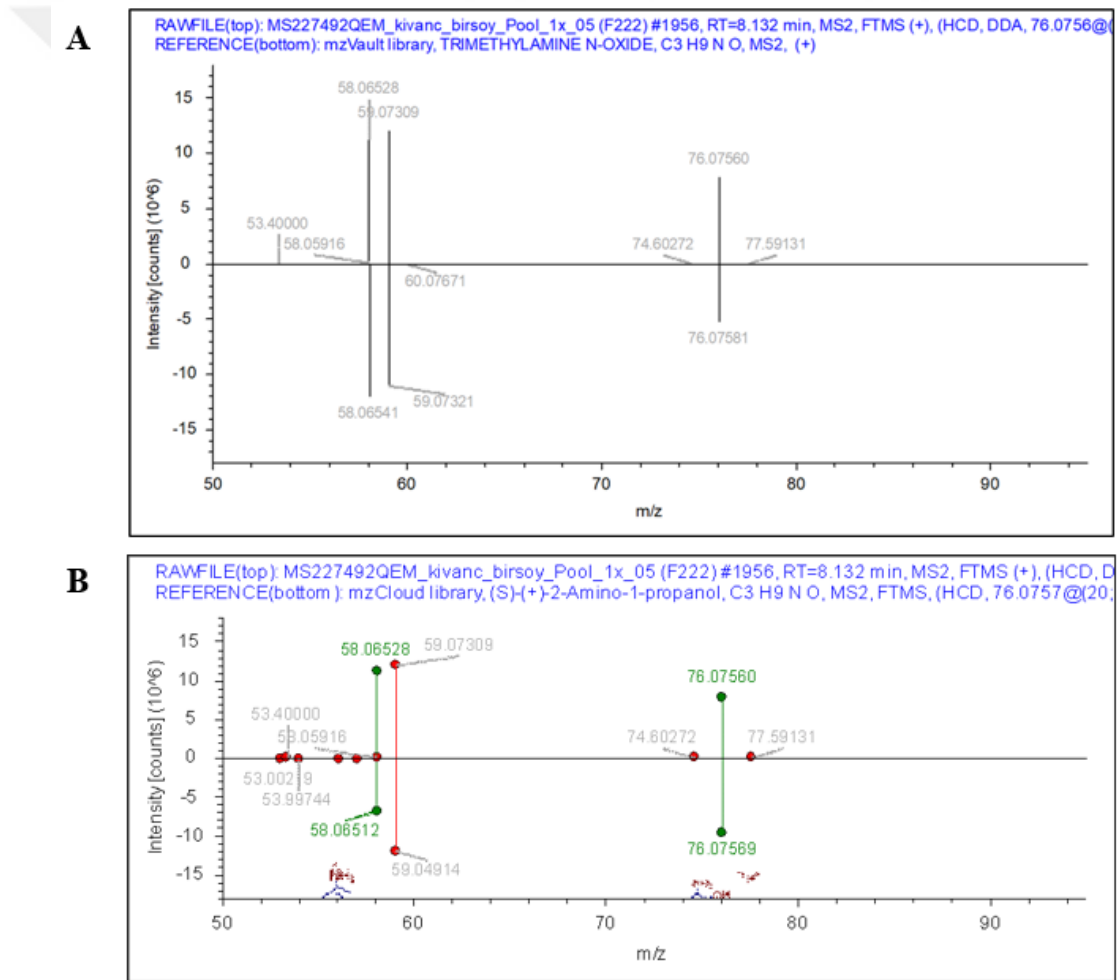
Metabolomik stratejileri, her biri kendine özgü avantajları ve sınırlamaları olan hedefli ve hedefsiz yaklaşımlar olarak ikiye ayrılabilir. Hedefsiz metabolomiks, kimyasal olarak bilinmeyenler de dahil olmak üzere bir örnekteki tüm tespit edilebilen metabolitlerin analizine odaklanırken, hedefli metabolomiks belirli metabolit gruplarının ölçümüdür. Hedefli metabolomiks, bu nedenle bir veya birkaç hipotezi doğrulamada güçlüdür; buna karşın, hedefsiz metabolomiks, insan hastalık risklerini anlamada bir dizi çığır açan keşfe yol açan yeni metabolitlerin keşfedilmesi fırsatını sunar. Hedefsiz metabolomiks keşif çalışmalarında geniş metabolit kapsamını korumak için biyolojik örnekler genellikle minimal ön işlem ile analiz edilir. Buna karşılık, hipotez odaklı hedefli analizlerde, örnek hazırlığı optimize edilerek belirli metabolitlerin seçici ekstraksiyonu ve diğer bol miktarda bulunan matris bileşenlerinin uzaklaştırılması sağlanır (Cajka ve Fiehn, 2016).

HRMS, izobarik olmayan molekülleri ayırt edebilse de, aynı kütleye ve benzer parçalanma desenlerine sahip izomerleri yalnızca HRMS teknikleriyle ayırt etmek her zaman mümkün değildir. İki izobarik molekül için aynı fragment iyonlarının üretilmesi durumunda, kütle spektrumu verileri kimliklendirme ve doğrulama için gerekli ayırt etme düzeyini sağlayamaz. Bu nedenle, izobarik türleri ayırt etmek için kromatografik ayırma gerekli bir adımdır (Lee ve diğ., 2019).

Hedefsiz metabolomiks analizi sonucu elde edilen MS/MS spektral verileri, hangi moleküle ait olduğunu belirlemek için MS/MS spektral kütüphanelerinde arandığında, aynı spektral bilgiye farklı kütüphaneler tarafından farklı kimlikler atanabilir. Bunun nedenlerinden biri, spektral benzerlik açısından kütüphanede en yakın kimliğin atanmasıdır; ancak bazen bu farklılıklar, kütüphanelerin içeriklerinin sınırlı olmasından da kaynaklanabilir. Bu çalışmada elde edilen bir MS/MS spektral verisi için iki farklı MS/MS spektral kütüphanesi tarafından farklı kimlikler atandığı gözlemlenmiştir. Moleküler formülü C_3H_9NO olan ve ortak öncü iyon ile fragment iyona sahip, kimliği bilinmeyen bu molekül, MoNA kütüphanesi tarafından TMAO olarak, mzCloud kütüphanesi tarafından ise (S)-(+)-2-Amino-1-propanol olarak atanmıştır (Şekil 3.5).

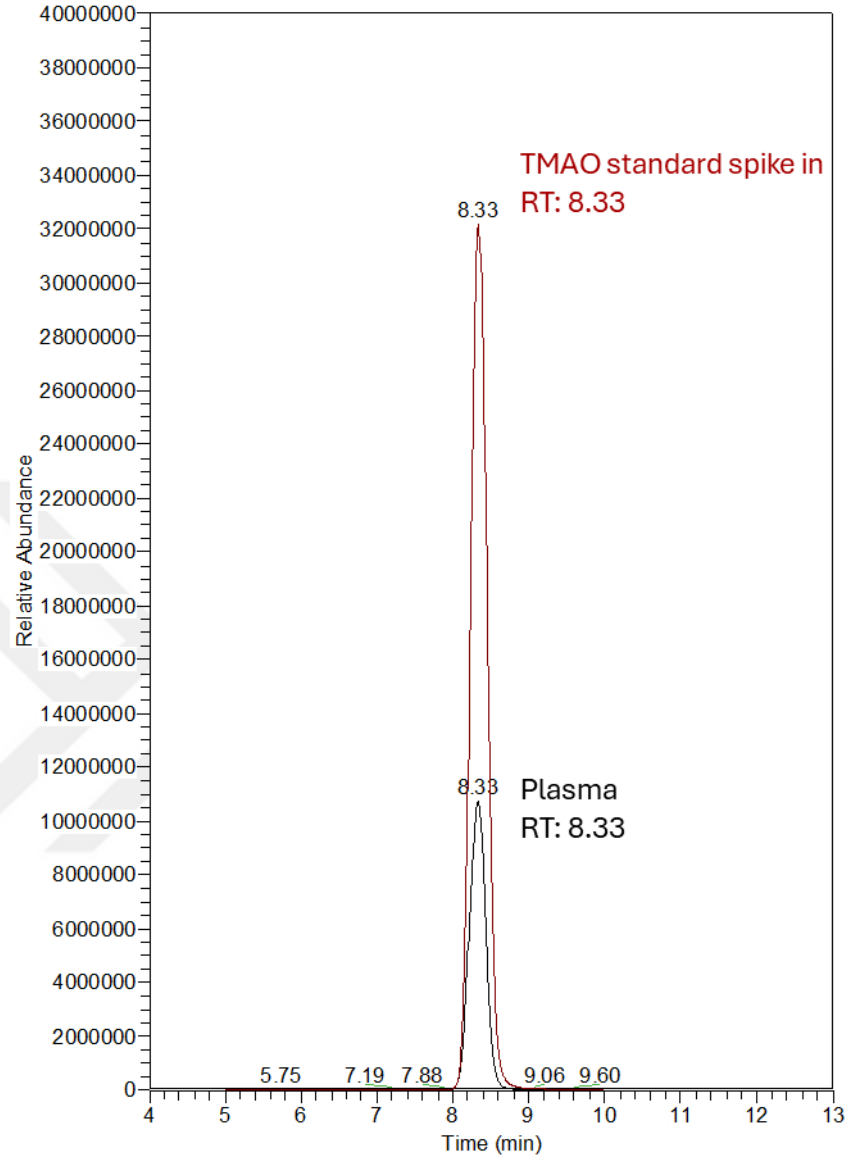
(S)-(+)-2-Amino-1-propanol biyolojik bir molekül olmadığından ve örnekler biyolojik kökenli olduğundan, bilinmeyen molekülün kimliğinin (S)-(+)-2-Amino-1-propanol

olmasındansa TMAO olma ihtimalinin daha yüksek olduğu mantıklıdır. Ancak, deney grupları arasında farklı bulunan bu özelliğin, saf referans standart kullanılarak aynı analitik ortamda analiziyle kimliğinin doğrulanması önemlidir. Bilinmeyen molekülün TMAO olup olmadığını doğrulamak için kolondaki alıkonma süresi (retention time) bilgisi kullanılarak hem saf standart hem de standart ile zenginleştirilmiş havuzlanmış örnek analiz edilmiştir. Zenginleştirilmemiş havuzlanmış örneklerle karşılaştırıldığında, 76.0756 m/z iyon kromatogramında (EIC) bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.6). Ayrıca, hem endojen bilinmeyen hem de sentetik standardın MS/MS parçalanma spektrumları karşılaştırıldığında, bu diyetle ilgili bileşiğin TMAO olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3.7).



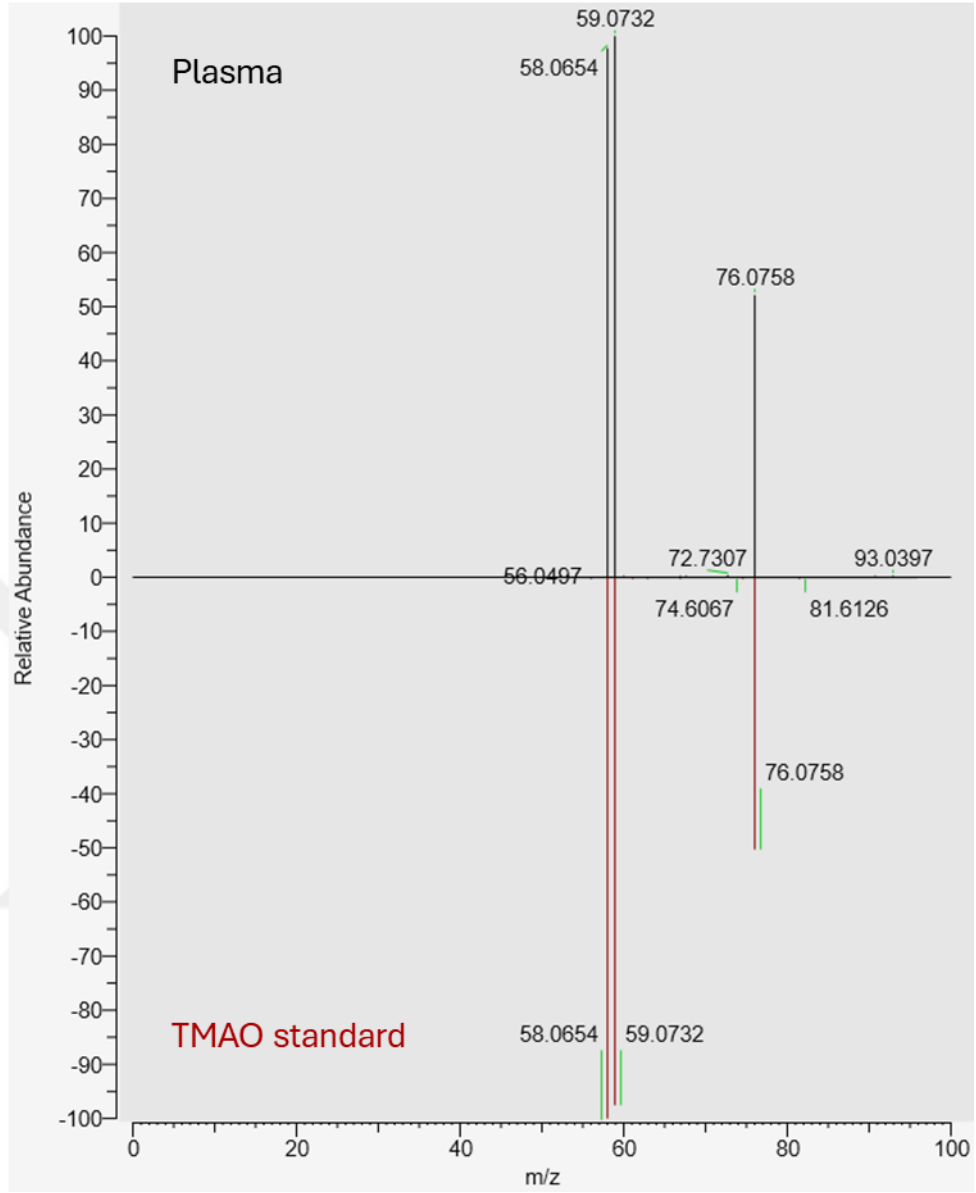
Şekil 3.5 : MS/MS parçalanma ayna grafiği A: Plazmadaki (üstte) ve mzVault (MoNA) kütüphanesin MS/MS deki TMAO referansı (altta), 76.0756 m/z @ 8.132 dakika öncü iyonu için ddMS parçalanma desenleri ile eşleşen parçacıklar: 58.06528 ve 59.07309 m/z. B: Plazmadaki (üstte) ve mzCloud kütüphanesindeki (S)-(+)-2-Amino-1-propanol referansı (altta), 76.0756 m/z @ 8.132 dakika öncü iyonu için ddMS parçalanma desenleri ile eşleşen tek parçacık: 58.06528 m/z.

EIC: 76.0757 m/z



Şekil 3.6 : TMAO ile zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş örneklerin üst üste bindirilmiş iyon kromatogramları, doğru kütle ve kromatografik profil uyumuyla bilinmeyen bileşeni TMAO olarak tanımlamaktadır.

MS2 76.0757@hcd30.00



Şekil 3.7 : 76.0756m/z @8.33 dakika öncü iyonunun plazma örneğindeki (üstte) ve saf TMAO standardının (altta) paralel reaksiyon izleme (PRM) MS/MS parçalanma ayna grafiğinin uyumu bilinmeyen bileşiğin TMAO olduğunu doğrulamış oldu.



KAYNAKLAR

- Anto, L., & Blesso, C. N.** (2022). Interplay between diet, the gut microbiome, and atherosclerosis: Role of dysbiosis and microbial metabolites on inflammation and disordered lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 105, 108991.
- Assress, H. A., & Ferruzzi, M. G., & Lan, R. S.** (2023). Optimization of mass spectrometric parameters in data dependent acquisition for untargeted metabolomics on the basis of putative assignments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 34(8), 1621-1631.
- Beyaz, S., Chung, C., Mou, H., Bauer-Rowe, K. E., Xifaras, M. E., Ergin, I., Dohnalova, L., Biton, M., Shekhar, K., Eskiocak, O., Papciak, K., Ozler, K., Almeqdadi, M., Yueh, B., Fein, M., Annamalai, D., Valle-Encinas, E., Erdemir, A., Dogum, K., Shah, V., ... Yilmaz, Ö. H.** (2021). Dietary suppression of MHC class II expression in intestinal epithelial cells enhances intestinal tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 28(11), 1922-1935.
- Bennett, B. J., de Aguiar Vallim, T. Q., Wang, Z., Shih, D. M., Meng, Y., Gregory, J., Allayee, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., Edwards, P. A., Hazen, S. L., & Lusis, A. J.** (2013). Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metabolism*, 17(1), 49–60.
- Bittremieux, W., Wang, M., & Dorrestein, P. C.** (2022). The critical role that spectral libraries play in capturing the metabolomics community knowledge. *Metabolomics*, 18(12), 94.
- Boateng, L., Ansong, R., Owusu, W. B., & Steiner-Asiedu, M.** (2016). Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana Medical Journal*, 50(3), 189-196.
- Bolognini, D., Dedeo, D., & Milligan, G.** (2021). Metabolic and inflammatory functions of short-chain fatty acid receptors. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 16, 1-9.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C.** (2006). Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36, 485-501.
- Cajka, T., & Fiehn, O.** (2016). Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 88(1), 524–545.

- Calder, P. C.** (2015). Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1 Suppl), 18S-32S.
- Cheng, T. Y., Lee, T. W., Li, S. J., Lee, T. I., Chen, Y. C., Kao, Y. H., Higa, S., Chen, P. H., & Chen, Y. J.** (2024). Short-chain fatty acid butyrate against TMAO activating endoplasmic-reticulum stress and PERK/IRE1-axis with reducing atrial arrhythmia. *Journal of Advanced Research*, S2090-1232(24)00332-1. Advance online publication.
- Choi, J. W., Ohn, J. H., Jung, H. S., Park, Y. J., Jang, H. C., Chung, S. S., & Park, K. S.** (2018). Carnitine induces autophagy and restores high-fat diet-induced mitochondrial dysfunction. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 78, 43–51.
- Costabile, G., Vetrani, C., Bozzetto, L., Giacco, R., Bresciani, L., Del Rio, D., Vitale, M., Della Pepa, G., Brighenti, F., Riccardi, G., Rivellese, A. A., & Annuzzi, G.** (2021). Plasma TMAO increase after healthy diets: results from 2 randomized controlled trials with dietary fish, polyphenols, and whole-grain cereals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114(4).
- da Silva, G. F., Rocha, L. W., & Quintão, N. L. M.** (2014). Nutraceuticals, dietary supplements, and functional foods as alternatives for the relief of neuropathic pain. In Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease: *Prevention and Therapy* (pp. 87–93). Elsevier Inc.
- Dayrit, F. M.** (2023). Editorial: Saturated fat: metabolism, nutrition, and health impact. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1208047.
- De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Storia, A., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D.** (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11), 1812–1821.
- Ding, C., Kalli, A., Yang, C., Stratton, T., & Grensemann, H.** (2020). Unknown profiling of drinking water using high-resolution LC-MS/MS and new software. *Thermo Fisher Scientific*, Poster Note 64746.
- Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J. M., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J., & Viant, M. R.** (2013). Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9, 44–66.
- Guo, J., & Huan, T.** (2020). Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 92(12), 8072-8080.
- Han, L., & Li, Y.** (2023). Application of high-speed gallium nitride devices in mass spectrometry sweeping mode. *Electronics*, 12(24), 4966.

- Hollerbach, A., Ayrton, S., Jarmusch, A., & Cooks, R. G.** (2017). Desorption electrospray ionization: Methodology and applications. In J. C. Lindon, G. E. Tranter, & D. W. Koppenaal (Eds.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed., pp. 401-408). Academic Press.
- Jameson, E., Doxey, A. C., Airs, R., Purdy, K. J., Murrell, J. C., & Chen, Y.** (2016). Metagenomic data-mining reveals contrasting microbial populations responsible for trimethylamine formation in human gut and marine ecosystems. *Microbial Genomics*, 2, e000080.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M.** (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462.
- Kilic, E., & Basaran, P.** (2025). Dietary Fatty Acids Modulate Gut Microbiota-Derived Trimethylamine-N-Oxide: Potential Mechanisms and Future Perspective. *Nutrients*, 17(23), 3787.
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warriar, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H., ... Hazen, S. L.** (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, 19(5), 576–585.
- Koh, A., & Bäckhed, F.** (2020). From association to causality: the role of the gut microbiota and its functional products on host metabolism. *Molecular Cell*, 78(4), 584–596.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F.** (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345.
- Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., & Vahidi, S.** (2013). Uncovering the mechanism of electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 85(1), 2-9.
- Lee, J., Krotulski, A. J., Fogarty, M. F., Papsun, D. M., & Logan, B. K.** (2019). Chromatographic separation of the isobaric compounds cyclopropylfentanyl, crotonylfentanyl, methacrylfentanyl, and paramethylacrylfentanyl for specific confirmation by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1118-1119, 164-170.
- Lindmark Månsson H.** (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, (52).
- Link, J. C., & Reue, K.** (2017). Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 37, 225–245.
- Liu, Y., & Dai, M.** (2020). Trimethylamine N-oxide generated by the gut microbiota is associated with vascular inflammation: New insights into atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, Article 17.
- Makarov, A.** (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72, 1156–1162.

- March, R. E., & Todd, J. F. J.** (2015). Radio frequency quadrupole technology: Evolution and contributions to mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, 316-328.
- Marques, F. Z., Nelson, E., Chu, P. Y., Horlock, D., Fiedler, A., Ziemann, M., Tan, J. K., Kuruppu, S., Rajapakse, N. W., El-Osta, A., Mackay, C. R., & Kaye, D. M.** (2017). High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation*, 135(10), 964-977.
- Mauvais-Jarvis F.** (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of Sex Differences*, 6, 14.
- Peng, B., Li, H., & Peng, X. X.** (2015). Functional metabolomics: From biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein & Cell*, 6(9), 628–637.
- Raymond, E. M.** (1999). Ion trap mass spectrometers. In J. C. Lindon (Ed.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Pages 1000-1009 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122266803001435>).
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S.** (2016). Gut microbiota, metabolites, and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352.
- Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis J.** (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10, 361–374.
- Savaryn, J. P., Toby, T. K., & Kelleher, N. L.** (2016). A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*, 16(18), 2435–2443.
- Schoeler, M., & Caesar, R.** (2019). Dietary lipids, gut microbiota, and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20, 461–472.
- Schugar, R. C., Shih, D. M., Warriar, M., Helsley, R. N., Burrows, A., Ferguson, D., Brown, A. L., Gromovsky, A. D., Heine, M., Chatterjee, A., Li, L., Li, X. S., Wang, Z., Willard, B., Meng, Y., Kim, H., Che, N., Pan, C., Lee, R. G., Crooke, R. M., ... Brown, J. M.** (2017). The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Reports*, 19(12), 2451–2461.
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A.** (2016). Untargeted metabolomics strategies: Challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897–1905.
- Siuzdak, G.** (2004). An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from The expanding role of mass spectrometry in biotechnology (2nd ed.). MCC Press: San Diego. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9(2), 50–63.
- Spivak, I., Fluhr, L., & Elinav, E.** (2022). Local and systemic effects of microbiome-derived metabolites. *EMBO Reports*.

- van der Laan, T., Kloots, T., Beekman, M., Kindt, A., Dubbelman, A. C., Harms, A., van Duijn, C. M., Slagboom, P. E., & Hankemeier, T. (2019). Fast LC-ESI-MS/MS analysis and influence of sampling conditions for gut metabolites in plasma and serum. *Scientific Reports*, 9(1), 12370.
- Vilskersts, R., Kuka, J., Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Makarova, E., Sevostjanovs, E., Cirule, H., Grinberga, S., & Dambrova, M. (2015). Methyl- γ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, 72, 101–107.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lusis, A. J., & Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), 57–63.
- Wanichthanarak, K., Jeamsripong, S., Pornputtapong, N., & Khoomrung, S. (2019). Accounting for biological variation with linear mixed-effects modelling improves the quality of clinical metabolomics data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 611–618.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 482–493.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., ... Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D801–D807.
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107.
- Yoo, W., Zieba, J. K., Foegeding, N. J., Torres, T. P., Shelton, C. D., Shealy, N. G., Byndloss, A. J., Cevallos, S. A., Gertz, E., Tiffany, C. R., Thomas, J. D., Litvak, Y., Nguyen, H., Olsan, E. E., Bennett, B. J., Rathmell, J. C., Major, A. S., Bäumler, A. J., & Byndloss, M. X. (2021). High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide. *Science*, 373(6556), 813–818.
- Zhao, J., Zhao, F., Yuan, J., Liu, H., & Wang, Y. (2023). Gut microbiota metabolites, redox status, and the related regulatory effects of probiotics. *Heliyon*, 9(11), e21431.
- Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11), 5288–5296.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ece Kılıç

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yükseklisans** : 2017, National University of Singapore, Kimya

MESLEKİ DENEYİM

- **06/2023 - Günümüz** : Araştırma Destek Uzmanı, The Rockefeller University
- **05/2021 - 06/2023** : Araştırma Görevlisi, Cold Spring Harbor Laboratory
- **2022 Yaz** : Öğretim Asistanı, CSHL Metabolomics course, Cold Spring Harbor Laboratory
- **08/2017 - 01/2019** : Araştırma Görevlisi, Aarhus University
- **06/2013 - 09/2013** : Stajyer, Ar-Ge Departmanı, Warsteiner Brewery

ÖDÜLLER:

- **2014 - 2016** : Tam burslu A*STAR lisansüstü bursu, Singapur
- **06-09 / 2013** : ERASMUS staj bursu
- **2011 - 2014** : Yeditepe Üniversitesi, Dekanlık Yüksek Onur Listesi

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Kilic E., Pervin Basaran,** (2025), Dietary Fatty Acids Modulate Gut Microbiota-Derived Trimethylamine-N-Oxide: Potential Mechanisms and Future Perspective, *Nutrients*, 17(23), 3787.
- **Kilic E. Pervin Basaran, Kivanc Birsoy, Semir Beyaz,** (2025), Dietary Fatty Acid-Dependent Alterations in Gut Microbiota-Derived Metabolites (Poster), *Cancer Metabolism and Signaling in the Tumor Microenvironment*, New York Academy of Science, <https://events.nyas.org/event/cancermetabolism/summary>

Diğer Yayınlar, Sunumlar ve Patentler:

- **Khan, A., Unlu, G., Lin, P., Liu, Y., Kilic, E., Kenny, T. C., Birsoy, K., & Gamazon, E. R.** (2024). Metabolic gene function discovery platform GeneMAP identifies SLC25A48 as necessary for mitochondrial choline import. *Nature Genetics*, 56(8), 1614–1623.
- **Kilic E.; Novoselova M.V.;; Sukhorukov G. B.; Kiryukhin M. V.** (2017). Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules, *Scientific Reports*.
- **Lau H. H.; Kilic E.; Kiryukhin M.** (2019). Polymer Capsules. Singapore: *Jenny Stanford Publishing*.
- **Bislev, L.S.; Sundekilde, U.K.; Kilic, E.; ... ; Bertram, H.C.** (2020). Circulating Levels of Muscle-Related Metabolites Increase in Response to a Daily Moderately High Dose of a Vitamin D3 Supplement in Women with Vitamin D Insufficiency—Secondary Analysis of a Randomized Placebo-Controlled Trial, *Nutrients*.
- **Kiryukhin M. V.; ...; Kilic E.; Haigh B.; Regan M.** (2017). Multilayered Shells: Encapsulation, Protection and Targeted Delivery of Food Bioactives, *11th ISP – International Symposium on Polyelectrolytes*, Russia.
- **Kilic E.; Wang H.; Huang D.; Kiryukhin M.** (2015). Proanthocyanidins having inhibition activity to glycoside hydrolase, *5th Molecular Materials Meeting*, Singapore.