

**VAZOAKTİF İNTESTİNAL POLİPEPTİD (VIP) ve HİPOFİZ ADENİLAT
SİKLAZ AKTİVE EDİCİ POLİPEPTİD (PACAP)'ın LC-MS/MS YÖNTEMİ ile
KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Sema KOYUTÜRK

Eskişehir 2019

**VAZOAKTİF İNTESTİNAL POLİPEPTİD (VIP) ve HİPOFİZ ADENİLAT
SİKLAZ AKTİVE EDİCİ POLİPEPTİD (PACAP)'in LC-MS/MS YÖNTEMİ ile
KARAKTERİZASYONU**

Sema KOYUTÜRK

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Erol ŞENER

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2019

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1601S036 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sema Koyutürk'ün 'Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP) ve Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptid (PACAP)'in LC-MS/MS Yöntemi ile Karakterizasyonu' başlıklı tezi 18/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvan-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman)	: Doç.Dr. Erol ŞENER	
Üye	: Prof.Dr. Dilek AK	
Üye	: Doç.Dr. Emirhan NEMUTLU	
Üye	: Prof.Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR	
Üye	: Doç.Dr. Ali ÖZCAN	

Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

ÖZET

VAZOAKTİF İNTESTİNAL POLİPEPTİD (VIP) ve HİPOFİZ ADENİLAT SIKLAZ AKTİVE EDİCİ POLİPEPTİD (PACAP)'in LC-MS/MS YÖNTEMİ ile KARAKTERİZASYONU

Sema KOYUTÜRK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2019

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN)

Nöropeptidler, nöronlar tarafından iletişim için kullanılan peptitlerdir. Vazoaktif intestinal polipeptit (VIP) ve hipofiz adenilat sıklaz aktive edici polipeptid (PACAP), beynin hipotalamus bölgesinden elde edilen glukagon/sekretin ailesine ait polipeptitlerdir. Amino asit dizilimleri açısından birbirlerine oldukça benzerler.

Bu tez çalışmasında, VIP ve PACAP-38'in, hassas Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) yöntemi ile analitik açıdan karakterizasyonu yapıp incelenmiştir. Her iki peptitin analizi için kromatografik (C8 ve C18 ayırım kolonları, hareketli fazın organik çözücü ve asit içeriği, akış hızı gibi) ve kütle spektrometrik (peptidlere ait temel iyon ve parçalarının gözlenmesi, parçalama voltajı, parçalama enerjisi gibi) parametreler incelenmiştir. Peptitlerin adsorpsiyon sorununun kaynakları araştırılmış ve adsorpsiyonu engelleyici faktörler LC-MS/MS analizlerinde denenmiştir. Analizlerde VIP için 665,9 (M^{+5}) m/z temel iyonu ve 799,5 ve 770,7 m/z parça iyonları gözlenirken, PACAP-38 için 504,3(M^{+9}), 567,3(M^{+8}), 648,3(M^{+7}) ve 755,9(M^{+6}) m/z temel iyonları üzerinden incelemeler yapılmıştır. Ayrıca peptitlerin yüzeye adsorbsiyonunu engelleyici olarak albümin çözeltisi ve yüzey aktif maddelerin analizlere etkisi araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Vazoaktif intestinal polipeptit (VIP) ve Hipofiz adenilat sıklaz aktive edici polipeptid (PACAP-38), LC-MS/MS, Peptidomik, Peptit adsorpsiyonu

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE (VIP) AND PITUITARY ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP) WITH LC/MS-MS METHOD

Sema KOYUTÜRK

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Science, June 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erol ŞENER

(Co-Supervisor: Lecturer, PhD. Arın Gül DAL POÇAN)

Neuropeptides are peptides used for communication by neurons. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) are obtained from the hypothalamus region of the brain, glucagon/secretin family of polypeptides. VIP and PACAP are quite similar to each other in terms of amino acid sequences.

In this thesis, the analytical characterization of VIP and PACAP-38 by sensitive Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS / MS) method have been carried out. For the analysis of both peptides, the parameters for chromatography (C8 and C18 separation columns, organic solvent and acid content of the mobile phase, flow rate etc.) and mass spectrometry (observation of basic ions and fragments of peptides, fragmentor voltage, fragmentation energy, etc.) were examined. The sources of the adsorption problem of the peptides were investigated and the factors inhibiting adsorption were tested in LC-MS / MS analysis. In the analysis, 665,9 (M^{+5}) m/z base ion and 799,5 and 770,7 m/z fragment ions were observed for VIP, while 504,3 (M^{+9}), 567,3 (M^{+8}), 648,3 (M^{+7}) and 755,9 (M^{+6}) m/z basic ions for PACAP-38 were investigated. In addition, the effects of albumin solution and surfactants on the analysis were investigated as inhibitor of adsorption of peptides to the surface.

Key Words: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) ve Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP-38), LC-MS/MS, Peptidomics, Peptide adsorption

18/06/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Sema KÖYÜTÜRK

ÖNSÖZ

Bilimde kadının rolünün ve değerinin yükselmeye başladığı dünyada, ülkemiz için bu akımın bir parçası olmak bana büyük bir onur ve gurur vermektedir. Bilimsel çalışmaların tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de daha multidisipliner olması umut vaat etmekte ve biz araştırmacılara geniş çalışma alanları sunmaktadır. Bu yüzden Kimyager olmama rağmen sağlık alanında araştırmalar yapmam bana büyük bir gurur vermekte ve motivasyon sağlamaktadır. Çünkü gerçek bilimsel ilerleme ve üretim sağlayabilmek için sabrın ve özverinin yanısıra iletişimin ve multidisipliner çalışmanın oldukça önemli olduğunu düşünmekteyim.

Doktora tez çalışmalarım kapsamındaki peptitler olan VIP ve PACAP için yapılan analitik incelemeler, ileride farmakolojik/fizyolojik açıdan yapılacak çalışmalara basamak oluşturması ve fikir vermesi açısından öncü olabilir.

Bu yolda fikirleri ve düşünceleri ile bize ışık tutan Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora süreci ve tez çalışmalarım sırasında akademik donanımı, bilgi birikimi ve tecrübeleri ile büyük bir sabırla bana yol gösteren ve katkı sağlayan Sayın Danışman Hocam Doç.Dr. Erol ŞENER'e,

Akademik deneyimi, bakış açısı ve fikirlerinin yanı sıra desteğini her zaman hissettiğim, maddi ve manevi anlamda hep destekçim olan Sayın Hocam Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN'a,

Bu zorlu yolda motivasyonumu yüksek tutmam için yanımda olan ve desteği hep var olan Sayın Hocam Prof.Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR'a,

Doktora süresince çalışmalarımı yakından takip eden ve desteklerini esirgemeyen değerli Hocalarım Sayın Prof.Dr. Muzaffer TUNCEL ve Sayın Prof.Dr. Dilek AK'a,

Sabırları, iyi niyetleri ve bakış açıları ile hayatımda olmalarından büyük mutluluk duyduğum, bu süreçte hep benimle birlikte olan arkadaşlarım Araş.Gör. Sakine ATİLA KARACA, Araş.Gör. Merve BAYSAL, Uzm.Dr. Okan USLU, Ecz. Evrim GÜZEL DEMİRTÜRK ve Dr. Wafa BADULLA'ya,

Yaklaşık 8 senelik yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca bilgi paylaşımları için Analitik Kimya Anabilim Dalı Hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Doktora tez çalışmalarını gerçekleştirdiğim Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) bünyesindeki Hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Doktora sürecimin son bir senesinde dahil olduğum Abdi İbrahim İlaç A.Ş.'nin ArGe Bölümü'nde çalışma ve akademik hayatımı birlikte yürütebilmem için desteklerini esirgemeyen, bu zorlu yolda bana moral ve motivasyon sağlamaya çalışan Sayın Direktörüm Zdravka KNEZEVIC, Sayın Müdürlerim Arzu USTAOĞLU ve Mine GÖKALP, Sayın Yöneticim Gizem KAYA, çalışma grubum Likit-2 ve çalışma arkadaşlarım Meseret ÖZGÜR, Zeynep HALAMOĞLU, Özge OKUROĞULLARI, Hatice CANBAĞI YILDIZ, Melis ATEŞ, Joanna FETTAHOĞLU'na,

sonsuz teşekkürlerimi en içten şekilde sunarım.

Ve belki de hayatımın en büyük şansları olan, ömrüm boyunca her konuda yanımda oldukları gibi bu süreçte de elimi hiç bırakmayan, en büyük destekçilerim ailem; babam Ali KOYUTÜRK, annem Pervin KOYUTÜRK ve kardeşim Mustafa KOYUTÜRK'e bu doktora tezimi atfeder, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Sema KOYUTÜRK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Peptidomik	3
2.2. Nöropeptitler	4
2.3. Tez Kapsamında İncelenen Nöropeptitler	6
2.3.1. Vazoaktif intestinal polipeptit (VIP).....	6
2.3.2. Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP)	8
2.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi	9
2.4.1. İyonlaştırma yöntemleri.....	11
2.4.2. Kütle analizörleri.....	13
2.5. Peptit Analizlerinde Kütle Spektrometrisinin Önemi	16
2.6. Peptit/Proteinlerin Yüzeye Adsorpsiyonu	19
2.7. VIP ve PACAP ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar	24
3. GEREÇLER	30
3.1. Kimyasal Maddeler	30
3.2. Cihazlar	30
4. YÖNTEM ve BULGULAR	31
4.1. Çözücü Seçimi ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	31
4.2. Kromatografik Parametreler	31
4.3. Yöntemin Optimizasyonu	32
4.4. VIP için Yapılan Adsorpsiyon Engelleyici Çalışmalar	53

4.5. PACAP-38 için Yapılan Adsorpsiyon Engelleyici Çalışmalar.....	61
5. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	86

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1. Başlangıç gradienti.....	32
Tablo 4.2. Farklı parçalama voltajlarında tekrarlı yapılan analizler sonucu elde edilen değerler (n=6)	39
Tablo 4.3. CAV-Kütle miktarı ilişkisi	42
Tablo 4.4. 799,5 m/z için %FA-pik alanı-%BSS değişimi (n=5).....	47
Tablo 4.5. 770,7 m/z için %FA-pik alanı-%BSS değişimi (n=5)	47
Tablo 4.6. VIP pikine farklı pH’lardaki hareketli fazın etkisi (n=5)	49
Tablo 4.7. %0,2 FA-ACN içeren hareketli faz ile analizlenen 2,50 µg/mL VIP sonuçları (n=5)	51
Tablo 4.8. %0,2 FA-MeOH içeren hareketli faz ile analizlenen 2,50 µg/mL VIP sonuçları (n=5)	51
Tablo 4.9. Farklı akış hızlarında 799,5 m/z kütesine ait veriler (n=3)	52
Tablo 4.10. Farklı akış hızlarında 770,7 m/z kütesine ait veriler (n=3)	52
Tablo 4.11. 500 ng/mL VIP için 665,9 m/z kütesine ait piklerin karşılaştırması (SIM yöntemi ile)	60
Tablo 4.12. Üçüncü deneme gradienti	63
Tablo 4.13. Dördüncü deneme gradienti	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Peptidomik çalışmalar için akış şeması	3
Şekil 2.2. VIP'in kimyasal yapısı	6
Şekil 4.1. Tarama yöntemi ile 5,00 µg/mL VIP analizi	34
Şekil 4.2. SIM yöntemi ile 1,25, 2,50 ve 5,00 µg/mL VIP analizi	36
Şekil 4.3. 1109,09 m/z için 10-200 V arası parçalama voltajı taraması.....	37
Şekil 4.4. 832,1 m/z için 10-200 V arası parçalama voltajı taraması	37
Şekil 4.5. 665,9 m/z için 10-200 V arası parçalama voltajı taraması	38
Şekil 4.6. Parçalama voltajı-pik alanı grafiği	38
Şekil 4.7. VIP'e ait amino asit dizilimi ve MS'de tahmin edilen parçalanması.....	40
Şekil 4.8. 2,50 µg/mL VIP, 665,9 (+5) m/z kütleinin 'Product iyon' yöntemi ile yapılan analizi sonucunda elde edilen parçaları.....	41
Şekil 4.9. CAV- parça kütle miktarı değişimi grafiği	43
Şekil 4.10. 799,5 m/z 'ye ait CAV-pik alanı-BSS grafiği	44
Şekil 4.11. 770,7 m/z 'ye ait CAV-pik alanı-BSS grafiği	44
Şekil 4.12. Pik alanları açısından 799,5/770,7 m/z oranına ait CAV-pik alanı-BSS grafiği.....	44
Şekil 4.13. 799,5 m/z için %FA-pik alanı-%BSS grafiği	47
Şekil 4.14. 770,7 m/z için %FA-pik alanı-%BSS grafiği	47
Şekil 4.15. VIP piki üzerine AcAc'nin etkisi.....	48
Şekil 4.16. VIP piki üzerine ACN'nin etkisi	50
Şekil 4.17. VIP piki üzerine MeOH'ın etkisi	50
Şekil 4.18. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %1 AcAc'li).....	54
Şekil 4.19. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %1 AcAc'li).....	54

Şekil 4.20. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc'li)	55
Şekil 4.21. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc'li)	55
Şekil 4.22. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)	56
Şekil 4.23. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)	56
Şekil 4.24. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)	57
Şekil 4.25. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)	57
Şekil 4.26. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)	58
Şekil 4.27. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)	58
Şekil 4.28. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)	59
Şekil 4.29. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)	59
Şekil 4.30. 500 ng/mL VIP, %1 AcAc ile seyreltilmiş	60
Şekil 4.31. 500 ng/mL VIP, %1 AcAc-%50 ACN ile seyreltilmiş	61
Şekil 4.32. 500 ng/mL VIP, %5 AcAc-%50 ACN ile seyreltilmiş	61
Şekil 4.33. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, Üçüncü deneme gradienti ile)	64
Şekil 4.34. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, Dördüncü deneme gradienti ile)	65
Şekil 4.35. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, %1 AcAc-%80 ACN ile)	66
Şekil 4.36. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, %0,5 formik asit-%80 ACN ile)	67
Şekil 4.37. 500 ng/mL PACAP-38 (SIM yöntemi ile)	69
Şekil 4.38. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, A: %1 FA-Su ve B: %1 FA-ACN'li hareketli faz ile)	70
Şekil 4.39. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albümin ile kaplanmış)	71
Şekil 4.40. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albuminli ve SDS'li)	73

Şekil 4.41. 500 ng/mL PACAP-38

(Tarama yöntemi ile, albuminli ve Tween-80'li).....74

Şekil 4.42. 500 ng/mL PACAP-38

(Tarama yöntemi ile, albuminli ve PEG400'lü)75

Şekil 5.1. VIP'e ait çoklu yüklenmiş tür ve parçalarının değişimi77

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.2. Bir LC-MS/MS sistemi	11
Görsel 2.3. İyonlaştırma yöntemlerinin seçimi	12
Görsel 2.4. Elektrosprey iyonlaştırma tekniği.....	12
Görsel 2.5. Dört çubuklu kütle analizörü.....	14
Görsel 2.6. Protein/peptitlerin yüzeye adsorbsiyonu.....	20
Görsel 2.7. Adsorpsiyonu mekanizması ve engelleyici yöntemler	22
Görsel 4.1. VIP analizi için tarama yöntemine ait MS parametreleri.....	33
Görsel 4.2. VIP analizi için SIM yöntemine ait MS parametreleri	35
Görsel 4.3. Aynı analiz içinde parçalama voltajı taraması	37
Görsel 4.4. Aynı analiz içerisinde parçalama enerjisi taraması	40
Görsel 4.5. Aynı analiz içerisinde hücre içi hızlandırıcı voltaj taraması.....	42
Görsel 4.6. MRM yöntemine ait MS parametreleri.....	46
Görsel 4.7. SIM yöntemine ait MS parametreleri	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Pik alanı
AcAc	: Asetik Asit
ACN	: Asetonitril
Ala	: Alanin
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartat
BSA	: Bovine Serum Albumin (Buzağı Serum Albumini)
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CAV	: Cell Accelerator Voltage (Hücre içi Hızlandırıcı Voltaj)
CE	: Collision Energy (Parçalanma Enerjisi)
CGRP	: Kalsitonin-Gen İlişkili Peptit
CMC	: Critical Micelle Concentration (Kritik Misel Derişimi)
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
Da	: Dalton
dak	: Dakika
DC	: Direct Current (Doğru akım)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ESI	: Elektrosprey Ionization (Elektrosprey İyonlaştırma)
FA	: Formik Asit
Gln	: Glutamin

His	: Histidin
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi)
Ile	: İzolösin
k`	: Kapasite Faktörü
LC-MS/MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometri)
Leu	: Lösin
Lys	: Lizin
MECC	: Miselli Elektrokinetik Kromatografi
MeOH	: Metanol
Met	: Metiyonin
MRM	: Multiple Reaction Monitoring (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)
N	: Teorik Tabaka Sayısı
ort	: Ortalama
PACAP	: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptit)
PEG	: Polietilen Glikol
Phe	: Fenilalanin
pI	: İzoelektrik Nokta
pK_a	: Asitlik Sabiti
pK_b	: Baziklik Sabiti
QQQ	: Triple Quadrupole (Seri bağlanmış 3'lü Quadrapol)

RF	: Radiofrequency (Radiofrekans)
RIA	: Radioimmunoanalysis (Radyoimmünoanaliz)
S	: Simetri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	: Serin
SIM	: Selected Ion Monitoring (Seçilmiş İyon Analizi)
SNR	: Signal Noise Ratio (Sinyal Gürültü Oranı)
ss	: Standart Sapma
T	: Kuyruklanma Faktörü
TFA	: Trifloro asetik asit
Thr	: Treonin
TIC	: Total Ion Chromatogram (Toplam İyon Kromatogramı)
Tyr	: Tirozin
UV	: Ultraviyole
Val	: Valin
VIP	: Vasoactive Intestinal Peptide (Vazoaktif İntestinal Peptit)
W	: Pik genişliği

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uzun yıllardır, beyinde hücreler arasındaki iletişimi sağlayan moleküllerin sinirlerden gelen uyarıları diğer hücrelerin anlamasını sağlayan yapıların sadece nörotransmitterler olduğu sanılmaktaydı. Son yıllarda işlerin bu kadar basit olmadığı, nöronlarda elektrik uyarısının ve beyin kontrolünün yalnızca nörotransmitterler yoluyla oluşmadığı anlaşılmıştır. Son 30 yıl içerisinde yapılan beyin araştırmaları, başka iletişim moleküllerinin de varlığını ortaya çıkarmıştır. En önemli gelişmelerden biri, "nöropeptit" denen moleküllerin keşfi olmuştur (http-1).

Nöropeptitler uzun süredir beyindeki kimyasal sinyaller olarak bilinmektedir. Nöropeptitlerin keşfi son zamanlarda biyokimya, endokrinoloji ve fizyolojideki araştırmalarla olmuş ve üç kavram üzerine inşa edilmiştir:

- ✓ Endokrin sistemdeki kimyasal sinyaller peptit hormonlarıdır.
- ✓ Peptitlerin nörosekresyonu (sinir hücreleri tarafından hormon yapımı) sinir sisteminde genel bir ilkedir.
- ✓ Sinir sistemi peptit sinyallerine yanıt verir.

Bu önemli noktalar nöropeptitlerin bugün nasıl tanımlandığına katkıda bulunmuştur; Nöropeptitler küçük protein yapılı maddelerdir, nöral yüzeylerde görev yapar ve düzenli salgı yoluyla nöronlar tarafından yayılırlar. Bu nedenle nöropeptitler beyinde birçok fizyolojik fonksiyonu (korku, saldırganlık, sirkadiyen ritim (biyolojik saat), öğrenme vb.) olan sinyal moleküllerinin en çeşitli sınıfıdır (Burbach, 2011).

Canlı organizmalar bünyesindeki faaliyetleri düzenleyebilmek için oldukça karmaşık kimyasal sinyalizasyon sistemi gerektirir. Hücre içi biyokimyasal iletişim ağırlıklı olarak hormonlar ve nörotransmitterlerin davranışına bağlıdır. Hormonların kimyasal olarak heterojen grupları çok sayıda peptit, protein ve amino asit içerir. Peptit ve protein hormonları özel reseptörlere bağlanma yolu ile işlev gösterirler. Hormon-reseptör etkileşimleri ikincil mesajcıları içeren kademeli sinyalizasyon yolu ile özel enzimleri etkinleştirir ve sentez işlemini başlatır (Sewald ve Jakubke, 2002, s. 90).

Sindirim sistemi içerisinde birçok peptit hormonunun yer aldığı ve bunun sonucunda, bağırsakların, vücudun en büyük endokrin hormon üreten organı olduğu görülmüştür. Gastrointestinal (mide-bağırsak) hormonu genlerinin, sindirim sistemi dışında da oldukça yaygın ifade edilmesi, bu peptit hormonlarının bir yandan genel fizyolojik ve biyokimyasal olaylar açısından çok fonksiyonlu düzenleyici olarak, diğer

yandan ise akut metabolik hormonlar, nörotransmitterler, büyüme ve doğurganlık faktörleri olarak kullanımını sağlamaktadır (Sewald ve Jakubke, 2002, s. 99).

Ayrıca önceleri beyinde bulunduğu düşünülen birkaç peptitin günümüzde bağırsakta da var olduğu; bağırsakta var olan bazı peptitlerin ise beyinde de mevcut olduğu yapılan araştırmalar ile netleşmiştir. Bu nedenle, nöropeptitler için açık bir tanım yapmak zorlaşırken, peptitlerin vücudun genelinde bulunan biyoaktif bileşikler olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır (Sewald ve Jakubke, 2002, s. 107).

Rehfeld'in (Rehfeld, 1998) yaptığı gastroenteropankreatik peptit sınıflandırmasında sekretin, gastrin, insülin, somatostatin vb. gibi peptit grupları yer almaktadır. Peptit aileleri arasında sekretin grubunda yer alan vazodilat intestinal polipeptit (VIP) ve hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) bu tez çalışması kapsamında incelenmek üzere seçilmiştir. VIP ve PACAP'ın aminoasit dizilimi yönünden birbirlerine oldukça benzemeleri, sindirim sistemi dışında beyin dokusu ve sıvısı içerisinde de bulunmaları bu peptitlerin tercih sebebi olmuştur.

VIP ve PACAP ile ilgili literatürler incelendiğinde nöropeptit olmalarından dolayı tıbbi açıdan fizyolojik ve farmakolojik olarak birçok çalışması yapılmıştır. Bunlar daha çok hastalıkların teşhisine ve tedavisine yönelik çalışmalardır. Fakat analitik açıdan oldukça kısıtlı çalışmalar mevcuttur. Bunun nedeni, nöropeptitlerin beyinde oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunması, peptit analizlerinde karşılaşılan zorluklar (yüzey adsorpsiyonu gibi) ve analizini mümkün kılacak yöntemin geliştirilememesi olarak düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında yapılacak araştırmalar ile olabildiğince hassas, basit ve hızlı bir analitik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. VIP ve PACAP'ın analizi için LC-MS/MS gibi oldukça duyarlı bir teknik ile yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

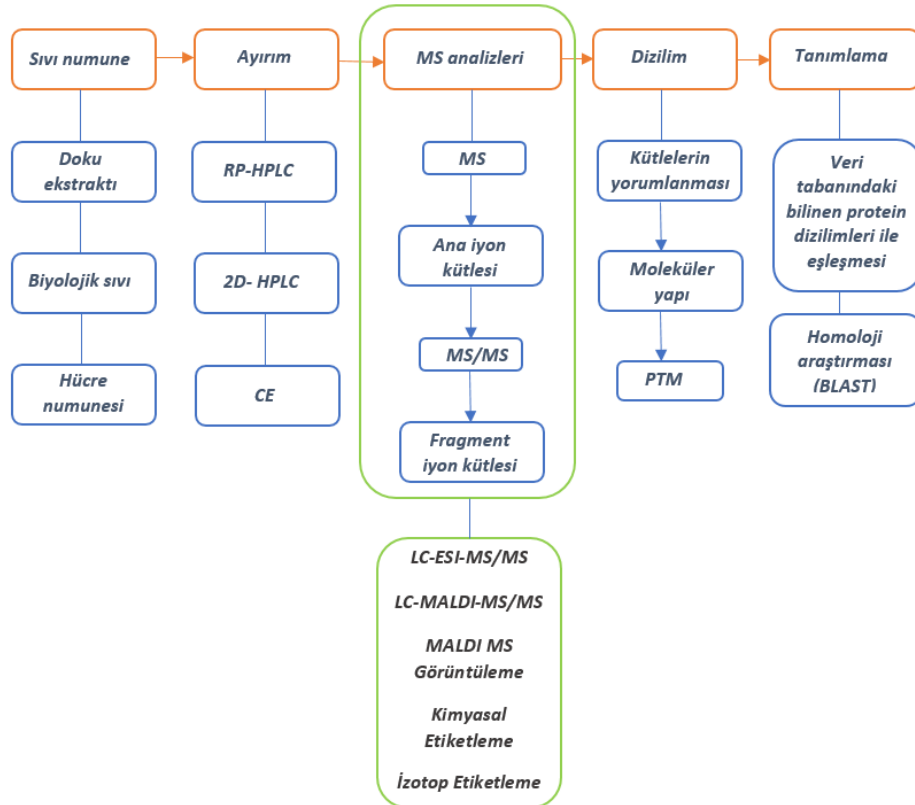
Bu araştırma ile VIP ve PACAP'ın gelecekte yapılacak analitik/fizyolojik/farmakolojik çalışmalar için bir temel oluşturabileceği ve ayrıca hastalıkların teşhisi ve tedavisi ile bu iki nöropeptitin beyindeki konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi inceleyecek çalışmalar için bir basamak olarak görülebileceği öngörülmüştür.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Peptidomik

Peptidomik terimi, belirli bir biyolojik numunede bulunan endojen peptitlerin yüksek verim ile doğrudan ölçümleri ve yapısal karakterizasyonları için kullanılan bir metot olarak tanımlanmaktadır. Bu konu üzerine yapılan çalışmalar, örnekte yer alan peptit ile ilgili bilgi eksikliği, kimyasal ve anatomik karmaşıklık, hacim ve boyut olarak örnekleme zorluğu gibi birçok sınırlamadan dolayı çok sayıda farklı yaklaşımlara yönelmiştir. Bu yaklaşımlar peptidomiğin nicel özelliğini daha güvenilir hale getirmiştir (Romanova ve Sweedler, 2015).

Bir örnekteki peptit analizleri genellikle 4 basamaktan oluşur: numuneden peptitlerin ekstraksiyonu, ayırımı, dedeksiyonu ve sonuçta bireysel analizi/tanımlanmasıdır. Kütle spektroskopisi yöntemi ise peptidin tanımlanma işlemi için vazgeçilmezdir (Baggerman vd., 2004).



Şekil 2.1. Peptidomik çalışmalar için akış şeması

Biyoinformatik ve sıvı kromatografi ile desteklenmiş kütle spektrometri yöntemlerini içeren biyoanalitik metotların kullanılması tıp ve yaşam bilimleri alanlarında artarak devam etmektedir. Aynı zamanda, peptitlere ait veri işleme verimliliği, kütle doğruluğu, ayırım ve tespit sınırı açısından teknolojik olarak iyileştirme hala devam etmektedir (Romanova ve Sweedler, 2015).

Peptidomik araştırmaları oldukça geniş örnek çeşidi içermektedir; böcek beyinlerinden veya memelilerin tanımlanmış beyin bölgelerinden elde edilen örnekler büyük bir havuzda toplanır ve peptidomik çalışmalarda kullanılır (Romanova ve Sweedler, 2015).

Nöropeptidomik belirli fizyolojik koşullar altında sinir sistemindeki hücrelerde ve dokulardaki nöropeptitlerin kapsamlı bir şekilde araştırıldığı yaklaşımı ifade eder. Nöropeptitler, sinir sistemi içerisinde davranış kontrolü ve düzenleyici fonksiyonları içeren sinyal moleküllerinden oluşan bir komplekstir. Nöropeptitler oldukça düşük miktarlarda var oldukları için genellikle yüksek hassasiyet, büyük seçicilik ve geniş bir dinamik algılama aralığı gerektiren yöntemler ile analizlenir (Yin vd., 2011). Nöroendokrin dokular lokal olarak yüksek nöropeptit konsantrasyonu içerir ve bu nedenle minimum numune manipülasyonu MS görüntüleme ile doğrudan analiz için uygundur (Romanova ve Sweedler, 2015).

2.2. Nöropeptitler

Nöronlar, biyolojik sistemin bir bölümünden diğer bölümüne bilgi iletimi sağlayan, akson, dendritler ve çekirdeği içeren bir hücre gövdesinden oluşan yapılardır. Sinir uçları diğer nöronlar ile bağlantı ve iletişimi sağlamaktadır. Birbirine oldukça sıkı bağlanmış nöron ağı beyindeki bilgi işlenmesinin temel mekanizmasıdır (Desidero, 1984, s. 13).

Bir nöropeptid, peptit bağları ile birlikte en az iki amino asitten oluşan bir endojen protein molekülüdür. Nöronun hemen hemen tüm bölgelerinde, çoğunlukla sinapsındaki akson terminalinde geniş, yoğun çekirdekli keseciklerde bulunurlar (Sanzone, 2011). Nörotransmitterlere göre nöropeptitler, nöronun sinir uçları, somato ve dendritlerini içeren birçok kısımdan farklı mekanizmalar ile salınırlar. Gerçekte peptit içeriğinin %85'i dendritlerdedir. Dendritik nöropeptit salım mekanizması akson terminal salımından çok

farklı olabilir. Bu durumda farklı şekilde düzenlenmiş peptit salımları vücuttaki peptit etkilerinin beyindeki peptit etkilerinden bağımsız olmasını sağlar (Ludwig, 2012).

Bir nöropeptidin işlevi genellikle bir nörotransmitter veya hormon olarak sınıflandırılması ile belirlenir, ancak terimler sıklıkla karıştırılır. Genel olarak nöropeptitler, nörotransmitterlere göre davranış üzerinde daha uzun süreli ve çeşitli etkiler uygularlar. Nörotransmitterler ve nöropeptidler bilgiyi farklı şekilde işlemekle birlikte direkt hücrelerarası kimyasal haberciler olarak ayrı ayrı veya birlikte hareket ederler ve bir arada var olurlar, bu şekilde eşgüdümlü fonksiyonlara katkıda bulunabilir (Sanzone, 2011).

Genel olarak nöropeptitler ve nörotransmitterler arasındaki farklar şöyle sıralanabilir:

Nöropeptitler;

- 400-4000 Da ağırlığında büyük moleküllerdir.
- Sentezlendikten sonra sinaptik uca yavaş ulaşırlar.
- Presinaptik uca geri alınamazlar.
- Etkilerini çok düşük konsantrasyonlarda oluştururlar.
- Etkileri uzun sürer.
- Uzun mesafelere taşınabilirler.
- Peptidazlar ile parçalanırlar.

Nörotransmitterler;

- 200 Da ağırlığından küçük moleküllerdir.
- Sinaptik uca hemen ulaşırlar.
- Presinaptik uca geri alınabilirler.
- Etkilerini nöropeptitlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda gösterirler.
- Etkileri daha kısa sürer.

Peptitler, merkezi sinir sistemi ve çevresel organlarda birçok etki gösterebilirler. Merkezi sinir sisteminde önemli etkilerinin olması yıllar boyu araştırma konusu olmuştur. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Sewald ve Jakubke, 2002):

- Beslenme (bombesin, PACAP gibi)
- Davranış (vazopressin, kalsitonin-gen ilişkili peptit (CGRP) nörotensin gibi)
- Stres (substance P gibi)
- Uyku (vazopressin gibi)
- Öğrenme (substance P gibi)
- Hafıza (vazopressin, galanin gibi)

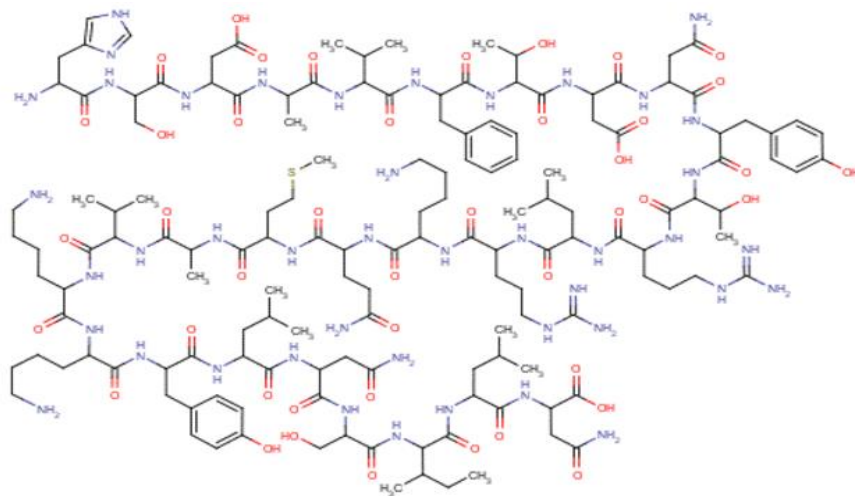
2.3. Tez Kapsamında İncelenen Nöropeptitler

2.3.1. Vazoaktif intestinal polipeptit (VIP)

VIP, merkezi ve çevresel sinir sisteminde oldukça yaygın bulunan 28 amino asit içeren glukagon/sekretin ailesinden bir nöropeptittir (Watanebe, 2016).

VIP'e ait amino asit dizilimi, yapısı ve fizikokimyasal özellikleri aşağıda verilmektedir:

- ✓ His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂ (<http-2>)
- ✓ Kapalı Formül: C₁₄₇H₂₃₈N₄₄O₄₂S
- ✓ Molekül ağırlığı: 3325,80 Da
- ✓ Çözücü: %1 asetik asit
- ✓ pI >11 (Watanebe, 2016)



Şekil 2.2. VIP'in kimyasal yapısı (<http-3>)

İlk kez, 1970 yılında, domuz bağırsağından izole edilip akciğerde düz kas gevşetici vazodilatör peptit olarak keşfedilmiştir (Said, 1991). Başlangıçta gastrointestinal hormon olarak anılmasına rağmen son zamanlarda yapılan araştırmalar ile nörotransmitter ve nöromodülatör özellikleri olan bir nöropeptit olarak bilinmektedir (Watanabe, 2016).

VIP, beyinde hipotalamusun suprakiazmatik çekirdek, pankreas ve bağırsak gibi birçok dokuda üretilir. Genel olarak görevleri aşağıdaki gibi sıralanabilir: (http-4).

- ✓ Sindirim sistemiyle ilgili olarak düz kasları gevşetir (yemek borusu, mide, safra kesesi), pankreas ve safra sıvısının salgılanması için uyarır, gastrik asidin salgılanması ve bağırsaktan emilimini engeller. Düz kas kasılmasını uyarması, kan damarlarını genişletmesi, pankreatik bikarbonat salgılanmasını uyarması, gastrik asit salınmasını inhibe eden bileşikler uyarmasının yanında bağırsaktaki en büyük rolü su ve elektrolit salgılanmasını uyarmaktır. Bu etkiler hareketliliği arttırmak için birlikte çalışır.
- ✓ Mide hücrelerinden pepsinojen salınımını uyarır.
- ✓ Bazı otonomik sinirler ve beyinde bulunur. Beynin suprakiazmatik çekirdek (SCN) denilen bölgesinin özel bir kısmında bulunur. VIP, bu bölgedeki özel beyin hücreleri arasındaki iletişimde önemli rol oynar.
- ✓ VIP prolaktin hormonu salınımını düzenlemeye yardımcı olur.
- ✓ VIP kalpte de bulunur ve kardiyovasküler sisteme önemli etkisi vardır, koroner damar genişlemesine sebep olur. Kalp yetmezliğinin tedavisinde yararlı olabilmesi için araştırmalar yapılmaktadır.
- ✓ Büyüme hormonu salgılayan hormon (GH-RH) VIP ailesinin bir üyesidir ve ön hipofiz bezinden büyüme hormonu salgılaması için uyarır.

Ayrıca glikojenolizi artırır, arteriyel kan basıncını düşürür, otoimmün reaksiyona neden olmadan immün sistemi güçlendirir, beyin hücrelerinde apoptozisi engeller, nöroprotektif etkileri vardır, anti oksidan özellik gösterirler. Bu özellikleri nedeni, septik şok, hemorajik şok, iskemik-reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi çok çeşitli patolojilerde koruyucu ve tedavi edici gücü gündemdedir. VIP'in dünü; vazodilatör bir peptid olarak keşfi, yaygın biyolojik etkilerinin ve ince bağırsaklara ilaveten var olduğu dokuların belirlenmesidir, bugünü; birçok patolojiye karşı koyan güçlü bir doku koruyucu olmasının yanında nöroimmün-endokrin etkileşiminin baş molekülü olmasıdır, yarını; bugün etkin tedavileri olmayan birçok hastalığın özellikle

Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için ilaç geliştirilmesinin umut molekülü olmasıdır (Tunçel ve Korkmaz, 2010).

2.3.2. Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP)

PACAP, sekretin/glukagon ailesinden 27 ve 38 amino asit içerikli olan bir nöropeptittir (Nakamachi, 2016).

PACAP'ın amino asit dizilimi ve fizikokimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir:

✓ PACAP-38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂

✓ Kapalı formülü: C₂₀₃H₃₃₁N₆₃O₅₃S

✓ Molekül ağırlığı: 4534,26 Da (http-5)

✓ Çözücü: Suda ve etanolde çözünür. Sulu çözeltisi 4°C'de stabil değilken, 10⁻⁴ M derişimdeki çözeltisi -80°C'de 1 yıl stabildir (Nakamachi, 2016).

✓ PACAP içeriğindeki 7 Lys ve 4 Arg amino asidi ile bazik özellik taşımaktadır.

İlk olarak, 1989 yılında, koyun hipotalamusunun ekstraktından izole edilerek keşfedilmiştir (Miyata vd., 1989).

Önemli biyolojik fonksiyonlarda yer aldığı düşünölen PACAP'ın dizilimi ilkel canlılardan memelilerin evrimine kadar oldukça iyi korunmuştur. PACAP beyinde ve çevre organlarda (özellikle endokrin pankreas, solunum ve ürogenital yollarda) oldukça yaygın bulunmaktadır (Vaudry vd., 2000).

PACAP, eşit biyolojik aktivitedeki formlarda 27 aminoasit (PACAP27) ve 38 aminoasit (PACAP38) den oluşmaktadır. Peptitlerin her ikisi de N terminal bölgedeki konformasyonu ve dizilimi aynı olmasına rağmen, PACAP-38'in C terminal dizisi 1-27 bölgesine esnek bağlanmasıyla kısa bir sarmal sergiler. Endojen PACAP'ların çoğu PACAP-38 şeklindedir. PACAP'ın temel dizilimi nispeten en yakın hormon olan VIP ile %68 aynıdır (Goyal ve Pisegna, 2014). PACAP-38 ve PACAP-27'nin amino asit dizilimi aşağıdaki gibidir:

PACAP-38 HSDGIFYDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK-NH₂

PACAP-27 HSDGIFYDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH₂

PACAP reseptörlerinin moleküler klonlanması üç ayrı reseptör varlığını göstermiştir; çok sayıda dönüşüm sistemiyle eşleştirilen PACAP'a özgü PAC1 reseptör ve PACAP/VIP'ten farklı adenilil siklaz ile eşleştirilen VPAC1 ve VPAC2 reseptörleridir. PAC1 reseptörü özellikle beyinde adrenal ve hipofiz bezlerinde oldukça bol bulunurken VPAC reseptörleri aslında karaciğer, akciğer ve üreme organlarında bulunmaktadır. PACAP ve PACAP reseptörlerinin geniş dağılımı peptidin biyolojik fonksiyonlarını ve farmakolojik etkilerini belirlemeye yönelik çalışmaların artmasına sebep olmuştur (Vaudry vd., 2000).

Serebral iske mi ya da inme, beyine kan akışının azalması ile karakterize edilir. Kan akışının tıkanma derecesine bağlı olarak inmenin global ve fokal olmak üzere iki tipi vardır. Global inme toplam kan akışının kaybedildiği zamanlarda meydana gelirken, fokal inme serebral arter tıkanıklığı nedeniyle kan akışının kesildiği zaman bölgesel olarak meydana gelir. PACAP'ın nöroprotektif potansiyeli Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, travmatik beyin hasarı veya felç gibi akut nörolojik durumlar ve nörodejeneratif hastalıkları için in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Fokal inme sonrasında enfarktüs hacmi, ödem ve nörolojik eksiklikler PACAP yoksunu farelerde vahşi hayvanlardan daha fazladır. Bu durum nöronal korumada endojen peptitlerin kritik rolünü gösterir. Az miktarda PACAP varlığının beyni korumak için yeterli olduğu düşüncesi intraserebroventriküler yöntemi ile sıçan üzerinde yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Dejda vd., 2011).

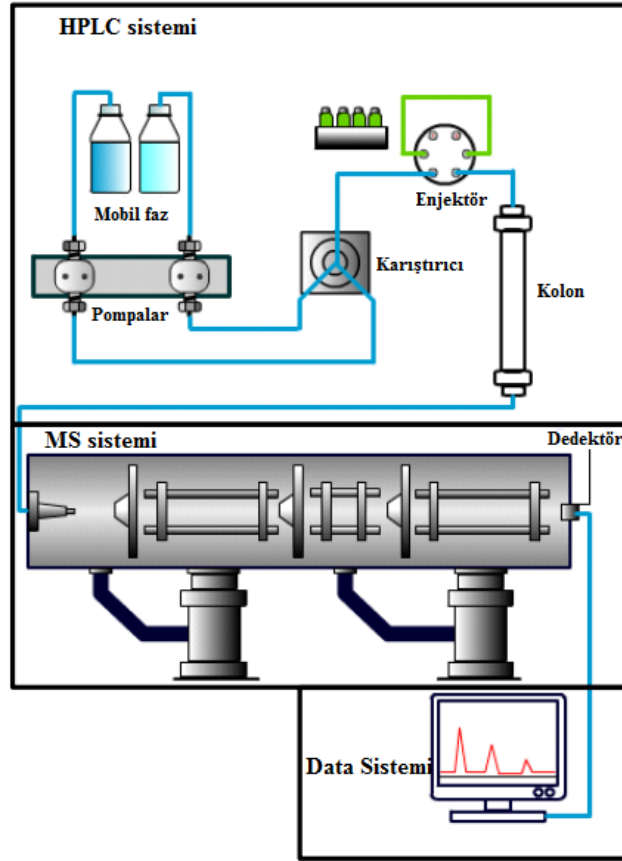
2.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

MS ile desteklenmiş sıvı kromatografi cihazları laboratuvarlar için ideal analitik araçlardır. Çözülmüş halde bulunan herhangi bir karışım sıvı kromatografi kolonunda bileşenlerine ayrılırken, MS'te ayrılan maddeler iyonize hale getirilerek her bileşen için molekül ağırlığı tanımlanabilir. Bir LC-MS/MS sisteminde moleküle ait ana iyon karakteristik bir parçalanma ile parça iyonlarına dönüşebilir ve bu iyonlar molekülün tanımlanması ve miktar tayininde kullanılabilir (McMaster, 2005, s. 1).

MS; iyon, elektriksel alan ve vakum olarak üç temel esastan oluşur. Tekniğin temeli, gaz fazında ve elektrik yüklü olan bileşenlerin vakumlu ortamda uygulanan elektriksel alan veya manyetik alan yardımı ile uçurulmasına dayanır. Bileşenler kütle/yük (m/z) oranlarına göre elektriksel alanda uçuş farklılığı göstermekte ve bu şekilde birbirlerinden ayrımları sağlanmaktadır. Birbirinden ayrılan bileşenler elektrik alan veya manyetik alan ile yönlendirildikten sonra bir yüzeye çarptırılarak elektrik sinyali üretirler. Bunun sonucunda iyonik bileşenler hem birbirinden ayrılmış olur hem de miktarları ile doğru orantılı olarak sinyal üretmiş olurlar. MS'in diğer dedektörlerden farkı bu çalışma prensibi ile ortaya çıkar: bir dedektör olduğu kadar aynı zamanda bir ayırım cihazıdır.

MS'in çalışma prensibi gaz fazında gerçekleştiği için sıvı kromatografi ile uzun yıllar birlikte kullanılamamıştır. Amerikalı bilimci John Bennett Fenn'in atmosferik basınçta iyonizasyon (API) sağlayan elektrosprey iyonlaştırma (ESI) tekniğini bulması ile sıvı fazdaki bileşenlerin iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilmeleri mümkün hale gelmiştir. Bu çalışma ile John B. Fenn 2002 Nobel Kimya Ödülü'nü alan kişilerden biridir (Herschbach & Kolb, 2014, s. 9-11). Bu buluş ile sıvı fazdaki bileşenler MS'e girmeden bir ara ünite ile iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilmektedir. Böylelikle sıvı kromatografinin ayırım gücü MS'in seçiciliği ve hassasiyeti ile birleştirilmiştir.

Bir LC-MS sistemi; Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC), gaz fazına geçişi ve iyonlaşmayı sağlayacak olan API ünitesi ve MS'in birbiri ardınca bağlanmasından oluşur. Bir MS sistemi ise genel olarak vakum pompaları, iyonları kütle analizörüne yönlendiren iyon optikleri, kütle analizörü, iyonlardan elektrik sinyali elde edilen dedektör, tüm bu verilerin toplandığı ve işlendiği bilgisayar ve yazılımdan meydana gelmektedir (Görsel 2.2).



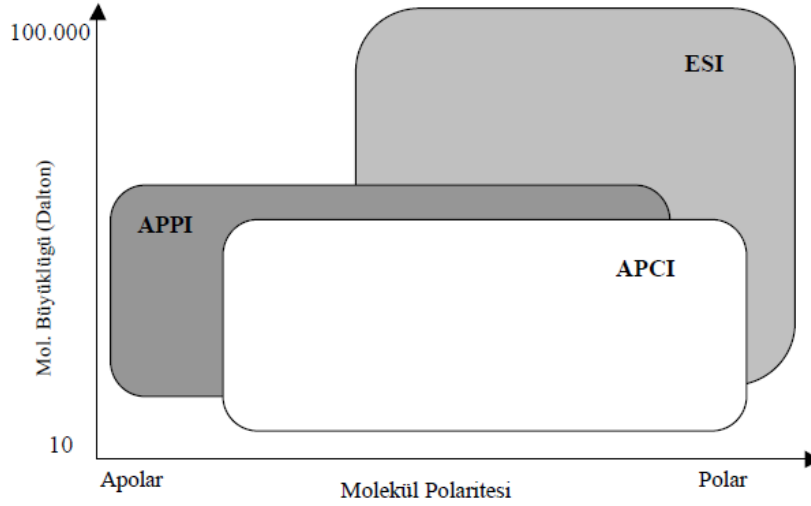
Görsel 2.2. Bir LC-MS/MS sistemi (<http-6>)

2.4.1. İyonlaştırma yöntemleri

Numuneler iyon kaynaklarında analiz öncesi iyonize hale gelirler. MS’te kullanılan çeşitli iyonlaştırma yöntemleri vardır. Burada en önemli nokta, iyonlaşabilen analitin fizikokimyasal özellikleri ve iyonizasyon süreci boyunca aktarılan iç enerjidir. Bazı iyonizasyon teknikleri oldukça güçlüdür ve yoğun parçalanmaya yol açarlar. Diğerleri ise daha yumuşak ve sadece moleküler türlerin iyonlarını oluştururlar. Elektron iyonizasyonu ve kimyasal iyonizasyon yalnızca gaz fazında moleküller için geçerlidir. Bunların kullanımı için bileşiğin uçucu ve termal olarak kararlı olması gerekir (Hoffman ve Stroobant, 2007, s. 15).

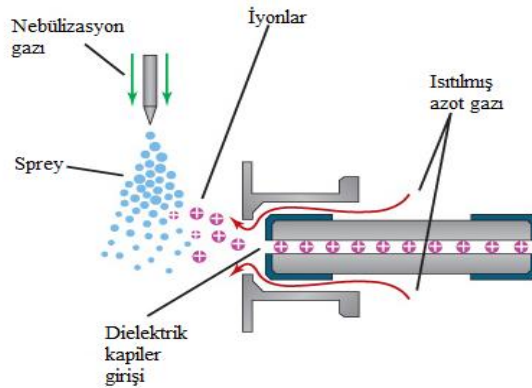
İyon kaynakları sıvı faz ve katı faz olarak ikiye ayrılır. Sıvı faz iyon kaynağında analit çözeltisi içerisinde. Analit çözeltisi spreyleme işlemi ile iyon kaynağına gelir ve damlacıklar haline dönüşür, atmosferik basınç altında iyonlar üretilip vakum altındaki MS’e gönderilir. ESI, atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınçta foto iyonizasyon (APPI) bu tip iyon kaynaklarındandır. İyonlaştırılacak

bileşenin moleküler büyüklüğü ve polaritesine bağlı olarak bu üç iyonlaştırma tekniği arasında seçim yapılmaktadır (Hoffman ve Stroobant, 2007, s. 15).



Görsel 2.3. İyonlaştırma yöntemlerinin seçimi (Tsoupras, 2005)

ESI yönteminde, sıvı kromatografiden gelen ve analiti içeren hareketli faz elektriksel bir alana azot gazı ile spray edilir. Spray sırasında sıvı halde bulunan hareketli faz damlacıklarına dönüşür ve damlacıklar giderek küçülerek içerisindeki iyonlar Coulomb patlamasına neden olurlar. Bu şekilde sıvı fazdan kurtulan iyonlar elektrik alan yardımı ile kütle analizörüne doğru hızlandırılır. Kütle analizörüne gelmeden hemen önce etrafındaki olası çözücülerden kurtulmak için desolvatizasyon (çözücü uçurma) ünitesinde sıcak azota maruz bırakılır ve tamamen gaz fazına geçmesi sağlanır.



Görsel 2.4. Elektrosprey iyonlaştırma tekniği (<http-7>)

En yumuşak iyonizasyon tekniği olup polar bileşikler için ideal bir yöntemdir. Bu bileşikler arasında proteinler, peptitler, nükleik asitler, farmasötikler ve doğal ürünler sayılabilir.

APCI yönteminde, hareketli fazın belirli bir sıcaklığa yükseltip gaz fazına dönüşmesi sağlanır. Gaz fazına dönüşen hareketli faz içerisindeki bileşikler ve kimyasallar elektrik yüklü bir iğneye (corona) doğru püskürtülür. İğne üzerindeki elektriksel alan ile uyarılmış bileşikler ve hareketli faz içerisindeki kimyasallar arasında proton aktarımı ile iyonlaşma gerçekleşir. Oluşan iyonlar ısıtılmış azot ile olası çözücüsünden uzaklaştırılıp kütle analizörüne gönderilir.

APPI yönteminde ise hareketli fazın yine belirli bir sıcaklığa yükseltip gaz fazına geçişi sağlanır. Bu yöntemde Ultraviyole (UV) radyasyonu yayan lamba kullanılır. UV lambasından gönderilen fotonların enerjisi ile sprey halindeki bileşenler iyonlaştırılır. Diğer iki yöntemde de olduğu gibi oluşan iyonlar ısıtılmış azot ile olası çözücüsünden uzaklaştırılıp kütle analizörüne gönderilir.

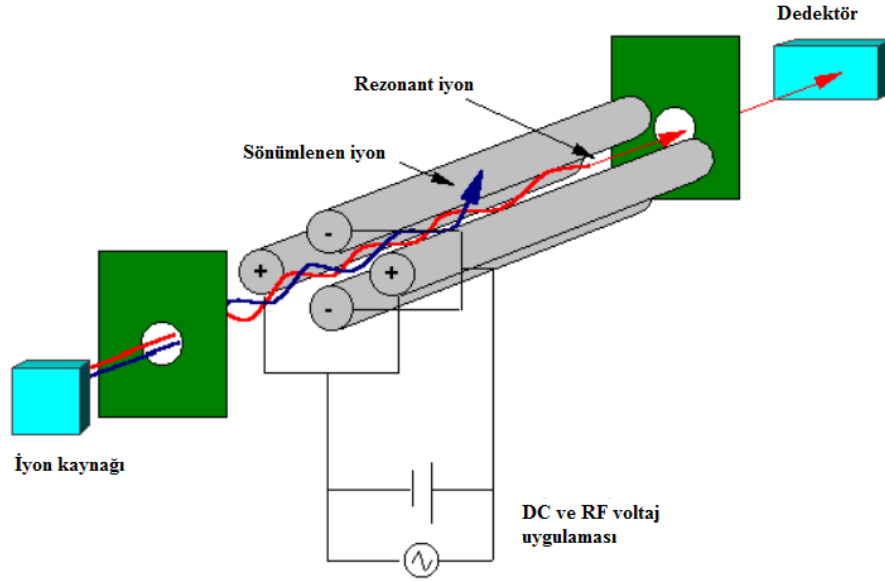
Katı faz iyon kaynağında ise analit uçucu olmayan bir katmanda yer alır. Bu katman genellikle bir katı veya viskoz bir sıvı olan bir matriksi içeren çeşitli hazırlama yöntemleri ile elde edilir. Numuneyi içeren bu matriks enerji parçaları veya fotonlar ile uyarılır ve açığa çıkan iyonlar analizöre yönlendirilir. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI), plazma desorpsiyon ve alan desorpsiyon kaynakları bu yöntemler arasında yer alır (Hoffman ve Stroobant, 2007, s. 15).

2.4.2. Kütle analizörleri

Kütle analizörleri MS'in en önemli kısmı olup analitlerin gaz fazında vakum altında uçurulduğu ve m/z oranlarına göre birbirinden ayrıldığı kısımdır. Farklı geometrilerde, farklı m/z aralıklarına uygun ve farklı çözünürlükteki kütle analizörleri şöyle sıralanabilir: Dört çubuklu (Quadrupole), iyon tuzağı (Ion-trap) ve uçuş zamanlı (Time of Flight, TOF) (McMaster, 2005).

Dört çubuklu kütle analizörü LC-MS sistemlerinde en yaygın kullanılan kütle analizörü olup tetragonal olarak yerleştirilmiş dört çubuktan oluşur. Çubuklara karşılıklı olacak şekilde negatif doğru akım (-DC) ve radyo frekansı (RF) ile pozitif doğru akım (+DC) ve RF uygulanır. Meydana gelen elektrik ve manyetik alanda iyonlar m/z 'lerine

göre uçarlar. İyon kaynağından dedektöre kadar olan uçuş süresi (dwell time) içerisinde çubuklara uygulanan RF ve DC değerleri DC/RF oranı sabit kalacak şekilde doğrusal olarak değiştirilerek farklı m/z 'deki iyonların dedektöre ulaşması sağlanır. Dedektöre ulaşamayan iyonlar ise sönmümlenirler (Görsel 2.5).



Görsel 2.5. Dört çubuklu kütle analizörü (<http-8>)

Bir parçalama ünitesi ile ayrılmış iki adet dört çubuklunun seri bağlanması ile ‘tandem (dizili) kütle analizörü’ olarak bilinen (QQQ) analizörler elde edilir. Parçalama ünitesi (collision cell) silindirik yapıda ve altı veya sekiz çubuktan oluşmaktadır. Burada iyon ayırımı veya taraması yapılmaz. Sadece çubukların arasındaki boşluktan uçan iyonlara inert bir gaz (azot, helyum gibi) ile elektrik enerjisi verilir ve parçalanmaları sağlanır. Parçalama yapılmadığı zamanlarda ise bu kısım iyonları birinci dört çubukludan üçüncü dört çubukluya iletmekle görevlidir (Hoffman ve Stroobant, 2007, s. 189-194).

Tandem kütle analizörlerinde ana kütle m/z 'lerinin tayininin yanında ana kütleyle ait parçaların da tayininin yapılması mümkündür. Ana kütleyle ait fragmanlar iyi bir kalitatif analiz verisi olabildiği gibi bu fragmanların biri veya birkaçı ile oldukça hassas ve seçici kantitatif analiz de yapılabilir. Bu yönü ile tandem kütle analizörleri hem yapı tayininde hem de miktar tayininde kullanılan benzersiz cihazlardır.

Tandem kütle analizörlerinde tarama (SCAN), seçilmiş iyon analizi (SIM) ve seçilmiş reaksiyon analizi (SRM) gibi farklı uygulamalar mevcuttur (Hoffman ve Stroobant, 2007, s. 189-194).

Sistemin birinci dört çubuklu kısmında DC ve RF değerleri değiştirilerek farklı m/z 'deki iyonların ikinci ve üçüncü dört çubukludan geçip detektöre ulaşması sağlanır ve bu şekilde SCAN yapılmış olur.

Birinci dört çubukluda DC ve RF değeri sabit tutularak belirli bir m/z 'deki iyon, ikinci ve üçüncü dört çubukludan direkt geçerek detektöre ulaşır. Bu işlem ile SIM gerçekleştirilir. Belirli bir m/z 'deki iyonla ait kütle spektrumu elde edilip kalitatif amaçlı kullanılabilir.

MS/MS uygulaması ile ana kütleyle ait parçaları taramak mümkündür. İlk dörtlüde belirli bir m/z 'deki iyon seçilip (SIM yapıp) parçalama ünitesine ulaştırılır. Burada ana kütle parçalanıp oluşan fragmanların hepsi üçüncü dörtlüden direkt geçerek detektöre ulaşırsa fragman taraması yapılmış olur. Bunun sonucunda ana kütle parçalanma ürünlerine ait kütle spektrumu yani kalitatif verileri elde edilmiş olur.

Bunun yanında, birinci dörtlüde seçilen belirli m/z 'deki iyon (SIM yapılarak) parçalama ünitesinde fragmanlarına parçalanıp üçüncü dörtlüye aktarılır. Üçüncü dörtlüde bu fragmanlardan biri ya da birkaçı seçilerek detektöre gönderilir (üçüncü dörtlüde tekrar SIM yapılır). Üçüncü dörtlüde bir iyon seçilerek yapılan analizler SRM, birden fazla iyonun seçilmesi ile yapılan analizler ise çoklu reaksiyon gözlemlenmesi (MRM) olarak adlandırılır. Bu işlem ile elde edilen verilerde analiz gürültüsü azalmakta, sinyal-gürültü oranı diğer uygulamalara göre artmakta ve düşük dedeksiyon seviyelerinde bile kantitatif analizleri mümkün kılmaktadır.

İyon tuzağı sistemlerinde iyonlar elektrik alan ile bir tuzağın içerisinde hapsedilmektedir. Uygulanan RF ile iyonlar detektöre sıralı bir şekilde gönderilebilirken, istenen iyon ya da iyonlar tuzağın içinde bırakılıp alternatif akım ile parçalanabilmektedir. Bu işlem sürekli tekrarlanabildiğinden iyon tuzağı kütle analizörleri n sayıda iyon izolasyonu ve parçalama işlemi yapabildiğinde MS^n şeklinde gösterilmektedir. Ancak iyonları belirli zaman aralıklarında paketler halinde aldığı ve bu durumun iyon kaybına neden olması sebebi ile kantitatif analiz hassasiyeti yönünden tandem kütle analizörlerine göre düşük verimdedirler (McMaster, 2005, s. 74-78).

TOF sistemleri tek bir kütle analizöründen oluşup SIM ve tarama uygulamasını gerçekleştirebilirler, parçalama işlemi yapamazlar. Genellikle MALDI iyonlaştırma tekniği ile birlikte büyük moleküllerin ayırımı ve yüksek çözünürlüklü olarak kütle tayini yaparlar. Temel olarak, iyonlaştırılan bileşenler iki plaka arasına uygulanan elektriksel alan yardımı ile uçurularak detektöre varış zamanlarına göre birbirlerinden ayrılıp kütle tayinleri yapılabilir. Diğer kütle analizörlerine göre kütle kesinliği oldukça yüksek olup virgülden sonra dört basamağa kadar hassasiyetle sonuç verebilir (McMaster, 2005, s. 79-81).

2.5. Peptit Analizlerinde Kütle Spektrometrisinin Önemi

Uzun yıllar biyomoleküllerin vücut sıvılarından ve dokulardan analizinde immünoanaliz yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak yöntemin spesifikliği maddelerin çapraz etkileşiminden dolayı oldukça düşüktür. Biyolojik sistemlerde bulunan peptitlerin doğasındaki heterojenlik (deaminasyon, oksidasyon vb. gibi birçok modifikasyondan dolayı) radyoimmünoanaliz (RIA) ile elde edilen sonuçların yorumlanmasında problemler meydana getirmektedir. Biyolojik ekstraktların ters faz HPLC ile ayırımı RIA'nın spesifikliğini attırsa da yeterli olmamaktadır (Nilsson vd., 1998).

Modern kütle spektrometrisi yöntemi, biyomoleküllerin aminoasit dizilimi ve tam molekül kütlesi hakkında bilgi edinmeye izin vermektedir. Teknolojinin gelişmesi ile ESI-MS ve MALDI-MS kullanımı tıp ve sinir bilimi alanlarında oldukça yaygınlaşmıştır. Molekül kütlesini doğru ölçüm yeteneği ile diğer metotlara göre üstünlük sağlamaktadır. Asetilasyon, amidasyon, fosforilasyon ve glikolizasyon gibi modifikasyonları da tanımlamaya ve doğrulamaya yardımcı olur. Ayrıca yeni nöropeptitlerin analizi ve tanımlanması için MS ile elde edilen aminoasit dizilim bilgisi de oldukça büyük önem taşır (Nilsson vd., 1998).

Protein ve peptitlerin MS ile analizlerinin mümkün olmasını sağlayan, aslında yapılarının buharlaştırma/iyonizasyon sırasında MALDI/ESI gibi yöntemler ile bozulmamasıdır. Bu yöntemler ile iyonizasyon, proton eklenmesi ya da ayrılması şeklinde gerçekleşir. Bu nedenle molekül ağırlıklarına ait bilgiler oldukça kesin elde edilir (Trauger vd., 2002).

MALDI ve ESI her birinin spesifik avantajlarının olduğu çok farklı tipte iyonizasyon kaynaklarıdır. MALDI, kompleks bileşiklerin bile üstesinden gelebiliyorken; ESI doğrudan LC'nin ara yüzü olabilmektedir. MALDI-TOF veya ESI-Quadrupol/ESI-Ion Trap gibi standart analizörler ile olan performansları açısından düşük kütle aralıklarında benzerdirler. Fakat ESI-Quadrupol peptit analizlerinde daha iyi ayırım ve doğruluk sağlama eğilimindedir. ESI, MALDI'ye göre daha düşük duyarlılığa sahipken bu özelliğini nano-ESI ile geliştirmiştir. Nano-ESI'da sprej iğnesi çok küçük ve kütle analizörünün vakum girişine daha yakın durumdadır. Bu durum verimi artırır ve numune gereksinimini önemli ölçüde azaltır. Akış hızı nl/dak düzeyinde olduğu için damlalar daha küçük oluşur, safsızlıklara karşı daha toleranslı hale gelir. Peptit ve proteinlerin çok düşük miktarlarda bulunduğu ortamlardan analizleri için oldukça uygundur (Trauger vd., 2002).

ESI'nın peptit analizlerinde kullanılıyor olmasının nedenleri;

- ✓ Sıvı kromatografi ile uyumluluğu
- ✓ Tandem MS ile uyumluluđu
- ✓ Yüksek duyarlılık (nano-ESI ile pikomol düzeyine inilebilmesi)
- ✓ Çoklu yüklenmeye izin verip m/z aralığı sınırlı analizörlerin peptit analizlerinde kullanımını mümkün kılması

ESI'nın önemli bir özelliği, çoklu yüklenmiş türler üretebilmesidir. Bu özellik küçük kütle aralığına sahip olan kütle analizörlerinde büyük protein/peptit yapılarının gözlenebilmesini mümkün kılar. Ayrıca tek bir spektrumdan aynı peptit için çoklu yüklenmiş türlerin gözlenmesi, farklı yollardan moleköl ağırlığı hesaplanmasına izin verir. Bu daha doğru moleköl ağırlığı hesaplanmasını sağlar (Trauger vd., 2002).

Peptitlerin analizinde ortaya çıkan soru 'yük durumu nasıl belirlenir?'. Bunun iki yolu vardır: izotop modelinin görüntülenmesi veya bitişik yük durumuna bakılması. Yük durumu gözlenirken ve hesaplama yapılırken bitişik piklerin yükleri karşılaştırılır. Kütle birimi 1'er artıyorsa +1, 1/2'şer artıyorsa +2, 1/3'er artıyorsa +3 yüklüdür ve benzer şekilde devam eder. Bu özelliğinden dolayı ESI ile çoklu yüklenmiş iyon üretilmesi, daha doğru ve eksiksiz fragmentasyon spektrumları verir. Bu da peptitlerin aminoasit dizilimleri açısından önemlidir (Trauger vd., 2002).

Peptit çözeltisinin ESI'da gaz fazına geçerek yüklü iyonlar haline dönüşmesi lizin (Lys), histidin (His) ve Arjinin (Arg) gibi bazik aminoasitlerin protonlanması ile gerçekleşir. Protonlanmanın gerçekleşmesi için ise analitin hem gaz fazında hem de

çözelti formunda (düşük pH'ta) bazik olması gerekir. Genellikle peptidin temel aminoasit dizilimi ve iyonize olabilen amino gruplarının pK_b değeri ESI cevabını etkileyen temel nedenler olarak görülse de durum daha farklıdır. Bunların dışında ESI cevabını yani seçiciliğini, yük dağılımını ve MS spektrumundaki sinyal yoğunluğunu etkileyen diğer parametreler ESI geometrisi, sprej gazın akış hızı, analit derişimi, çözücü ve analitin bazikliği, çözücü yüzey gerilimi, gaz faz bazikliği ve pH'tır. Ayrıca aminoasit tipi, sayısı ve peptidin yapısı yük durumu ve dağılımını en fazla etkileyen faktörlerdendir (Nielsen, 2013).

ESI'da oluşan iyonlar kütle analizörü girişı öncesinde çarpışmaya maruz kalırlar. Kütle analizöründen içeri girecek iyonların enerjisi, meydana gelecek fragmentasyonun miktarını belirleyebilir. Bu enerji, parçalama potansiyeli değiştirilerek ayarlanabilir. Ağza girmiş iyonların enerjisi oraya uygulanacak potansiyel ile belirlenir. Daha düşük enerji ile daha fazla fragmentasyon gözlenir. Buna ek olarak, peptidin yük dağılımının değişmesine sebep olabilir. Bu durum, MS'e giren peptidin daha büyük çarpışma enerjisi gerektirmesi ile ilgilidir. Yüksek potansiyellerde daha fazla proton peptitten ayrılır ve yük dağılımında kaymaya neden olur. Parçalama voltajı artarsa daha büyük yüklü iyonlar oluşur. Örneğin 50 kV ile M^{+2} iyonu oluşur iken 150 kV ile M^{+4} iyonu oluşur (Trauger vd., 2002).

Genellikle LC-MS-ESI sistemlerinde hareketli faza eklenen formik asit (FA), asetik asit (AcAc), amonyum hidroksit gibi kimyasallar ile analit iyonizasyonunun artırılması ve sinyalin iyileştirilmesi hedeflenir. Çözelti pH'ı, ortamdaki asit derişimi arttırıldıkça peptidin asidik yan zincirlerindeki pK_a değerinin altına düştüğü için MS spektrumundaki baskın iyonun yük durumu artar, daha küçük kütleli iyonlar oluşur. Fakat kritik pH noktası geçildiğinde iyon baskılama meydana geldiği için düşük pH'larda elde edilen daha büyük yüklü iyonların MS spektrumundaki sinyal miktarı düşebilir. Bu yüzden pH ayarlama önem kazanır (Nielsen, 2013).

Hareketli faz akış hızının düşmesi temel iyon pikinin gözlenmesinde olumlu rol oynar. En iyi ESI cevabı sprej gazı varlığında elde edilir. Akış hızı $\mu\text{l}/\text{dak}$ olarak çalışılırken ESI cevabı doğrudan analit derişimine bağlı hale gelir, çünkü akış hızı üzerinde yapılan değişiklikler sinyal yoğunluğuna önemli bir etki yapmaz. Fakat akış hızı nl/dak olarak çalışıldığında iyonizasyonun yaklaşık 100 kat arttığı ve ESI cevabının direkt olarak akış hızı ile orantılı olduğu gözlenir (Nielsen, 2013).

Analit derişiminin artması peptit üzerindeki protonlanmada meydana gelen yarışmadan dolayı düşük m/z'ye sahip iyonların görölmesini engellemektedir. Bu nedenle düşük analit derişimi ile daha büyük yüklü iyonlar elde edilirken, yüksek analit derişimlerinde küçük yüklü iyonlar elde edilir (Nielsen, 2013).

İyonizasyon öncesi peptitlerin çözünürlüğüne ek olarak hareketli faz içeriğı de önem kazanmaktadır. Hareketli faz içerisindeki çözücünün analitin yük durumuna etkisi ve ESI'de yüklü damladan çözücünün buharlaştırılabilmesi oldukça önem taşır. Daha uçucu çözücü karışımlarında (metanol (MeOH), diklorometan gibi) daha büyük yüklü türler baskın hale gelir. Bu durum damlaların etrafındaki çözücülerin daha hızlı buharlaşması nedeniyle oluşur. MeOH'ün buhar basıncı asetonitril (ACN) veya izopropil alkol (IPA)'ya göre daha yüksek (kaynama noktası daha düşük) olduğu için damlalardan daha hızlı uzaklaşır. Ancak daha düşük uçuculuktaki çözücülerle de büyük yüklü iyonlar elde edilebilir. Çünkü peptidi içeren damlaların oluşumundan hemen önce çözücünün büyük kısmı buharlaşabilir. Bunun yanı sıra bazı peptitler için çözücü uçuculuğunun değişmesi, baskın yük durumunu değiştirmeyebilir. Fakat MeOH, IPA gibi protik özelliğı olan çözücülerin kullanımı ESI cevabını yani iyon yoğunluğunu ACN, diklorometan gibi aprotik çözücü kullanımına göre arttırmaktadır (Nielsen, 2013; Giorgianni vd., 2004).

Aminoasit içeriğı ve peptit polaritesi açısından değerlendirildiğinde ESI'daki iyon yoğunluğu zincirin ucunda Arg bulunması > apolar peptit > polar peptit olarak sıralanabilir. Arjininin N- ya da C- terminalde olması peptidin elektronegatifliğini arttırır, pozitif ESI için seçici bir durum oluşturur ve sinyal yoğunluğu artar (Nielsen, 2013).

Hareketli faza elektrolit eklenmesi ile (amonyum asetat gibi) baskın iyonun yük durumu azaltılabilir. Ortamdaki elektrolit miktarının artışı ile orantılı olarak yük dağılım durumu da daha düşük seviyelere inebilir (Nielsen, 2013).

2.6. Peptit/Proteinlerin Yüzeye Adsorpsiyonu

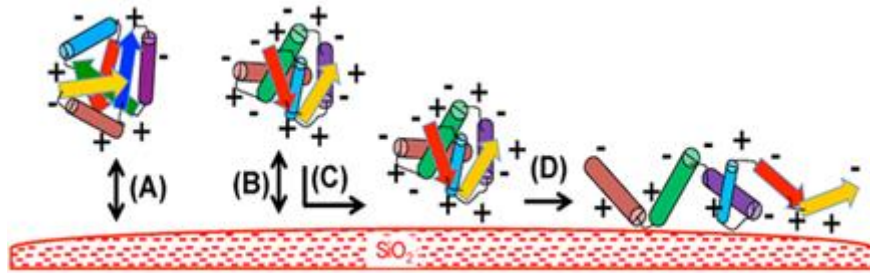
Peptit/proteinler yapılarındaki polar, nonpolar ve yüklü kısımlardan dolayı silikaya hidrojen bağı veya iyonik etkileşim ile adsorbe olurlar. Bu durum üç problemi ortaya çıkarır (Baker, 1995, s. 223-226):

- ✓ Peptit/protein silikaya adsorbe olduğu için kolonda kalıp dedektörün önünden geçemez.

- ✓ Düşük peptit/protein derişimlerinde tamamı adsorplanabilir.
- ✓ Adsorpsiyondan dolayı kuyruklanmış ya da genişlemiş pikler görülebilir.

İnorganik yüzeyler ile protein etkileşimi çalışmalarında referans materyal silika (SiO_2)dır. Kristaline silika yüzeyleri silanol grupları (Si-OH) ve siloxan köprülerinden ($-\text{Si-O-Si}-$) oluşur. $\text{pH} > 3$ olduğunda silanol grupları deprotonlanarak negatif yüklü Si-O^- yüzeyler haline dönüşür.

Proteinin silikaya adsorpsiyonu hem proteinin elektrostatik özellikleri hem de yüzeyde yapısal deformasyonun indüklenme yeteneği sonucunda oluşur. İyonik etkileşim ve hidrojen bağları ile elektrostatik etkileşim en önemlisidir. Özellikle Lys, Arg gibi nötral pH 'ta pozitif yüklü bazik amino asitler elektronegatif silika yüzeyler ile elektrostatik etkileşim kurduğu için önemlidir (A-B). Bu basamağın tersinir olduğu düşünülür. Adsorpsiyon basamağının diğer aşamasında ise proteinlerin sertlik-yumuşaklığına bağlı olarak değerlendirme yapılır. Sert ve sıkı yapılı proteinler (aromatik özellikli kalıntıları fazla) yüzeyde dağılmazken, zayıf iç bağları olan proteinler (aromatik özellikli kalıntıları az) ise dağılmaya daha yatkındır ve etkileşimin artacağı şekilde yüzeyde yayılarak yeniden yapısal bir form oluşturur. Bu değişim boyunca siloksan köprüleri gibi hidrofobik kısımlar ile proteinin hidrofobik kısımları birbirlerine maruz kalıp etkileşirler. Adsorpsiyonun bu basamağı tersinmezdir (C-D) (Mathé vd., 2013).



Görsel 2.6. Protein/peptitlerinlerin yüzeye adsorbsiyonu (Mathé vd., 2013)

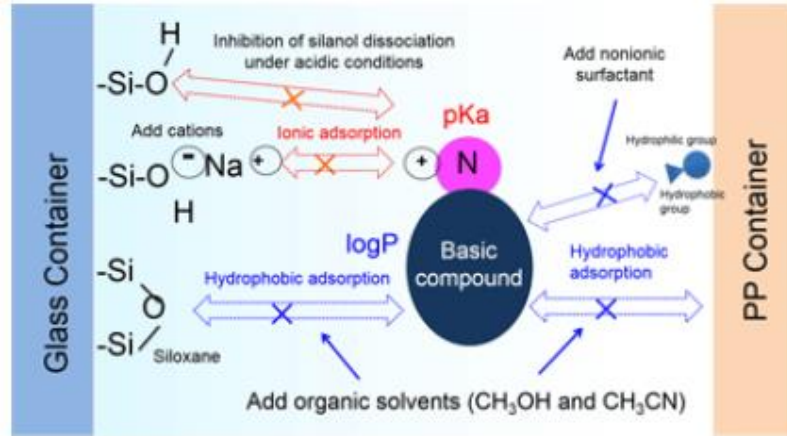
Adsorpsiyon süreci esas olarak; protein yeniden düzenlenmesinden ve kütledeki su moleküllerinin serbest bırakılmasından doğan bir entropi kazanımı tarafından yönetilir. Termodinamik bakımından, itici güç, proteinin yapısal yeniden düzenlenmesi ile birlikte yüzeye bağlı su molekülleri ve tuz iyonlarının giderilmesi ile ilk aşamada esas olarak entalpi ve ikinci aşamada entropi olacaktır (Mathé vd., 2013).

Ancak protein adsorpsiyonuna karşı meyilli ya da dirençli olduğunu belirleyen fizikokimyasal parametreler durumu kesin olarak tanımlayamaz. Örneğin, yüksek oranda pozitif yüklü amino asit ve düşük miktarda kalıntı içerdiği bilinen sert proteinlerin adsorpsiyona yatkın olması beklenir. Fakat deneysel çalışmalar bazı spesifik amino asitlerin adsorpsiyon sürecini teşvik edici ya da engelleyici bir durumu olduğunu göstermemiştir. Genellikle protein adsorpsiyon çalışmaları lizozim veya serum albümin gibi belirli proteinler üzerine yapılmıştır. Bu yüzden sonuçları genellemek doğru olmayabilir (Mathé vd., 2013).

Numune hazırlama sırasında kullanılan malzemeler genellikle cam ve polipropilen/ polietilen olmak üzere iki çeşittir. Cam malzemelerin yüzeyleri yüksek oranda hidrofilik silanol ve hidrofobik siloksan (yüksek sıcaklıklarda silika jelinin erimesi / oluşumu sırasında ortaya çıkan dehidrate silanoller) grupları ile kaplıdır. Bir sulu çözelti içinde, cam malzemeler eşzamanlı olarak moleküllerin silanol gruplarına iyonik adsorpsiyonu (pozitif iyon değiştirme modu) ve siloksan gruplarına bağlı hidrofobik adsorpsiyon (ters faz) üretmektedir. Bu iyonik adsorpsiyon olgusu, bazik moleküller için analiz kolonlarındaki silanollerin neden olduğu alıkonma zamanında artış ve pik kuyruklanması durumu ile benzerdir. Plastik malzemelerde ise molekül ağırlığı büyük polimerlerin neden olduğu adsorpsiyon hidrofobik adsorpsiyondur. Yani, adsorpsiyon olayı, malzeme materyaline bağlı olarak değişiklik gösterir ([http-9](http://9)).

Bu karakteristik özelliklerden dolayı, yüksek pKa değerine sahip bazik bileşikler cam yüzeye (silanollere) ve büyük logP değerine sahip bileşikler de hem cam hem de plastik yüzeye adsorplanmaya eğilimlidir. Bu nedenle adsorpsiyonu engellemek için numune hazırlığı sırasında dikkat edilmesi gereken noktalardan biri de ilgili bileşiğin fizikokimyasal özelliklerine göre (pKa ve logP gibi) cam ya da plastik malzeme seçimi olmalıdır.

Asidik ve nötral bileşikler cam ve plastik yüzeye hidrofobik etkileşim ile adsorbe olurlar. Bu nedenle, ortama MeOH, ACN gibi bir organik çözücü ya da noniyonik yüzey aktif madde eklenmesi adsorpsiyonu engelleyebilir. İlgili bileşiğin logP değerine bağlı olarak %10-50 oranında organik çözücü ya da %0,1 yüzey aktif madde eklemek numune hazırlama sırasında adsorpsiyonu azaltmak için etkili olabilmektedir. Bazik bileşikler için numune hazırlama sırasında malzeme seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar vardır çünkü bazik bileşik farklı mekanizmalar ile cam ve plastik yüzeye adsorbe olur.



Görsel 2.7. Adsorpsiyonu mekanizması ve engelleyeyici yöntemler (http-9)

Bazik bileşikler cam yüzeylere hem iyonik hem de hidrofobik olarak aynı anda adsorbe olurlar. Bu nedenle, numune hazırlama, her iki adsorpsiyon mekanizmasına karşı koymak için ayarlanmalıdır. Ortama NaCl gibi bir tuz eklenmesi, Na^+ iyonlarının negatif yüklü silanolleri kapatması nedeni ile iyonik adsorpsiyonu azaltabilir. Alternatif olarak, silanollerin iyonlaşmasını engellemek için numune hazırlama işlemi asidik koşullarda gerçekleştirilebilir. Bunun için fosforik asit, asetik asit vs. eklenebilir. Asidik ve nötral bileşiklerdeki olduğu gibi hidrofobik adsorbsiyon ise ortama organik çözücü ya da noniyonik yüzey aktif madde eklenmesi ile engellenebilir. Bazik bileşikler plastik malzemelerde de hidrofobik adsorpsiyona yol açar, bu yüzden bu adsorpsiyonu azaltmak için numune çözeltisine organik bir çözücü veya noniyonik yüzey aktif madde eklenebilir (http-9).

Peptitler ile çalışırken dikkat edilmesi gereken diğer bir konu ise hem çözelti hem de numunede saklama sırasında oluşabilecek agregasyondur. Agregasyon, stok çözelti içerisinde peptidin kendi içinde veya başka peptitler ile oluşturacağı kovalent veya kovalent olmayan bağlanmadır. Kovalent bağlanma; disülfid bağları veya ester ve amid bağları ile oluşurken, kovalent olmayan bağlanma ise peptidin yüklü kısımları arasında meydana gelir. Agregatlar küçük olabilir, iki peptit dimeri, üç peptit ise trimeri oluşturabilir. Bunlar dondurma işleminden çok etkilenmez ve daha çözünür özelliktedir. Daha büyük agregatlar çözünür olmayabilir, bir kez oluştu mu tekrar çözünmeyebilir. Bu durumun doğasından dolayı Alzheimer hastalığı gibi hastalıkları tetiklediği düşünülür (Li vd., 2013, s. 152).

Agregatlar genellikle yüksek konsantrasyonda veya yüksek sıcaklık, pH koşulları, dondurma ve çalkalama ile oluşabilir. Hatta bu son ikisi (dondurma ve çalkalama) biyolojik numunelerin toplanması, kullanılması ve saklanması sırasında sıklıkla karşılaşıldığı için özellikle önemlidir (Li vd., 2013, s. 153).

Biyolojik matriksteki peptitlerin başarılı bir şekilde analiz edilmesi için yöntem geliştirme ve validasyonu sırasında oldukça iyi ve dikkatli bir şekilde toplanması, kullanılması ve saklanması gerekir. Özellikle dondurma prosedürünün optimize edilmesine ihtiyaç vardır. Agregasyonu azaltmak için -80°C de saklanmasındansa -20°C tercih edilmelidir. Ayrıca yüzey aktif maddeler gibi bazı ajanların eklenmesinin agregasyona etkisi de araştırılabilir (Li vd., 2013, s. 153).

Adsorpsiyon olayını kontrol etmek ya da azaltmak için bazı ajanlar kullanılabilir. Bunlar CHAPSO (3-([3-Kolamidopropil]dimetilamonyo)-2-hidroksi-1-propansülfonat), Tween 20, Tween 80 gibi bir yüzey aktif madde olabilir. Bunları test etmenin en iyi yolu ardışık tekrarlı transfer deneyidir. Numuneye ajan eklenerek yapılır. Farklı konsantrasyonlarda en az ihtiyaçla optimum olanı bulmak için deneyler yapılır. Çünkü bu ajanların çoğu iyon baskılama ya da arttırması yönünde etki yapacaktır. Seçilen ajanın kullanımı en etkili olduğu en uygun pH değerini araştırarak iyileştirilebilir (Li vd., 2013, s. 152).

Yüzey aktif madde varlığında çözünürlüğe katkısından ve agregasyonu engellediği için peptit/proteinler daha etkili bir şekilde ayrılabilir. Birçok yüzey aktif madde çözücü viskozitesini, yüzey gerilimini ve difüzyon katsayısını düşürdüğü için hareketli faz içerisine eklenebilir. Fakat ters faz kromatografide yüzey aktif maddeler çok dikkatli kullanılmalıdır. Çünkü peptit/proteinlerin yanısıra hidrofobik ligandlara çok güçlü tutunur ve kolonlardan ayrılması neredeyse imkânsız hale gelir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yüzey aktif maddeler peptit/protein ve kolonlara bağlandığı zaman kolonların kromatografik özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca yüzey aktif maddelerin çözünürlüğü tuzların ve organik çözücülerin varlığından etkilenir, çökme ihtimali de dikkate alınarak çalışılmalıdır. Eğer kullanımı kesinlikle gerekli ise bir kolon spesifik bir yüzey aktif madde için ayrılmalıdır (Cunico vd., 1998).

Cam ve plastik yüzeylerde adsorpsiyonu azaltmak için en etkili yöntem hem tuz hem de ya organik çözücü ya da noniyonik yüzey aktif maddeyi aynı anda numune

çözeltisine eklemektir. Adsorpsiyonu engellemenin diğer bir yolu, buzağı serum albümini (BSA) gibi pasive edici bir protein ya da polietilen glikol (PEG) gibi bir bileşik ile tüm yüzeyi doyurmaktır (http-9).

Numune hazırlama sürecinde kullanılan malzemelerin yüzeylerinde meydana gelecek adsorpsiyonu engellemek için BSA'nın çözeltisi hazırlanıp adsorplayıcı yüzeyler bu çözelti ile kaplanabilir. BSA'nın yanısıra farklı kimyasallar (yüzey aktif maddeler, organik çözücüler, PEG gibi) numune hazırlama sırasında çözeltilere eklenebilir (Maes vd., 2014; Li vd., 2010; Xu vd. 2005). Fakat bu şekilde hazırlanmış numunelerin kromatografi ve MS çalışmalarına olan olumsuz etkileri her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

2.7. VIP ve PACAP ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Bir örneğin proteomik/peptidomik analizi 4 basamaktan oluşmaktadır: proteinlerin/peptidlerin numuneden ekstraksiyonu, ayırımları, dedeksiyonları ve ayrılan maddelerin bireysel analizleri/tanımlanmaları şeklindedir (Baggerman vd., 2004). Son zamanlara kadar ayırma ve tanımlama tekniklerinden oluşan belirli tekniklerin ya tek ya da kombinasyon halinde kullanılmasıyla protein çalışmaları yapılmıştır. Bu oluşumlar kromatografi, izoelektrik odaklama, elektroforez ve diğer kombinasyonlarıdır. Bunların ayrılmasını takiben, proteinler çeşitli yaklaşımlarla ya dolaylı olarak (jeldeki büyüklüğüne göre, bir liganda bağlanabilme veya bir liganda olan ilgisine göre) ya da doğrudan protein dizilimi vasıtasıyla (EDMAN degradesyonu ile N-terminalden ya da karboksipeptidaz veya tiyosiyonat degradesyonu ile C-terminalden), ayrıca kütle spektroskopisi kullanılarak tanımlanabilmiştir (Soloviev ve Finch, 2005). Protein/peptid ayrılmasında geleneksel yaklaşımlar birbirini takip eden birçok sayıda saflaştırma basamağına dayalıdır. Örneğin, sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) takiben izoelektrik odaklama, birbiri ardına yapılan kromatografik ayırmalar (terz faz kromatografinin ardından iyon değişim kromatografisi) gibi. Genellikle her bir ayırma saflaştırma basamağı tespit ve miktar tayini aşamalarını takip eder. Sonuç olarak geleneksel proteomik tekniklerin çoğunluğu büyük numune tüketimi, düşük geri kazanım, maliyetleri ve fiziksel sınırlamalarından dolayı kullanımlarını kısıtlar (Baggerman vd., 2004).

Peptit hormonları veya nörotransmitterlerin amino asit dizilimlerinin bilinmesi önemlidir. İmmünohistokimya, RIA, enzim bağılı immünosorbent analizi (ELISA), MS nöropeptitlerin tayini ve dağılımı hakkında bilgi veren diğer yöntemlerdir (Soloviev ve Finch, 2005). Literatürde bu tekniklerin geleneksel ayırma yöntemleri ile birlikte kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Hansen vd. (2013), Wasilewska-Dzubinska vd. (2002) radioimmünoanaliz yöntemi ile VIP ve PACAP analizini gerçekleştirirken, Eftekhari vd. (2014) PACAP ve CGRP'nin analizini radioimmünoanaliz ile gerçekleştirmişlerdir. Matsuda vd. (2002) ise enzim-immünoanaliz yöntemi ile balığın sinir sisteminden PACAP'ın analizi için bir yöntem geliştirmişlerdir.

Soucheleau ve Denoroy (1992), sıçan beyninden VIP tayini için yüksek performanslı kapiler elektroforez (HPCE) yöntemi geliştirmiştir. İlk olarak serebral korteks, katı faz ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiş ve ters faz HPLC ile saflaştırılmıştır. HPLC'de RP 300 C8 kolon (220×4,6 mm, 7µm, 300Å) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak A ve B hatlarının (A: %0,1 Trifloro asetik asit (TFA) ve B: %0,09 TFA-%80 ACN) kullanıldığı bir gradient ile ayırım yapılmıştır. 1,0 mL/dak akış hızında ve 214 nm dalga boyunda çalışılmıştır. VIP yönünden zengin fraksiyonlar UV dedektörlü HPCE cihazının kullanıldığı kapiler zon elektroforez (CZE) ve miselli elektrokinetik kromatografi (MECC) ile analizlenmiştir. Elektroforetik analizler 72 cm x 50 µm'lik çıplak silika kapiler kolonda ve 200 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. CZE'de kullanılan çalışma tamponu farklı pH'larda (2,5-5,0) 20 mM sodyum sitrat tamponudur. 30°C kapiler sıcaklığında 25 kV voltaj uygulanarak analiz yapılmıştır. MECC yönteminde ise 20 mM SDS içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılmıştır. 35°C kapiler sıcaklığında yine 25 kV voltaj uygulanarak analiz yapılmıştır. Endojen VIP piklerinin tespiti farklı pH değerlerinde CZE analiz performansı ile teyit edilmiştir. Geliştirilen HPCE yöntemi VIP'nin iyi bir moleküler spesifiklikle ölçülmesi ve dedekte edilmesine izin vermiş ve radyoimmünoanaliz ile elde edilen verilerin valide edilmesi için referans yöntem olarak sunulmuştur.

Matsuda vd. (1997), PACAP'ın vatoz balığı cinsi bir balığın beyninden izolasyonu ve yapısının belirlenmesi için yapılan çalışmada, AcAc ve aseton yardımıyla beyinden ekstraksiyon yapılmış ve ardından bir jel filtrasyon, bir katyon değiştirici ve iki ters faz kolon ile HPLC tekniği kullanılmıştır. Saflaştırma, bir anti-PACAP 27 serum kullanılarak, SDS-PAGE ve Western blot analizi ile izlenmiştir. Bu şekilde PACAP 44

kalıntıları elde edilmiştir. N-terminal 38 kalıntılı kısmının karşılaştırılabilir kısmının amino asit dizisi değerleri, memelilerdeki ile %92, tavuk ile %89, kurbağa ile %89 ve teleost olarak bilinen balık grubundaki ile %82 benzerlik göstermiştir. Vatozun ekstra altı C-terminal kalıntısı, dört ayaklılarınki ve teleostların PACAP prekürsörlerininki ile benzediği görülmüştür. Bu sonuçlar dört ayaklı ve teleostların PACAP'ları ile yüksek benzerlik gösteren amino asit dizilimine sahip PACAP'ın vatoz beyinde mevcut olduğunu kanıtlamıştır (Matsuda vd, 1998). Aynı yöntemler kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise teleost ailesinden bir balık olan stargazer türü balığın beyinden PACAP benzeri bir peptidin izolasyonu yapılmış ve yapısı incelenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda kütle spektrometrisi ile 4623 g/mol molekül ağırlığına sahip PACAP benzeri bir peptid belirlenmiştir. Bu peptidin amino asit dizilimi koyundaki PACAP ile %89 ve kurbağadaki PACAP ile %87 benzerlik göstermiştir. Bu çalışmalar sonucunda dört ayaklılardaki PACAP ile yüksek benzerlik gösteren PACAP benzeri peptidin stargazer türü balığın beyinde de mevcut olduğu kanıtlanmıştır.

Phillips (1998), doku biyopsi parçalarında nöropeptit konsantrasyonu varlığını belirlemek için bir teknik geliştirmiştir. Bu teknik, rutin patolojik ve klinik incelemelerden elde edilen morfolojik olarak belirli bölgelerin mikro-disseksiyonunun ardından immünoafinite kapiler elektroforezle nöropeptitlerin (substance P, CGRP, VIP ve nöropeptit Y) analizini içermektedir. Bu prosedürde, hareketsizleştirilmiş antikorlar lazer indüklenmiş flüoresans dedektörlü kapiler elektroforez (CE-LIF) ile ayırım öncesinde ilgili analitleri yakalamak için kullanılmıştır. Sistemin avantajı seçilen analitlerin ölçümü için nispeten hızlı bir teknik olmasıdır. Ayrıca yöntem numunenin analiz öncesinde temizlenmesi ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır.

El-Karim vd. (2003), diş eti dokusundan üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile nöropeptit Y ve VIP'i en yüksek verimle ekstrakte etmiş, bu ekstraktları HPLC yöntemi ile analizlemişlerdir. Hareketli faz olarak A: %0,1 TFA/%99,9 su ve B: %0,1 TFA/%99,9 ACN hatlarından 60 dk'lık doğrusal bir gradient ile B içeriği %0'dan 60'a çıkarılmıştır. 4,6×100 mm Brownlee C18 kolonunda, 1 mL/dak akış hızında ve 214 nm'de analizler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma diş etinden VIP ve nöropeptit Y'nin analizlendiği ilk çalışma olmuş, ayrıca oldukça küçük dokularda dahi farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak doğru bir şekilde nöropeptit analizi yapılabileceği kanıtlanmıştır.

Jakab vd. (2004), farklı canlı türlerin merkezi sinir sistemlerinden aynı teknik ve deneysel koşullar altında PACAP-38'in analizi için RIA yöntemi geliştirmişlerdir. Sıçan, tavuk ve balıklardan beyinlerinin farklı bölgeleri ve spinal cord kısmı çıkarılmış ve dokular PACAP-38 analizi için RIA ile analizlenmiştir. Örneklerin fraksiyonlanması ters faz HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 4×25 mm) analiz kolonu ve Merck fraksiyon toplayıcısı kullanılmıştır. Hareketli faz olarak MeOH:%0,1 TFA(v/v) karışımı ile 0,5 mL/dak akış hızında ve 0,5 mL fraksiyon hacminde örnekler sistemden toplanmıştır. PACAP-38 için dedeksiyon limiti 2 fmol/mL olarak belirlenmiştir. PACAP-38 immünoreaktivitesi, sıçandan alınan beyin farklı dokularında en yüksek seviyelerde bulunmuştur. Balıklardan alınan beyin dokusu örneklerinde de PACAP-38 seviyesi yüksek iken, en az tavuk beyin dokusunda tespit edilmiştir.

Borzsei vd. (2009), insan plazması ve insan sütünde PACAP varlığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, laktasyon dönemindeki kadınlardan alınan süt ve sağlıklı kadın ve erkeklerden alınan plazma numunelerinden PACAP-38'in varlığı MS kullanılarak belirlenmiştir. PACAP konsantrasyonu hassas ve seçici bir yöntem olan RIA ile ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda sağlıklı insanlardan alınan plazma örneklerinde PACAP-38'in stabil bir düzeyde olduğu, yaş, cinsiyet, besin alımı ya da kadınlardaki hormonal döngü ile değişmediğini açığa çıkarmıştır. Ancak laktasyon dönemindeki kadınlardan alınan plazmalarda PACAP-38 seviyesi önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca bu çalışma, ilgili plazma örnekleriyle karşılaştırıldığında insan sütünde 5-20 kat daha fazla PACAP-38 olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Abaye vd. (2011), ESI öncesindeki (pre-ESI) faktörlerin (analit derişimi(1-2500ng/mL), hareketli faz içerisindeki FA derişimi (%0,01, 0,1, 1), organik faz içeriğı (%50-90 ACN) ve akış hızı (<10µl/dak) çoklu protonlanma üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada CGRP ve VIP incelenmiştir. ESI-QTOF-MS ile desteklenmiş nanoLC sisteminde 50±5µm i.d., 3,5 cm uzunluğunda kolon kullanılmıştır. 25,5 eV parçalama enerjisinin uygulandığı sistemde her iki peptit için de 300-3500 m/z aralığında spektrum toplanmıştır. pH 3,23 (%0,1 FA), 350-750 nL/dak akış hızı aralığı ve %50 ACN içeriğı optimum koşullar olarak belirlenmiş ve her iki peptit de bu koşullarda en yüksek duyarlılığı vermişlerdir. Doğrusallık analit derişiminin 1-750 ng/mL olduğu aralıkta protonlanmış hal için elde edilmiştir. ACN içeriğinin kritik olduğu vurgulanmış ve ACN

derişimi $\geq 60\%$ olduğu zaman VIP için çeşitli iyon baskılayıcı durumlar gözlenmiştir. Bu durum VIP için daha ağır iyon baskılama derecesi ile karışım halindeki peptitleri etkilemiştir. Bu çalışma, özellikle serbest peptit tayini sırasında tek protonlamanın baskın olmadığı zamanlarda çoklu protonlanmış türün izlenebilmesinin önemini ortaya koymuştur.

Czegledi vd. (2011), geviş getiren hayvanların sütünde ve plazmasında PACAP varlığını RIA yöntemi ile göstermişlerdir. PACAP ve spesifik receptörü olan PAC1'in süt bezlerinde varlığını ve konsantrasyonunu belirlemek için araştırmalar yapmışlardır. Koyun, keçi ve inekten alınan örnekleri RIA yöntemi ile analizlediklerinde hem süt hem de plazmada PACAP'ın varlığını göstermişlerdir. Her bir hayvan için PACAP-38 immünoreaktivitesi plazmaya göre süt örneklerinde 5-20 kat daha fazla bulunmuştur. Benzer şekilde koyundan alınan süt bezi homojenatında da ölçümler yapmıştır. PAC1 reseptörünün dağılımı floresans immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir.

Cui vd. (2013), VIP'in kimyasal ve biyolojik stabilitesini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Farklı pH değerleri, iyonik şiddet, sıcaklık ve yapay mide-bağırsak sıvılarında VIP'in stabilitesini HPLC metodu ile incelemişlerdir. Phenomenex luna C18 (250×4,6 mm, 5 μ m) kolon ile, ACN-0,1% TFA (26,5:73,5, v/v) hareketli fazı kullanılarak, 1 mL/dak akış hızında ve 220 nm dalga boyunda analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde VIP için dedeksiyon limiti (LOD) 360 ng/mL, teşhis limiti (LOQ) ise 900 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Araştırmalar sonucunda VIP'in asidik ve nötral (pH<7) ortamlarda stabil olduğu fakat bazik ortamlarda bozunduğu gözlenmiş, iyonik şiddetin VIP'in stabilitesi üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Dondurulmuş koşullarda VIP stabil halde kalmıştır fakat düşük derişimlerde dondurulmuş koşullarda dahi bozunduğu gözlenmiştir. Ayrıca yapay mide-bağırsak sıvılarında oldukça hızlı bozunması nedeni ile analiz sırasında dedekte edilememiştir.

Santos vd. (2014), PACAP-38'in analizi için kapiler elektroforez-kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. PACAP'ın pI değerinin 10'un üzerinde olması ters faz HPLC yöntemi ile analizlerde kolondaki tersinmez etkileşim nedeniyle analizi zorlaştırdığı için elektroforetik bir yöntem geliştirmişlerdir. CE'ye bağlı iyon tuzağı MS cihazında, 90 cm toplam uzunluk ve 30 μ m iç çapa sahip kapiler ile çalışma elektrodu olarak 100 mM amonyum asetat tamponunun (pH 2,95) kullanıldığı sistemde analizleri gerçekleştirmişlerdir. Kapilerin içindeki silika yüzeyinin deaktive edilmesi için poliamin

ile kaplama işlemi yapılmıştır. Enjeksiyon 25 s ve 5 psi basınçta hidrodinamik olarak yapılmıştır. Analiz sırasında 220 V/cm elektrik alan şiddeti uygulanmıştır. MS analizi için 250-2000 m/z aralığında tarama yapılmıştır. 11 dak'lık analiz ile PACAP-38 ve 2 tane safsızlık pikini gözlemlemişlerdir. Spektrumda en yüksek yoğunluğa sahip kütle olarak M^{+8} 'i elde etmişlerdir. Yöntemin doğrusallığını 5-5000 µg/mL derişim aralığında göstermişlerdir. Yöntemin seçiciliğini ve spesifikliğini ise 9,4 dak'da gelen PACAP piki ve 9,5 dak gelen safsızlık piki ile göstermişlerdir. Safsızlık pikini analiz yapılan koşullarda ve 10 µg/mL PACAP derişimde %3,5 olarak elde etmişlerdir.

Lock ve Fox (2015), VIP ve PACAP'ın analizi için yeni bir kapiler elektroforez-kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. 30 µm×91 cm ölçülerinde çıplak silika kapiler kolonu polietilenimin ile kaplanıp peptitlerin silikalar ile etkileşimi önlenmiştir. Kapiler kolonların kullanımı nedeni ile oldukça düşük akış hızlarında (nL/dak) çalışılmış ve yöntemin hassasiyeti arttırılmıştır. Çalışma elektrodu olarak %5 AcAc:%30 ACN:%65 su karışımı kullanılmıştır. Ayırım sırasında uygulanan voltaj ters polaritededir. QTrap kütle analizörünün kullanıldığı analizlerde VIP 666 m/z, PACAP 567,6 m/z iyonları seçilmiş ve bu iyonlar üzerinden gidilmiştir. Her iki peptit için de 1-200 ng/mL aralığında yöntemin doğrusal olduğu gösterilmiştir. 1 mL serum içerisine eklenen 1 ng/mL derişimli peptitlerin geliştirilen yöntem ile oldukça hassas bir şekilde analizi yapılabilmektedir.

3. GEREÇLER

3.1. Kimyasal Maddeler

- Albümin, > %98 saflıkta, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Asetik asit, %100 saflıkta, Merck (Almanya)
- Asetonitril, HPLC saflıkta, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Formik asit, ~%98 saflıkta LC-MS için, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptit (PACAP-38), referans standart, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Metanol, HPLC saflıkta, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Polietilen Glikol (PEG400), Merck (Almanya)
- Sodyum Dodesil Sülfat, $\geq$ %98,5 saflıkta, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Su, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Tween20, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Tween80, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Vazoaktif İntestnal Polipeptit (VIP), $\geq$ %95 saflıkta referans standart, Sigma-Aldrich (Almanya)

3.2. Cihazlar

- Analiz Kolonu 1, Ascentis Express Peptides, ES-C18, 100×2,1 mm, 2,7 μ m, Supelco, Sigma-Aldrich (Almanya)
- Analiz Kolonu 2, Zorbax C8 300 SB Narrow bore-2,1×150 mm, 3,5 μ m, Agilent Technologies (ABD)
- Buzdolabı, Arçelik, No Frost & Electronic (Türkiye)
- Distile su cihazı, Sartorius Stedim Biotech, Arium Pro VF (Almanya)
- Hassas terazi, Excellence Plus XP-205 model, Mettler Toledo (İsviçre)
- pH metre, Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion meter S220 (İsviçre)
- LC-MS/MS, 1290 LC sistemi ve 6460 Triple Quad MS sistemi, Agilent Technologies (ABD)
- Ultrasonik banyo, Bandelin Electronic, RK510 H (Almanya)
- Vorteks karıştırıcı, Jeio Tech, VM 96 B (Kore)

4. YÖNTEM ve BULGULAR

Tez kapsamında yer alan peptitlerin kimyasal yapıları, biyolojik numunede bulunuşları ve bu ortamlardan analizlerinin zor olması gibi parametreler literatürlerden incelenmiştir. Bunun sonucunda doğruluğu, seçiciliği ve hassaslığı oldukça yüksek olan LC-MS/MS yöntemi ile analizlere başlanmıştır. Mevcut LC-MS sisteminde iyonlaştırma, ESI ile gerçekleştirilmiştir. Elektrosprey iyonlaştırma tekniği, iyonlaştırma sırasında peptitlerin yapılarını bozmadığı ve m/z aralığı sınırlı kütle analizörleri ile çoklu yüklenmeye izin verdiği için peptit analizlerinde tercih edilmektedir (Trauger vd., 2002).

4.1. Çözücü Seçimi ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Analizlere VIP ile başlanmıştır. İlgili literatürler incelendiğinde çözücü olarak su, su:ACN karışımları ve %1 AcAc öne çıkmaktadır. VIP'in bazik yapıda olması ve analiz sırasında iyonlaşmasını kolaylaştırmak için çözücü olarak %1 AcAc seçilmiştir. VIP standart maddesi, 0,25 mg/mL derişimde stok olacak şekilde %1 AcAc içinde çözülmüştür. Bu çözeltiden 1,25, 2,50 ve 5,00 µg/mL derişimlerinde çalışma çözeltileri hazırlanmış, seyreltme çözeltisi olarak yine %1 AcAc kullanılmıştır.

Stabilite açısından sorun yaşamamak için ana stok çözeltisi (0,25 mg/mL VIP) -80°C'de saklanırken, çalışma çözeltilerinin hazırlandığı ara stok çözeltisi (25 µg/mL VIP) -18°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2. Kromatografik Parametreler

Ayırım işleminin gerçekleşeceği analiz kolonu C18 ters faz kolonudur. Kolon, 100×2,1mm ebatlarında, 2,7 µm partikül büyüklüğünde olup peptit gibi büyük moleküllerin analizlerinde analit pikinin kapasite faktörünü arttırmak ve pik morfolojisini iyileştirmek için 160 Å por büyüklüğüne sahiptir.

Literatürlerde kullanılan hareketli fazlar incelendiğinde VIP'in bazik olmasına ve MS'e girmeden önce iyonlaşacak olmasına dayalı olarak genellikle asidik hareketli fazlar yer almaktadır. ACN ve suyun yanında LC-MS/MS çalışmalarına da uygun olması açısından başlangıç olarak FA kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrı hatlarda olacak

şekilde %0,2 FA-su (A hattı) ve %0,2 FA-ACN (B hattı) çözeltileri hazırlanıp bu hareketli faz ile deneylere başlanmıştır.

MS analizlerinde kolondan gelen analitin iyonlaşma odasına girdiğinde tamamının iyonlaşmasını sağlamak ve madde kaybının önüne geçmek için düşük akış hızları tercih edilmektedir. Bu nedenle, 0,2 mL/dak akış hızı ile deneylere başlanmıştır.

Literatür bilgilerinde, VIP'in amino asit içeriğinden kaynaklı polar yapıda olduğuna değinilmiştir (Watanebe, 2016). Bu nedenle kullanılan hareketli faz ve kolonun da etkisi ile VIP'in uzun süre alıkonmayacağı öngörülerek Tablo 4.1'de gösterilen gradient ile analizlere başlanmıştır. Bu gradient ve akış hızı değerleri MS optimizasyonu süresince kullanılan ve daha sonra tekrar değerlendirilecek olan geçici değerlerdir.

Tablo 4.1. *Başlangıç gradienti*

Zaman (dak)	%A	%B	Akış hızı (mL/dak)
0	90	10	0,2
8	30	70	0,2

Ayrıca diğer parametreler olan enjeksiyon hacmi 2 µL ve kolon sıcaklığı da 30°C olarak ayarlanmıştır.

4.3. Yöntemin Optimizasyonu

Analizlere MS'e ait parametreler incelenerek başlanmıştır. VIP, 3325,8 g/mol molekül ağırlığına sahip büyük bir peptittir. 'QQQ' olarak bilinen üç adet ardışık dört çubuklu mevcut kütle analizörü ile en fazla 3000 m/z'ye kadar tarama yapılabildiği için, VIP'in +1/-1 yüklenerek analizlenmesi mümkün değildir. Ancak çoklu iyonlaştırma ile +2, +3, +4 vb. şekilde yüklenmesi ile analizlenebilir.

ESI ile peptitlerin çoklu yüklenmiş türleri elde edilebilmektedir ancak bu m/z değerine ait her bir izotopik kümenin doğruluğunun ispatlanması peptitlerin yapılarının aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır. *Deconvolution (Ayrıştırma)* adı verilen matematiksel bir yöntem ile MS yazılımlarında peptitlerin çoklu yüklenmiş m/z değerindeki kütlelerinden peptidin ana kütesine geçilebilmekte ve molekül kütlesi tahmin edilebilmektedir (Xu vd., 2018).

Ayrıca VIP'in pI değeri 11'den büyük olduğu için asidik ortamlarda yani pI değerinden düşük pH'larda katyon olarak davranacağı için sadece pozitif polaritede analizler gerçekleştirilmiştir.

Kütle analizörüne ve VIP'e ait özellikler dikkate alınarak öncelikle 'MS2 Scan' olarak bilinen tarama yöntemi ile 100-3000 m/z aralığında tarama yapılmıştır. Tarama yöntemi için MS parametreleri aşağıda Görsel 4.1'de verilmektedir:

Ion source
AJS ESI

Time filtering
☒ Peak width 0.07 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	MS2 Scan	To MS	0	0	☒

Scan segments

Segment Name	Start Mass	End Mass	Scan Time	Fragmentor	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	200	1800	500	135	7	Positive

Source parameters

Gas Temp: 300 °C

Gas Flow: 5 l/min

Nebulizer: 45 psi

Sheath Gas Temp: 350 °C

Sheath Gas Flow: 7 l/min

Positive Negative

Capillary: 3500 V 3500 V

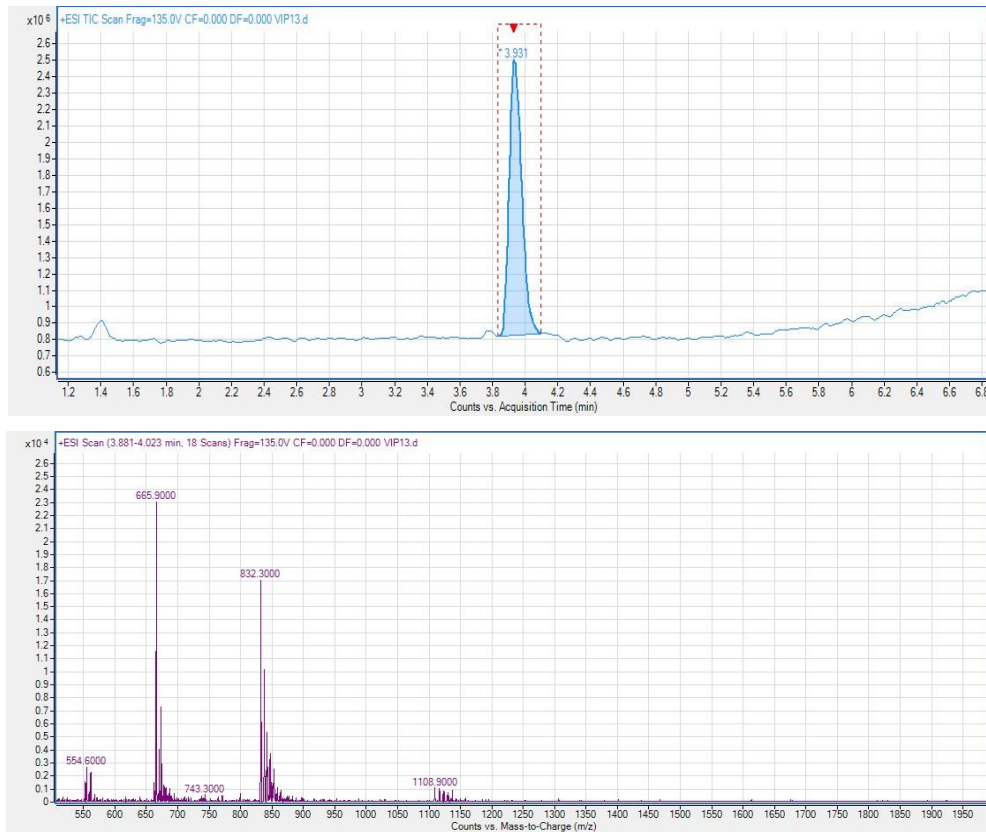
Nozzle Voltage: 500 V 500 V

Görsel 4.1. VIP analizi için tarama yöntemine ait MS parametreleri

İyon kaynağı parametrelerinden gaz sıcaklığı ve akış hızı iyonların MS'e iletileceği kapiler etrafından iyonlaşma odasına püskürtülen ve spreyn kurutulup iyon veriminin artırılması sağlayan parametredir. 'Sheath gas' olarak bilinen gaz, spreyn haline gelen

numuneyi bir kılıf gibi sararak dağılmasını engelleyen ve iyon kaybını engelleyip MS'e daha fazla iyon iletilmesine katkı sağlayan parametredir. 'Nebulizer' olarak bilinen gaz sprej gazı olup, sıvı haldeki örneği iyonlaşma odasına spreyleyen gazdır ve basınçla kontrol edilir. Kolondan gelen örneğin akış hızına ve hareketli faz içeriğine bağlıdır. İyonlaşma odasında ve parçalama hücresinde kullanılan gaz inert özellikte olan azot gazıdır. Kapilere voltaj uygulanarak elektrik alan oluşturulur ve iyonların MS içerisinde kütle analizörüne iletilmesi sağlanır. Molekülün ağırlığına göre optimize edilebilir. 'Nozzle voltage' ise iğnenin ağız kısmına uygulanan, analizlenecek bileşiğin polaritesine bağlı olarak değişebilen bir parametredir.

Teorikte gözlenmesi beklenen m/z değerleri $1663,9(M^{+2})$, $1109,6(M^{+3})$, $832,3(M^{+4})$, $666,0(M^{+5})$ gibi kütlelerdir. Tarama sonrasında elde edilen VIP'e ait kromatogram ve kütle spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Tarama yöntemi ile 5,00 µg/mL VIP analizi ((554,6 (M^{+6}), 665,9 (M^{+5}), 832,3 (M^{+4}), 1108,9 (M^{+3}))

Bu kütlelerin seçiciliğini arttırmak ve VIP'e ait olduğunu kesinleştirmek için 'MS2 SIM' olarak bilinen SIM yöntemi ile 1109,6(M⁺₃), 832,3(M⁺₄), 666,0(M⁺₅) kütleleri incelenmiştir. MS2 SIM yöntemine ait MS parametreleri aşağıda Görsel 4.2'de verilmiştir.

Ion source

AJS ESI

Time filtering

☒ Peak width 0.07 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	MS2 SIM	To MS	0	0	☒

Scan segments

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Mass	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	VIP+3	☐	1109.09 Unit		150	135		7 Positive
	VIP+4	☐	831.8 Unit		150	135		7 Positive
	VIP+5	☐	665.6 Unit		150	135		7 Positive

Source parameters

Gas Temp: 300 °C

Gas Flow: 5 l/min

Nebulizer: 45 psi

Sheath Gas Temp: 350 °C

Sheath Gas Flow: 7 l/min

Capillary: 3500 V

Nozzle Voltage: 500 V

Positive

Capillary: 3500 V

Nozzle Voltage: 500 V

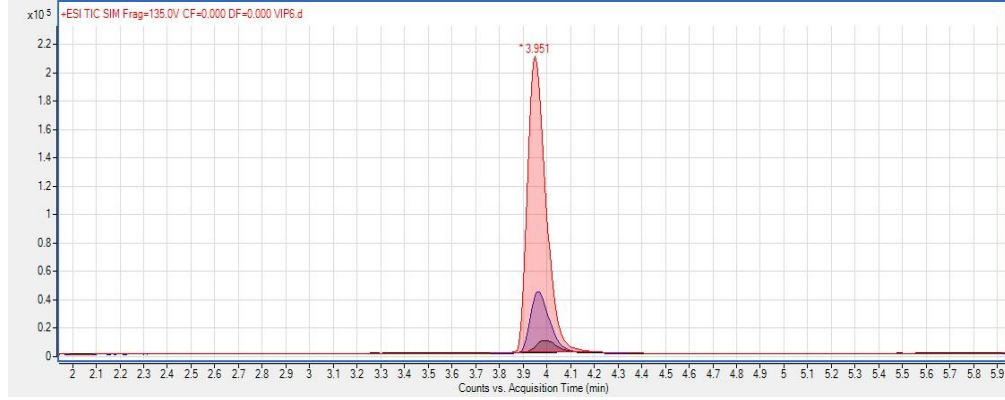
Negative

Capillary: 3500 V

Nozzle Voltage: 500 V

Görsel 4.2. VIP analizi için SIM yöntemine ait MS parametreleri

Ayrıca derişim ve alan artışı arasındaki ilişkiyi görmek için artan derişimlerde VIP analizlenmiştir. Artan VIP derişimlerine ait toplam iyon kromatogramı (TIC) Şekil 4.2'de sunulmaktadır.



Şekil 4.2. SIM yöntemi ile 1,25, 2,50 ve 5,00 µg/mL VIP analizi

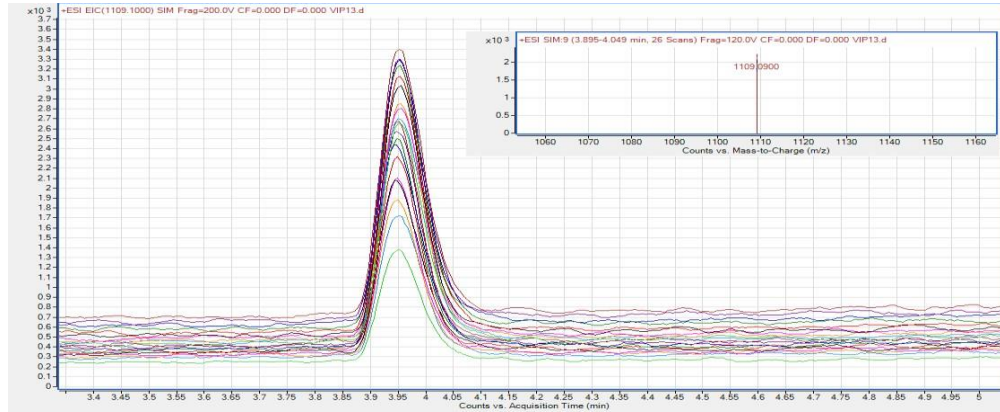
Tekrar edilebilir alıkonma zamanları, VIP'e ait bu üç kütlenin her analizde stabil olması ve derişim artışı ile pik alanlarının artıyor olması 3,9 dak'da gelen pikin VIP olduğunu kesinleştirmiştir. Seçilen m/z kütleleri ilerleyen aşamalarda parçalar üzerinden MRM yöntemi ile çalışılacağı için parçalama voltajı taraması yapılmıştır. *Parçalama voltajı*, iyonlaşma odası ve kütle analizörünün ilk dörtlüsü arasında yer alan kapilerin son çıkışına uygulanan ve ana kütlenin seçilip parçalama hücrelerine ulaştırılmasını sağlayan voltajdır. Mevcut cihaz üzerinde 0-400 V arasında taramaya izin verilmektedir ve cihazın varsayılan değeri 135 V'tur. Her bir m/z değerine (1109,1, 832,1 ve 665,9) ait parçalama voltajı taraması SIM yöntemi ile 10-200 V arasında incelenmiştir. Voltaj taraması ayrı analizler ile değil, yazılımın özelliğinden dolayı tek bir analiz içinde 10 bölüme (segment) kadar farklı voltajları taramayı mümkün kıldığı için toplamda iki analizde yapılmıştır. Yazılıma ait bu özelliği gösteren kesit Görsel 4.3'te yer almaktadır. Analizler sırasında 2,50 µg/mL VIP çözeltisi kullanılmıştır.

Time segments							
#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored	
1	0	MS2 SIM	To MS	0	0	☒	

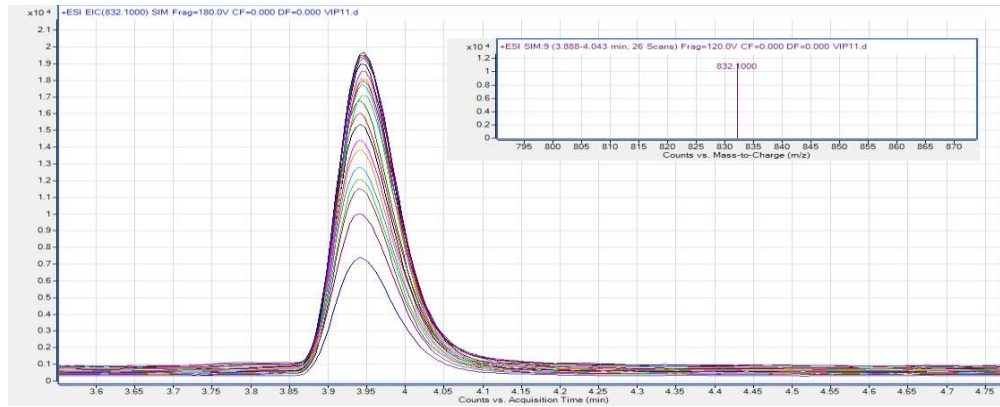
Scan segments									
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Mass	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Cell Accelerator Voltage	Polarity	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	10	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	20	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	30	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	40	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	50	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	60	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	70	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	80	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	90	7	Positive	
	VIP+5	☐	665.9	Wide	50	100	7	Positive	

Görsel 4.3. Aynı analiz içinde parçalama voltajı taraması

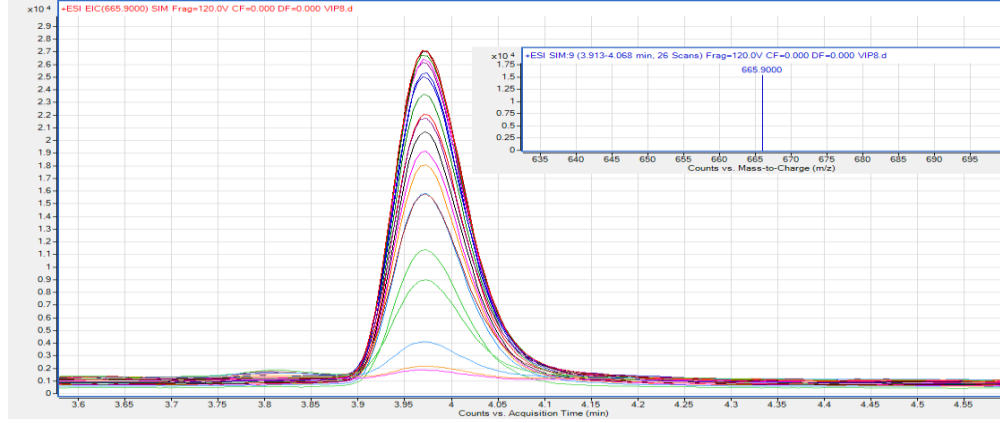
Her bir kütle için parçalama voltajı taramasına ait iki analizden elde edilen kromatogramlar ve MS spektrumları Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.3. 1109,09 m/z için 10-200V arası parçalama voltajı taraması

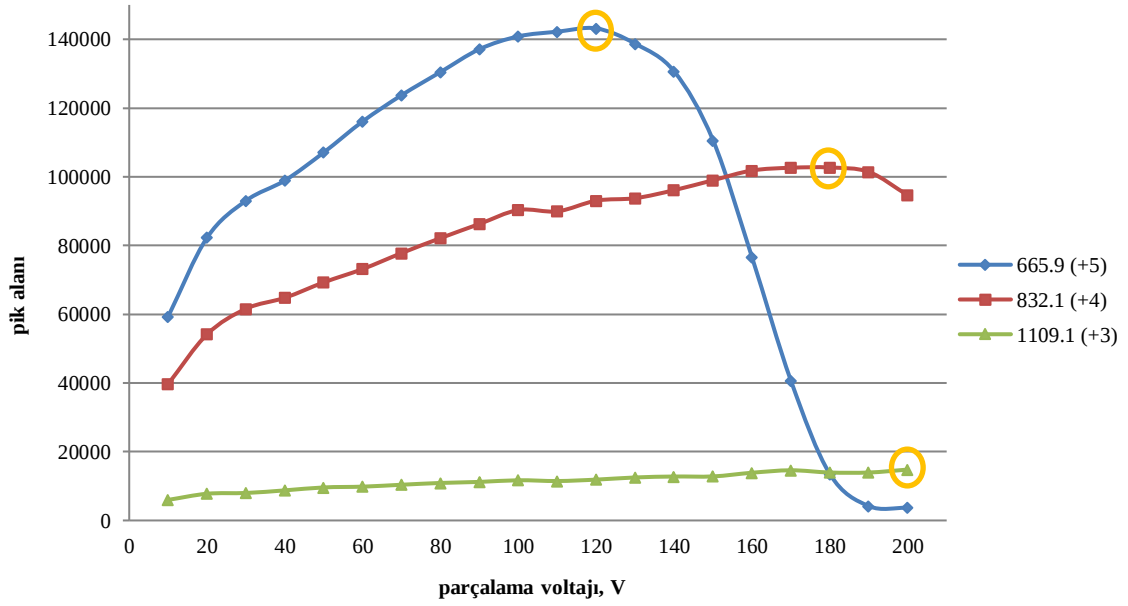


Şekil 4.4. 832,1 m/z için 10-200 V arası parçalama voltajı taraması



Şekil 4.5. 665,9 m/z için 10-200 V arası parçalama voltajı taraması

Parçalama voltajı taraması sonuçlarında pik alanları ve buna bağlı olarak sinyal gürültü oranlarında (SNR) farklanmalar olduğu görülmüştür. Parçalama voltajına karşı her kütle için elde edilen pik alanları ile aşağıda çizilen grafik elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Parçalama voltajı-pik alanı grafiği

Bu grafikten de görülmüştür ki, 665,9 m/z için 120 V, 832,1 m/z için 180 V ve 1109,1 m/z için 200 V parçalama voltajları ile en büyük pik alanları elde edilmiştir. Fakat 1109,1 m/z kütlelerinden elde edilen pik alanlarının 832,1 ve 665,9 m/z kütlelerine göre oldukça düşük olması, bu kütle ile daha düşük derişimlerde çalışılamayacağını göstermiştir. Bu nedenle 832,1 ve 665,9 m/z kütlelerine odaklanılmıştır. M^{+4} ve M^{+5} e ait

bu kütlelerin en büyük pik alanına sahip oldukları (832,1 m/z için 180 V ve 665,9 m/z için 120 V) ve cihazın varsayılan değeri olan 135 V parçalama voltajında tekrar edilebilir analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre BSS'leri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır (Tablo 4.2'de sunulmuştur).

Tablo 4.2. Farklı parçalama voltajlarında tekrarlı yapılan analizler sonucu elde edilen değerler (n=6)

	120 V		135 V		180 V	
	832,1	665,9	832,1	665,9	832,1	665,9
	A	A	A	A	A	A
1	217696,23	313745,19	231956,1	312121,41	226962,64	35510,53
2	226775,86	323868,87	237530,46	315819,88	233452,15	37108,69
3	225151,47	325150,25	235696,84	313448,29	234037,53	37077,13
4	227155,61	325718,95	232772,46	308863,39	236635,93	36630,75
5	223906,28	324309,53	229042,29	306499,54	242386,43	34649,76
6	223827,33	324949,95	220806,14	295403,71	238330,6	33588,36
ort	224085,46	322957,12	231300,72	308692,70	235300,88	35760,87
ss	3426,99	4559,14	5932,42	7302,12	5209,73	1436,86
%BSS	1,53	1,41	2,56	2,37	2,21	4,02

Tablo 4.2'ye göre en yüksek pik alanı ve en düşük BSS'ye sahip olan 120 V parçalama voltajında 665,9 m/z kütlesi olmuştur. Diğer kütlelere göre yüksek sinyal elde edildiği için sonraki analizlerde 665,9 (M^{+5}) m/z kütlesi ve 120 V parçalama voltajı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

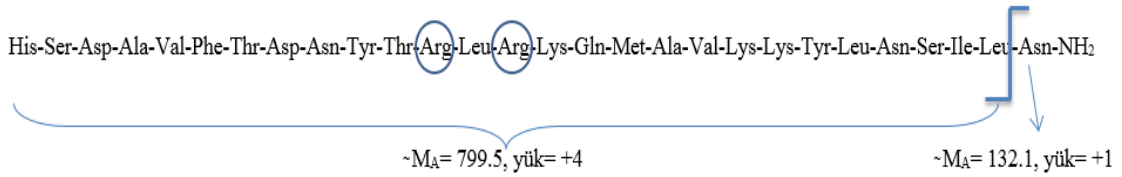
Çalışmanın ileriki aşamalarında yöntemin seçiciliğini oldukça arttıran MRM yöntemini kullanabilmek için VIP'in 665,9 m/z kütlesine ait parçalar 'Product iyon' olarak bilinen parçalanma iyon yöntemi ile belirlenmiştir. 50-3000 m/z aralığında parça taraması yapılmıştır. Böyle geniş m/z aralığında tarama yapılmasının nedeni, 665,9 m/z kütlesi +5 yüklü olduğu için ana kütle gibi düşünülüp (3328,5 g/mol) parçalandığında kendisinden büyük parçalarının olabileceğindendir. Parçalama hücrelerinde iyonları parçalarına ayırmak için bir enerji gereklidir ki buna *çarpışma enerjisi (collision energy)* adı verilmektedir. Mevcut cihaz 0-250 V arasında enerji uygulamaya izin vermektedir ve cihazın varsayılan enerjisi 0 V'tur. Parçalama hücrelerine uygulanan farklı enerjiler (10, 20, 30 ve 40 V) ile 665,9'un parçaları incelenmiştir. Parçalama enerjisi yazılımın özelliğinden kaynaklanan tek analiz içinde voltaj taraması ile yapılmıştır. Yazılım bir analiz içinde dört farklı voltaj taramaya izin vermektedir. Yazılımın bu özelliği bir kesit ile Görsel 4.4'te gösterilmiştir.

Time segments						
#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1		Product Ion	To MS	0	0	☒

Scan segments									
Segment Name	Precursor Ion	MS2 From	MS2 To	Scan Time	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity	
VIP+5	665.9	50	850	100	120	10		7	Positive
VIP+5	665.9	50	850	100	120	20		7	Positive
VIP+5	665.9	50	850	100	120	30		7	Positive
VIP+5	665.9	50	850	100	120	40		7	Positive

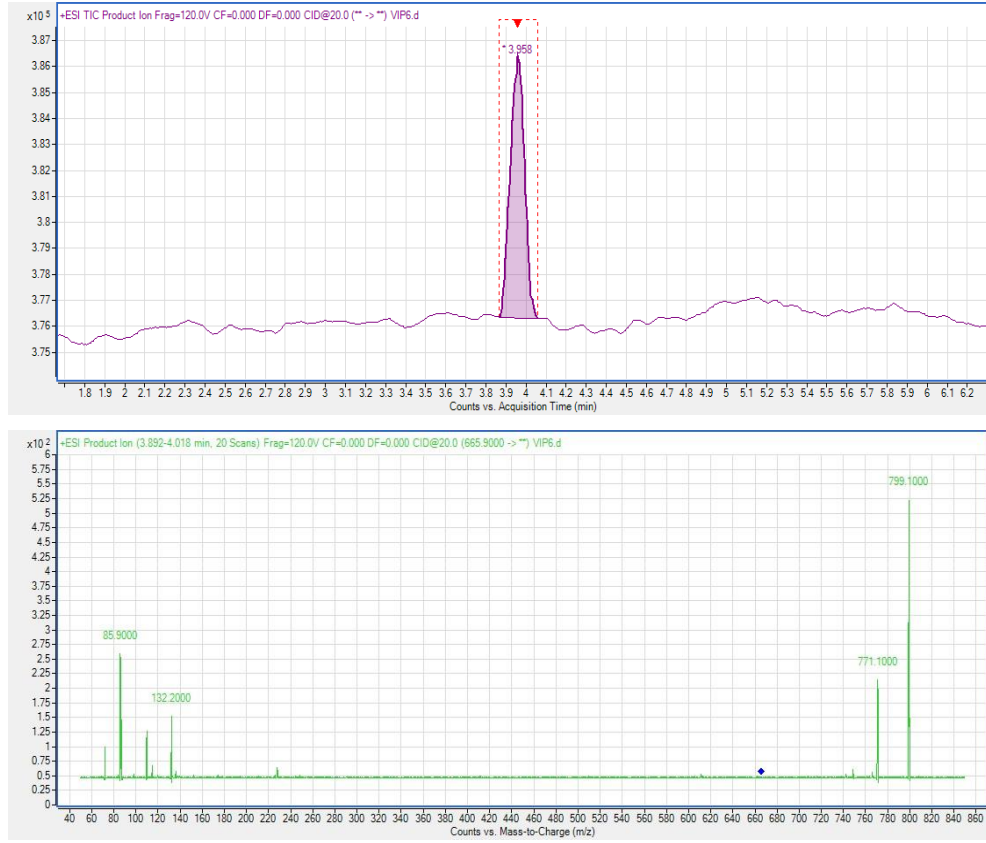
Görsel 4.4. Aynı analiz içerisinde parçalama enerjisi taraması

10 V gibi düşük parçalama enerjisi ile herhangi bir parça oluşmamasına karşın, uygulanan enerji arttıkça daha küçük parçalar oluştuğu görülmüştür. 20 V uygulandığı sırada 799,4, 770,8 ve 132,1 m/z gibi kütleler gözlenmiştir. Bu kütleler tekrar edilen analizlerde de yer almıştır. VIP'e ait amino asit dizilimi Şekil 4.7'te gösterildiği gibidir:



Şekil 4.7. VIP'e ait amino asit dizilimi ve MS'de tahmin edilen parçalanması

Yapısında yer alan Arg amino asidinin bazik olmasından dolayı (pK_a 13,2) MS'de +4 iyonlaşmasının Arg üzerinden, +1 iyonlaşmasının ise asparajin (Asn) üzerinden gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Bu durumda VIP parçaları şekilde gösterildiği gibi Leu-Asn bağının kopması ile elde edilmiştir. Gözlenen kütleler ve tahmin edilen yükler üzerinden hesaplama yapıldığı zaman +5 yüklü 665,9 kütlelerinin, +4 yüklü 799,4 ve +1 yüklü 132,1 kütlelerine parçalanmış olabileceği düşünülmüştür. Yapılan hesaplamalar sonucunda da ((799,4×4) + (132,1×1) = (665,9×5)) VIP'in ana kütlelerine erişilmiştir. Kütle analizörünün tarama aralığının sınırlı olması nedeni ile VIP'e ait +1 yüklü kütle (molekül ağırlığı 3325,8 Da olduğu için çoklu yüklenmiş tür olmadan direkt olarak 3326,8 m/z kütle) gözlenemediği için yazılım üzerinden deconvolution yapılamamıştır. Fakat bu algoritma dikkate alınarak yapılan hesaplamalar ile doğrulama yapılarak 665,9 m/z kütlelerinin parçaları 799,4 ve 132,1 m/z şeklinde kesinleştirilmiştir (Şekil 4.8'de sunulmuştur).



Şekil 4.8. 2,50 µg/mL VIP, 665,9 (+5) kütesinin ‘Product iyon’ yöntemi ile yapılan analizi sonucunda elde edilen parçaları

Parçalama enerjisini 20 V civarında daha spesifik gözleyebilmek için tarama alanı daraltılmıştır. ‘Product iyon’ yöntemi ile 15-20 V arası tarama yapılmıştır; 16 V parçalama enerjisi uygulandığında 799,4 ve 132,1 m/z kütlelerine ait piklerin alanları en fazla elde edilmiştir. 799,4 m/z kütesinden sonra spektrumlarda kütle miktarı olarak fazla olan 770,7 m/z’ye rastlanmaktadır. Bu durumda kantitatif analizler için (quantifier) 799,4 m/z kütesi seçilirken, kalitatif olarak (qualifier) VIP kütesini doğrulamak amacı ile 770,7 m/z kütesi seçilmiştir. İleriki aşamalarda MRM ile yapılan analizler bu iki kütle üzerinden gerçekleştirilmiştir.

İlk kütle analizöründen gelen kütlelerin parçalanma hücrelerinde kalma süresini etkileyip kütleleri hızlandıran veya yavaşlatan parametre ise *hücre içi hızlandırıcı voltaj* (cell accelerator voltage, CAV)dır. Mevcut cihaz 1-8 V arası taramaya izin vermekte ve cihazın varsayılan değeri 7 V’tur. Her analit için değişiklik göstereceğinden dolayı taranması önerilmektedir. $CAV \geq 7$ iken analit hücre içinde çok hızlı hareket edeceğinden

iyon kaybına neden olurken, $CAV \leq 3$ iken çok yavaş hareket ettiği için *cross contamination* (çapraz kontaminasyon) diye bilinen sonradan gelen iyon ile aynı anda parçalaması işlemine maruz kalacağı için MRM geçişlerinde sorun yaratabilmektedir. Bu parametrenin 665,9 m/z'nin parçaları üzerine etkilerini incelemek için önce 'Product iyon (Parçalanma İyonları)' yöntemi ile tarama yapılmıştır. Yazılımın özelliği nedeni ile bu parametrede de tek analizde tarama gerçekleştirilmiştir (Görsel 4.5'te sunulmuştur). Bu analizlerin sonucunda parçaların kütle miktarları değişimi incelenmiştir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.9'da sunulmuştur).

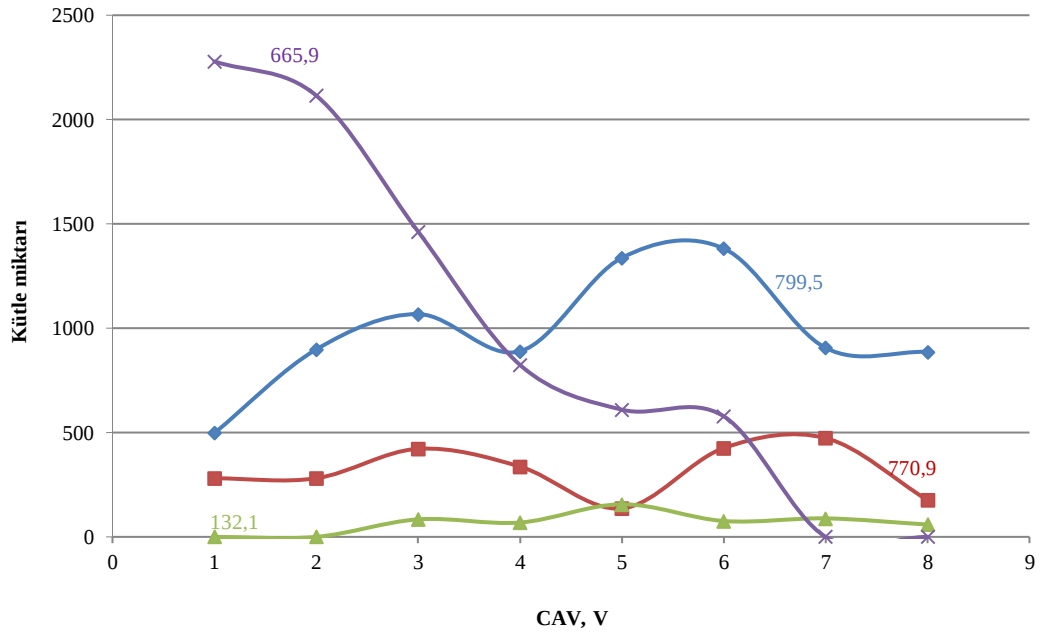
Time segments						
#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	Product Ion	To MS	0	0	☒

Scan segments									
Segment Name	Precursor Ion	MS2 From	MS2 To	Scan Time	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity	
VIP+5	665.9	50	850	100	120	16	1	Positive	
VIP+5	665.9	50	850	100	120	16	2	Positive	
VIP+5	665.9	50	850	100	120	16	3	Positive	
VIP+5	665.9	50	850	100	120	16	4	Positive	

Görsel 4.5. Aynı analiz içerisinde CAV taraması

Tablo 4.3. CAV-Kütle miktarı ilişkisi

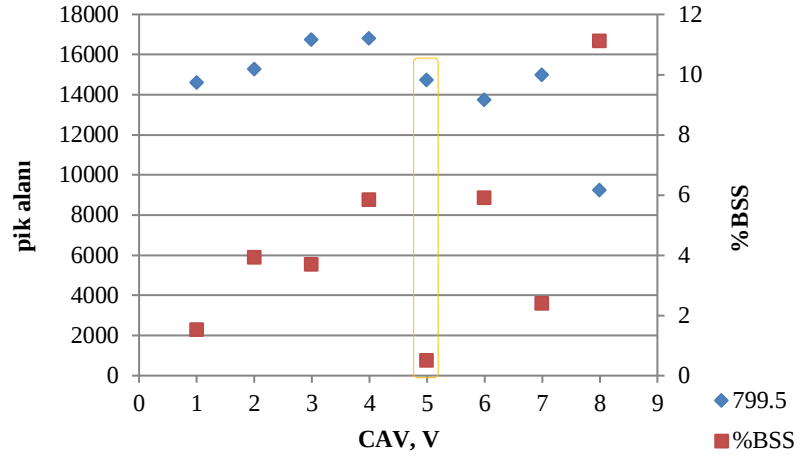
CAV (V)	Kütle miktarı			
	799,5	770,9	132,1	665,9
1	497,14	280,76	0,00	2278,82
2	898,30	280,88	0,00	2114,84
3	1067,60	422,05	84,00	1462,93
4	889,28	336,69	68,75	823,97
5	1337,40	136,39	156,16	609,60
6	1381,93	425,77	76,00	577,68
7	905,47	473,20	88,50	0,00
8	886,57	175,88	59,00	0,00



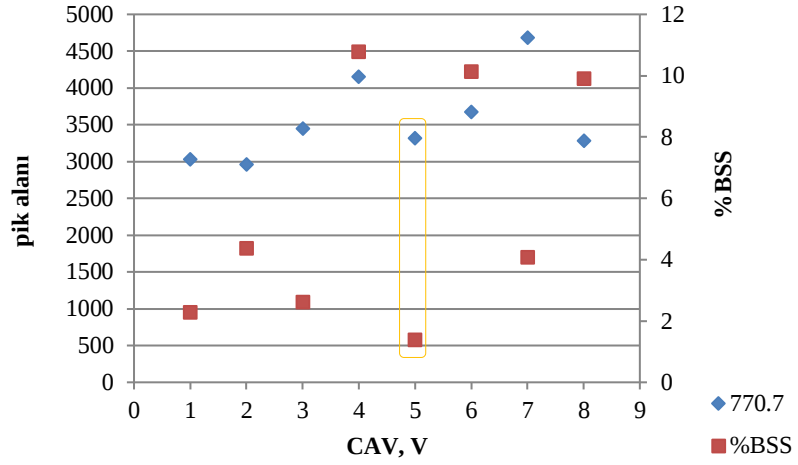
Şekil 4.9. CAV- parça kütle miktarı değişimi grafiği

Grafikten de görüldüğü gibi CAV'ın artması ile parçalanma artmış ve bir süre sonra ortamda parçalar fazla iken 665,9 m/z kütlesi gözlenmemiştir. Fakat yaklaşık 6 V'tan sonra gözlenmesi istenen kütlelerde de azalma görülmüştür. Bunun nedeni, 665,9 m/z kütesinin parçalanma hücrelerinde çok hızlı hareket etmesi, yeterli süre parçalanmaya maruz kalamayıp kütle kaybının gerçekleşmesi olabilir. Ardından MRM yöntemi ile 1-8 V arası tarama yapılmıştır. 2,50 µg/mL VIP'in kullanıldığı tekrarlı yapılan analizler sonucunda uygulanan voltaj-pik alanı-BSS değerlerine karşı çizilen grafikler Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

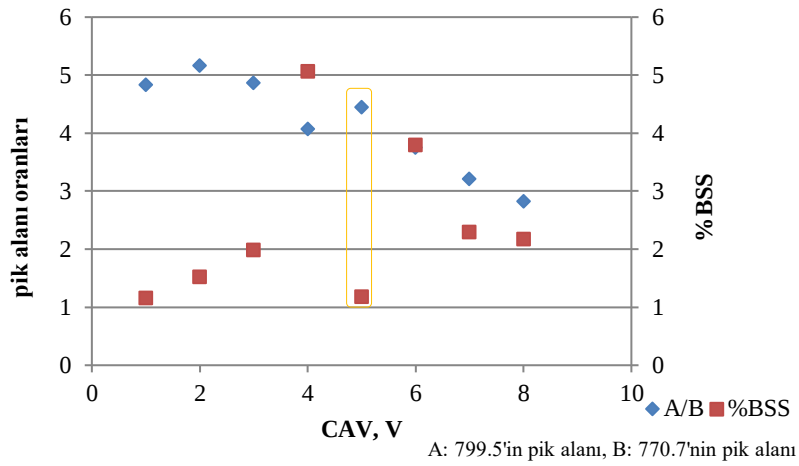
Pik alanları yönünden 799,5 m/z, 770,7 m/z ve bu iki kütlelerin birbirlerine oranlarından elde edilen grafiklerden de görüldüğü gibi pik alanlarının çok yüksek olmamasına rağmen %BSS'nin düşük olduğu nokta CAV 5 V iken elde edilmiştir. Bu durum 5 V enerji uygulayarak en uygun hızda VIP'in parçalanmaya maruz kaldığını ve stabil parçalar elde edildiğini göstermiştir.



Şekil 4.10. 799,5 m/z'ye ait CAV-pik alanı-BSS grafiği



Şekil 4.11. 770,7 m/z'ye ait CAV-pik alanı-BSS grafiği



Şekil 4.12. Pik alanları açısından 799,5/770,7 m/z oranına ait CAV-pik alanı-BSS grafiği

CAV taraması yapılmadan önce (CAV 7 V iken) parçalama enerjisi taranmış ve 16 V olarak bulunmuştur. Fakat CAV'ın 5 V olarak optimize edilmesi, hücre içinde VIP'in yavaşladığını ve parçalama enerjisinin buna bağlı olarak yeniden taranmasını gerektirmiştir. Parçalama enerjisi önceki gibi 'Product iyon (Parçalanma İyonları)' yöntemi ile 10-20 V arasında yeniden taranmıştır. Giderek daraltılan aralıklarda yapılan analizler sonucunda parçalar 18 V'ta yoğun olarak gözlenmiştir. Çoklu reaksiyon görüntülenmesi (MRM) yöntemi ile 18 V parçalama enerjisi uygulanarak yapılan analizlerde, 16 V'a göre daha büyük ve tekrar edilebilir pik alanları elde edilmiştir. Sonuçta parçalama enerjisi 18 V ve CAV 5 V olarak analizlere devam edilmiştir.

MS parametreleri optimize edildikten sonra VIP'in çözücüsünün pik morfolojisi, alanı ve alıkonma zamanına etkisi incelenmiştir. Bu farklanmayı gözlemlemek için ayrı ayrı su:ACN (1:1) ve %1 AcAc içerisinde hazırlanan VIP çözeltileri kullanılmıştır. Stok çözeltilerden 1,25, 2,50 ve 5,00 µg/mL derişimlerinde VIP çözeltileri hazırlanıp MRM yöntemi ile analiz edilmiştir. MRM yöntemine ait MS parametreleri aşağıda Görsel 4.6'da verilmiştir.

VIP'in polar yapıda olduğu, apolar ortamlarda çözünürlüğü azaldığı için sulu faza sıkışıp kaldığı ve bunun sonucunda da iyonlaşmasının zorlaştığı bilinmektedir (Abaye vd., 2011). Ayrıca VIP bazik yapıda olduğu için asit içeren çözelti ortamında tuz oluşturup daha kararlı bir yapıda bulunmaktadır. Tekrarlı yapılan analizler sonucunda %1 AcAc içerisinde çözünmüş VIP'in analizlerinde daha büyük ve tekrar edilebilir pik alanları elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda asidik ortamdaki VIP stoğu kullanılmıştır.

Araştırmalara kromatografik parametrelerden hareketli fazın optimizasyonu ile devam edilmiştir. LC-MS çalışmalarında iyonlaşma odasında peptitlerin iyonlaşmasını sağlamak ya da kolaylaştırmak için hareketli faza uçucu özellikteki H⁺ kaynağı eklenmelidir. Bunlar FA, AcAc gibi organik asitlerdir (McMaster, 2005). İlk olarak hareketli fazdaki FA oranı değişimi incelenmiştir. Bunun için %0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4 FA içeren sulu (A hattı) ve ACN'li (B hattı) çözeltiler hazırlanmıştır. 2,50 µg/mL VIP her bir hareketli fazda ayrı ayrı tekrarlı bir şekilde analizlenmiştir. Analizler sonucunda farklı miktarlarda formik asit içeren hareketli faz ile analizlenen VIP'in pik alanı ve %BSS'sı incelenmiştir (Tablo 4.4-4.5 ve Şekil 4.13-4.14'de sunulmuştur). Analizler MRM ile 799,5 ve 770,7 m/z kütleleri üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Ion source

AJS ESI

Time filtering
☒ Peak width

0.07

 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
▶ 1	0	MRM	To MS	0	0	☒

Scan segments

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	VIP+5	☐	665.6	Unit	799.5	Unit	200	120	18	5	Positive
	VIP+5	☐	665.6	Unit	770.7	Unit	200	120	18	5	Positive

Source parameters

Gas Temp:

300

 °C
 °C

Gas Flow:

5

 l/min

Nebulizer:

45

 psi
 psi

Sheath Gas Temp:

350

 °C

Sheath Gas Flow:

7

 l/min

Positive

Negative

Capillary:

3500

 V

3500

 V
 V

Nozzle Voltage:

500

 V

500

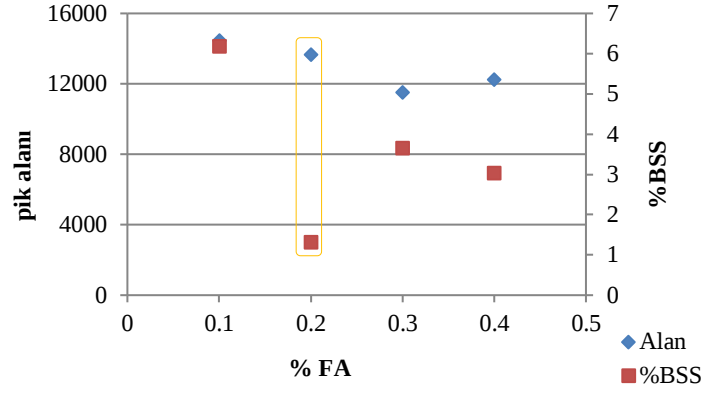
 V

Görsel 4.6. MRM yöntemine ait MS parametreleri

Tablo 4.4-4.5 ve Şekil. 4.13-4.14’de yer alan veriler değerlendirildiğinde yüksek pik alanı ve düşük BSS olarak açısından %0,2 FA’nın VIP piki için en uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.4. 799,5 m/z için %FA-pik alanı-%BSS değişimi (n=5)

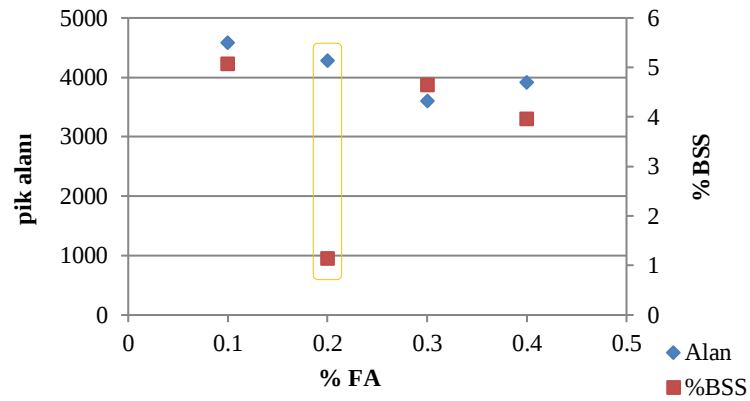
%FA	A	%BSS
0,1	14463,36	6,18
0,2	13667,37	1,32
0,3	11498,17	3,65
0,4	12237,30	3,03



Şekil 4.13. 799,5 m/z için %FA-pik alanı-%BSS grafiği

Tablo 4.5. 770,7 m/z için %FA-pik alanı-%BSS değişimi (n=5)

%FA	A	%BSS
0,1	4580,26	5,08
0,2	4277,70	1,15
0,3	3596,94	4,64
0,4	3917,32	3,96

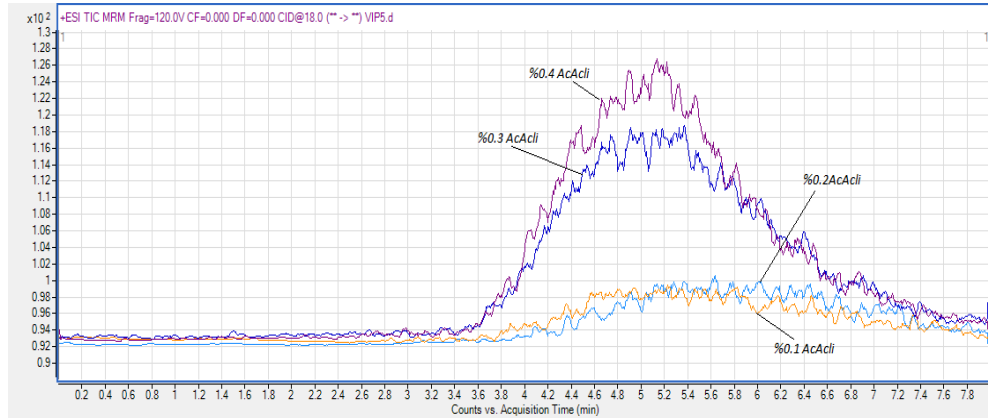


Şekil 4.14. 770,7 m/z için %FA-pik alanı-%BSS grafiği

%0,2 FA içeren hareketli fazın pH'ının VIP piki üzerine etkisini incelemek için FA'nın pK_a değeri dikkate alınmıştır. pK_a 3,8 olduğu için ortamın pH'ı (sulu fazın) yaklaşık 3'e ayarlanarak analizler gerçekleştirilmiştir. pH ayarlama işlemi sırasında NH_4OH kullanılmıştır. %0,2 FA içeren sulu fazın pH'ı 2,45 olarak ölçülmüştür. Bunun yanında NH_4OH eklenmesi ile pH 2,94 ve 3,15 olan iki farklı hareketli faz hazırlanmıştır. Analizler MRM ile 799,5 ve 770,7 m/z üzerinden gerçekleştirilmiştir. Üç farklı pH değerindeki (2,45, 2,94 ve 3,15) hareketli fazlar 2,50 $\mu g/mL$ VIP analizinde kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6'dan da görüldüğü gibi pH'ın artması ile VIP'in alıkonma zamanı artmıştır. Pik alanı ve SNR ise pH'ın artması ile azalmıştır. pH değişiminin VIP pikinin simetrisi üzerine de herhangi bir olumlu etkisi olmadığı için hareketli fazın pH'ının değiştirilmemesine yani yaklaşık pH 2,45'te çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

FA'ya göre daha zayıf bir asit olan AcAc'in (pK_a 4,8) hareketli faza eklenmesinin VIP piki üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaç ile hareketli faz içerisindeki oranı %0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4 olarak değişen farklı çözeltiler hazırlanıp 2,50 $\mu g/mL$ VIP analizlenmiştir. Analizler MRM ile 799,5 ve 770,7 m/z üzerinden gerçekleştirilmiştir. AcAc'li hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilen analizlerin sonucunda TIC'nin üst üste koyulması ile elde edilen görüntü Şekil 4.15'te verilmiştir.



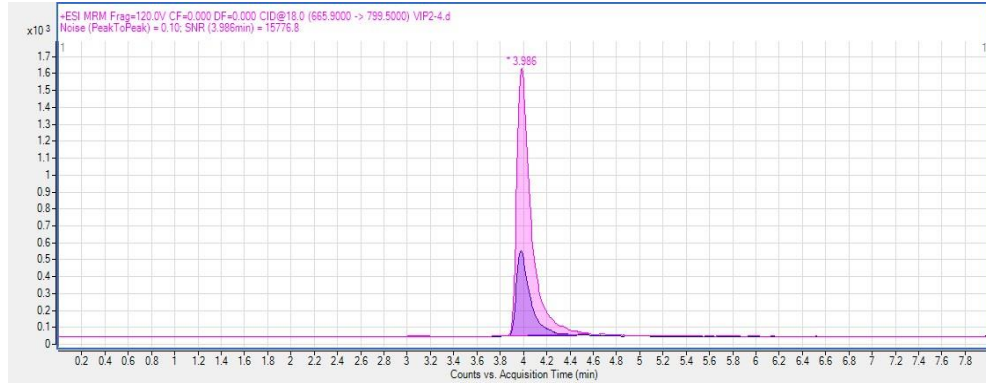
Şekil 4.15. VIP piki üzerine AcAc'nin etkisi

Tablo 4.6. VIP pikine farklı pH'lardaki hareketli fazın etkisi (n=5)

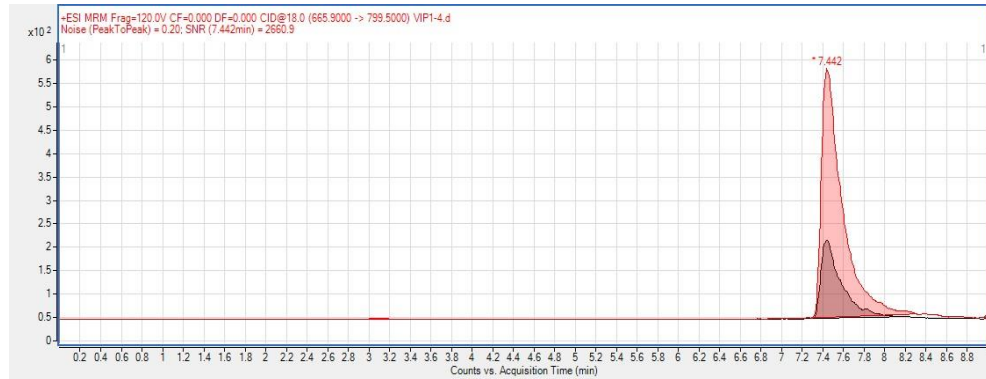
		1	2	3	4	5	ort	ss	%BSS		
pH= 2,45	799,5	Zaman (dak)	3,95	3,95	3,95	3,95	3,95	0,00	0,10		
		A	14011,47	14258,90	13797,52	13506,47	13259,48	13766,77	396,27	2,88	
		SNR	17108,60	11446,00	9024,70	6457,10	7450,70	10297,42	4248,03	41,25	
		S	1,90	2,01	2,06	1,96	1,89	1,96	0,07	3,68	
	770,7	Zaman (dak)	3,94	3,95	3,94	3,95	3,95	3,94	0,00	0,10	
		A	4045,15	4220,18	4177,35	4267,23	4164,53	4174,89	82,95	1,99	
		SNR	10047,40	15059,40	5036,30	3868,00	15249,90	9852,20	5368,70	54,49	
		S	2,02	1,85	2,22	2,08	2,10	2,05	0,14	6,58	
	pH= 2,94	799,5	Zaman (dak)	4,25	4,24	4,24	4,24	4,37	4,27	0,06	1,31
			A	903,60	893,43	1106,61	1094,15	1147,35	1029,03	120,81	11,74
SNR			5845,90	3228,40	3760,40	1558,90	8050,00	4488,72	2511,34	55,95	
S			2,18	2,49	2,27	1,84	2,08	2,17	0,24	11,03	
770,7		Zaman (dak)	4,24	4,24	4,24	4,23	4,24	4,24	0,01	0,15	
		A	269,10	301,40	360,75	335,12	373,33	327,94	42,88	13,08	
		SNR	1016,10	672,50	316,70	2330,70	2728,50	1412,90	1058,35	74,91	
		S	2,55	2,23	2,32	2,51	1,91	2,30	0,26	11,15	
pH= 3,15		799,5	Zaman (dak)	4,26	4,26	4,26	4,24	4,26	4,25	0,01	0,14
			A	487,19	496,55	493,81	453,23	484,27	483,01	17,36	3,59
	SNR		2071,00	4351,90	1473,30	3944,90	4243,90	3217,00	1344,08	41,78	
	S		1,56	1,88	1,91	1,73	1,82	1,78	0,14	7,92	
	770,7	Zaman (dak)	4,25	4,26	4,26	4,24	4,26	4,25	0,01	0,18	
		A	158,39	156,50	140,02	139,96	146,00	148,17	8,84	5,96	
		SNR	1493,50	1305,10	662,80	1327,90	1261,60	1210,18	318,36	26,31	
		S	1,73	1,45	1,68	1,46	1,66	1,60	0,13	8,22	

Şekil 4.15’de verilen kromatogramlardan da görüldüğü gibi, hareketli faz içerisindeki AcAc’in VIP’in iyonlaşmasında zayıf kaldığı ve bu yüzden VIP sinyalinin kötüleştiği görülmektedir. Ayrıca bu durum pikin alıkonma zamanını da ötelenmesine neden olmuştur.

Hareketli fazdaki organik çözücü polaritesinin VIP pikine etkisi incelenmiştir. Bunun için %0,2 FA içeren sulu fazın yanında ayrı ayrı ACN’li ve MeOH’lı fazlar kullanılmıştır. ACN ve MeOH’ın MS’de VIP’i iyonlaştırmadaki etkileri MRM ile 799,5 ve 770,7 m/z kütleleri üzerinden izlenmiştir. Analizlerde 2,50 µg/mL VIP çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 4.16. VIP piki üzerine ACN’nin etkisi



Şekil 4.17. VIP piki üzerine MeOH’ın etkisi

Kromatogramlardan da görülmektedir ki, VIP piki MeOH’lı hareketli faz ile daha fazla alıkonmuş, pik tabanında genişleme ve kuyruklanma meydana gelmiş, simetrisi bozulmuş ve alanı da azalmıştır. MeOH ve ACN içeren hareketli fazlar ile elde edilen veriler Tablo 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.7. %0,2 FA-ACN içeren hareketli faz ile analizlenen 2,50 µg/mL VIP sonuçları (n=5)

%0,2 FA ACNli								
799,5					770,7			
	Zaman (dak)	A	SNR	T	Zaman (dak)	A	SNR	T
1	3,99	13785,47	9629,70	2,92	3,99	4218,40	8254,80	2,63
2	3,99	13840,84	19696,60	2,96	3,99	4331,57	4072,70	2,80
3	3,99	13730,86	5310,80	2,84	3,98	4292,47	1942,90	2,95
4	3,99	13585,99	15766,80	2,61	3,98	4234,56	2524,80	2,78
5	3,99	13393,70	8687,20	2,59	3,98	4311,48	6256,40	2,80
ort	3,99	13667,37	11818,22	2,78	3,98	4277,70	4610,32	2,79
ss	0,00	179,99	5800,85	0,17	0,00	49,09	2633,69	0,11
%BSS	0,00	1,32	49,08	6,23	0,11	1,15	57,13	4,06

Tablo 4.8. %0,2 FA-MeOH içeren hareketli faz ile analizlenen 2,50 µg/mL VIP sonuçları (n=5)

%0,2 FA MeOHlı								
799,5					770,7			
	Zaman (dak)	A	SNR	T	Zaman (dak)	A	SNR	T
1	7,48	7268,71	5818,40	3,65	7,48	2315,19	2428,00	3,87
2	7,46	7647,90	1654,90	4,13	7,46	2366,01	540,20	3,71
3	7,44	7546,95	2660,90	4,00	7,44	2299,91	927,30	4,44
4	7,44	7348,57	1937,50	3,68	7,43	2171,14	1423,80	3,94
5	7,43	7259,90	3427,70	3,70	7,42	2200,76	1688,20	3,57
ort	7,45	7414,41	3099,88	3,83	7,44	2270,60	1401,50	3,91
ss	0,02	174,30	1668,05	0,22	0,02	81,73	725,10	0,33
%BSS	0,29	2,35	53,81	5,70	0,33	3,60	51,74	8,48

Hareketli fazın optimizasyonu sonunda %0,2 FA-su ve %0,2 FA-ACN'nin kullanıldığı şartlarda en iyi VIP piki elde edilmiştir. Bu yüzden çalışmalara %0,2 FA-su ve %0,2 FA-ACN hareketli fazı ile devam edilmiştir.

Hareketli fazın optimize edilmesinden sonra bir diğer kromatografik parametre olan akış hızı taramasına geçilmiştir. %0,2 FA-su ve %0,2 FA-ACN hareketli fazı kullanılarak MRM ile 799,5 ve 770,7 m/z kütleleri üzerinden farklı akış hızlarında VIP analizlenmiştir. Analizlerde 2,50 µg/mL VIP çözeltisi kullanılmıştır. 0,15-0,35 mL/dak akış hızlarında elde edilen veriler Tablo 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Farklı akış hızlarında 799,5 m/z kütesine ait veriler (n=3)

		799,5							
akış hızı (mL/dak)		Zaman (dak)	A	SNR	S	T	W	k`	N
0,35	ort	3,16	3798,17	3336,30	0,38	2,20	0,48	1,30	7026,67
	ss	0,01	22,49	1022,84	0,02	0,10	0,01	0,00	281,79
	%BSS	0,21	0,59	30,66	4,06	4,55	2,39	0,00	4,01
0,3	ort	3,34	4424,45	2930,60	0,40	2,10	0,48	1,40	7514,67
	ss	0,00	38,86	418,22	0,02	0,10	0,00	0,00	206,73
	%BSS	0,10	0,88	14,27	4,33	4,76	0,85	0,00	2,75
0,25	ort	3,60	5083,50	3687,20	0,38	2,07	0,53	1,60	7286,67
	ss	0,01	164,05	515,40	0,03	0,06	0,01	0,00	360,22
	%BSS	0,18	3,23	13,98	7,53	2,79	1,95	0,00	4,94
0,2	ort	3,98	6218,69	5945,00	0,42	2,03	0,56	1,80	7247,67
	ss	0,00	90,64	3024,66	0,01	0,06	0,01	0,00	130,94
	%BSS	0,10	1,46	50,88	1,39	2,84	1,15	0,00	1,81
0,15	ort	4,61	7934,30	20447,83	0,43	1,93	0,65	2,30	6928,67
	ss	0,00	112,72	18867,81	0,02	0,06	0,03	0,00	151,14
	%BSS	0,09	1,42	92,27	3,53	2,99	4,37	0,00	2,18

Tablo 4.10. Farklı akış hızlarında 770,7 m/z kütesine ait veriler (n=3)

		770,7							
akış hızı (mL/dak)		Zaman (dak)	A	SNR	S	T	W	k`	N
0,35	ort	3,15	1171,67	5580,83	0,37	2,27	0,46	1,27	6827,33
	ss	0,01	31,15	2597,53	0,01	0,15	0,01	0,06	168,74
	%BSS	0,32	2,66	46,54	3,09	6,74	1,77	4,56	2,47
0,3	ort	3,34	1214,21	7277,03	0,40	2,03	0,46	1,40	7355,00
	ss	0,00	26,72	2594,51	0,03	0,06	0,03	0,00	824,29
	%BSS	0,00	2,20	35,65	6,61	2,84	6,99	0,00	11,21
0,25	ort	3,60	1377,41	3031,30	0,41	2,03	0,49	1,60	7616,67
	ss	0,01	7,96	1677,14	0,02	0,06	0,02	0,00	213,88
	%BSS	0,18	0,58	55,33	5,68	2,84	3,53	0,00	2,81
0,2	ort	3,98	1753,57	2795,93	0,43	1,97	0,53	1,80	8170,00
	ss	0,00	49,06	1516,71	0,01	0,06	0,02	0,00	534,87
	%BSS	0,10	2,80	54,25	2,66	2,94	3,21	0,00	6,55
0,15	ort	4,61	2268,58	5898,47	0,43	2,03	0,67	2,30	6090,00
	ss	0,01	26,96	158,50	0,05	0,15	0,03	0,00	937,33
	%BSS	0,14	1,19	2,69	10,83	7,51	4,20	0,00	15,39

4.4. VIP için Yapılan Adsorpsiyon Engelleyici Çalışmalar

Literatürde yapılan araştırmalarda peptit çalışmalarında adsorpsiyon olayına rastlanılmıştır. Standart çözeltilerin hazırlanırken, kullanıldığı deney araç-gereçleri (tüpler, pipet uçları, vialler vs.) üzerine adsorplanabildikleri görülmüştür. Çözelti haline getirildikleri ortam koşullarında peptitler kendi kimyasal özelliklerinden kaynaklı olarak cam veya polipropilen yüzeylere tutunabilmektedirler. Bu durum dikkate alınarak çalışmalara adsorplanmayı engelleyici parametreler incelenerek devam edilmiştir.

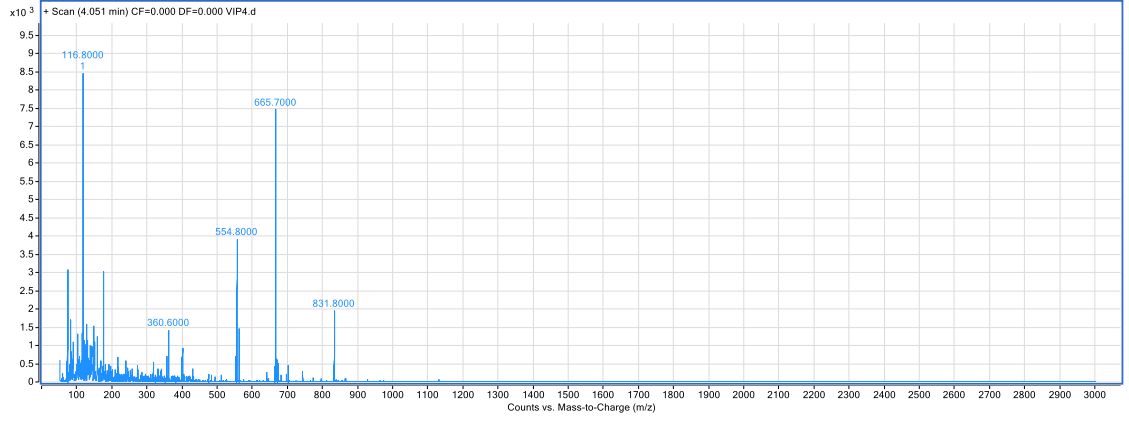
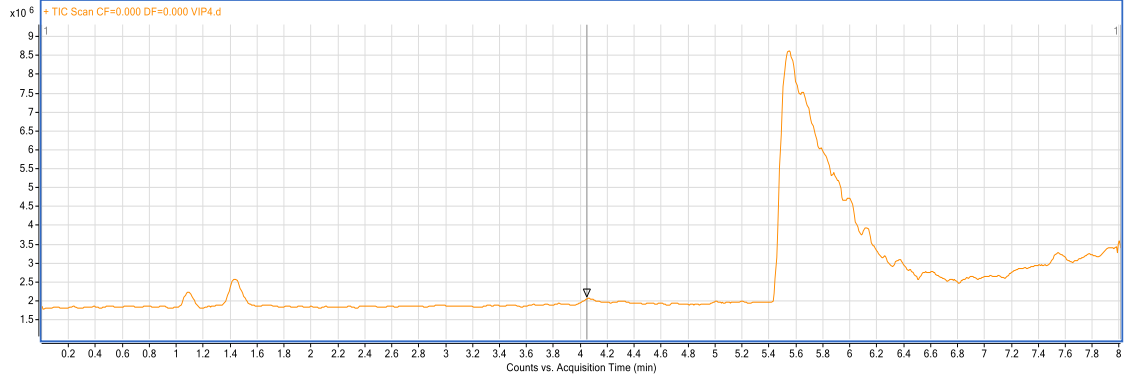
Adsorplanmayı engelleyici olarak peptidin temas ettiği yüzeylerin kaplanması ve etkileşimin kesilmesi amacı ile *albumin* ön plana çıkmaktadır. Kaplama işlemi için BSA çözeltisi (%1'lik) hazırlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılacak pipet ucu, tüp, vial vb. malzemeler bu albumin çözeltisi ile çalkalanıp kurutulmuştur. Ardından standart peptit çözeltileri ve çalışma çözeltilerinin hepsi bu kaplanmış malzemeler kullanılarak hazırlanmıştır. Ayrıca stok peptit çözeltisi içerisine de BSA eklenmiştir.

VIP stoğu (0,25 mg/mL) %1 BSA çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak 1 saat ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çalışma çözeltileri bu karışım kullanılarak hazırlanmıştır.

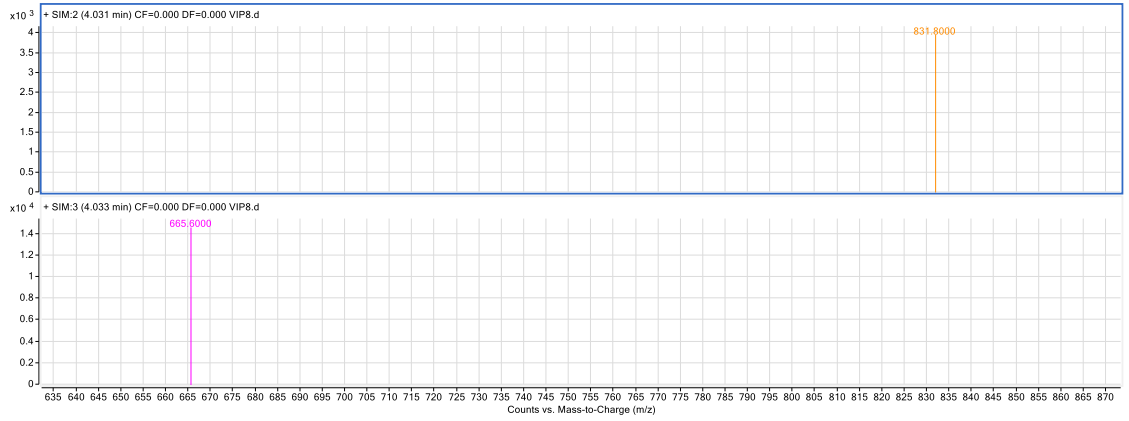
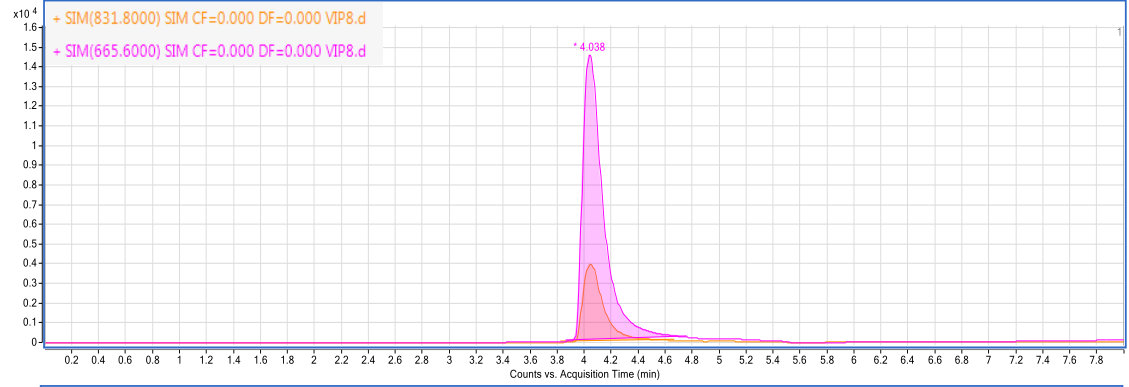
Aynı zamanda çözücünün de adsorpsiyon üzerine etkisi incelenmiştir. Normalde VIP stoğu %1 AcAc içerisinde hazırlanmıştır. Önceki optimizasyon çalışmalarında da sürekli %1 AcAc ile seyreltilmiştir. Adsorpsiyonu engelleyici/azaltıcı etkisi olup olmadığını görmek için 3 farklı seyreltme çözeltisi hazırlanmıştır:

- %1 AcAc
- %1 AcAc-%50 ACN
- %5 AcAc- %50 ACN

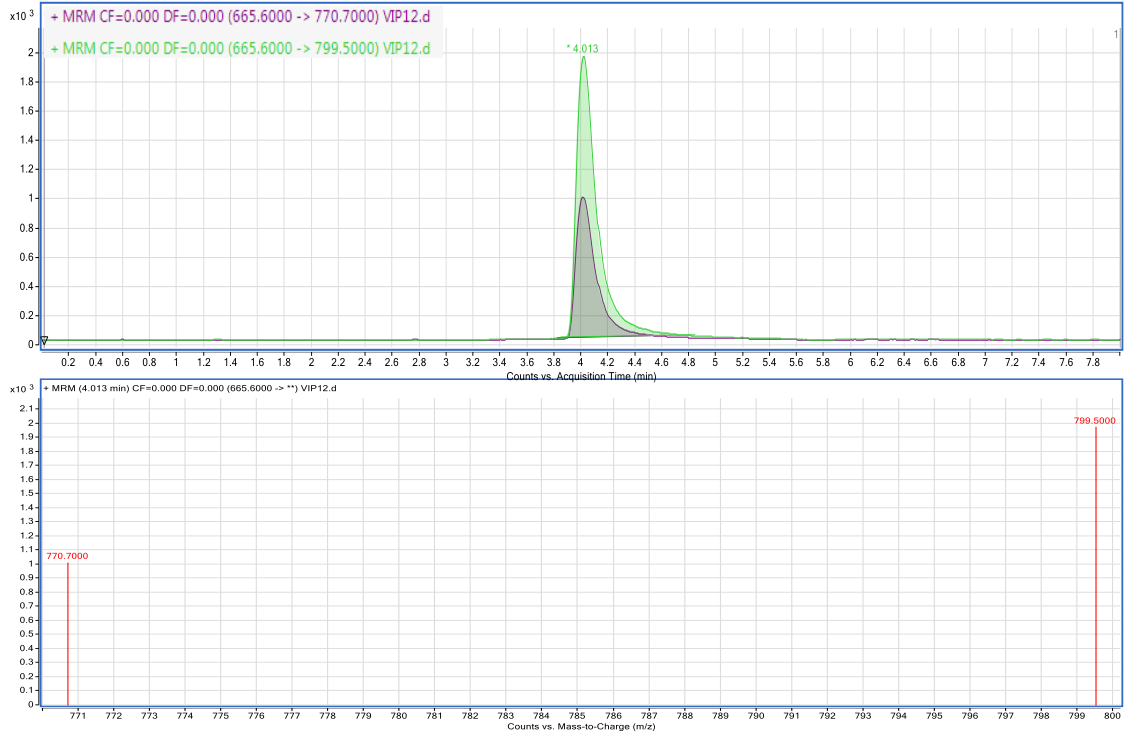
Bu çözeltiler ile 3 farklı set VIP çalışma çözeltileri (250 ve 500 ng/mL) hazırlanmış ve sırayla Tarama-SIM-MRM yöntemleri ile analizlenmiş, Şekil 4.18 ve 4.29'da sunulmuştur.



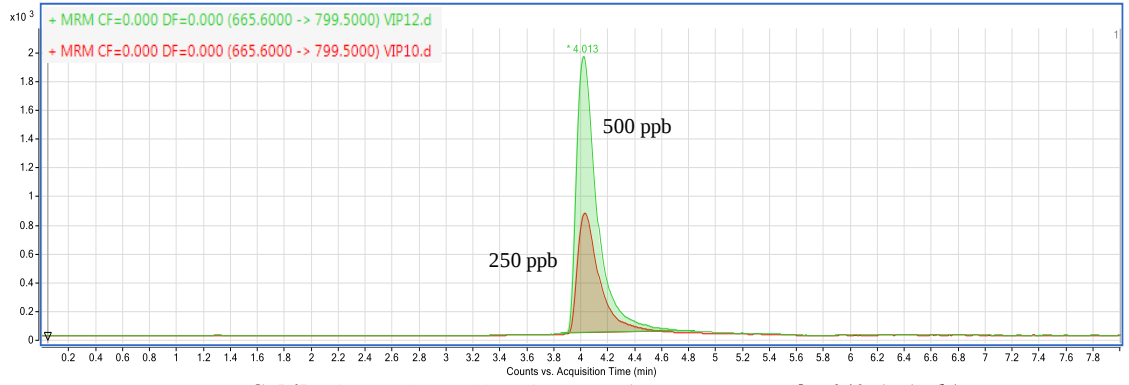
Şekil 4.18. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %I AcAc'li)



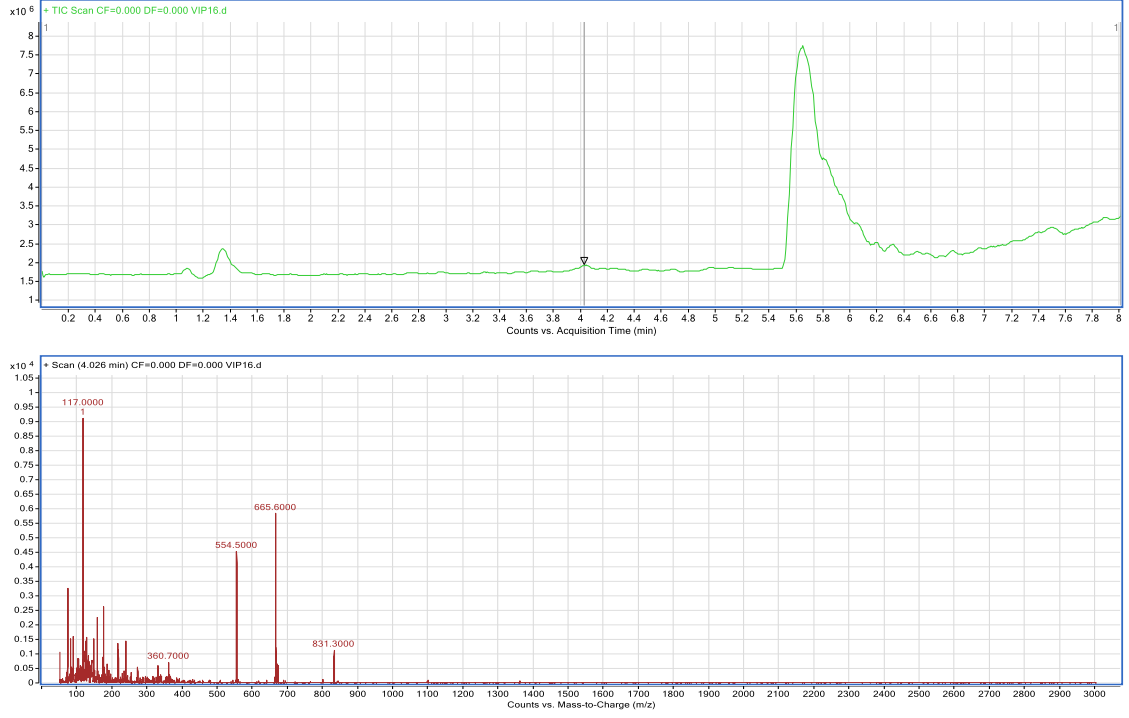
Şekil 4.19. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %I AcAc'li)



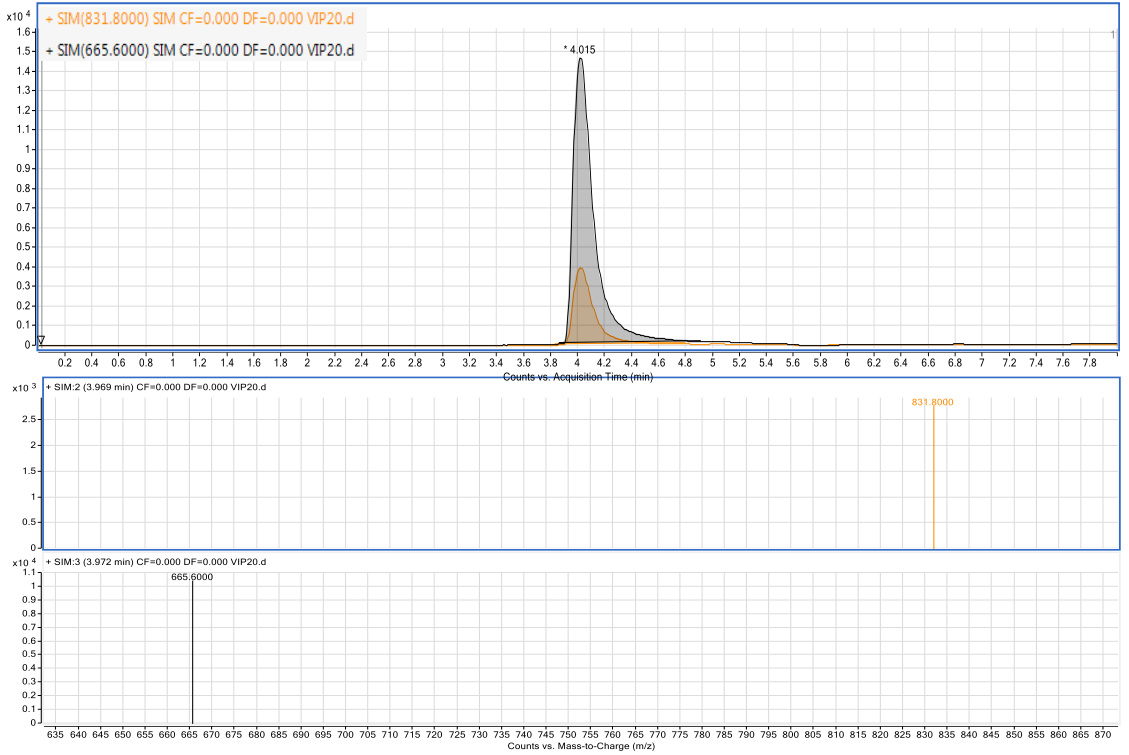
Şekil 4.20. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc'li)



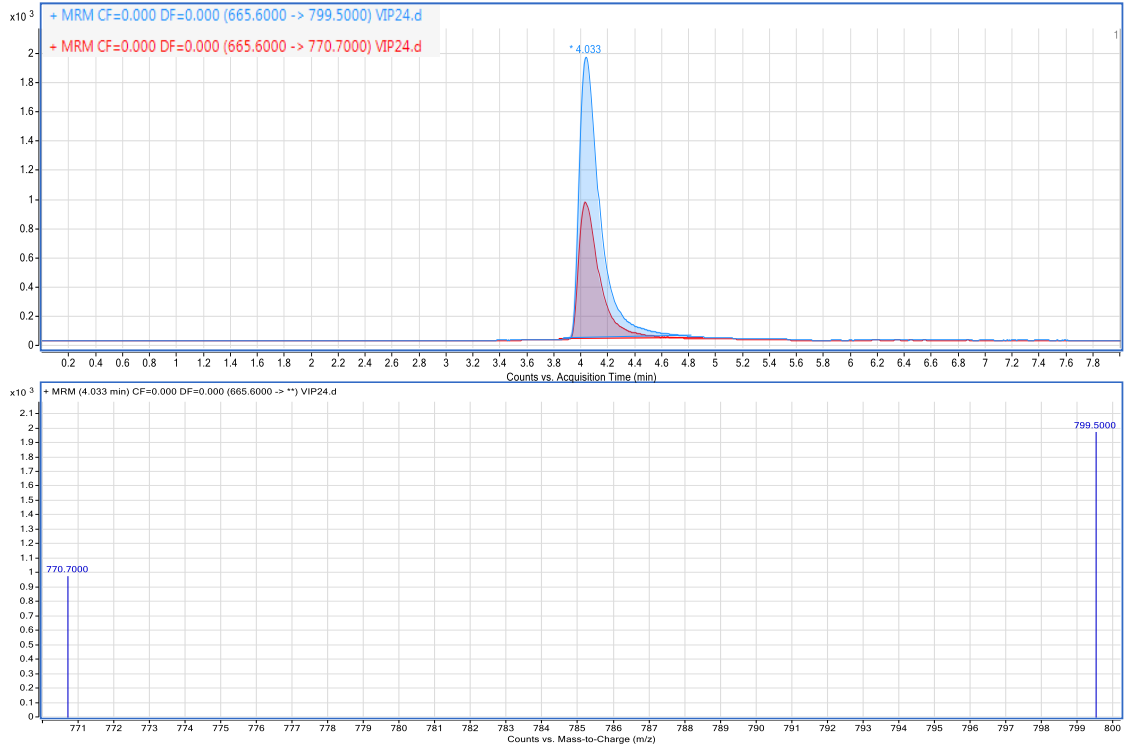
Şekil 4.21. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc'li)



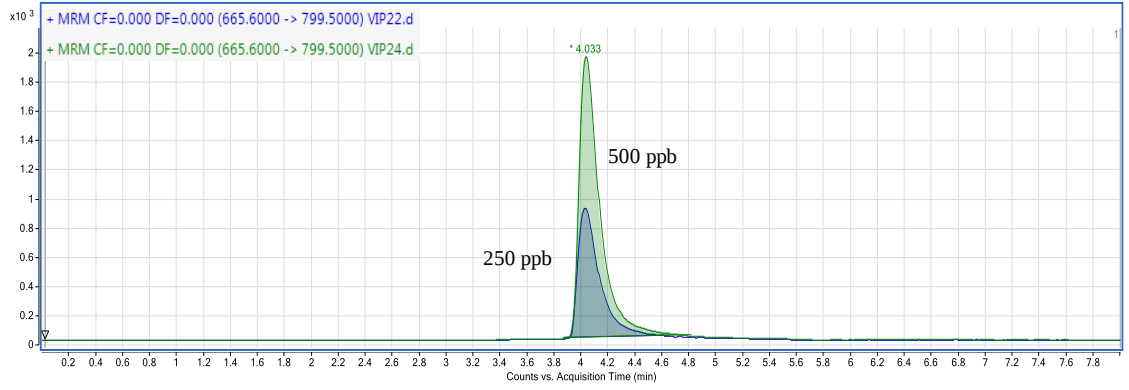
Şekil 4.22. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)



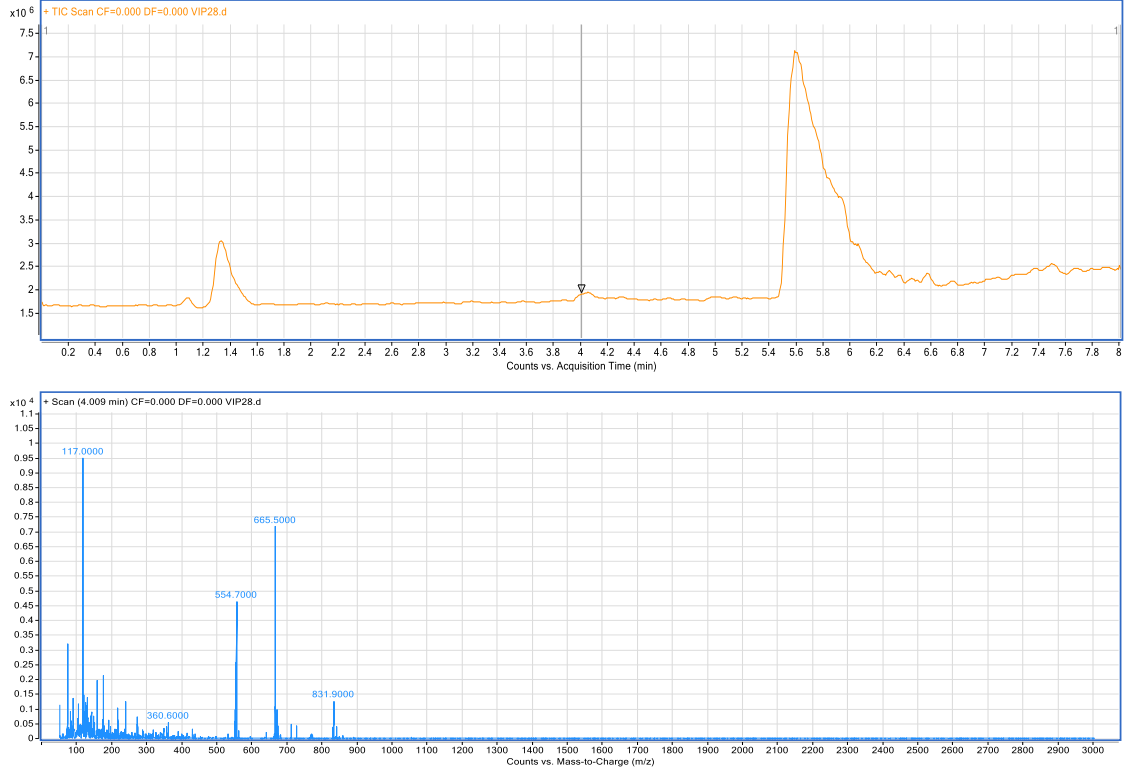
Şekil 4.23. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)



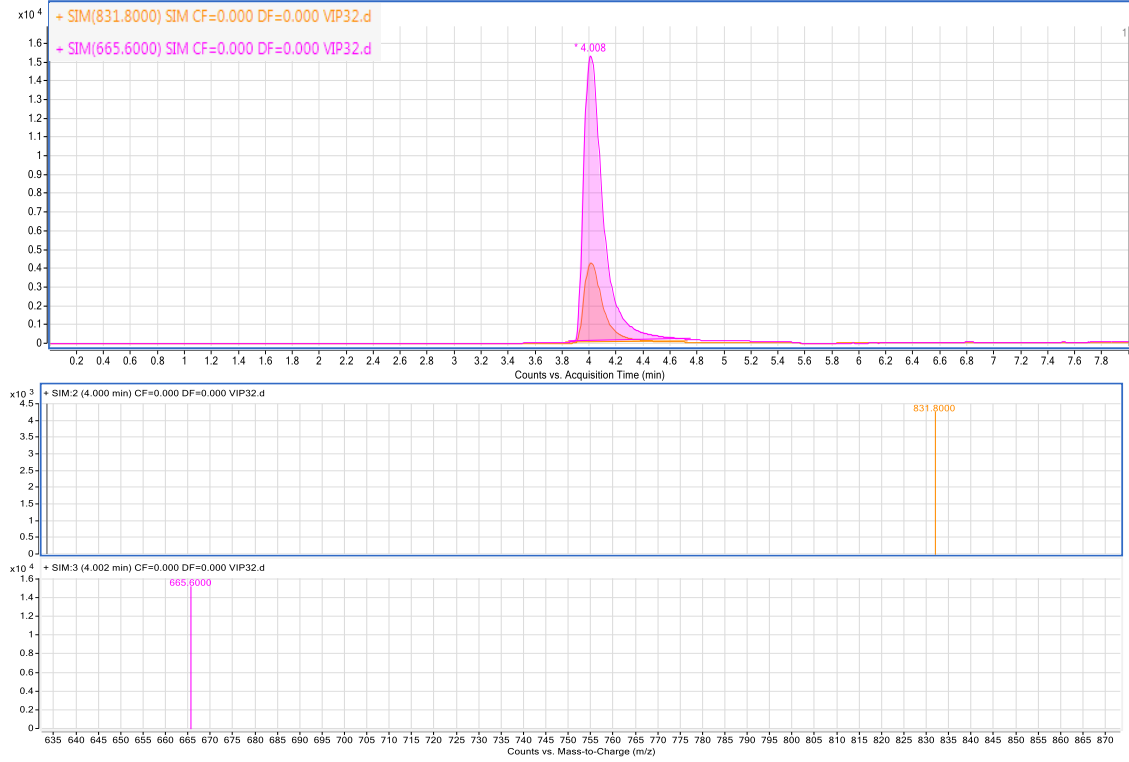
Şekil 4.24. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)



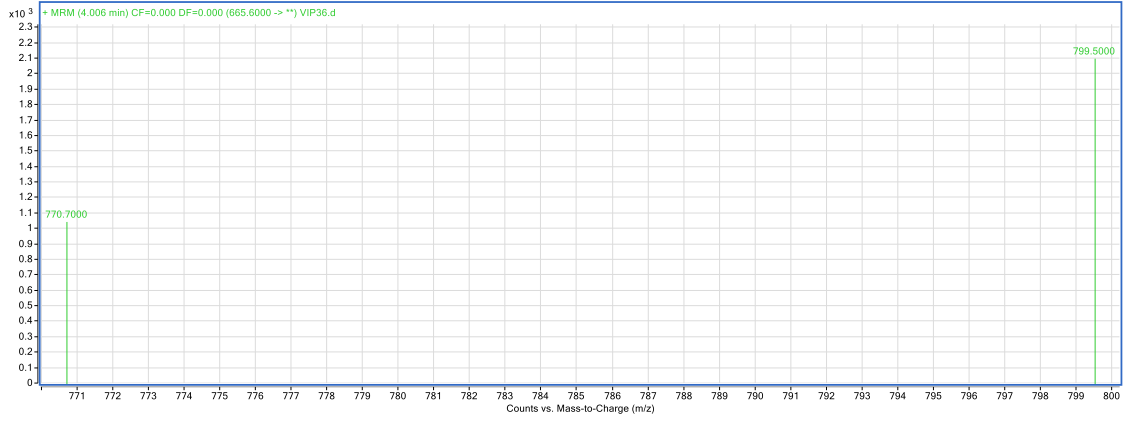
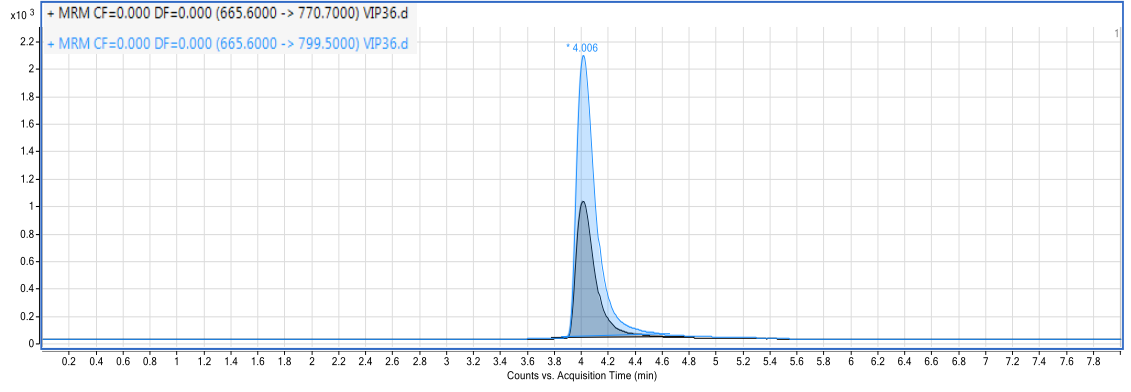
Şekil 4.25. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %1 AcAc-%50 ACN'li)



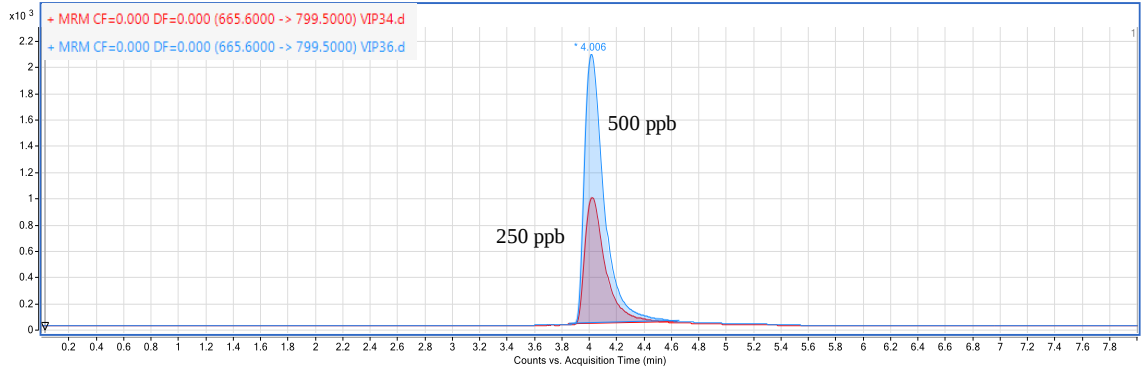
Şekil 4.26. 500 ng/mL VIP (Tarama yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)



Şekil 4.27. 500 ng/mL VIP (SIM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)



Şekil 4.28. 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)



Şekil 4.29. 250 ve 500 ng/mL VIP (MRM yöntemi ile, %5 AcAc-%50 ACN'li)

Ortamda organik çözücünün olması ve asitliğin artırılması adsorpsiyonu azaltıcı etki göstermiştir. Seyreltme çözeltileri arasında piklerde belirgin bir farklanma olmamıştır. Her üç seyreltme çözeltisi ile VIP pikinde kuyuklanma meydana gelmiştir. Piklerin alıkonma zamanı ve alanları arasında fark yok iken değerlendirme SNR'ye göre

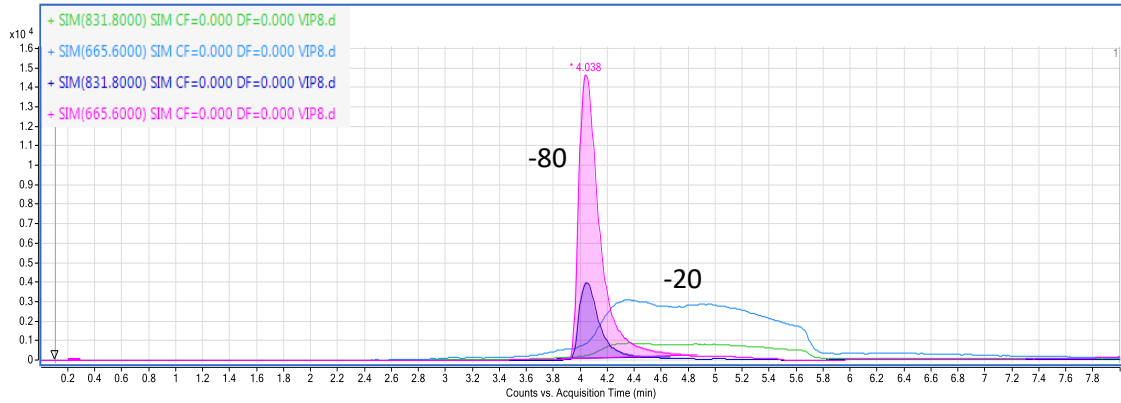
yapılmıştır (Tablo 4.11). Ayrıca derişim artışı ile pik alanları da orantılı olarak değişmektedir.

Tablo 4.11. 500 ppb VIP için 665,9 m/z kütleline ait piklerin karşılaştırması (SIM yöntemi ile)

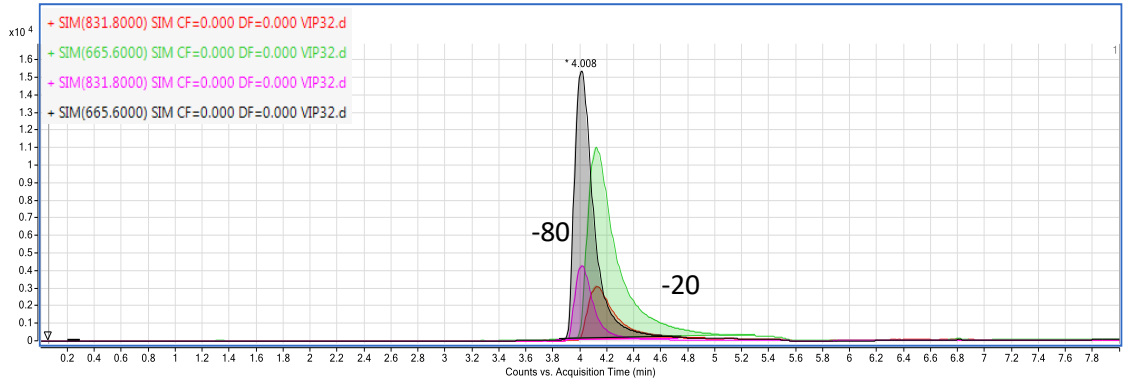
VIP	Zaman (dak)	A	SNR
%1 AcAc ile VIP	4,038	160799,98	8863,4
%1AcAc-%50 ACN ile VIP	4,015	156932,27	11948,9
%5AcAc-%50 ACN ile VIP	4,008	154503,54	11701,6

Asitliğin artması adsorpsiyon için belirgin bir fark göstermezken, ortama organik çözücünün girmesi apolarlığı arttırdığı için polar olan VIP'in çözünürlüğünü azaltmış, iyonlaşmasını engellemiş, albümin ile kaplı olmasına rağmen iyonik halde olabilecek yüzeye tutunmasını durdurmuştur.

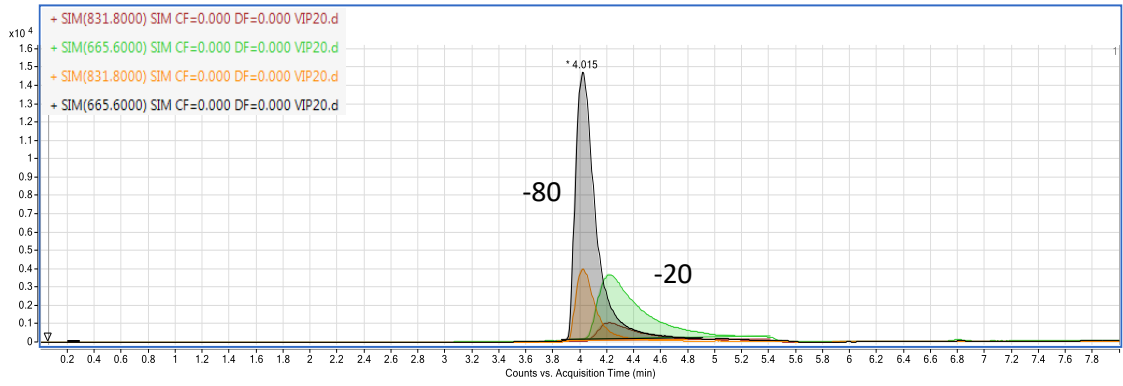
VIP standart peptit çözeltisinin farklı saklama koşullarındaki stabilitesi de bu çalışmalar sırasında incelenmiştir. 16 ay boyunca -80°C ve 2 ay boyunca -20°C'de bekletilen albuminsiz ve kaplanmamış vialler içerisindeki VIP çözeltileri kullanılarak yukarıdaki üç farklı seyreltme çözeltisi ile 500 ng/mL derişiminde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler SIM modunda analizlenip 665,9 ve 832 m/z kütleli pikler üzerinden karşılaştırmalar yapılmıştır (Şekil 4.30-4.32).



Şekil 4.30. 500 ng/mL VIP, %1 AcAc ile seyreltilmiş



Şekil 4.31. 500 ng/mL VIP, %1 AcAc-%50 ACN ile seyreltilmiş



Şekil 4.32. 500 ng/mL VIP, %5 AcAc-%50 ACN ile seyreltilmiş

16 ay boyunca -80°C 'de saklanan VIP kullanılarak ve farklı seyreltme çözeltilerinden elde edilen pikler arasında belirgin bir fark gözlenmezken, 2 ay boyunca -20°C 'de saklanan VIP çözeltilerinde asit ve organik çözücünün miktarı arttıkça pik alanlarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum -20°C 'deki adsorpsiyonun -80°C 'dekine göre daha fazla olduğunu, peptidin stabilitesinin daha düşük sıcaklıklarda daha fazla olduğunu göstermiştir.

4.5. PACAP-38 için Yapılan Adsorpsiyon Engelleyici Çalışmalar

Analizlere PACAP-38 ile devam edilmiştir. İlgili literatürler incelendiğinde çözücü olarak su ve %1 AcAc öne çıkmaktadır. PACAP-38'ın 4 Arg ve 7 Lys amino asidi içermesi nedeni ile VIP'ten (3 Lys ve 2 Arg amino asidi içeriyor) bile daha bazik yapıda olması ve analiz sırasında iyonlaşmasını kolaylaştırmak için çözücü olarak yine %1 AcAc seçilmiştir. PACAP-38 standart maddesi, 0,5 mg/mL derişimde stok olacak şekilde %1

AcAc içinde çözülmüştür. Bu stok çözelti albuminli ve kaplanmış viallerdeki PACAP-38'in (0,25 mg/mL) yanında albuminsiz ve kaplanmamış viallerdeki PACAP-38 (0,5 mg/mL) olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Stabilitelerini korumak amacı ile tüm PACAP-38 çözeltileri -80°C'de saklanırken, çalışma çözeltileri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Albuminli ve kaplanmış viallerde bulunan 0,25 mg/mL'lik PACAP-38 stoğundan 125, 250 ve 500 ng/mL derişimlerinde çalışma çözeltileri hazırlanmış, seyreltme çözeltisi olarak yine %1 AcAc-%50 ACN kullanılmıştır.

VIP analizlerinin de yapıldığı %0,2 FA-su (A) ve %0,2 FA-ACN (B) hareketli faz kullanılarak 0,2 mL/dak akış hızında Tablo 4.1'de verilen gradient koşullarında denemeler yapılmıştır. Pozitif polaritede 50-3000 m/z aralığında tarama yöntemi ile yapılan analizler sırasında hiçbir PACAP-38 piki ve kütlesi gözlenememiştir. Ortamda albümin de olduğu için büyük gelen albümin pikinin içinde kalabileceği düşünülerek farklı gradientler (15 dak'da B hattı %10→90'a değiştirilmiştir) de denenmiş fakat PACAP-38 gözlenememiştir.

Albuminsiz ve kaplanmamış viallerde bulunan 0,50 mg/mL'lik PACAP-38, 1:1 oranında %1 BSA ile karıştırılmış, 1 saat ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından 125, 250 ve 500 ng/mL derişimlerinde çalışma çözeltileri %1 AcAc-%50 ACN ile hazırlanmıştır. Aynı kromatografik ve MS koşullarında yapılan analizlerde de PACAP-38 piki ve kütlesi gözlenememiştir.

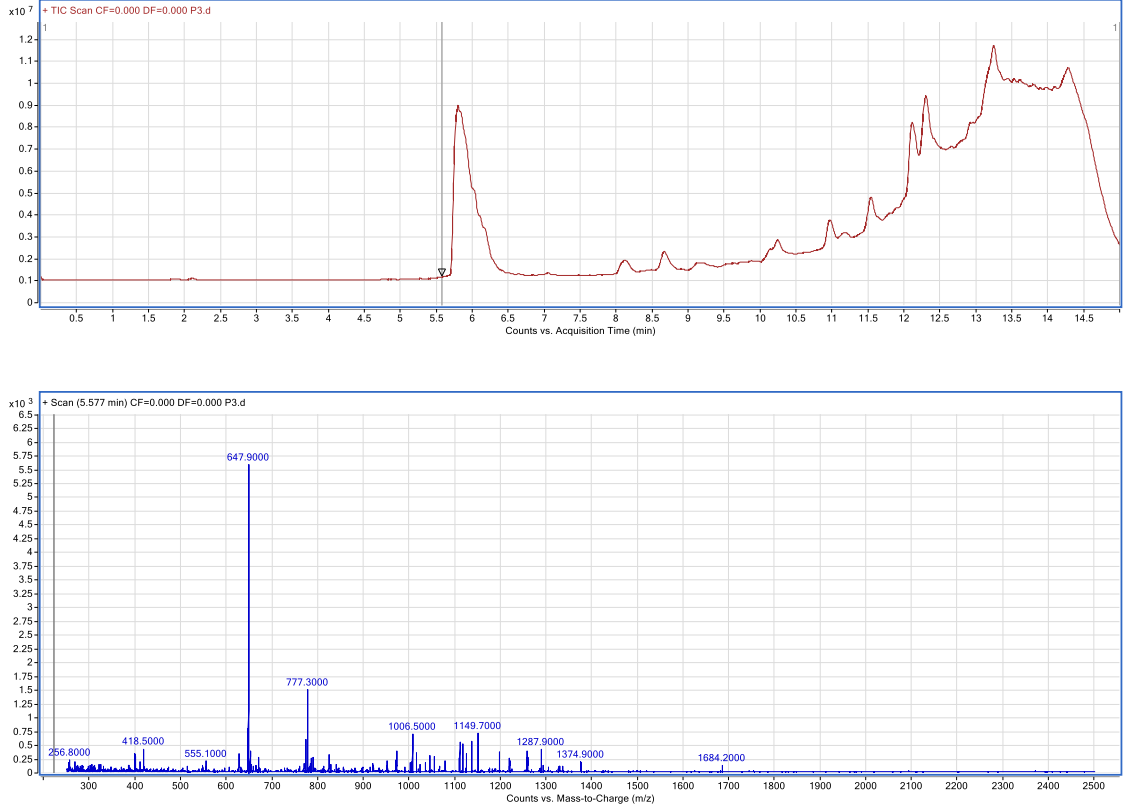
Yukarıdaki çalışma çözeltileri hazırlanırken ara stok olarak kullanılan 2500 ng/mL derişimindeki PACAP-38 çözeltilerinden organik içeriğin arttırıldığı %1 AcAc-%80 ACN seyreltme çözeltisi ile yine üç farklı derişimde çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Hem albuminli ve kaplanmış hem de albuminsiz ve kaplanmamış malzemelerde bulunan PACAP-38 çözeltileri kullanılmıştır. Organik faz miktarının arttırılması ile adsorplanmış olan peptidin hidrofobik kısımlarının çözünürleştirilmesi ve yüzeyden koparılması amaçlanmıştır. Tablo 4.1'de verilen gradientin yanı sıra Tablo 4.12'de verilen gradient ile analizler yapılmıştır.

Tablo 4.12. Üçüncü deneme gradienti

Zaman (dak)	%A	%B	Akış hızı (mL/dak)
0	90	10	0,2
11	10	90	0,2
12	10	90	0,2
15	90	10	0,2

50-3000 m/z aralığında tarama yöntemi ile yapılan analizlerde PACAP-38 piki ve kütlesi gözlenememiştir. PACAP-38'i daha hassas inceleyebilmek için tarama sırasındaki kütle aralığı daraltılıp 250-2500 m/z yapılmış fakat yine de PACAP-38 gözlenememiştir.

PACAP-38'in hidrofobik etkileşimin fazla olmasından dolayı analizlerin yapıldığı C18 kolonda silanoller ile daha fazla etkileşip kolonda kalıyor olabileceği düşünülüp farklı bir C8 (Zorbax 300 SB Narrow bore-2,1×150 mm, 3,5 µm) kolona geçiş yapılmıştır. Aynı hareketli faz (A: %0,2 FA-su, B: %0,2 FA-ACN) ve Tablo 5.8'de verilen gradient ile denemelere devam edilmiştir. Albumin ile kaplanmış tüplerde bulunan ve albümin içeren PACAP-38 stoklarından %1 AcAc-%80 ACN karışımı ile seyreltmeler yapılarak 500 ng/mL'lik çözelti hazırlanmış, 250-2500 m/z aralığında pozitif modda tarama yapılmıştır. Tarama sonucunda kütle miktarı oldukça düşük olmasına rağmen az da olsa 648,0 (M⁺) kütlesi gözlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, Üçüncü Deneme Gradienti ile)

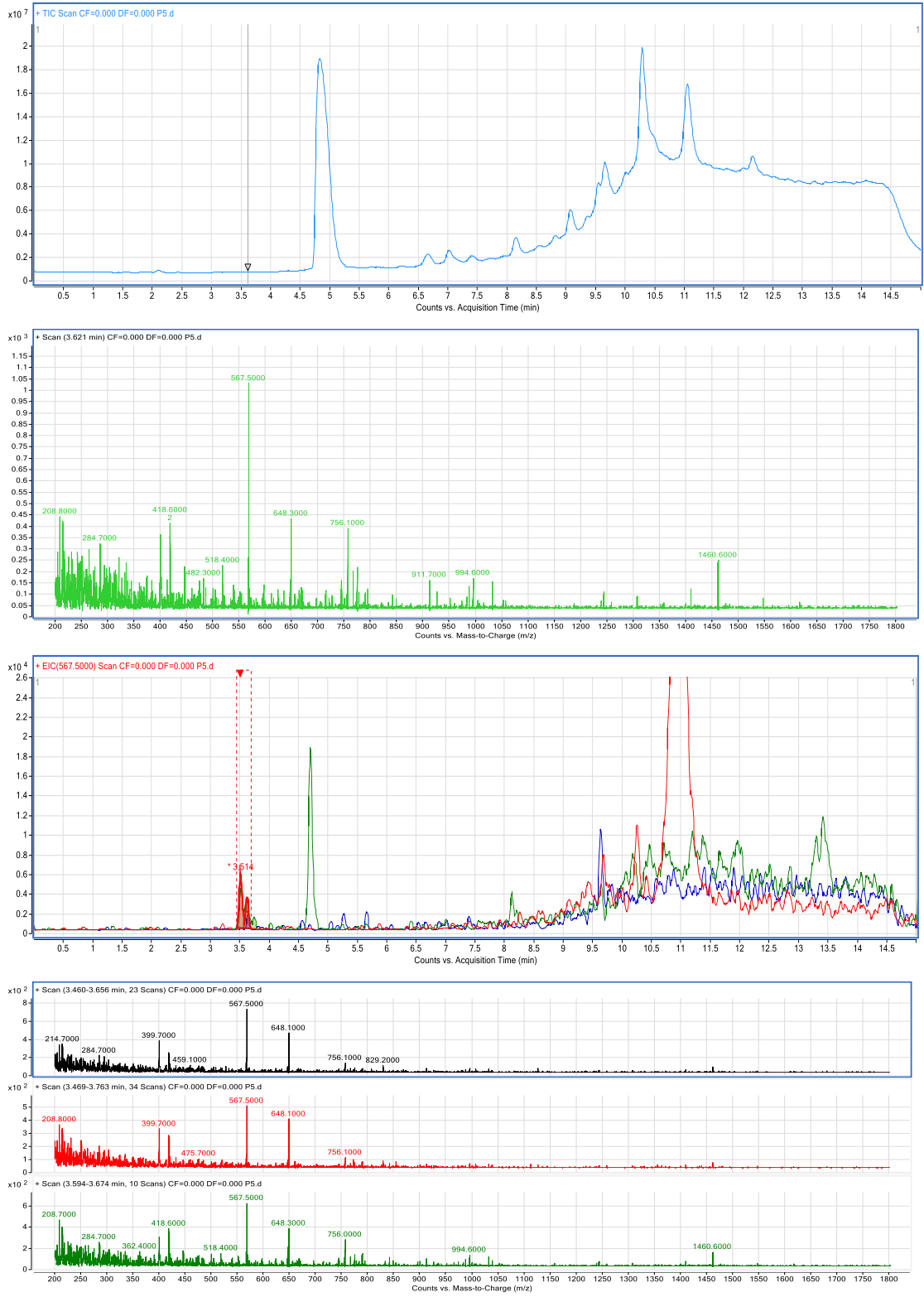
Hareketli fazın asitliğinin artırılıp PACAP-38'in daha fazla iyonlaşmasını sağlamak için hareketli faz A: %0,5 FA-su ve B: %0,5 FA- ACN olarak hazırlanmıştır. Diğer kromatografik ve MS koşulları sabit tutularak aynı çözeltiler yeniden analizlenmiştir. Analizler sonucunda çok küçük de olsa 567,2 (M^{+8}) kütlesi gözlenmiştir.

Gradient Tablo 4.13'teki şekline dönüştürülüp tarama aralığı 200-1800 m/z olarak daraltılıp, analiz tekrarlanmıştır.

Tablo 4.13. Dördüncü deneme gradienti

Zaman (dak)	%A	%B	Akış hızı (mL/dak)
0	90	10	0,2
8	5	95	0,2
12	5	95	0,2
15	90	10	0,2

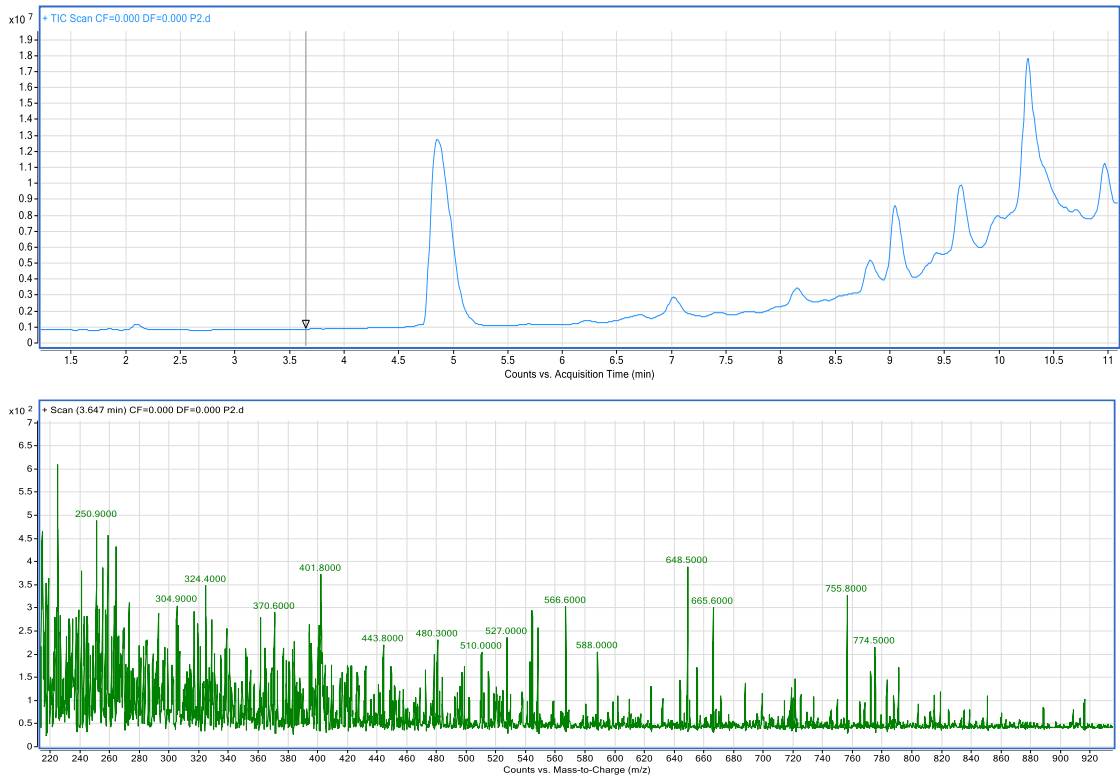
Analiz sonucunda kromatogramda belirgin bir pik olmamakla birlikte kütle spektrumunda az da olsa 504,2(M^{+9}), 567,6(M^{+8}) ve 648,4(M^{+7}) kütleleri gözlenmiştir (Şekil 4.34).



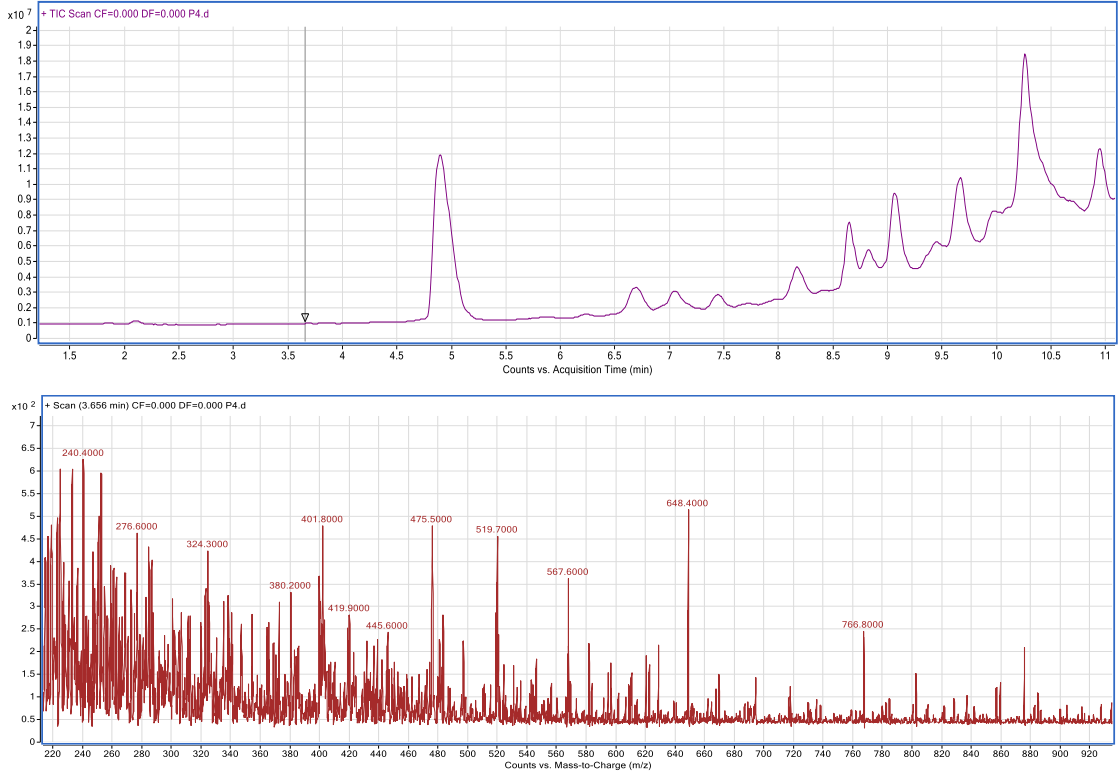
Şekil 4.34. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, Dördüncü Deneme Gradienti ile)

Asitliğin artırılması PACAP-38'in iyonlaşmasını kolaylaştırıp kütle gözlenmesini sağladığı için daha kuvvetli bir asit olan TFA ile aynı hareketli faz tekrar hazırlanıp analizler tekrarlanmıştır. Fakat PACAP-38'e ait herhangi bir kütle veya pik gözlenmemiştir.

Hareketli faz içeriği olarak FA'ya geri dönmüştür. Bu sefer seyreltme çözeltisi içerisinde AcAc ya da FA olmasının PACAP-38 üzerine etkisini incelemek için iki farklı çözelti (%1 AcAc-%80 ACN ve %0,5 formik asit-%80 ACN) ile seyreltilmiş 500 ng/mL PACAP-38 çözeltisi hazırlanmıştır. Hareketli faz A: %0,5 FA-su ve B: %0,5 FA-ACN ve Tablo 4.13'deki gradientin kullanıldığı sistemde 200-1800 m/z aralında tarama yapılmıştır. Her iki seyreltme çözeltisi için de belirsiz pik ve 567(M⁺₈), 648(M⁺₇) ve 756(M⁺₆) kütleleri gözlenmiştir (Şekil 4.35-4.36).



Şekil 4.35. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, %1 AcAc-%80 ACN ile)



Şekil 4.36. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, %0,5 FA-%80 ACN ile)

Tarama yöntemi ile pik gözükmediği için çözeltiler SIM analizlenmiştir. PACAP-38'e ait SIM yönteminde MS parametreleri aşağıda Görsel 4.7'de verilmiştir.

SIM yöntemi ile analizlenen PACAP-38 için 567(M⁺₈), 648(M⁺₇) ve 756(M⁺₆) kütlelerinin aynı anda gözlemlendiği alıkonma zamanı 3,6 dak olarak görülmüştür, fakat pik şekli oldukça kötü gelmiştir. SIM yöntemi ile analizlenen PACAP-38'e ait kromatogramlar Şekil 4.37'de verilmiştir.

Ion source

AJS ESI

Time filtering
☒ Peak width

0.07

 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
▶ 1	0	MS2 SIM	To MS	0	0	☒

Scan segments

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Mass	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	PACAP+6	☐	756.7	Unit	150	135	7	Positive
	PACAP+7	☐	648.6	Unit	150	135	7	Positive
	PACAP+8	☐	567.2	Unit	150	135	7	Positive

Source parameters

Gas Temp:

300

 °C
 °C

Gas Flow:

5

 l/min

Nebulizer:

45

 psi
 psi

Sheath Gas Temp:

350

 °C

Sheath Gas Flow:

7

 l/min

Positive

Negative

Capillary:

3500

 V

3500

 V
 V

Nozzle Voltage:

500

 V

500

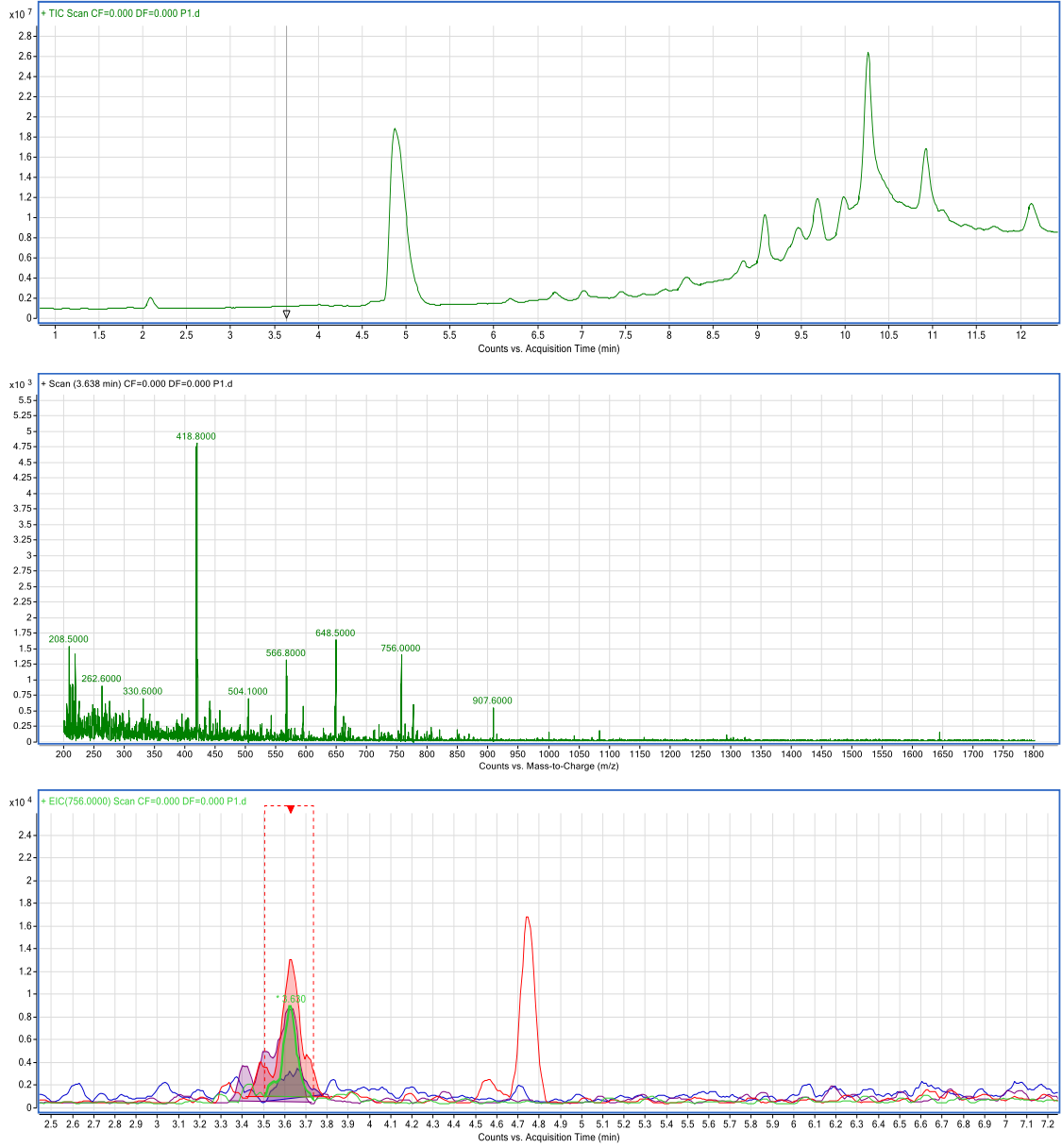
 V

Görsel 4.7. SIM yöntemine ait MS parametreleri



Şekil 4.37. 500 ng/mL PACAP-38 (SIM yöntemi ile)

Hareketli faz ve seyreltme çözeltisinde FA ile devam edilmiştir. Hareketli fazdaki FA miktarı %1'e çıkarılıp PACAP-38 pikinin daha düzgün ve net görülmesi hedeflenmiştir. Çalışma çözelti hazırlanırken ise %1 FA-%80 ACN kullanılmıştır. Yeni hareketli faz kullanılarak Tablo 4.13'teki gradient ile 500 ng/mL PACAP-38, 200-1800 m/z aralığında taranmıştır. Analiz sonucunda 504,3(M^{+9}), 567,3(M^{+8}), 648,3(M^{+7}) ve 755,9(M^{+6}) kütleleri gözlenmiştir (Şekil 4.38).

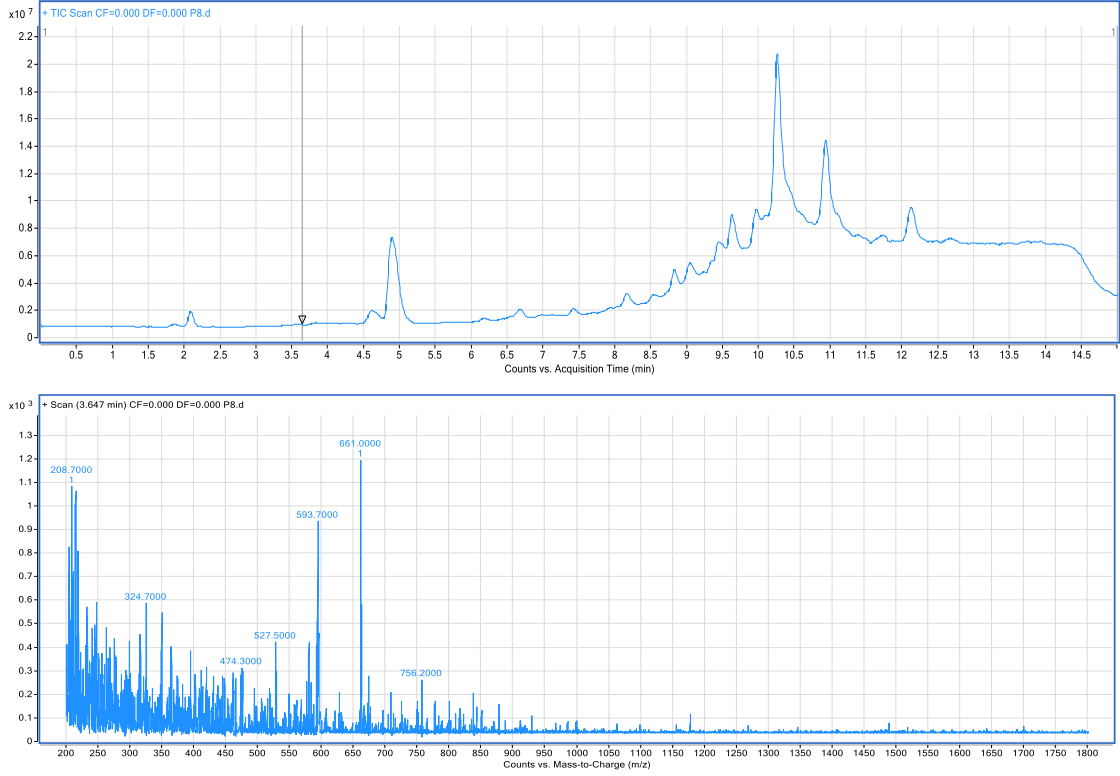


Şekil 4.38. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi, A: %1 FA-Su ve B: %1 FA-ACN'li hareketli faz ile)

FA'lı seyreltme çözeltisi ile devam edilmesine karar verilmiştir. Çünkü hem hareketli faz ile uyumu dikkate alınmış, hem de daha fazla protonlanmış PACAP-38 kütesi ($504,3(M^{+9})$) gözlenebilmiştir.

Buraya kadar yapılan analizlerde PACAP-38 çözeltileri polipropilen viallerde hazırlanmış ve saklanmıştır. Cam viallerde adsorpsiyon olayının izlenebilmesi için cam yüzeydeki Si-OH grupları %1 FA ve %1 BSA ile ayrı ayrı kaplanıp deaktive edilmiştir. İki farklı türde kaplanmış bu vialler içerisine albuminli ve albuminsiz olmak üzere PACAP-38 çözeltileri hazırlanmıştır. %1 AcAc-%80 ACN seyreltme çözeltisi ile 500

ng/mL PACAP-38 çözeltileri hazırlanıp kromatografi ve MS koşulları değiştirilmeden analize verilmiştir. FA ile kaplanmış viallerdeki PACAP-38 analizinde hiçbir kütle gözlenmezken, albumin ile kaplanmış viallerde düşük miktarda 756(M⁺₆) kütlesi gözlenmiştir (Şekil 4.39). Bu durum PACAP-38'in cam yüzeylerde daha çok tutunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.39. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albümin ile kaplanmış)

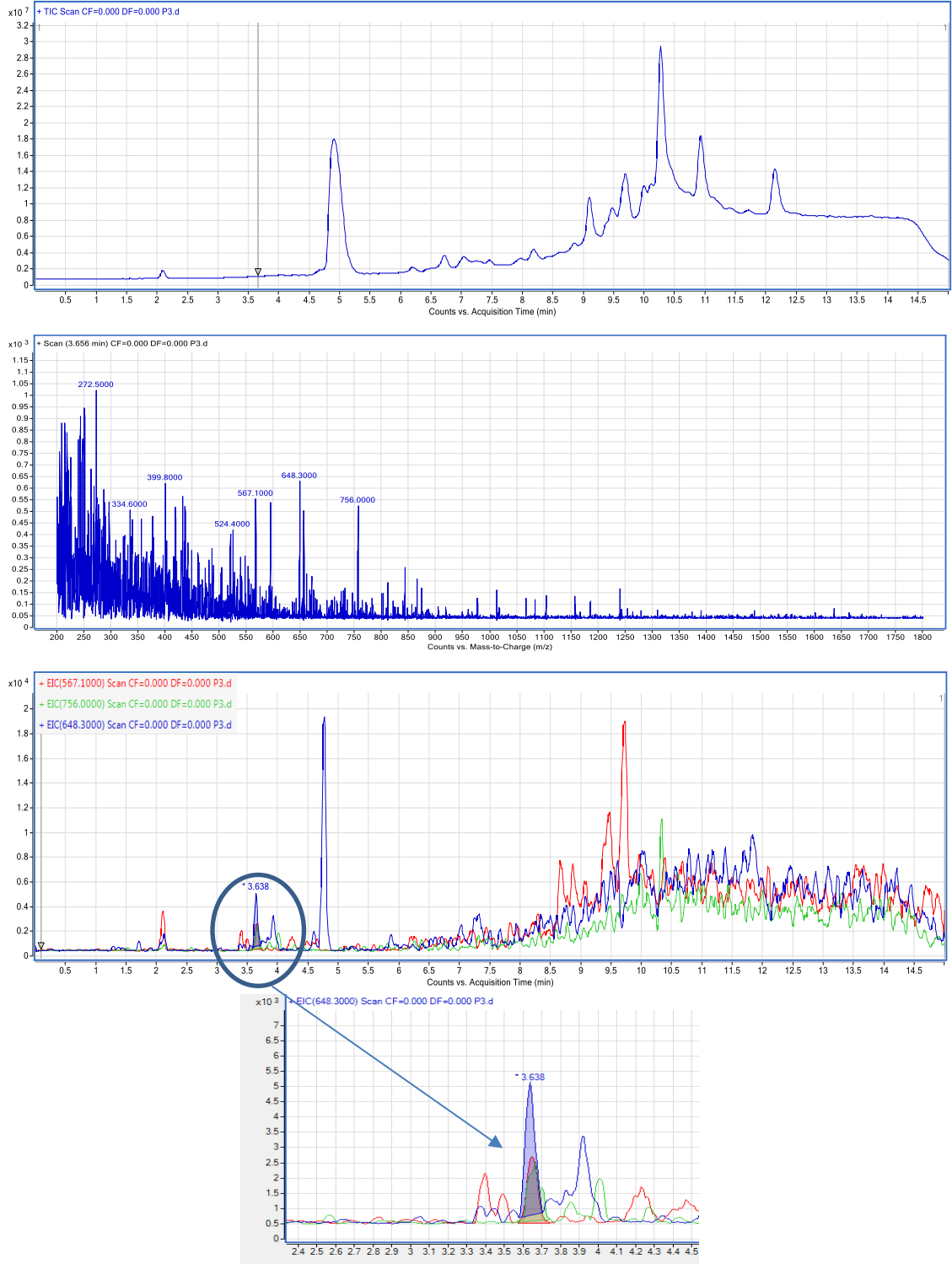
Adsorpsiyonu engellemek için numune içerisine yüzey aktif madde eklenip denemeler yapılmıştır. Yüzey aktif maddeler LC-MS analizlerinde iyon baskılayıcı görev üstlenip analitin gözlenmesini engelleyebileceği için tercih edilmezken, adsorpsiyona karşı davranışının izlenmesi amaçlanmıştır. SDS anyonik yüzey aktif madde olarak PACAP-38'e bağlanıp adsorpsiyonu engelleyebileceği öngörülmüştür. Bu doğrultuda SDS'nin kritik misel derişimi (CMC) değeri (25°C'de 8,2 mM (Baker, 1995)) dikkate alınıp numuneye ilk eklendiği vialdeki son derişimi bu CMC değerinden büyük olacak şekilde %0,5'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Seyreltmenin yapılacağı ana PACAP-38 stoğu içerisinde SDS 8,67 mM derişime sahip olmuştur. Seyreltme çözeltisi olarak %1 FA-%80 ACN kullanılarak 500 ng/mL derişiminde albuminli ve albuminsiz olmak üzere iki farklı

PACAP-38 çözeltisi hazırlanmıştır. Hareketli faz A: %1 FA-su ve B: %1 FA- ACN ve Tablo 4.13'te verilen gradient ile 200-1800 m/z aralığında tarama yapılmıştır. Albuminsiz ve SDS'li PACAP-38 çözeltilerinin analizinde herhangi bir kütle gözlenmezken albumin ve SDS'li olanlarda 567,1(M⁺⁸), 648,3(M⁺⁷) ve 756,0(M⁺⁶) kütleleri oldukça düşük miktarda gözlenmiştir (Şekil 4.40).

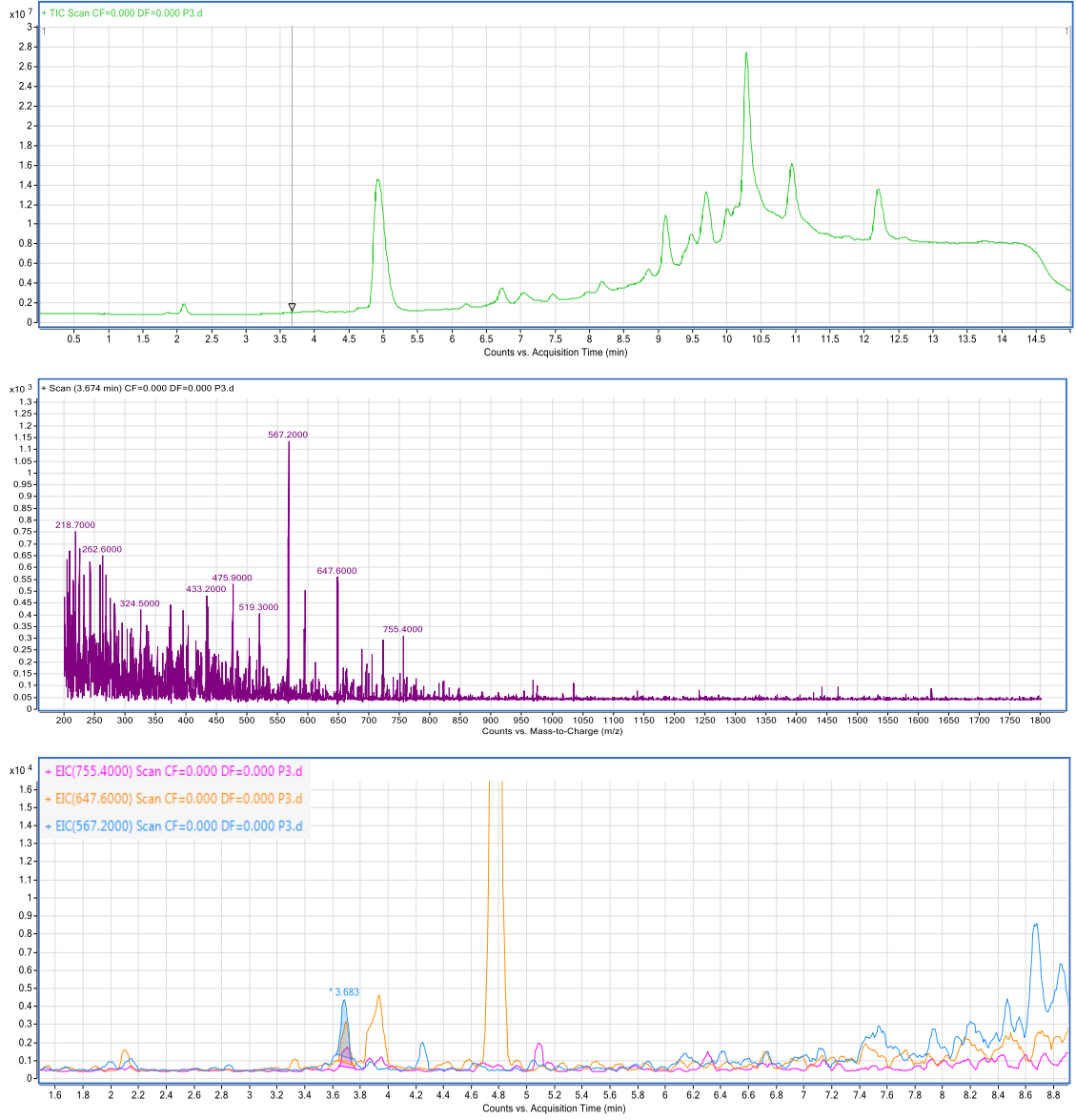
Non-iyonik yüzey aktif madde olan Tween80 aynı şekilde numune ortamına eklenip denemeler yapılmıştır. Tween80 için 20-25°C'de CMC değeri 0,012 mM olarak verildiğinden SDS'deki gibi derişik olacak şekilde çözeltisi hazırlandığında numune stoğu içindeki 0,812 mM Tween80 elde edilmiştir. Seyreltme çözeltisi olarak %1 FA-%80 ACN kullanılarak albuminli 500 ng/mL PACAP-38 çözeltisi hazırlanmış ve aynı koşullarda analizlenmiştir. Tarama yöntemi ile yapılan analizlerde 567,2(M⁺⁸), 647,6(M⁺⁷) ve 755,4(M⁺⁶) kütleleri düşük miktarda gözlenmiştir (Şekil 4.41).

Adsorpsiyon engelleyici olarak bazı çalışmalarda PEG'e de rastlanmıştır. Bu durum dikkate alınarak ortama PEG eklenerek denemeler yapılmıştır. Ayrıca adsorpsiyon olayının sıcaklık yükseldiğinde tersine döneceği ve adsorplanan PACAP-38'in çözeltiye geçeceği öngörölüp çözelti bir süre sıcak ortamda bekletilmiştir.

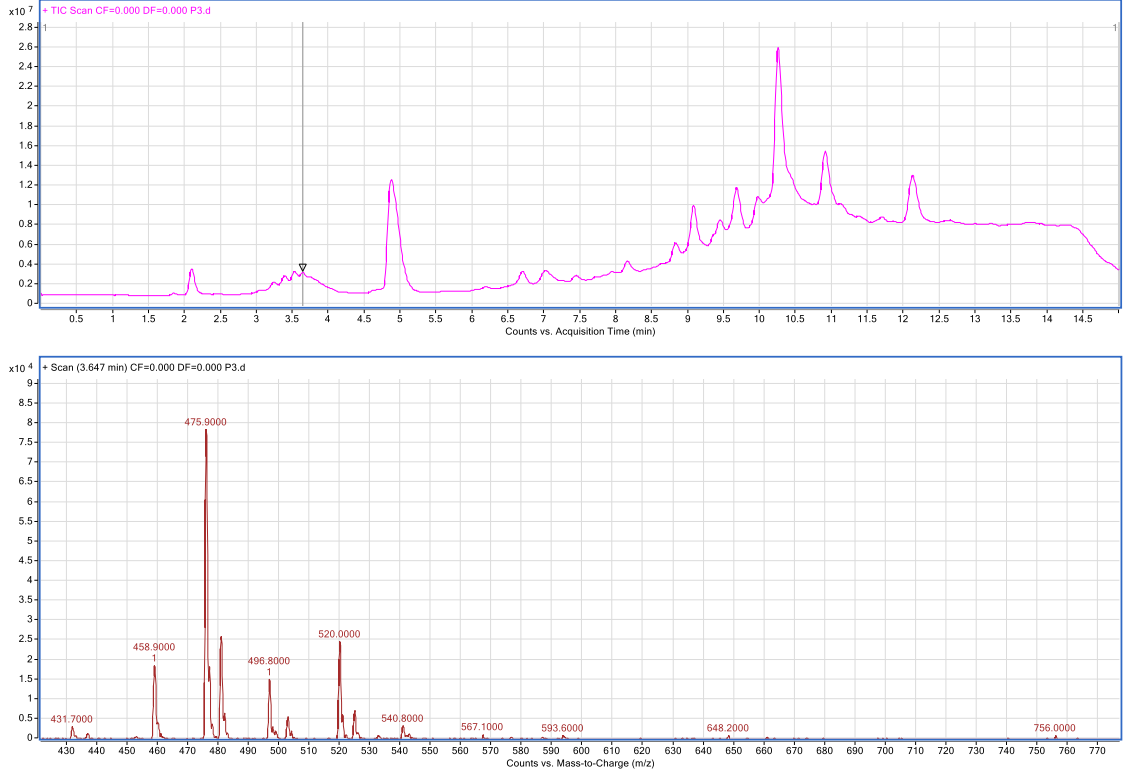
Bu bilgiler ışığında albuminli PACAP-38 stoğu içerisine Tween80'de olduğu gibi Tween20 eklenmiştir. Bunun yanında başka bir PACAP-38 çözeltisine de aynı oranda %0,1 PEG400 çözeltisinden eklenmiştir. 80°C'ye ısıtılmış ultrasonik banyoda 20dak bekletilmiştir. Bu PACAP-38 stokları kullanılarak %1 FA-%80 ACN çözeltisi ile albuminli 500 ng/mL PACAP-38 çözeltileri hazırlanmış ve aynı koşullarda analizlenmiştir. Isıtılmış, Tween20 içeren albuminli PACAP-38 çözeltilerinin analizi sonucu çok küçük 648,3(M⁺⁷) ve 756(M⁺⁶) kütleleri gözlenirken, PEG400 içeren çözeltilerin analizinde de 567,1(M⁺⁸), 648,2(M⁺⁷) ve 756,0(M⁺⁶) kütleleri hemen hemen Tween20'lide olduğu gibi gelmiştir. Hatta PACAP-38 pikinin olduğu yerde PEG400 piklerinin de olduğu kütle spektrumundan da gözlenmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4.40. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albuminli ve SDS'li)



Şekil 4.41. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albuminli ve Tween-80'li)



Şekil 4.42. 500 ng/mL PACAP-38 (Tarama yöntemi ile, albuminli ve PEG400'lü)

Hem yüzey aktif maddelerin hem de PEG eklenmesinin PACAP-38 adsorpsiyonunu engelleyici bir etkisi olmamıştır. Hatta LC-MS sisteminde PACAP-38 iyonlaşmasını engelleyip aynı alıkonma zamanında gelmesi de analizi zorlaştırmıştır. Bu durum iyon baskılamanın var olduğunu kanıtlamıştır.

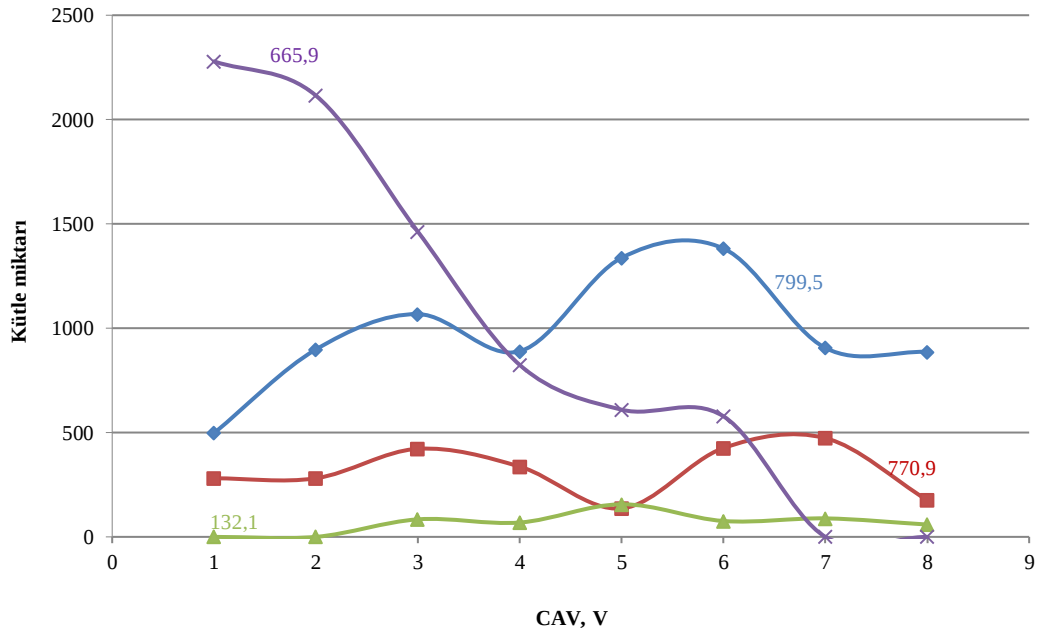
5. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Beyindeki kimyasal sinyaller olarak bilinen nöropeptitler birçok fizyolojik fonksiyonu olan yapılardır. VIP ve PACAP, mide-bağırsak sisteminde keşfedilmiş olmasına rağmen beyin dokusu gibi vücudun farklı kısımlarında da yer almaktadır. Sekretin-glukagon ailesine ait olan bu iki nöropeptidin aminoasit dizilimi açısından birbirine oldukça benzediği de bilinmektedir.

VIP ve PACAP açısından yapılan çalışmaların fizyolojik/farmakolojik açıdan oldukça detaylı olmasına rağmen analitik açıdan yetersiz olması, nöropeptitlerin biyolojik dokularda ve sıvılarda miktarlarının düşük olmasından, analizleri sırasında karşılaşılan zorluklardan, yeterince hassas yöntemlerin geliştirilememesinden kaynaklanmaktadır.

Bu tez kapsamında, biyolojik doku ve sıvılardan VIP ve PACAP-38'in analizine öncü olacak, hassas ve seçici LC-MS/MS yöntemi kullanılarak analiz metodu geliştirilmesi hedeflenmiştir.

PACAP-38'e göre daha küçük bir nöropeptit olan VIP ile LC-MS analizlerine başlanmış; kromatografik parametrelerin yanında MS'e ait parametreler de incelenmiştir. Kromatografik açıdan hareketli faz içeriği, organik çözücü miktarı ve cinsinin yanı sıra peptidin iyonlaşması üzerine etkisi olan asit miktarı ve cinsi açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca peptidin MS'te iyonlaşması ve iyon yoğunluğuna etkisi olacağı için akış hızının da taraması yapılmıştır. Kromatografik açıdan %0,2 FA-su ve %0,2 FA asit-ACN içeren hareketli faz ile 0,2 mL/dak akış hızında en iyi VIP piki elde edilmiştir. VIP'in pI değerinin 11'den büyük olmasından dolayı asidik ortamda pozitif iyonlaştığı bilindiği için MS analizleri pozitif modda gerçekleştirilmiştir. VIP'e ait temel iyonun yanında parçalama voltajı ve hücre içi hızlandırıcı voltajın da optimize edilip peptidin parçalanması sonucu elde edilen çoklu yüklenmiş türleri de gözlenebilmiştir. VIP'in +5 yüklü iyonu olan 665,9 kütlesi MRM yöntemi ile parçalandığında 799,5 m/z (quantifier) ve 770,7 m/z (qualifier) parça kütleleri başarılı bir şekilde karakterize edilmiştir.



Şekil 5.1. VIP'e ait çoklu yüklenmiş tür ve parçalarının değişimi

Tarama, SIM ve MRM yöntemi ile yapılan analizlerde yöntem oldukça seçici hale getirilmiştir.

VIP'in analizleri sırasında meydana gelen pik alanlarındaki düşme ve VIP'e ait kütlelerin gözlenememesi gibi sorunlar ortaya çıkmış, bu durumun VIP stabilitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Fakat yapılan literatür araştırmaları ve buna dayalı analizlerde sorunun stabilite kaynaklı değil peptidin yüzeye adsorpsiyonundan kaynaklandığı görülmüştür. VIP'in deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelere adsorpsiyonunu engellemek için %1 BSA çözeltisi ile bu malzemeler kaplanmış, stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanmasında bu malzemeler kullanılmış, hatta çözeltilerin içerisine dahi albümin çözeltisinden eklenmiştir. Ayrıca VIP için farklı oranlarda asit ve organik çözücü içeren seyreltme çözeltileri hazırlanmış ve adsorpsiyonu engelleme güçleri karşılaştırılmıştır. Bu koşullarda yapılan analizlerde VIP piki kromatogramlarda yer alırken çoklu yüklenmiş kütleleri de MS spektrumunda gözlenebilmiştir.

Adsorpsiyon probleminin olmasından dolayı PACAP-38 analizlerine doğrudan albümin ile kaplanmış malzemeler ve albümin içeren PACAP-38 çözeltileri ile devam edilmiştir. Kromatografik koşulların VIP ile aynı olduğu PACAP-38 analizlerinde, PACAP-38'in VIP'e göre daha büyük bir peptit olması nedeni ile diziliminde yer alan aminoasitlerin yüzey ile adsorpsiyonunu engellemede albümin yetersiz kalmış,

kromatogramlarda ve MS spektrumlarında PACAP-38 piki ve kütlesi gözlenememiştir. C18 analiz kolonunda silanoller ile daha fazla etkileşim kolonda tutunduğu düşünüldüğü için C8 analiz kolonunda da denemeler yapılmış ve PACAP-38 piki çok küçük de olsa gözlenebilmiştir. Hareketli faz içeriğindeki FA miktarının %1'e çıkarılması ile tarama modunda yapılan analizlerde PACAP-38'e ait çoklu yüklenmiş kütleler gözlenmiş fakat iyon yoğunluğu oldukça düşük kalmıştır. Albumin ile kaplamanın yanı sıra adsorpsiyonu engelleyici birçok deneme yapılmıştır; çözeltilerin yüksek sıcaklıkta bekletilip peptidin desorpsiyonunun sağlanması, çalışma çözeltilerine yüzey aktif madde (SDS, Tween 20, Tween 80) eklenmesi, PEG eklenmesi gibi. Literatürlerde adsorpsiyonu engellediği gösterilmesine rağmen LC-MS yönteminde eklenen farklı kimyasalların (yüzey aktif madde, PEG gibi) iyon baskılamadan dolayı peptit kütlesini görmeyi zorlaştıracak da bilindiği için peptit analizleri kısıtlanmıştır.

VIP ve PACAP-38'in her ikisinin de bazik özellikteki Lys ve Arg aminoasitleri bakımından yoğun pozitif yüklü olması, etkileşimde oldukları negatif yüzeyler tarafından güçlü bir şekilde tutunmalarına neden olmaktadır. Araştırmalar sırasında VIP için bu durumun bir miktar üstesinden gelinse de PACAP-38 için yeterli olmamıştır çünkü PACAP-38 VIP'e göre daha fazla Arg ve Lys amino asidi içerdiği için pozitif yükü daha fazla ve negatif yüzeylere tutunması daha güçlüdür. Buna rağmen LC-MS/MS gibi oldukça hassas ve seçici bir yöntem ile 'Triple quadrupole' olarak bilinen kütle analizörü sayesinde başarılı bir şekilde VIP ve PACAP-38 için çoklu yüklenmiş kütleleri ve parçaları gözlenebilmiştir. Fakat adsorpsiyondan kaynaklı olarak kütlelerin iyon yoğunlukları çok düşük kalmıştır.

Biyolojik numunelerde (beyin dokusu ve sıvısı gibi) peptit konsantrasyonlarının düşük olması nedeni ile geliştirilecek yöntemlere yönelik olarak temeli bu tez çalışmasında atılan VIP ve PACAP-38 analizi için adsorpsiyonun göz önünde bulundurulduğu farklı çalışmalar yapılabilir. Oldukça düşük seviyelere inilebildiği ve biyolojik örneklerde miktar tayinini yüksek doğrulukla yapabildiği için seçilen LC-MS/MS yöntemi adsorpsiyon sorunu çözüldüğü takdirde VIP ve PACAP-38 analizi için eşsiz bir yöntem olabilir. MS dedektöre uygun ve peptit iyonlarını baskılamayan bir adsorpsiyon engelleyici yöntem VIP ve PACAP-38'in eş zamanlı analizini dahi mümkün kılabilir.

LC-MS/MS yöntemine alternatif olarak klasik ters faz kromatografi yöntemleri dışında MS dedektörün bağlı olduğu kapiler elektroforez sistemleri ile de araştırmalar

yapılabilir. Çalışmaların yeni olmasına rağmen kapillerlerin içindeki silanollerin deaktive edilmesi ile peptit-silanol etkileşiminin azaltılması amaçlanabilir.

Peptitlerin sistemlere ve kolonlara adsorpsiyonunun dışında deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelere adsorpsiyonunu da engellemek için ticari olarak özel üretilmiş malzemeler kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abaye D.A., Pullen F.S., Nielsen B.V. (2011) Practical considerations in analysing neuropeptides, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide, by nano-electrospray ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry: monitoring multiple protonations. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 25, 1107-1116.
- Baggerman G., Verleyen P., Clynen E., Huybrechts J., De Loof A., Schoofs L. (2004) Peptidomics. *Journal of Chromatography B*, 803, 3–16.
- Baker D.L., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1995.
- Borzsei R., Mark L., Tamas A., Bagoly T., Bay C., Csanaky K., Banki E., Kiss P., Vaczy A., Horvath G., Nemeth J., Szauer E., Helyes Z., Reglodi D. (2009) Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *European Journal of Endocrinology*, 160, 561–565.
- Burbach JP., *Methods Mol Biol.*, 789, 1-36, 2011.
- Cui X., Cao D., Qu C., Zhang X., Zheng A. (2013) A study of the chemical and biological stability of vasoactive intestinal peptide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39 (12), 1907-1910.
- Cunico R.L., Gooding K.M., Wehr T. (1998) *Basic HPLC and CE Of Biomolecules*, Bay Bioanalytical Laboratory, Inc., Richmond, CA.
- Czegledi L., Tamas A., Borzsei R., Bagoly T., Kiss P., Horvath G., Brubel R., Nemeth J., Szalontai B., Szabadfi K., Javor A., Reglodi D., Helyes Z. (2011) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *General and Comparative Endocrinology*, 172, 115–119.
- Dejda A., Seaborn T., Bourgault S., Touzani O., Fournier A., Vaudry H., Vaudry D. (2011) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides*, 32, 1207–1216.
- Desidero, D.M. (1984) Analysis of Neuropeptides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*-Volume 6, Elsevier, s. 13

Eftekhari S., Salvatore C.A., Johansson S., Chen T., Zeng Z., Edvinsson L. (2013) Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood-brain barrier. *Brain Research*, S0006-8993(14)01615-1.

El-Karim I., Lundy F.T., Linden G.J., Lamey P.J. (2003) Extraction and radioimmunoassay quantitation of neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from human dental pulp tissue. *Archives of Oral Biology*, 48, 249-254.

Giorgianni F., Cappiello A., Beranova-Giorgianni S., Palma P., Trufelli H., Desiderio D.M. (2004) LC-MS/MS Analysis of Peptides with Methanol as Organic Modifier: Improved Limits of Detection. *Analytical Chemistry*, 76, 7028-7038.

Goyal D., Pisegna J. R. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP). *The Pancreapedia*. <http://www.pancreapedia.org/molecules/pituitary-adenylate-cyclase-activating-polypeptide-pacap> (Erişim tarihi: 14.11.2014)

Hansen J.M., Fahrenkrug J., Petersen J., Wienecke T., Olsen K.S., Ashina M. (2013) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the circulation after sumatriptan. *Scandinavian Journal of Pain*, 4, 211–216.

Herschbach, D. R. & Kolb, C. E. (2014). A Biographical Memoir. National Academy of Sciences. 9-11. <http://nasonline.org/publications/biographical-memoirs/>, (Erişim tarihi 11.01.2019).

Hoffman E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.

Jakab B., Reglodi D., Jozsa R., Hollosy T., Tamas A., Lubics A., Lengvari I., Oroszi G., Szilvassy Z., Szolcsanyi J., Nemeth J. (2004) Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61, 189–198.

Li W., Luo S., Smith H.T., Tse F.L.S. (2010) Quantitative determination of BAF312, a S1P-R modulator, in human urine by LC–MS/MS: Prevention and recovery of lost analyte due to container surface adsorption. *Journal of Chromatography B*, 878, 583-589.

Li W., Zhang J., Tse F.L.S. (2013) *Handbook Of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, s. 152-153.

Lock S., Fox S. (2015) CESI-MS A new way to Analyze for PACAP and VIP, Sciex, Warrington, UK.

Ludwig M. (2012) ‘Are Neuropeptides Brain Hormons?’ *Centre for Integrative Physiology*.

Maes K., Smolders I., Michotte Y., Eeckhaut A.V. (2014) Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography–mass spectrometry based bioanalyses: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1358, 1–13.

Mathé C., Devineau S., Aude J.C., Lagniel G., Chédin S., Legros V., Mathon M.H., Renault J.P., Pin S., Boulard Y., Labarre J. (2013) *Structural Determinants for Protein adsorption/nonadsorption to Silica Surface*. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081346>, (Erişim tarihi 21.12.2017).

Matsuda K., Onoue S., Kashimoto K., Hamakawa A., Kikuchi M., Uchiyama M., Mochizuki T., Arimura A. (2002) A newly developed enzyme-immunoassay for measuring the tissue contents of PACAP in fish. *Peptides*, 23, 1741–1750.

Matsuda K., Takei Y., Katoh J., Shioda S., Arimura A., Uchiyama M. (1997) Isolation and Structural Characterization of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)-like Peptide From the Brain of a Teleost, Stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides*, 18, 723–727.

McMaster M.C., *LC/MS A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2005.

Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D., Coy D.H. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164, 567-574.

Nakamachi, T. Subchapter 18C- Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide, *Handbook of Hormones, Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research* 2016, s. 146-147.

Nielsen B.V. (2013) <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/22269/practical-considerations-analysing-biologically-active-peptides-electrospray-ionisation-esi-mass-spectrometry/> (Son Erişim Tarihi 06.01.2019)

Nilsson C.L., Karlsson G., Bergquist J., Westman A., Ekman R. (1998) Mass Spectrometry of Peptides in Neuroscience. *Peptides*, 19 (4), 781–789.

Phillips T.M. (1998) Determination of in situ tissue neuropeptides by capillary immunoelectrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 372, 209-218.

Rehfeld J.F. (1998) The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiological Reviews*, 78, s. 1087.

Romanova E.V., Sweedler J.V. (2015) Peptidomics for the discovery and characterization of neuropeptides and hormones. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36 (9), 579-586.

Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide: biologic role in health and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 1991; 2:107-112

Santos M.R., Ratnayake C.K., Guttman G. (2014) Analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP 38) by CESI-MS. Sciex Separations a part of AB Sciex, Brea, CA, USA.

Sanzone, M. (2011). *Neuropeptides*. J.S. Kreutzer (Ed), Encyclopedia of Clinical Neuropsychology içinde (s. 1757-1758). Springer Science+Business Media LLC.

Sewald N., Jakubke H.D, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002, s. 90, 99, 107, 109

Soloviev M., Finch P. (2005) Peptidomics, current status. *Journal of Chromatography B*, 815, 11-24.

Soucheleau J., Denoroy L. (1992) Determination of vasoactive intestinal peptide in rat brain by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 608, 181-188.

Trauger S.A., Webb W., Siuzdak G. (2002) Peptide and Protein Analysis in Mass Spectrometry. *Spectroscopy*, 16, 15-28.

Tsoupras G. (2005) *LC/MSⁿ (ion trap) & LC/MSD (quadrupole) Sistemi ve Uygulamaları* Çalıştay Kitabı, SEM Laboratuvar Cihazları Paz. San. Ltd. Şti., İstanbul.

Tunçel N., Korkmaz O.T. “Vazoaktif İntestinal Polipeptid’in (VIP) Dünü, Bugünü, Yarını” http://www.tfbd.org.tr/yuklemeler/kongre_36.pdf Son Erişim Tarihi: 08.01.2015

Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H. (2000) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: From Structure to Functions. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 52 (2), 269–324.

Wasilewska-Dzubinska E., Borowiec M., Chmielowska M., Wolinska-Witort E., Baranowska B. (2002) Alfa 1 Adrenergic Potantiation of Progesterone Accumulation Stimulated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Cultured Rat Granulosa Cell. *Neuroendocrinology*, 23, 141-148.

Watanabe, J. Subchapter 18E- Vasoactive Intestinal Peptide, *Handbook of Hormones, Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research* 2016, s. 150-152.

Xu G., Stupak J., Yang L., Hu L., Guo B., Li J. (2018) Deconvolution in mass spectrometry based proteomics *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 32, 763–774.

Xu Y., Du L., Rose M.J., Fu I., Woolf E.J., Musson D.G. (2005) Concerns in the development of an assay for determination of a highly conjugated adsorption-prone compound in human urine *Journal of Chromatography B*, 818, 241-248.

Yin P., Hou X., Romanova E.V., Sweedler J.V. (2011) Neuropeptidomics: Mass Spectrometry-Based Qualitative and Quantitative Analysis, A. Meridgi (Ed), *Neuropeptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* içinde (223-236) Springer Science+Business Media.

http-1 <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/beyin.pdf> (Son Erişim Tarihi 30.11.2016)

http-2 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v3628?lang=en®ion=TR> (Son Erişim Tarihi 25.11.2018)

http-3 <http://www.pharmacology2000.com/Autonomics/Adrenergics1/Adrenergic-11.htm> (Son Erişim Tarihi 30.11.2016)

http-4 http://en.wikipedia.org/wiki/Vasoactive_intestinal_peptide (Son Erişim Tarihi 30.11.2016)

http-5
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1439?lang=en®ion=TR> (Son Erişim Tarihi 25.11.2018)

http-6
<http://www.ecs.umass.edu/eve/background/methods/chemical/Openlit/Chromacademy%20LCMS%20Intro.pdf> (Son Erişim Tarihi 01.01.2019)

http-7 https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf (Son Erişim Tarihi 05.01.2019)

http-8 <http://life.nthu.edu.tw/~labcyjw/BioPhyChem/Mass/quadrupo.htm> (Son Erişim Tarihi 07.01.2019)

http-9 <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/96/96uhplc.html> Asakawa N., The Horror of Sample Adsorption to Containers (Son Erişim Tarihi 23.02.2018)