



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**P MADDESİ ve KALSİTONİN GEN
İLİŞKİLİ PEPTİD'İN ÇEŞİTLİ
ANALİTİK YÖNTEMLERLE
ÖLÇÜLMESİ**

Neva Alasağ

Doktora Tezi

**P MADDESİ ve KALSİTONİN GEN
İLİŞKİLİ PEPTİD'İN ÇEŞİTLİ ANALİTİK
YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ**

Neva Alasağ

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, 2016

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Dilek-Doğrukol Ak (I. Danışman)

Doç. Dr. Erol Şener (II. Danışman)

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1203S048).

Jüri ve Enstitü Onayı

NEVA ALASAĞ'ın "P Maddesi ve Kalsitonin Gen İlişkili Peptid'in Çeşitli Analitik Yöntemlerle Ölçülmesi" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 07/09/2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL AK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Fatma TÖRE Abant İzzet Baysal Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER İstanbul Teknik Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Durişehvar ÖZER ÜNAL İstanbul Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU Hacettepe Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
27.09.2016 tarih ve 40 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Dilek AK



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Neva Alasağ
Doğum tarihi ve yeri : 1976, Bursa
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
26470 Tepebaşı / Eskişehir
0 541 781 47 07
nalasag@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Beşeylül İlkokulu
Nazilli, 1987
Ortaokul – Lise : Nazilli Lisesi
Nazilli, 1993
Lisans : Uludağ Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
Bursa, 2000
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bursa, 2004
Yabancı dil : İngilizce

Yayınlar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Alasag, N., Sener, E., Dogrukol-Ak, D., Simultaneous Determination of Substance P and CGRP in Rat Truncus Encephali Tissues, RegPep2016, Sözlü Sunum, Rouen, France, 12-14 Temmuz 2016.

Alasag, N., Sener, E., Dogrukol-Ak, D., Tore, F., Determination Of Calcitonine Gene-Related Peptide In Rat Brain stem Tissues By Liquid Chromatography-Electrospray Ionization- Tandem Mass Spectrometry, DRD 2015-International

Multidisciplinary Symposium on Drug Research &Development, Poster Bildiri, Eskişehir, Türkiye, 15-17 Ekim 2015.

Alasag, N., Sener, E., Doğrukol-Ak, D., Determination Of Substance P In Rat Brain Tissues By High Performance Liquid Chromatography- Electrospray Ionization- Tandem Mass Spectrometry, 12th International Symposium on VIP,PACAP and Related Peptides, Poster Bildiri, Nevşehir, Türkiye, 21-26 Eylül 2015.

Kılınç, E., Alasag, N., Kırboga, T., Ak, D., Tore, F., Superior Servikal Gangliyonektomi ve 48/80 Uygulamasının Sıcanlarda Trigeminal Gangliyon CGRP ve Substans P Düzeylerine Etkisi, 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2013, Poster Bildiri, Ankara, Türkiye, 10-14 Eylül 2013.

Alasag, N., Doğrukol-Ak, D., Spectrophotometric Determination of Memantine Hydrochloride In Bulk Form Using 4-Chloro-7-Nitrobenzofurazan Derivatization, International Symposium On Drug Research&Development, Poster Bildiri, Antalya, Türkiye, 27-29 Mayıs 2011.

Alasag, N., Ozer, E.T, Gucer, S., Investigation and Optimization of Some Parameters for BOD (biological oxygen demand) Measurements In Textile Waste Water. 4 th Aegean Analytical Chemistry Days, Poster Bildiri, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 2004.

Bilimsel Etkinlikler

Katılan Kurslar ve Eğitim Programları

Workshop ‘Quantification of peptides in biological samples’, CURIB, Mont-Saint-Aignan, France, 11 Temmuz 2016.

Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC-MS/MS Cihaz Kullanma Eğitimi, SEM Laboratuvar Cihazları Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye, 27-29 Kasım 2013.

Agilent 7100 Capillary Electrophoresis ve LIF (Laser Induced Fluorescence Detector) Cihaz Kullanma Eğitimi, SEM Laboratuvar Cihazları Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye, 30 Temmuz-1 Ağustos 2013.

Certification of the 1st International Certificate Program on Predictive and Personalized Medicine/Healthcare in Daily Modern Medicine and Pharmacy, Eskişehir, Türkiye, 13-16 Eylül 2012.

Temel ve Orta Düzey SPSS Eğitimi, Anadolu Üniversitesi Akademik Gelişim Birimi, Eskişehir, Türkiye, Mayıs 2013 dönemi.

Deney Hayvanları Kullanımı İle İlgili Eğitim Programı, Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), Eskişehir, Türkiye, 07-18 Mayıs 2012.

Europe & Metrology in Turkey (EMIT) workshop S04-02: "Integrated Quality Systems-an interpretation for universities", Bursa, Türkiye, 18-20 Ekim 2011.

AÜBİBAM Eğitim Seminerleri I "Kromatografik Sistemler (HPLC, LC-MS, GC-MS, FPLC, İyon Kromatografisi) Teorik ve Uygulamalı Eğitim" , Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye, 25-26 Eylül 2010.

I. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Uludağ Üniversitesi-Tübitak Butal, Bursa, Türkiye, 03-05 Temmuz 2002.

VIII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Uludağ Üniversitesi-Tübitak Butal, Bursa, Türkiye, 30 Ekim-1 Kasım 2002.

39th Graduate Study Programme, "Youth and the United Nations: A Partnership For the Future" , United Nations, Geneva, Switzerland, 02-20 Temmuz 2001.

Atomik Spektrometri ve Uygulamaları, Tubitak-Mam Tubitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı, Bursa, Türkiye, 10-11 Mayıs 2001.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid'in eş zamanlı tayini için beyin ve beyin sapı dokusundaki düzeyleri Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi ve Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Nöropeptidler için duyarlılığı yüksek Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi yöntemi geliştirilmiştir.

Ülkemizde bu çalışma Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi ve Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yönteminin birarada kullanıldığı ilk tez çalışması olacaktır. Ulusal ve uluslararası düzeydeki multidisipliner çalışmalara önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, değerli emeklerini benden esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında bana güven ve cesaret veren, sabır, hoşgörü, ilgi, samimiyet gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Dilek AK'a üzerimdeki emekleri için içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca varlığıyla, emeğiyle, bilgi ve tecrübesiyle her zaman beni destekleyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Erol ŞENER'e üzerimdeki emekleri için içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) bünyesinde bulunan Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi cihazıyla çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan AÜBİBAM eski Müdürü Prof. Dr. Lütfi GENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için gerekli olan her türlü kimyasal madde ve malzemeyi sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Var olma sebebim, hayatımın her aşamasında beni destekleyen canım aileme minnet duygusuyla teşekkür ederim.

P MADDESİ ve KALSİTONİN GEN-İLİŞKİLİ PEPTİD'İN ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ

ÖZET

Bu çalışmada sıçan beyin, beyin sapı dokusunda P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid'in Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi ve Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yöntemiyle analizi gerçekleştirilmiştir. C₈ kolon (150x2.1 mm, 3.5 µm) ve %0.2 formik asit içeren su-asetonitril gradiyent hareketli faz sisteminde ayrılan P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid için kütle spektrometri optimizasyon parametreleri belirlenmiş, ardından yöntemin validasyonu gösterilmiştir. P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid için pozitif polaritede elde edilen kütle spektrumu ve sırasıyla m/z 674.3→[600+254.4] ve 952.2→1214.0 iyon geçişleri kullanılmıştır. Doğrusal aralık P maddesi için 5.85-438.52 ng/mL, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için 0.21-155.28 ng/mL'dir. Yöntemin tayin sınırları P maddesi için 5.85 ng/mL, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için 0.21 ng/mL'dir. Yöntemin doğruluğu P maddesi için %98'den büyük, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için %87'den büyük geri kazanım ile, tekrar edilebilirliği ise gün içi ve günler arası P maddesi için %15'den küçük, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için %11 bağıl standart sapma ile gösterilmiştir. Bu yöntem sıçan beyin ve beyin sapı dokularına uygulanmıştır. Yöntemin beyin dokusundaki doğruluğu P maddesi için %97'den büyük geri kazanım ile, kesinliği ise %7'den küçük bağıl standart sapma ile gösterilmiştir. Beyin sapı dokusundaki doğruluğu P maddesi için %98'den büyük, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için %95'den büyük geri kazanım ile, kesinliği ise Substance P için %7'den küçük, Kalsitonin gen-ilişkili peptid için %13'den küçük bağıl standart sapma ile gösterilmiştir. Doku numunelerinin (n=6) analizine göre, beyin sapı dokusundaki P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid bazal endojen derişimler sırasıyla 415.10±124.80 ng/g, 132.07±196.77 ng/g olarak, beyin dokusundaki P maddesi derişimi ise 57.95±38.01 ng/g olarak hesaplanmıştır. Beyin dokusunda Kalsitonin gen-ilişkili peptid düzeyi yöntemin tayin sınırının altında kaldığı için hesaplanamamıştır.

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yöntemiyle, P maddesi ve Kalsitonin gen-ilişkili peptid için kit prosedürleri kullanılarak beyin ve beyin sapı dokusundaki derişimleri incelenmiştir. P maddesi düzeyi beyin ve beyin sapında belirlenememiştir. Kalsitonin gen-ilişkili peptid düzeyi ise beyin sapında 2351.24±292.49 ng/g, beyinde 1567.96±55.47 ng/g olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nöropeptid, P Maddesi, Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid, Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi, Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz

DETERMINATION OF SUBSTANCE P AND CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE BY VARIOUS ANALYTICAL METHOD

ABSTRACT

In this study, Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide analysis in rat brains and brain stem tissues were determined by using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Enzyme Linked-Immunosorbent Analysis methods. Firstly mass spectrometry parameters for Substance P and CGRP were optimized after achieving separation with C₈ column (150x2.1 mm, 3.5 μ m) and mobile phase containing 0.2% formic acid in water-acetonitrile then the method have been validated. Mass spectrum was obtained in positive polarity for Substance P and CGRP, and ion transitions were used at m/z 674.3 $\rightarrow$ [600+254.4] and 952.2 $\rightarrow$ 1214.0, respectively. Linearity range was 5.85-438.52 ng/mL for Substance P and 0.21-155.28 ng/mL for CGRP. The limit of quantification was 5.85 ng/mL for Substance P and 0.21 ng/mL for CGRP. Accuracy was shown with recoveries higher than 98% for Substance P, higher than 87% for CGRP. The method precision was shown by intra-day and inter-day precision lower than 15% RSD for Substance P and 11 % RSD for CGRP. This method was applied to rat brain and brain stem tissues. Accuracy in brain tissue was shown with recoveries higher than 97% and precision was shown lower than 7%RSD for Substance P. Accuracy in brain stem tissue was shown with recoveries higher than 98% for Substance P, higher than 95% for CGRP and precision was shown lower than 7% RSD for Substance P and 13%RSD for CGRP. According to tissue samples analysis (n=6), Substance P and CGRP basal endogene concentrations in brain stem tissue were calculated as 415.10 $\pm$ 124.80 ng/g and 132.07 $\pm$ 196.77 ng/g respectively, while Substance P concentration in brain was calculated as 57.95 $\pm$ 38.01 ng/g. CGRP concentration in brain tissue could not be calculated because of lower levels than limit of quantification of proposed method.

Substance P and CGRP concentration were determined in brain and brain stem tissues by using Enzyme Linked-Immunosorbent Analysis kit procedure. Substance P concentration wasn't calculated in brain and brain stem tissues. CGRP concentration was calculated as 2351.24 $\pm$ 292.49 ng/g in brain stem, 1567.96 $\pm$ 55.47 ng/g in brain.

Key Words: Neuropeptide, Substance P, CGRP, LC-MS/MS, ELISA

07/09/2016

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 edilen 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 ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Neva ALASAĞ

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Nöropeptidler	3
<i>P Maddesi (SP)</i>	4
<i>Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP)</i>	5
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi	7
<i>Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri</i>	8
<i>Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan kütle analizörleri</i>	9
Üç adet Ardışık Dört Çubuklu (Tandem) Kütle Analizörleri	11
Enzim İmmuno Analiz	13
<i>Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz</i>	14
<i>Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz yöntemleri</i>	14
P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Kantitatif Analizine Yönelik Kaynak Bilgisi	16
P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Enzim Bağlı Immunosorbent Analizi ile ilgili Kaynak Bilgisi	21
Beyin Dokusundan P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Ekstraksiyonu ile ilgili Kaynak Bilgisi	23
GEREÇLER	26
Kullanılan Kimyasallar	26
Kullanılan Cihazlar	27
YÖNTEMLER	28
Sıvı Kromatografisi-İyon Tuzağı Kütle Spektrometrisi ile	28

Yapılan Ön Çalışmalar	
Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Çalışmaları	28
<i>Nöropeptid çözeltilerinin hazırlanışı</i>	28
<i>Doku homojenizasyonu</i>	29
<i>Kromatografik koşullar</i>	30
<i>Kütle spektrometresi koşulları</i>	30
<i>Nöropeptidler için optimizasyon parametreleri</i>	30
<i>Moleküler iyon</i>	30
<i>Fragmentor voltajı</i>	30
<i>Fragman iyon ve parçalama enerjisi</i>	31
<i>Hızlandırıcı voltaj</i>	31
Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi Yönteminin Validasyonu	32
<i>Doğrusallık</i>	32
<i>Doğruluk, kesinlik ve tayin sınırı</i>	32
<i>Seçicilik</i>	33
<i>Matriks etkisi</i>	33
<i>Stabilite</i>	33
Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Tayin Koşulları	33
<i>Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Eş Zamanlı Analizi</i>	33
<i>Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Kantitatif Tayini</i>	33
Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Çalışmaları	34
<i>Numunelerin hazırlanması</i>	34
<i>P Maddesi Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı</i>	34
<i>Reaktif ve numunelerin mikrotitre plağa yerleşim düzeni</i>	35
<i>Reaktiflerin ve numunelerin mikrotitre plağa pipetlenmesi</i>	35
<i>Plağın inkübasyonu</i>	35
<i>İnkübasyon sonrası</i>	35
<i>Absorbans okunması</i>	36
<i>Kalsitonin Gen İlişkili Peptid Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı</i>	36
<i>Reaktif ve numunelerin mikrotitre plağa yerleşim düzeni</i>	36

<i>Reaktiflerin ve numunelerin mikrotitre plağa pipetlenmesi</i>	37
<i>Plağın inkübasyonu</i>	37
<i>İnkübasyon sonrası</i>	37
<i>Absorbans okunması</i>	37
BULGULAR ve TARTIŞMA	38
Sıvı Kromatografisi İyon Tuzağı Kütle Spektrometrisi Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar	39
Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimizasyonu	39
<i>Moleküler iyon</i>	39
<i>Fragmentor voltajı</i>	41
<i>Fragman iyon ve parçalama enerjisi</i>	41
<i>Hızlandırıcı Voltaj</i>	42
Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi Yönteminin Validasyonu	42
<i>Doğrusallık</i>	42
<i>Doğruluk, kesinlik ve tayin sınırı</i>	43
<i>Seçicilik</i>	44
<i>Matriks Etkisi</i>	46
<i>Stabilite</i>	47
Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Sonuçları	47
<i>Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Eş Zamanlı Analizi</i>	47
<i>Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Kantitatif Tayini</i>	49
<i>Beyin ve Beyin Sapı Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik</i>	51
P Maddesi Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Sonuçları	51
<i>Absorbans Değerleri</i>	51
<i>Analiz Sonuçları</i>	52
Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP) Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Sonuçları	53
<i>Absorbans Değerleri</i>	53
<i>Analiz Sonuçları</i>	53
SONUÇ ve ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	59

EKLER

EK-1 Etik Kurul Kararı

EK-2 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

EK-3 Tez Çalışması Sürecinde Üretilen Bildiriler

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid için Kaynaklardaki Kantitatif Tayin Koşulları	21
Çizelge 2 Kullanılan Gradient Sistem	30
Çizelge 3 P Maddesi için Reaktif ve Numunelerin Mikrotitre Plağa Yerleşim Düzeni	35
Çizelge 4 P Maddesi İçin Reaktif ve Numunelerin Pipetlenme Hacimleri	35
Çizelge 5 Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Reaktif ve Numunelerin Mikrotitre Plağa Yerleşim Düzeni	37
Çizelge 6 Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Reaktif ve Numunelerin Pipetlenme Hacimleri	37
Çizelge 7 SK-KS/KS Gradyent Elüsyon Programı	39
Çizelge 8 P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'nin Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometri Optimizasyon Parametreleri	42
Çizelge 9 P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Doğrusallık Analizi	43
Çizelge 10 P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptidin Doğruluk ve Kesinlik	44
Çizelge 11 SP ve CGRP İçin Matriks Faktör ve %RSD Değerleri	47
Çizelge 12 Doku numunesi ve standart çözeltilerin stabilite testlerindeki %Geri Kazanım	47
Çizelge 13 Beyin ve Beyin Sapı Dokularındaki Nöropeptid Derişimleri	51
Çizelge 14 P Maddesi İçin Beyin Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik	51
Çizelge 15 P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Beyin Sapı Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik Değerleri	51
Çizelge 16 P Maddesi İçin 410 nm'deki Absorbans Değerleri	52
Çizelge 17 P Maddesi İçin Standart Çözeltilerin Derişimlerine Karşılık Gelen %B/B ₀ Değerleri	53
Çizelge 18 Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin 410 nm' deki Absorbans Değerleri	53

Çizelge 19	Kalsitonin Gen İlişkili Peptid İçin Standart Çözeltilerin Derişimlerine Karşılık Gelen Absorbans Değerleri	54
Çizelge 20	Doku Örneklerindeki Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Derişimleri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 P Maddesinin Yapısı	4
Şekil 2 Sıçan Kalsitonin Gen İlişkili Peptidin Yapısı	6
Şekil 3 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresinin Bölümleri	8
Şekil 4 İyonlaştırma Yöntemlerinin Seçimi	9
Şekil 5 Kuadrapol Kütle Analizörü	10
Şekil 6 İyon Tuzağının Bölümleri	11
Şekil 7 Tandem Kütle Analizörü	11
Şekil 8 Tandem Kütle Spektrometresinin Şematik Görünümü	12
Şekil 9 Tandem Kütle Spektrometri Tarama Modları	13
Şekil 10 Doku Hazırlama İşlem Basamakları	29
Şekil 11 SP'nin m/z 674.300 Değerinde Pozitif İyonlaştırma Ayrılmış İyon Kromatogramı ve m/z spektrumu	40
Şekil 12 CGRP'nin (A) Toplam İyon Kromatogramı (TIC) ve (B) m/z spektrumu	41
Şekil 13 (A) P Maddesi ve (B) Asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait Toplam İyon Kromatogramı	45
Şekil 14 (A) Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid ve (B) Asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait Toplam İyon Kromatogramı	45
Şekil 15 (A) Beyin sapı dokusu (B) 2 M asetik asit çözeltisinin Toplam İyon Kromatogramı	46
Şekil 16 (A) Beyin dokusunda SP , (B) Beyin sapı dokusunda SP ve CGRP (C) SP ve CGRP karışım çözeltisine ait Toplam İyon Kromatogramı	48
Şekil 17 Beyin Dokusundaki P Maddesinin Standart Ekleme Kalibrasyon Grafiği	50
Şekil 18 Beyin Sapı Dokusundaki (A) P Maddesinin (B) Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Standart Ekleme Kalibrasyon Grafiği	50

Şekil 19 P Maddesi Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Kalibrasyon Eğrisi	52
Şekil 20 Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Kalibrasyon Eğrisi	54

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACH _E	: Asetilkolinesteraz
ACN	: Asetonitril
Ala	: Alanin
APCI	: Atmosferik Basıncıta Kimyasal İyonlaştırma
APPI	: Atmosferik Basıncıta Foto İyonlaştırma
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartik asit
BBMEC	: Sığır Beyin Mikrovasküler Endotel Hücresi
CDMEKC	: Siklodekstrin-Modifiye Miselli Elektrokinetik Kromatografi
CE	: Kapiler Elektroforez
CE-MS	: Kapiler Elektroforez-Kütle Spektrometresi
CGRP	: Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid
Cys	: Sistein
DHB	: 2,5-dihidroksibenzoik asit
EIA	: Enzim İmmuno Analiz
EIC	: Ayrılmış İyon Kromatogramı
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz
EMA	: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı
ESI	: Elektrosprey İyonlaştırma
FT	: Fourier Transform
GI	: Gastrointestinal
Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin

His	: Histidin
IL	: İnterleukin
Leu	: Lösin
LIF	: Lazer İndüklenmiş Floresans
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
Lys	: Lizin
m/z	: Kütle/yük
mAbs	: Fare monoklonal antikor
MALDI	: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
Met	: Metionin
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
NDA	: 2,3-Naftalendikarboksaldehit
NPY	: Nöropeptid Y
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
Phe	: Fenil alanin
Pro	: Prolin
QIT	: Kuadrupol İyon Tuzağı
RIA	: Radyo İmmun Analiz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel
SEC	: Boyut Eleme Kromatografisi
Ser	: Serin
SIM	: Seçici İyon İzleme
SK-KS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
SK-KS/KS	: Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi

SP	: P Maddesi
TFA	: Trifloroasetik asit
Thr	: Treonin
TIC	: Toplam İyon Kromatogramı
TNF- α	: Tümör Nekrosis Faktör-alfa
TOF	: Uçuş Zamanlı
V	: Voltaj
Val	: Valin
VIP	: Vazoaktif İntestinal Peptid

GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde teknolojinin ve iletişim araçlarının gelişmesi sayesinde milyarlarca insan birbirleriyle rahatça iletişime geçebilmekte, bilgisayarlar ve cep telefonları adeta tüm dünyayı birbirine bağlamaktadır. Genellikle sinir bilimciler bilgisayarların temel bileşenleri ile beyin arasında benzerlikler kurmuşlardır. Ancak beynimizde öyle bir iletişim ağı bulunmaktadır ki, yaklaşık 100 milyar sinir hücresi bu iletişim ağı üzerinden haberleşmekte, iletişimi kolaylaştırmak için milyarlarca bağlantı kurmaktadır. Burada bilgisayarlarda rastlanan bağlantı sorunları pek yaşanmamakta, kullanıcılar dinlenmemekte ve elektrik kesilmemektedir (Guyton&Hall, 2007).

Beyin sinir sistemi ile ilgili işlevlerini nöronlar aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Nöronlar birbirlerinden sinaps adı verilen boşluklar sayesinde ayrılmaktadırlar. Ayrıca burası mesajın bir nörondan diğerine geçmesini sağlamaktadır. Bir nöron çeşitli etkilerle uyarıldığında, hücre zarından sinaptik boşluğa geçen molekülleri serbest bırakmaktadırlar. Serbest kalan bu moleküller nöronlarda bulunan reseptör bölgelerine bağlanmaktadır. Uyarılmanın ardından onu takip eden kimyasal değişim beyin çalışma prensibinin temelini oluşturmaktadır (Guyton&Hall, 2007).

Kompleks nöronal ağda nöropeptidler gibi kimyasal haberleşme ajanları sinyal iletiminde, beyinde nörotransmitter ve nöromodülatör olarak anahtar rol oynamaktadır. Duyusal bilgi, gıda alım kontrolü ve hormon salgısının düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik görevleri içerdiği düşünülmektedir. Nöropeptidlerin organizmadaki sentezleri, metabolizmaları, parçalanmaları (degradasyonu) ve yapı-aktivite ilişkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sürmektedir. Sinyal iletim mekanizmalarının anlaşılmasında sinir bilimleri araştırmaları bakımından çok önemli olan biyolojik kökenli nöropeptidlerin düzeylerinin analizi ise ayrıca önem taşımaktadır. (Yeşilada ve Özkanlı, 2004). Nörotransmitterlere oranla 10^6 misli daha az olan düzeyleri (1-100 pM) nedeniyle nöropeptidlerin ayrılması ve karmaşık biyolojik numunelerdeki tayini zorlayıcı analitik konulardan biri olmuştur (Kennedy ve ark., 2002). Genellikle ayırmalarda kullanılan yöntemler, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE), boyut eleme kromatografisi (SEC), radyoimmünoanaliz (RIA), kapiler elektroforez (CE) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (SK) (Ban ve ark., 2001). Peptid ve proteinlerin kantitatif analizinde SK/KS yöntemlerinin kullanımı ile ilgili zorluklar nedeniyle yarışmalı enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) ve radyoimmünojenik tayinler (RIA) geleneksel olarak kullanılmıştır. Son yıllarda peptid yapılı ilaçların ve biyomarkerların çoğalmasından dolayı triple kuadrupol, iyon tuzağı, kuadrupol uçuş zamanlı (Q-trap) ve ardından kantitatif matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometri (MALDI-MS) ve sıvı kromatografi elektrosprey iyonizasyon donanımlı kütle spektrometri (SK-ESI-KS/KS) teknikleri ile ilgili teknolojik gelişmeler ve yeni analitik stratejiler peptidlerin kantitatif analizleri alanında yapılan çalışmalara önemli katkılar sağlamıştır (Beaudry ve Vachon, 2006, Murao ve ark., 2007). Günümüzde yapılan araştırmalar özellikle biyobelirteçler ile ilişkili olan yapısal ve mekanistik bilginin ortaya çıkarılmasına yönelmiştir. Ağrı ile ilgili çalışmalarda etkin biyobelirteçlerin keşfedilmesi hastalık durumunun daha iyi

anlaşılması için temel önem taşımaktadır. Nöropatik ve kronik ağrı mekanizmalarına eşlik ettiği rapor edilen P maddesi, kalsitonin gen-ilişkili peptid, vazoaktif intestinal peptid ve nörotensin gibi peptidler sinir iletiminde önemli bir role sahiptir ve özellikle nöropatik ağrı ile ilişkili durumlarda tedavi için yeni stratejilerin geliştirilmesi bakımından peptid düzeylerinin ölçümü önemlidir.

Çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayların gerçekleşmesinde önemli rolleri bulunan P maddesi ve kalsitonin gen-ilişkili peptid için spesifik, hızlı, doğru ve kesin bir yöntem geliştirilmesi, yöntemin sıçan beyin dokularında yapılacak kantitatif nöropeptid analizlerine uygulanması ve fizyolojik ve patofizyolojik amaçlı çalışmalara katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda P maddesi ve kalsitonin gen-ilişkili peptid'in beyin ve beyin sapı dokusundaki düzeylerinin eş zamanlı tayini için duyarlılığı yüksek Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi yöntemi geliştirilmiş, biyoanalitik validasyonu gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli beyin dokularında ilgili nöropeptid düzeyleri Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yöntemiyle belirlenmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Nöropeptidler

Peptidler, karboksil ve amino grupları arasında amid bağlarıyla bağlanmış aminoasitlerden oluşan polimerlerdir (Sewald ve Jakubke, 2002). Peptidler ve proteinler amino asit kalıntılarından oluşmalarına rağmen, ikisi arasında farklılıklar bulunmaktadır. Proteinler, en az 50 amino asit kalıntısı içermektedir. En önemli özelliği, 3 boyutlu yapıya sahip olmalarıdır. Peptidler, genellikle 50'den daha az amino asit kalıntısı içerirler ve genellikle 3 boyutlu yapıya sahip değildir. 15-50 amino asit kalıntısından oluşan orta büyüklükteki moleküller polipeptidler olarak adlandırılırlar (Bailey, 1990). Kısa zincirli biyoaktif peptidlerin kimyasal sinyalleri iletmesi ve düzenleme rolü son yıllarda daha fazla ilgi çekmektedir (Frerichs ve ark., 2004).

Nöropeptidler, farklı bir şekilde sentez edilen, hareketleri yavaş olan ve küçük-moleküllü transmitterlerden tamamen farklı olan bir grup transmitterdir. Nöronal hücre gövdesindeki ribozomlar tarafından büyük protein moleküllerinin bir parçası olarak sentezlenirler. Protein molekülleri önce hücre gövdesinin endoplazmik retikulumuna, daha sonra da iki değişikliğin gerçekleştiği Golgi cisimciğine giderler. Önce protein enzimatik olarak küçük parçalara bölünerek ya nöropeptid veya nöropeptid prekürsör maddesini serbest hale getirir. Sonra golgi cisimciğine sitoplazmaya serbestlenen nörotransmitteri küçük transmitter vezikülleri halinde paketler. Daha sonra transmitter vezikülleri günde birkaç cm gibi oldukça yavaş bir hızla akson sitoplazmasının aksonal akımıyla sinir liflerinin uçlarına kadar taşınırlar. Son olarak bu veziküller küçük-moleküllü transmitterlerde olduğu gibi aksiyon potansiyeline yanıt olarak transmitterlerini açığa çıkarır. Ancak vezikül otolize edilir ve yeniden kullanılmaz (Guyton&Hall, 2007).

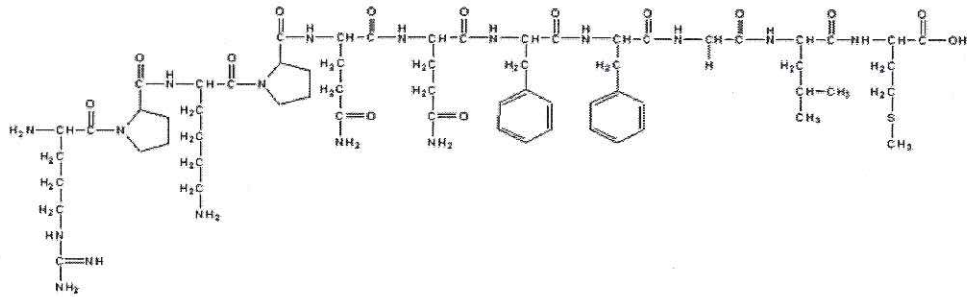
Nöropeptidler küçük-moleküllü transmitterlere göre daha az miktarda salınırlar. Nöropeptidlerin küçük molekülü transmitterlerden genellikle bin kez ya da daha fazla etkin olmaları bu açığı kapatır. Nöropeptidlerin diğer bir özelliği de daha uzun süreli etkilere neden olmalarıdır. Bu uzun süreli etkilerden bazıları; kalsiyum porlarının kapanması, hücrenin metabolik işleyişindeki değişiklikler, hücre çekirdeğindeki özel genlerin aktivasyonu veya deaktivasyonundaki değişiklikler ve eksitator veya inhibitör reseptörlerin sayılarındaki uzun süreli değişimler vb. sıralanabilir. Bu etkiler bazen günler, aylar hatta yıllar sürebilir (Guyton&Hall, 1996).

Nöropeptidler ilk önce gastrointestinal (Gİ) sistemde tespit edilmiştir. Memelilerin akciğerlerinde de çok sayıda peptid izole edilmiştir (Palmer ve ark., 1987). 1970 yılından bugüne kadar 60'ın üzerinde biyolojik olarak aktif peptid biyoassay, immünohistokimyasal, kimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle beyin ve medulla spinaliste karakterize edilmiştir. Bu peptidler ve reseptörleri hipotalamus ve vagusun dorsal motor nükleusu gibi yapılarda yoğun olarak bulunmaktadır. Otonom regülasyona dahil olan bu beyin bölgeleri ile periferik dokulardaki Gİ kanalın kontraktıl ve sekretör fonksiyonları ile ilgili yerlerdeki peptidler çift dağılımlıdır. Bunlara beyin-barsak (brain-gut) peptidleri ya da Gİ

peptidler/nöropeptidler adı verilmektedir. Bu nöropeptidler gastrik sekresyonu etkileyebilir, aynı zamanda mukozal sağlamlığın ve tamirin kontrolünde önemli olabilir. Bu nedenle gastrik mukozal hasarlar ile ilişkilerinin olduğu düşünülmektedir (Büyükcoşkun, 2002).

P Maddesi (SP)

SP taşıkininler ailesinde yer alan, sinir bilimleri alanında önemli nöropeptidlerden biridir. 11 aminoasitten oluşmaktadır. Kapalı kimyasal formülü $C_{63}H_{98}N_{18}O_{13}S$ olup molekül ağırlığı 1347.63 g/mol'dür. İlk defa 1931'de Von Euler ve Gaddum tarafından tanımlanmıştır. Büyük bir protein halinde sentezlendikten sonra enzimatik yolla aktif undekapeptid yapısına dönüşür. Amino asit dizilimi: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ şeklindedir. Şekil 1'de P maddesinin yapısı görülmektedir (Babu, 2003).



Şekil 1. P Maddesinin Yapısı

SP, merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde çeşitli davranış yanıtlarında ve nöronal survival ve dejenerasyonun düzenlenmesinde görev alır. Omurilikte SP ağrının nörotransmisyonunda görev alır ve otonomik refleksleri düzenler. Ayrıca kardiyovasküler ve solunum fonksiyonlarının düzenlenmesinde de role sahiptir. Periferik sistemde primer sensor nöronlarda, gastrointestinal, solunum kanalı ve genitoüriner kanalda intrinsic olan nöronlarda lokalize olmuştur (Beaudry ve Vachon, 2006).

SP ağrının algılanmasında önemli bir elementtir. SP'nin duyuşal işlevinin ağrı bilgisinin merkezi sinir sistemine iletilmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamat ile ağırlı uyaramı ileten primer sinir ileticilerinde birlikte bulunur. Duygudurum bozuklukları, anksiyete, stres, nörojeniz, nörotoksizite, bulantı/kusma ile ilişkilidir. SP ve diğer duyuşal nöropeptidler deri, kas ve eklemlerdeki duyuşal sinir liflerinin periferik uçlarından salınır. Bu salınımın bazı enfeksiyon veya yaralanma tiplerinin lokal yanıtı olan nörojenik inflamasyonda ilişkili olduğu bildirilmektedir. SP nin düzenleyici işlevi yüksek afiniteli reseptörü olan NK-1'in regülasyonu (düzenlenmesi) ile de ilişkilidir (De Felipe ve ark., 1998).

İnsan solunum yollarının sinirsel kontrolü oldukça komplekstir. Bu yüzden astım ile bronşial hiperreaktivite patogeneğinde nörojenik mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. SP'nin vasküler permeabiliteyi arttırıcı, solunum yolu duvarı

ödemi yapıcı ve mukus sekresyonunu artırıcı etkisi hayvanlar üzerinde gösterilmiş olup, henüz insan solunum yollarında belirlenmemiştir. İnsanlarda intradermal SP enjeksiyonuyla deride kızarıklık ve şişkinlikle karakterize edilen bir reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonu oluşturmada SP'nin histaminden 100 kat daha kuvvetli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, SP'nin kemotaktik ajanlara karşı nötrofil ve eozinofil yanıtını artırabileceği gösterilmiştir. Bu yüzden, SP'nin astımda görülen solunum yolu düz kas kontraksiyonu, mukoza ödemi, mukus hipersekresyonu, mast hücrelerinden mediatör salınımı ve inflamasyon gibi birçok olayda katkısı olabilir (Li ve ark., 2011).

SP, hipotalamus, septum ve amigdala gibi önbeyindeki bölgelerde yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Anormal SP düzeyleri şizofreni, Huntington, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi rahatsızlıklarla ilişkilidir (Babu ve ark., 2004).

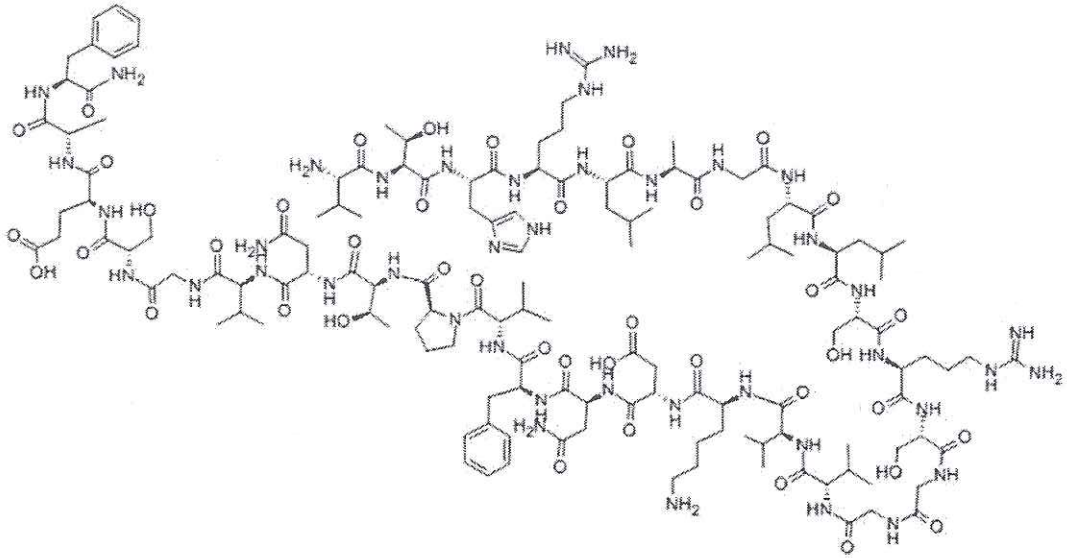
SP, kalitatif olarak deri, beyin-omurilik sıvısı, kan plazması, diş eti, ter bezleri, tükürük, sindirim sistemi dokusu, mukus ve son zamanlarda gözyaşında tespit edilmiştir. SP'nin gözyaşının normal salgılanmasında anahtar rolü olduğu bulunmuş, ancak bunun nasıl meydana geldiği belirlenmemiştir. Genel olarak SP'nin analizinin zorluğu nedeniyle, bu peptidin biyolojik fonksiyonunun anlaşılması zor olmuştur (Frerichs ve ark., 2004).

Deney hayvanları ile ilgili yapılan çalışmalarda SP'nin bellek fonksiyonlarını geliştirdiği ve yaşa bağlı hafıza kayıplarının azalmasından koruduğu öngörülmüştür. Alzheimer hastalarının beyinlerinin otopsi çalışmalarında SP immünreaktivite azalmıştır. Beyin omurilik sıvısındaki SP düzeylerinde artma ve azalmanın her ikisi de gözlenmiştir (Johansson ve ark., 2015).

SP'nin hücre üremesi, kemik iliği fibröz dejenerasyonu ve yara tedavisinde önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda romatoid artrit inflamasyonunda iltihap sökücü özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2016).

Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP)

Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP), kalsitonin peptid ailesinin bir üyesidir ve insanda α -CGRP ve β -CGRP olmak üzere iki formda bulunur. α -CGRP 37 amino asitli bir peptittir ve kromozom 11 de konumlanmış bulunan kalsitonin CGRP geninin alternatif uçbirleştirmesi sırasında oluşur. Kapalı kimyasal formülü, $C_{163}H_{267}N_{51}O_{49}S_2$ olup molekül ağırlığı, 3789.36 g/mol'dür. Sıçan CGRP'sinin amino asit dizilimi: Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asp-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Glu-Ala-Phe-NH₂ şeklindedir (Sewald ve Jakubke, 2002). Şekil 2'de sıçan kalsitonin gen-ilişkili peptid'in yapısı gösterilmektedir (http-1).



Şekil 2. Sıçan Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Yapısı

β -CGRP daha az çalışılan bir nöropeptiddir ve insanda bulunan formu farklı üç amino asit taşıması nedeniyle ile α -CGRP formundan ayrılır. Aynı bölgedeki farklı bir gen ile kodlanır.

CGRP periferik ve merkezi sinirlerde en yoğun üretilen peptidlerden biridir. En etkin peptid vasodilatördür ve ağrının iletilmesinde görev alır. Omurilikte (Spinal cord) CGRP'nin işlevi ve ekspresyonu sentezlendiği yere bağlı olarak farklı olabilir. CGRP başlıca omuriliğin ventral horn bölgesinde sentezlendiği zaman motor sinirlerin hücre gövdelerinden türevlenir ve yaralanmalardan sonra sinir dokularının rejenerasyonuna katkıda bulunabilir. CGRP omuriliğin dorsal horn'unda sentezlendiği zaman dorsal root gangliondan türetilir ve ağrının iletilmesinde görev alabilir. Trigeminal vasküler sistemde, trigeminal gangliondaki hücre gövdeleri CGRP'nin temel kaynağıdır. CGRP'nin ağrının algılanması ve kardiyovasküler hemostazda görev aldığı düşünülmektedir. Migren ve temporomandibular eklem rahatsızlıklarında CGRP'nin düzeyinde artışlar görülmektedir. Bu rahatsızlıkların yanı sıra kalp yetmezliği, hipertansiyon ve sepsis gibi diğer bazı rahatsızlıklarda düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Benemei ve ark., 2009).

Migren sırasında trigeminal ganglionda bulunan aktif hale gelmiş primer duyu sinirleri beyin zarlarında konumlanan periferik sinir uçlarından CGRP'yi salar. Salınan CGRP beyin zarı etrafında bulunan reseptörlerine bağlanarak reseptörlerini aktif hale getirir ve bu sırada vasodilatasyona, mast hücrelerinin degranülasyonuna ve plazmanın hücre dışına çıkışına neden olur. Migrenin patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğunu kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır. Migren ataklarında hem tükürük, hem jugular venden alınan plazmada yüksek CGRP derişimleri gözlenmektedir. Ayrıca migren rahatsızlığı bulunan kişilere intravenöz injeksiyon ile α -CGRP verildiğinde baş ağrısını artırdığı bildirilmektedir (Edvinsson ve Uddman, 2005; Edvinsson ve ark., 2012; Goadsby ve ark., 1990; Ho ve ark., 2010; Messlinger ve ark., 2011).

CGRP, afferent sinir terminallerinde lokalizedir ve hayvanların solunum yolları sinirlerinde SP ile birlikte lokalize olduğu tespit edilmiştir. İn vitro olarak, insan solunum yolu düz kaslarını SP'den daha kuvvetli bir şekilde kontrakte etmekte ve SP gibi mast hücrelerinden histamin salgılatmaktadır. Bir vazodilatör olarak nörojenik inflamasyonu artırabilir ancak vasküler permeabilite üzerine etkisi yoktur (Li ve ark., 2011).

CGRP, çeşitli ülser modellerinde antisekretör ve antiülser etkiler göstermektedir. Bu etkilerini kısmen somatostatin yoluyla oluşturduğu ileri sürülmüştür. CGRP, gastrik ülserlere karşı lokal defans mekanizmasına dahil olan kapsaisine duyarlı nöronlarda bulunan bir peptittir. Aynı şekilde SP ve nörokinin A'nın da bu nöronlarda bulunduğu ve bu nöropeptidlerin gastroprotektif etkilerinin mukozal kan akımına bağlı olduğu belirtilmiştir (Büyükcoşkun, 2002).

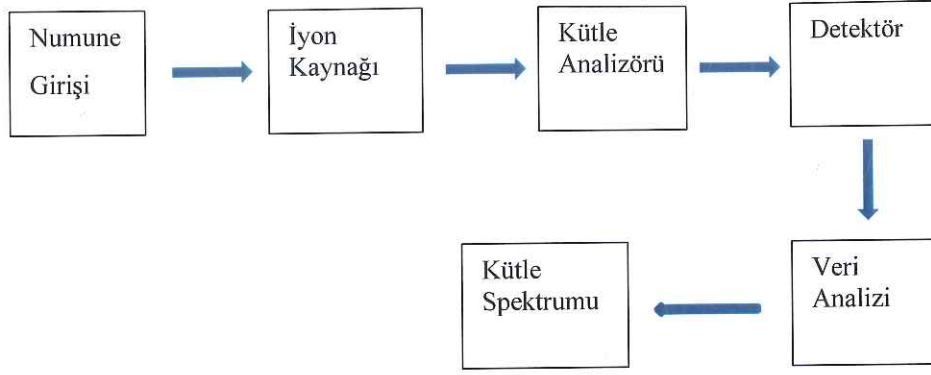
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

Sıvı kromatografisi (SK) sistemlerinde kütle spektrometresinin (KS) detektör olarak kullanılmasıyla oluşturulmuş analitik cihazlara sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (SK-KS) denilmektedir. SK-KS kombinasyonu laboratuvar için ideal bir analitik cihaz yaratmış, geniş bir kimyasal alanda kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına imkan sağlamıştır (McMaster, 2005).

KS'in tarihsel gelişim sürecinin ilk yıllarında Joseph John Thomson gazların elektriksel iletkenliğini ve elektronları keşfederek 1906 yılında fizik alanında Nobel kazanmıştır. 1950'li yıllardan itibaren KS tekniği kullanılmaya başlanmış ancak YPSK ve KS sistemlerini birleştirmek için yapılan çalışmalar 1990'lı yıllara kadar istenilen sonucu vermemiştir. John Bennet Fenn'in elektrosprey iyonlaştırma tekniğini bulmasıyla YPSK'nın ayırım gücüyle KS'in seçiciliği birleştirilmiştir. John Bennet Fenn söz edilen bu çalışma ile, Koichi Tanaka MALDI tekniğinin geliştirilmesi çalışması ve Kurt Würthrich biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapısının belirlenmesi için nükleer manyetik rezonans spektroskopisinin geliştirilmesi çalışmasıyla 2002 yılında Nobel Kimya ödülünü almışlardır (Hoffmann ve Stroobant, 2007; Griffiths, 2008).

KS tekniği, gaz fazında, üzerinde elektriksel yük taşıyan bileşenlerin vakumlanmış boşlukta uygulanan elektriksel ve/veya manyetik alanda uçurulmasına dayanır. Bileşenler kütle/yük (m/z) oranlarına göre elektriksel alanda uçuş farklılıkları göstermekte ve bu farktan yararlanılarak birbirlerinden ayrılabilir. Birbirinden ayrılan iyonlar yönlendirilip bir yüzeye çarptırılarak elektrik sinyali oluştururlar. SK-KS cihazları genel olarak SK, iyonlaştırma odacığı ve kütle analizöründen oluşmaktadır. **Şekil 3'**de SK-KS'in bölümleri gösterilmektedir.

Günümüzde SK-KS temeline dayalı teknikler, sağladıkları yüksek seçicilik ve hassasiyet ile peptidlerin biyolojik numunelerdeki kalitatif ve kantitatif analizlerine önemli bir katkı sağlamaktadır. Son yıllarda proteomik teknolojilerin gelişmesinde biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometri analizleri önemli bir yere sahiptir. Bu ilerlemeler sayesinde önemli hastalıkların potansiyel biyomarkerlarının belirlenmesi, teşhis ve tedavisine yönelik gelişmelere katkı sağlanmaktadır (Ziganshin ve ark., 2011).



Şekil 3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresinin Bölümleri

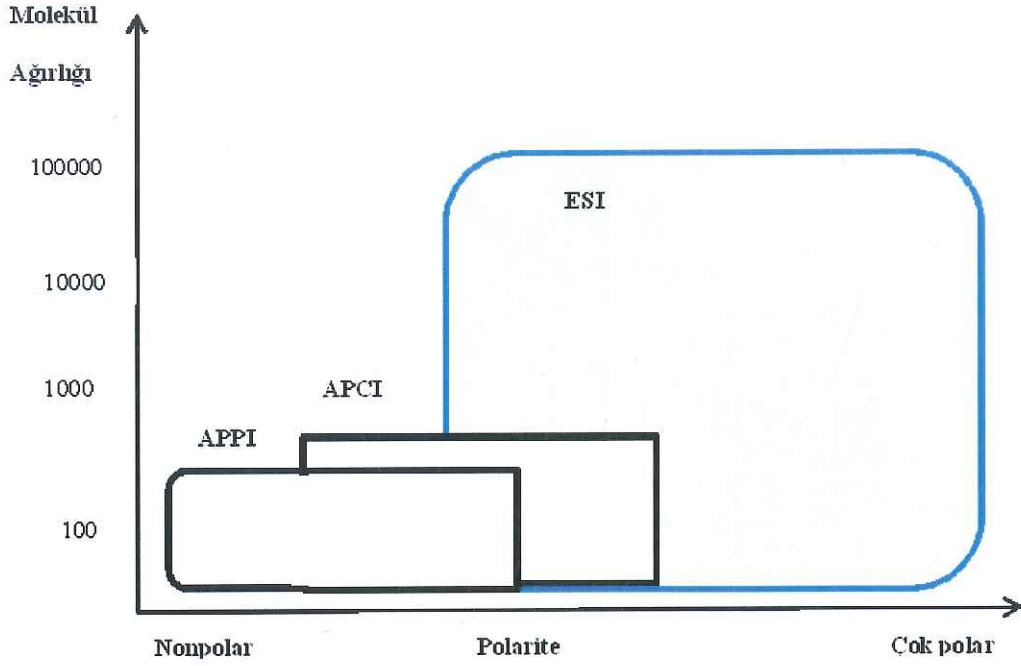
Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri

SK-KS sistemlerinde atmosferik basınçta bileşenleri sıvı fazdan gaz fazına geçiren, aynı zamanda iyonlaştıran teknikler uygulanmaktadır. Kullanılan iyonlaştırma yöntemlerine göre Elektrosprey İyonlaştırma (ESI), Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma (APCI) ve Atmosferik Basınçta Foto İyonlaştırma (APPI) olarak adlandırılmaktadır.

ESI yönteminde SK'den çıkan maddeleri taşıyan hareketli faz elektriksel bir alanda azot gazı yardımıyla spreylenmektedir. Sıvı hareketli faz spreylenmesinde damlacıklara dönüşmekte ve bu damlacıklar giderek küçülerek içerisindeki iyonlar *Coulomb* patlamasıyla sıvı fazdan kurtulup uygulanan elektrik alanı yardımıyla kütle ayırıcıya doğru hızlandırılmaktadır. Desolvatizasyon bölümünde kütle ayırıcıya gelmeden iyonlara karşıdan sıcak azot verilir. Çözücünün tamamen buharlaşarak iyonun gaz fazına geçmesi sağlanır.

APCI yönteminde SK'den çıkan hareketli faz spreylenmesinde 120°C 'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. Gaz fazına dönüşen hareketli faz kimyasalları ve hareketli fazın taşıdığı bileşenler elektrik yüklü bir iğneye (corona) doğru püskürtülür. İğne, üzerindeki elektriksel yükün uyarması sonucunda gaz fazındaki hareketli faz iyonları ya da püskürtücü gazın oluşturduğu iyonlar ile hareketli fazın taşıdığı maddeler arasında proton aktarımı yolu ile veya birbirlerine eklenme yolu ile iyonlaştırma gerçekleştirilir.

APPI yönteminde APCI yönteminde olduğu gibi SK'den çıkan hareketli faz spreylenmesinde 120°C 'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. APPI yönteminde APCI'daki yüklü iğne yerine UV radyasyonu yayan bir UV lambası kullanılır. UV lambasından gönderilen fotonların enerjisi yardımıyla spreylenmesindeki bileşenler iyonlaştırılır (Şener, 2007). İyonlaştırılacak molekülün büyüklüğüne ve polaritesine göre iyonlaştırma tekniği seçilmektedir. Şekil 4'de iyonlaştırma yöntemlerinin seçimi gösterilmektedir.



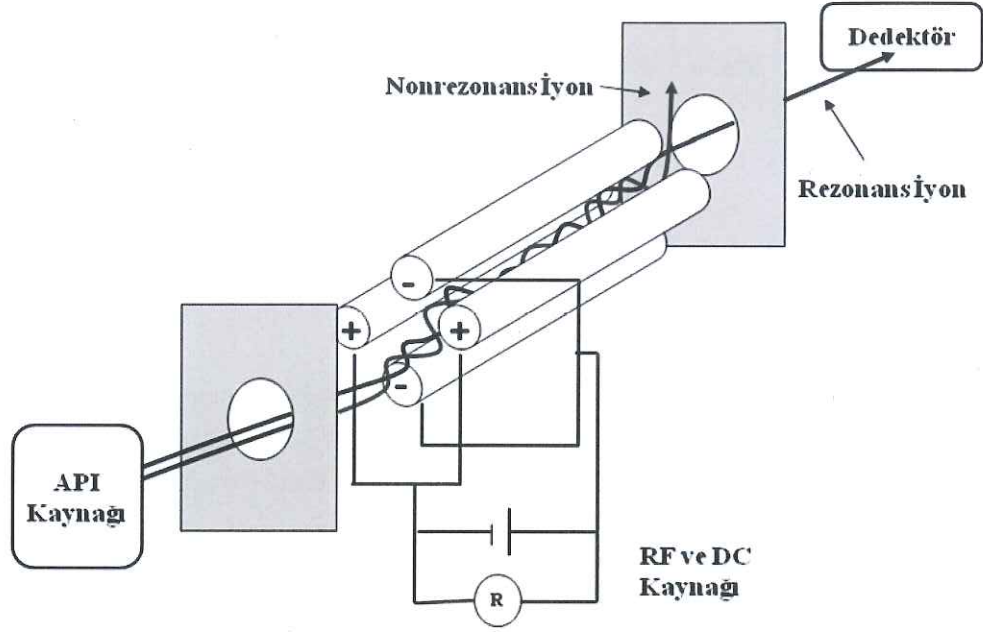
Şekil 4. İyonlaştırma Yöntemlerinin Seçimi

Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisinde kullanılan kütle analizörleri

Kütle analizörleri, bileşenlerin gaz fazında uçurulduğu ve m/z oranlarına göre birbirlerinden ayrıldığı bölümdür. Genellikle kullanılan kütle analizörleri dört çubuklu (quadrupole), iyon tuzağı (ion trap) ve uçuş zamanlı (time of flight, TOF), fourier dönüşüm-iyon siklotron rezonans kütle analizörleri ile seri bağlanmış tandem kütle analizörleridir (McMaster, 2005).

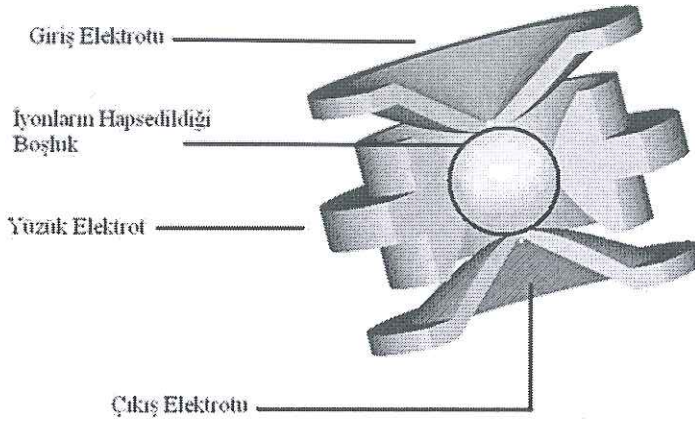
Dört çubuklu kütle analizörleri tetragonal olarak yerleştirilmiş dört tane metal silindirik çubuktan oluşurlar. Çubuklara ikişerli olarak eksi doğru akım (-DC) ve radyo frekansı (RF) ile artı doğru akım (+DC) ve radyo frekansı uygulanır. Uygulanan DC ve RF değerleriyle bağlantılı olarak belli m/z 'ye sahip iyonlar uçuşlarının sonunda detektöre ulaşırlar, ulaşamayanlar kütle ayırıcının içerisinde sönümlenirler.

Dört çubuklu kütle analizörlerinde kütleler iki farklı uygulama ile analiz edilebilmektedir. Birinci uygulama, DC ve RF değerleri sabit tutularak belli bir m/z değerinin detektöre ulaşımının sağlanmasıdır. Buna seçilmiş iyon analizi (SIM) denilmektedir. İkinci uygulamada ise DC ve RF değerleri değiştirilerek farklı m/z 'lerin detektöre ulaşmasıdır. Buna tarama (scan) denir. Şekil 5'de kuadrapol kütle analizörü gösterilmektedir.



Şekil 5. Kuadrapol Kütle Analizörü

İyon tuzağı kütle ayırıcılarında iyonlar, tuzağın içerisine doldurulmakta ve tuzağa uygulanan elektriksel kuvvetlerle hapsedilmektedir. Hapsedilen iyonlar tuzağa uygulanan radyo frekansının değiştirilmesi ile detektöre sıralı bir şekilde gönderilebilmekte ya da istenen iyon veya iyonlar diğer iyonlardan ayrılarak tuzağın içinde yalnız bırakılabilmektedir. Böylelikle istenen iyonlar izole edilip tuzağa uygulanan alternatif akım ile parçalanabilmektedir. Oluşturulan parçalardan istenenler tuzakta izole edilip tekrar parçalanabilmektedir. Dolayısıyla defalarca kütle parçalama işlemi yapılabilmektedir. SIM veya MRM uygulamalarıyla kantitatif analiz yapılabilmektedir. Ancak Tandem MS'e göre hassasiyeti daha düşüktür. **Şekil 6'**da iyon tuzağının bölümleri gösterilmektedir.



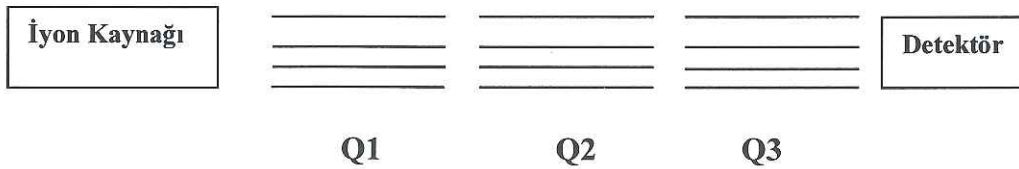
Şekil 6. İyon Tuzağının Bölümleri

TOF kütle analizörlerinde, iyonlaştırılan bileşenler iki plaka arasına uygulanan elektriksel alan yardımıyla doğrusal bir şekilde uçurulmakta, detektöre varış zamanlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Bu yöntemle büyük moleküllerin ayırımı ve yüksek çözünürlüklü olarak kütle tayini yapılabilmektedir. Uçurulan iyonların kütleleri virgülden sonra altıncı basamak hassasiyetinde belirlenebilmektedir. Genellikle MALDI tekniği ile kullanılmaktadır. Son yıllarda sıvı kromatografisine bağlı TOF sistemleri de kullanılmaktadır.

Fourier dönüşüm-iyon siklotron rezonans kütle analizörleri, iyon tuzağı gibi iyonların hapis edildiği bir odacıktan meydana gelir. Bu odacığa uygulanan manyetik ve elektriksel alan yardımıyla iyonlar kararlı durumda odacık içinde devamlı uçurulmaktadır. Değiştirilen radyo frekansı ile hapsedilmiş iyonlar rezonansa getirilip odacık içinde aynı zamanda detektör görevi gören yüzeye çarptırılmaktadır. Yüzeyde oluşan akım zamana bağlı olarak fourier dönüşümü ile kütle-sinyal ilişkisine çevrilmektedir. Bu yöntemle iyon tuzağı analizörleri gibi KS^n çalışmaları yapılabilmektedir. Bunun yanında büyük moleküllerin yüksek çözünürlüklü ayırımlarının da yapılabildiği bir yöntemdir. Fakat KS yöntemleri arasında en pahalı olanıdır.

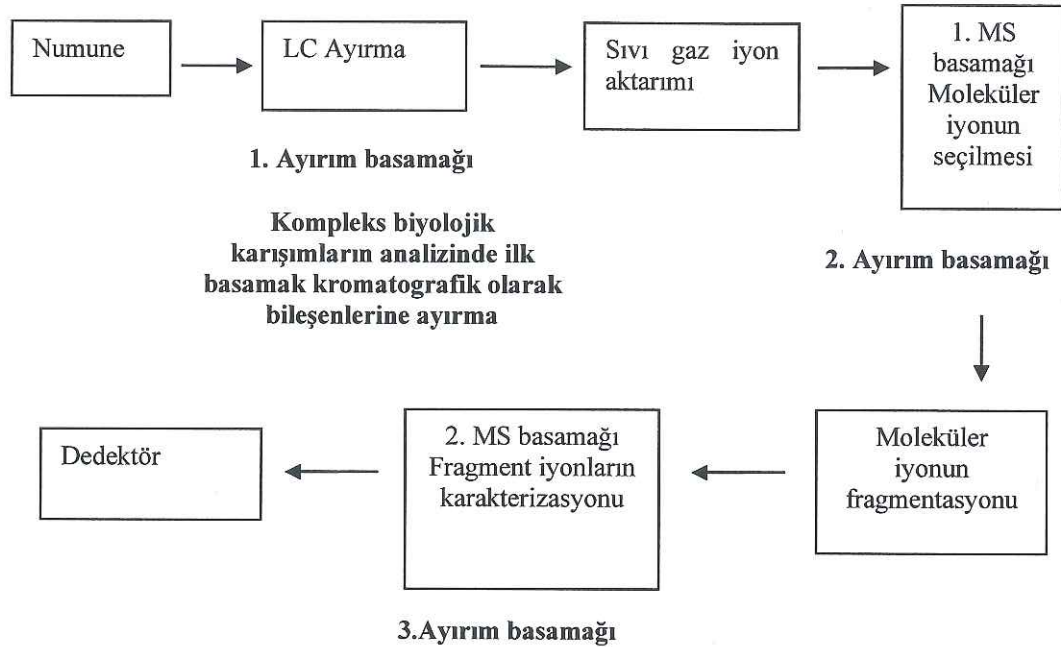
Üç adet Ardışık Dört Çubuklu (Tandem) Kütle Analizörleri

Tandem kütle analizörleri, bir parçalama ünitesi ile ayrılmış iki adet dörtlü kütle analizöründen oluşur. Şekil 7'de tandem kütle analizörü gösterilmektedir. Parçalama ünitesi uyguladığı elektriksel enerjiyi inert bir gaz aracılığıyla iyonlara aktararak parçalanmasını sağlar. Parçalama işlemi yapılmadığı zamanlarda birinci dörtlü kütle analizöründen çıkan iyonları üçüncü kütle analizörlerine iletir.



Şekil 7. Tandem Kütle Analizörü

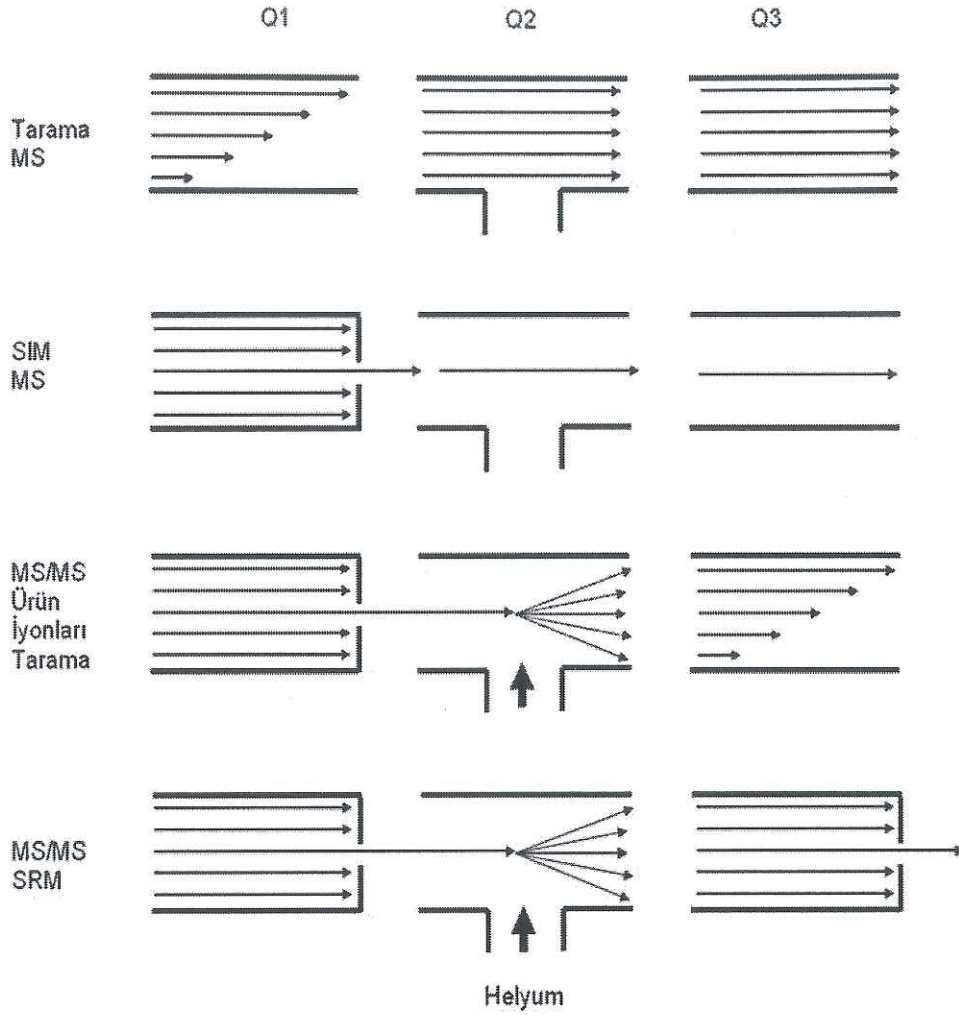
Tandem Kütle Spektrometrisi (KS/KS), iki basamaklı kütle analizini içeren genel bir metottur. Birinci analizör moleküler iyonu izole etmek için kullanılır. İkinci spektrometre fragmentor iyonu analiz eder (Hoffmann ve Stroobant, 2007). **Şekil 8'**de tandem kütle spektrometresinin şematik görünümü gösterilmektedir.



Şekil 8. Tandem Kütle Spektrometresinin Şematik Görünümü (Lavagnini ve ark., 2006)

KS/KS'de ana kütle m/z 'lerinin tayini yanı sıra ana kütlelerin parçalanması ve parçalarının tayini de yapılabilmektedir. Ana kütlelerin parçalanarak oluşturduğu fragman iyonlar iyi bir kalitatif analiz verisidir. Seçilen ana kütlelerin parçalanarak oluşturduğu fragmanlardan biri yada birkaçı seçilerek elde edilen veriler de çok seçici ve duyarlı kantitatif analiz verisi oluşturulur. Bu yönleriyle seçici, duyarlı hem miktar tayinlerinde hem de yapı tayinlerinde kullanılan benzersiz cihazlardır.

KS/KS'de dörtlü analizörlerin SIM ve tarama uygulamalarının yanı sıra kütle parçalaması da vardır. Diğer bir uygulama çoklu reaksiyon izlemedir (MRM) ve düşük saptama seviyelerinde kantitatif analiz yapılmasına imkan sağlamaktadır (Şener, 2011). **Şekil 9'**da Tandem KS tarama modları gösterilmiştir.



Şekil 9. Tandem Kütle Spektrometri Tarama Modları

Enzim İmmuno Analiz

Enzim İmmuno Analiz (EIA), enzimlerin katalitik özelliklerinin ve immunolojik reaksiyonların kalitatif olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Enzim-işaretli antikor veya antijenler, ligandla (ölçülecek madde) reaksiyona girer. Daha sonra ortama enzim substratı ilave edilir. Bu ilave edilen substratın derişimindeki azalma veya ürün derişimindeki artış ölçülür. Çoğunlukla enzim olarak alkale fosfataz, peroksidaz, beta galaktozidaz ve glukoz-6-dehidrojenaz işaretlemek için kullanılır.

Oluşan bileşiklerin ölçümü için bazen fotometrik yöntemlerden yararlanılır. Özellikle çok amaçlı, yüksek performanslı fotometrelerde ölçümler basit ve ucuz olarak yapılabilmektedir. Ancak floresans veya kemiluminesans işaretli substrat veya ürünleri kullanabilen yöntemler fotometrik olanlara tercih edilmektedir. Çünkü, floresan ve kemifloresan ölçümlerin duyarlılığı fazladır (Crowther, 1995).

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz (ELISA) yöntemi, 1960'lı yıllarda Radyo İmmun Analiz (RIA) yöntemlerine alternatif olarak bulunmuş olup bu yöntemde kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olması ve atık maddelerinin radyasyon tehlikesi olmaması nedeniyle kullanımı yaygınlaşmıştır.

ELISA, bir immunosorbent (katı bir desteğe bağlı antijen veya antikor) ve enzim bağlı bir immunoreaktant (tepki veren) kullanılan bir enzim immuno analizidir. Bu yöntemde antijen ve antikorlar arasındaki özel etkileşim esastır (Crowther, 1995). Yöntem antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır.

ELISA yönteminin başarılı olmasının sebeplerini şu şekilde sıralayabiliriz:

1. Antikor, antijen gibi maddeler plastik gibi katı yüzeylere pasif olarak adsorbe olabilmektedir. 96 kuyucuklu mikrotiter plaklar ticari olarak bulunmakta, manipülasyonu ve reaktiflerin hazırlanması kolay olmaktadır. Çok fazla sayıda numunenin küçük hacimlerinin kullanılması ile hızlı bir şekilde analiz edilmesine imkan sağlamaktadır.
2. Reaktanlardan birisi katı yüzeye tutunduğu için, bağlı ve serbest reaktiflerin ayrılması basit bir yıkama prosedürüyle kolayca yapılabilmektedir.
3. ELISA'nın sonuçları gözle gözlenebilen bir renk reaksiyonudur ve özel olarak dizayn edilmiş multichannel spektrofotometreler kullanılarak hızlıca okuma yapılabilmektedir. Bu, verilerin saklanması ve istatistik olarak analiz edilmesine imkan sağlar (Crowther, 1995).

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz (ELISA) yöntemleri

ELISA analizi 4 farklı yöntemle gerçekleştirilebilmektedir:

Doğrudan ELISA Yöntemi

Antijen katı faz yüzeyine tutturulur. Yıkamadan sonra, enzim-etiketlenmiş antikor eklenir. İnkübasyon periyodu ve yıkamadan sonra enzim substratı eklenir. Renk değişiminin ardından, mikrotiter plak ELISA cihazında okutulur (Crowther, 1995).

Doğrudan ELISA, ELISA analizinin diğer yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha hızlı gerçekleşmektedir. Çünkü yalnızca bir antikor kullanılmakta ve daha az işlem basamağı içermektedir. Bu analiz spesifik antikor-antijen reaksiyonlarında diğer antikorlar arasında çapraz reaktiviteyi uzaklaştırmaya yardım etmek için kullanılabilir. Primer antikor tek başına etiketlenmelidir. Bu durum, çoklu deneylerde zaman kaybına, daha düşük duyarlılığa sebep olmaktadır.

Dolaylı ELISA Yöntemi

Dolaylı ELISA, primer antikorun ve işaretlenmiş ikincil antikorun çift bağlanmasını içeren iki basamaklı bir işlemdir. Primer antikor ile antijen inkübe edilir. Ardından ikincil antikor ile inkübe edilir. Ancak ikincil antikorun sebep olduğu çapraz bağlanmadan dolayı nonspesifik sinyaller meydana gelebilir. Bu yöntem, oldukça duyarlı, esnek ve maliyeti düşüktür (Crowther, 1995). Yoğun

olarak, serum numunelerinden spesifik antikorların titrasyonu veya deteksiyonu için kullanılır (Crowther, 1995).

Sandviç ELISA Yöntemi

Sandviç ELISA, diğer yöntemlere göre daha az kullanılır fakat numunede antijen deteksiyonunda oldukça yüksek bir etkiye sahiptir. Ayrıca, birçok ticari ELISA sandviç ELISA yöntemini kullanmaktadır.

Bu yöntemde, antikorların iki tabakası arasındaki antijenlerin miktar tayini yapılır. Antijen, antikora bağlanma kapasitesi olan en az iki antijenik epitop içermelidir ya da Sandviç ELISA sistemlerindeki antikorları yakalamak için monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılmalıdır. Bu yöntem oldukça spesifiktir. Kompleks numuneler için uygundur. Esnek ve duyarlıdır. Plak antikor ile kaplanır. Numune eklenir ve herhangi bir antijen antikora bağlanır. Detekte antikor eklenir ve antijene bağlanır. Enzim bağlı sekonder antikor eklenir ve detekte antikora bağlanır. Substrat eklenir ve enzim ile detekte edilebilecek şekle dönüştürülür.

Rekabetçi ELISA Yöntemi

Rekabetçi ELISA, diğer yöntemlerden farklıdır. İşlem basamakları basitçe şöyle özetlenebilir:

1. Primer antikor (işaretlenmemiş) numune antijeni ile inkübe edilir.
2. Antikor-antijen kompleksi mikrotiter plağa eklenir.
3. Plak yıkanarak bağlanmamış antikor uzaklaştırılır. Numunedeki fazla antijen kuyucuklarda bulunan daha az sayıdaki antikor ile bağlanır. Bu yüzden yöntem rekabetçi ELISA ismi verilmiştir.
4. Enzim ile birincil antikora özgü ve bağlanabilen ikincil antikor ilave edilir.
5. Substrat eklenir ve kalan enzimler kromojenik veya floresans sinyal ortaya çıkarır.

Bu yöntem oldukça spesifiktir, kompleks numuneler için uygundur, esnek ve duyarlıdır (Crowther, 1995).

P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Kantitatif Analizine Yönelik Kaynak Bilgisi

SP ve CGRP'nin miktar tayini ile ilgili olarak kaynak araştırmasında karşımıza çıkan makalelerle ilgili özet bilgiler aşağıda verilmektedir.

Kostel ve Lunte (1997), SP ve metabolitlerinin tayini için kapiler elektroforez ile ayırma sonrası türevlendirme ve Lazer-İndüklenmiş Floresans (LIF) saptama yöntemini bildirmektedirler. Post-kapiler kimyasal türevlendirme sistemi, naftalen-2,3-dikarboksaldehit ve β -merkaptotanol ile çalışmaktadır. SP ve metabolitlerinin belirlenmesi için kolon sonrası saptamaya olanak sağlayan iki reaktör tasarlanmış ve değerlendirilmiştir. Türevlerin floresan spektroskopik özellikleri optimum ayırma koşulları altında incelenmiştir. Geliştirilen sistem, beyinde SP metabolizmasını araştırmak için sıçan *striatum*'unun SP ile perfüzyonunu takiben alınan mikrodializ numunelerinin tayini yapılarak değerlendirilmiştir.

Rissler ve ark. (1997), radyoaktif işaretleyici olan [125 I] ile kloramin T yöntemini kullanarak SP'yi işaretlemişler, [125 I]-[Tyr⁸]-SP elde edilmiş ve sıçan beyin membranlarında yer alan SP reseptörlerine bağlanmayı incelemişlerdir. Muamele edilmemiş olan işaretli SP ile sıçan beyin membranlarında bağlanma gözlenmez iken işaretli peptidin merkaptotanol ile indirgenmesinden sonra bağlanma gözlenmiştir. Sıvı Kromatografisi (SK) yöntemi bu çalışmada işaretli peptidin diğer reaksiyon yan ürünlerinden ayrılması ve saflaştırılması için kullanılmıştır. Merkaptotanol ile muamele edilmiş işaretli peptidin sıçan beyin membran homojenatlarında yapılan bağlanma çalışmalarında bağlanmanın zamana bağımlı olduğu, 60 dk içinde maksimum değere ulaştığı ve saturable mekanizma ile gerçekleştiği belirlenmiştir. İşaretlenmemiş peptid ve SP reseptörlerine bağlanan iki amfibiyan taşıyıcının olan fisalemin (physalemine) ve eledoisin (eledoicine) ile yarışmalı bağlanma çalışmaları yapılmış ve bağlanmanın spesifikliğı gösterilmiştir. Önerilen işaretleme yöntemi ve merkaptotanol ile indirgeme işlemi ilk defa bu çalışmada uygulanmış ve önceki araştırmalarda bildirilen işaretleme yöntemlerine göre daha fazla verimle reseptörlere bağlanma gösterilmiştir.

Savunma mekanizmalarının nöropeptidler aracılığı ile düzenlenmesi nörojenik inflamasyon olarak isimlendirilen olayların neden olduğu doku hasarlarında klinik koşulların birçoğu ile ilişkilidir. Bu hastalık seyirlerinde ve tedavi sırasında nöropeptid derişimlerinin izlenmesi, hastalık aktiviteleri ile korelasyonlu laboratuvar değerlendirmeleri için mevcut uygun prosedürlerin olmayışına bağlı olarak zorluklar taşımaktadır. Bu problemi aşmak üzere doku biyopsilerinde bulunan nöropeptid derişimlerinin tayininde kullanılabilecek bir teknik geliştirilmiştir. Teknik, rutin patolojik veya klinik değerlendirmelerden elde edilen donmuş kısımların morfolojik olarak tanımlanmış alanlarının mikro-dissection işlemi ile alınması ve ardından immunoafinite kapiler elektroforez ile nöropeptidlerin analizini içermektedir. Bu işlemler dizisinde immobilize antikolar kullanılarak ilgili nöropeptidler yakalanmış, CE ile ayrılmış ve LIF ile saptanmıştır. Sistemin bir avantajı SP, CGRP, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ve Nöropeptid Y (NPY) için bağıl olarak hızlı (yaklaşık 10 dk) bir analize olanak

sağlamasıdır. İşaretli numunenin analiz öncesinde ön temizleme işlemleri de elimine edilmiştir, böylece yakalanmış analitlerin salınmasından önce bu tip materyallerin yıkanarak uzaklaştırılmasına gerek kalmamıştır. Teknik alışılmış immunoassay tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve üstünlüğü gösterilmiştir. Ayrıca biyopsi materyalinin tanımlanmış morfolojik alanlarında birden fazla nöropeptidin (SP, VIP, CGRP ve NPY) ölçülebilme üstünlüğüne de sahiptir (Philips, 1998).

Larsson ve Lutz (2000), kapiler elektroforez-kütle spektrometri (CE-MS) tekniğinin kullanıldığı peptid analizlerinde duyarlılığın iyileştirilmesi için transient izotakoforez yöntemini önermektedirler. Bu yöntemle 0.9 µL hacimlerin injeksiyonu mümkün olmaktadır. Tek bir kuadropol kütle analizör ile sheat (kılıf) sıvı elektrosprey arayüz kullanılmıştır. Öncelikle teknik, sitokrom C'nin triptik dijesti için kalitatif amaçla uygulanmış ve düşük zemin gürültülü ve yüksek kaliteli spektrumlar elde edilmiştir. İkinci olarak seçici iyon izleme (SIM) yöntemi ile peptidomimetik direk trombin inhibitörü olan melagatran (M_r 429.5) ve endojen nöropeptidler olan SP (M_r 1348) ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP, M_r 3806) için doğrusal aralık araştırılmıştır.

Freed ve ark. (2001) sıçan *striatum*' unda *in vivo* mikrodializ ile elde edilen numunelerde, SP metabolizmasını araştırmışlardır. SP, 0.2 µL/dk'da 5 saat perfuse edilmiş ve metabolizması 13 saatin üzerinde izlenmiştir. Mikrodializ işleminin uygulanması ile elde edilen numuneler naftalen-2,3-dikarboksaldehit (NDA)/siyanür ile kolon öncesi türevlendirilmiş, kapiler içinde ayrılmış ve LIF detektörün kullanıldığı siklodekstrin-modifiye elektrokinetik kromatografi (CDMEKC-LIF) ile saptanmıştır. SP'nin (3-11), (1-9) ve (1-4) fragmanlarını ve daha küçük genişlikteki (1-7) fragmanını oluşturmak üzere hızlıca metabolizmaya uğradığı gösterilmiştir. Metabolitler, SP ilavesinden sonra 2-3 saatte kararlı düzeylere ulaşmışlardır.

Babu ve ark. (2003), sıçan beyin doku ekstrelerinde biyoaktif bir nöropeptid olan SP'nin saptanması ve tayini için kapiler zon elektroforez metodu geliştirmişlerdir. Yöntem, katı faz ekstraksiyon ve immunopresipitasyon (immuno-çökeltme) tekniklerinin bir kombinasyonu ile saflaştırma işlemlerinin ardından kapiler zon elektroforez ile ayırma işlemlerini içermektedir. Saflaştırma amacıyla yapılan çalışmalarda SP'ye seçici olan antikolar ilgili analiti yakalamak için kullanılmıştır. Tampon tipi ve derişimi, tampon pH değeri ve uygulanan voltaj gibi farklı ayırma parametreleri yüksek verimlilikte kapiler zon elektroforez ayırma sağlamak için incelenmiştir. Ayırma tamponu olarak pH değeri 2.5 olan 100 mM fosfat tamponu kullanılmış ve 185 nm dalga boyunda çalışılarak muamele edilmemiş ergitilmiş silika kapiler ile ayırma sağlanmıştır. Asidik ortamda yapılan elektroforez ve başarılı yıkama işlemleri ile adsorpsiyon problemleri çözülmüştür. Yöntem 15 dk. nın altında analiz süresi ve % 3.91 bağlı standart sapmaya olanak sağlamaktadır. SP, aynı zamanda, Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometri (MALDI-TOF-MS) ile kantitatif olarak analiz edilmiş ve veriler kapiler zon elektroforez verileriyle karşılaştırılmıştır. Miligram düzeydeki beyin dokusu kullanılarak kapiler zon elektroforez ve MALDI-TOF-MS yöntemlerinin birlikte kullanımı ile SP nin pikomol altı düzeylerde miktar tayini gösterilmiştir.

Babu ve ark. (2004), SP nöropeptidinin sıçan beyin dokularında MALDI-MS (matriks-destekli lazer desopsiyon iyonizasyon-kütle spektrometri) analizine uygun immunopresipitasyon prosedürünü tanımlamışlardır. Beyin doku ekstratlarından SP'ye yönlendirilmiş antikolar ile SP çöktürülmüş (immunopresipitasyon), MALDI TOF-MS ile analiz edilmiştir. Kütle spektrometrik analiz ile tek yüklü $[M+H]^+$ iyon pikinin SP'nin moleküler kütesine karşılık geldiği ve 1.6% saptama hatası ile gözlemlendiği gösterilmiştir. Miligram düzeyindeki beyin dokusu örneklerinde bu yöntem kullanılarak pikomol miktarlarında SP saptanabilmektedir.

Frerichs ve ark. (2004), SP tayini için CE ile LIF saptamayı temel alan bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. SP, florojenik bir reaktif olan NDA ile CE-LIF sistemine enjeksiyondan önce türevlendirilmiştir. Kolon öncesi türevlendirme şeması enjeksiyon zenginleştirme teknikleriyle birleştirildiğinde SP'nin saptanması nanomolar altı düzeylere inmektedir. İnjektasyondan önce numuneye ön deriştirme uygulanmadığı halde saptama sınırı (LOD) 100 pM elde edilmiştir. 5 nM SP içeren altı farklı standart numune ile tekrar edilebilirlik çalışması yapıldığında % 6.8 bağıl standart sapma elde edilmiş, göç zamanları için tekrar edilebilirlik % 0.08 bağıl standart sapma düzeyinde bulunmuştur. Bu yöntem, tükürük numunesindeki SP'nin tayininde kullanılmış ve insan tükürük numunesindeki SP miktarı 3 nM olarak belirlenmiştir.

Phillips ve Wellner (2006), çip-temelli immunoafinite kapiler elektroforezi kullanarak klinik numunelerde nöropeptidlerin ölçülmesi için bir yöntem geliştirmişlerdir. Çip temelli cihazların üstünlüğü bağıl olarak hızlı analiz, reaktif sarfiyatının düşük düzeyde olması ve klinik tarama ve tanımlara uygulama kolaylığı olarak bildirilmektedir. İki çipi bulunan kapiler elektroforez sistemi dizayn edilerek performansı nöropeptidlerin eşlik ettiği kas ağırlı hastaların doku sıvılarında iltihap oluşturan nöropeptidlerin derişimlerinin hızlı bir şekilde ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Ölçülen nöropeptidler SP, CGRP ve VIP'tir. Her iki çip de ticari olarak mevcut olan çip elektroforez sistemine uygun kılmak için üretilmiştir. Çiplerden biri ilgili analiti yakalamak için immobilize antikor dizisi içeren immunoekstraksiyon portu olarak ve diğeri elektrokinetik akış immunoanalizi gerçekleştirmek için dizayn edilmiştir. Karmaşık biyolojik sıvılarda iltihap oluşturan biyoışaretleyicilerle yapılan çalışmaların sonuçları yaygın olarak kullanılan ticari olarak mevcut yüksek duyarlılıktaki immunoanalizlerle karşılaştırıldığında, iki çip bazlı sistemlerin bağıl olarak hızlı ve doğru prosedür sağlayabildiği gösterilmiştir. 12 farklı iltihaplanma-ilişkili mediyatör bu sistem kullanılarak yaklaşık 2 dakikada belirlenebilmektedir, halbuki akış immunoanaliz çipinin kullanıldığı sistemle işlemler 30 dakika sürmektedir.

Beaudry ve Vachon (2006), sıçan omuriliğindeki SP derişimini belirlemek için hızlı ve seçici bir yöntem geliştirmişlerdir. Sıvı kromatografisi- elektrosprey-kuadrupol iyon tuzluğu-kütle spektrometri (SK-ESI-QIT-KS) ile analizler gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemlerinde metanol:%0.1 formik asit içeren gradient hareketli faz 0.2 mL/dk akış hızında C18 (50x2.1 mm) analitik kolona verilerek uygulanmış ve omurilikteki analizler için 10-500 pmol/mL analitik aralık incelenmiştir. LOD değeri 10 fmol olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin

sıçan omuriliğinde SP'yi teşhis ve tayin etmek için gerekli olan seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve kararlılık karakteristiklerine sahip olduğu gösterilmiştir.

Phillips ve Wellner (2007), insan deri biyopsilerinin biyokimyasal analizinde kullanılması için yarı otomatik çip temelli immunoafinite kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Biyopsi dokularının microdissection ile sağlanması ve çözünürleştirilmesi işleminden sonra analizi hedeflenen biyomarkerler 12 antikoru bir panel kullanılarak immunoafinite tekniği ile yakalanmış ve çipin ekstraksiyon portunda bulunan cam fiber disk üzerinde konumlandırılmıştır. Yakalanmış analitler 635 nm de ışını yayan laser boya ile işaretlenerek ayırma kanalına elektroelüsyon ile aktarılmıştır. Analitlerin tamamı için elektroforetik ayırma 2.2 dk içinde her bir pikin online LIF saptanması ve pik alanı integrasyonu ile sağlanmıştır. Çip temelli sistemden elde edilen sonuçlar ticari olarak bulunan yüksek duyarlılığa sahip immunoassay ile karşılaştırılmış, çip temelli kapiler elektroforez tayinin kompleks biyolojik materyallerde iltihap oluşturan biyomarkerlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN γ , TGF-(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN γ , TGF- β , MIP-1 α , MCP-1, SP, CGRP, NY, VIP) derişiminin belirlenmesinde hızlı ve doğru bir prosedüre olanak sağladığı belirlenmiştir. Önerilen sistemin doğruluk ve kesinliğinin klasik immunoassay ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu bildirilmektedir. Geliştirilen yöntemin çeşitli biyomedikal analizlerin geniş bir aralığında uygulanabilir olduğu ifade edilmektedir.

SP nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra ağrı ve depresyon ile de ilişkilidir. SP'nin bu advers etkilerinin çoğunun, potansiyel olarak kan-beyin engelinde oluşan metabolitlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Kan-beyin engelinin invitro modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada SK-KS/KS yöntemi ile SP'nin metabolizması araştırılmıştır. SP metabolizması 100 nM–10 μ M derişim aralığında non-saturable bulunmuş, 5 saat sonra peptidin yaklaşık %70'i bozulmadan kalmıştır. Bu yöntemle SP'nin başlıca metabolitleri 3-11 ve 5-11 olarak belirlenmiştir. Daha önce bildirilmeyen 5-11 ve 6-11 metabolitleri de ilk defa bu çalışma ile bulunmuştur. Daha az miktardaki SP metabolitleri olan 1-9 ve 2-11 de teşhis edilmiştir. Kan beyin engelinde oluşan SP metabolitlerinin, zamana karşı profili verilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile, SP'nin farmakolojisinde kan-beyin engelinin rolü aydınlatılmıştır (Chappa ve ark., 2007).

Wang ve ark. (2009), yengeç (*Cancer borealis*)'in nöroendokrin organlarındaki nöropeptitlerin kütle spektrometrik analizi için, basitleştirilmiş numune hazırlama ve küçük ölçekli ayırmayı birleştiren işlemler önermektedirler. Nöropeptitlerin ekstraksiyonunu iyileştirmek için, yaygın bir MALDI matriksi olarak kullanılan sulu çözeltide doygun derişimde hazırlanmış 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) ile basit ve tek basamaklı bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. DHB kapiler elektroforezde çalışma elektroliti olarak da kullanılmış ve MALDI-Fourier Transform kütle spektrometrik (FT-MS) saptama ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Yöntemin aralarında SP'inde bulunduğu dokuz farklı nöropeptidin analizinde hem peptid ekstraksiyonu işlemleri hem MALDI saptama için uygun olduğu, peptid karışımlarının CE-MALDI-MS analizinde ayırma gücü ve duyarlılığın iyileştiği bildirilmektedir.

SP ve CGRP nöropatik ağrı gelişimi ve devam eden süreçte önemli bir role sahiptir. Beaudry ve ark. (2009), sıçan omurilik örneklerinde SP, CGRP ve dinorfin A'nın SK-ESI/KS/KS ile karakterizasyonu, teşhisi ve miktar tayini için bir yöntem önermişlerdir. Örnekler alındıktan sonra TFA çözeltisinde homojenize edilmiştir. Kromatografik ayırma için C8 (100x1 mm) kolon ve 75 µL/dk akış hızında 19 dk süre doğrusal gradient (0:100, ACN:0.2 % formik asit, 40:60) uygulanarak 32 dk içinde analiz tamamlanmıştır. Sıçan omuriliğinde peptidler full scan KS/KS spektrumları kaydedilerek teşhis edilmiştir. Doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametrelerinin analizlerin yürütülmesi için uygun olduğu gösterilmiştir. Ardından yapılan sıçan omuriliği analizlerinde SP için 110.7 pmol/g, CGRP için 2541 pmol/g endojen derişimler bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin nöropatik ve kronik ağrının hayvan modellerinde nöropeptid regülasyonunun belirlenmesi için yararlı olacağı bildirilmektedir.

Cavazza ve ark.(2011), SP'nin CE-MS ile saptanması ve miktarının yeni analitik metotla değerlendirilmesi için eş eksenli sıvı ara yüzey kaplama geliştirmişlerdir. Bu yöntem, insan osteosarkoma SaOS-2 hücre hattı ile SP'nin inkübasyonu sırasında SP'nin enzimatik hidrolizinin değerlendirilmesi için uygulanmıştır. SP'nin yıkılması ile açığa çıkan amino asitlerin analizi eş zamanlı ve aynı elektroforetik koşullarda yapılmıştır ve SP'nin kayboluşu ile paralel, amino asit oluşumunun kinetik tanımlanmasına izin veren sonuçlar elde edilmiştir. Intact SP ve serbest amino asitler 600 s inkübasyon süresi boyunca izlenmiştir. SaSO-2 hücrelerinin varlığında aşırı hızlı hidroliz gösteren peptidlerin yarı ömrü 4.3 s olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, endopeptidazların aktivitesinin oluşumunun ve ardından aminopeptidaz aktivitesinin primer bağ kırılmasından sonra oluşan serbest amino asitlerin salınımdan sorumlu olduğu hipotezine yol açmaktadır.

Pailleux ve ark. (2012), farelerde TRPV1 reseptörünün çıkarılmasının merkezi sinir sisteminde bulunan SP ve Nörokinin A ekspresyonunu değiştirdiğini kantitatif kütle spektrometri analizinde ortaya çıkarmışlardır. Nöropeptid derişimlerini ölçmek için Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) kullanarak spinal cord ve beyin dokularında seçici ve duyarlı bir metod geliştirmişlerdir.

Çizelge 1'de P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid için literatürdeki kantitatif tayin parametreleri gösterilmiştir.

Çizelge 1. P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid için Kaynaklardaki Kantitatif Tayin koşulları

Örnek	Tayin Yöntemi	Saptama Tarzı	LOD Değeri	Kaynak
Sıçan omuriliği	HPLC-ESI/MS/MS	ESI-QIT-MS	SP 7 pmol/mL CGRP 65 pmol/mL	Beaudry ve ark.(2009)
Sığır beyin mikrovasküler endotel hücresi (BBMEC)	LC/MS/MS	ESI-MS	1 nM	Chappa ve ark. (2007)
Sıçan beyin dokusu	CZE-MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	0.5-20 pmol/μl	Babu ve ark. (2004)
Sıçan beyin dokusu	CZE-MS	ESI-MS	6 nmol/L	Larsson ve Lutz (2000)
Tükrük	CE	LIF	100 pM	Frerichs ve ark. (2004)
Sıçan <i>striatumu</i>	CDMEKC	LIF	2.5-26.5 nM	Freed ve ark. (2001)
Sıçan beyin dokusu	CZE	UV detektör	0.25 pmol /μl	Babu ve ark. (2003)
İnsan osteosarkoma SaSO-2 hücre hattı	CE- MS	ESI-IT-MS	0.02 μmol/L	Cavazza ve ark. (2011)
Sıçan omuriliği	LC-ESI-QIT	ESI-QIT-MS	10 fmol	Beaudry ve Vachon (2006)
Fare omuriliği Fare beyin dokusu	HPLC-ESI/MS/MS	ESI-IT-MS	99.9-165.8 fmol/mg 137.4-258.5 fmol/mg	Pailleux ve ark. (2012)

P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi ile ilgili Kaynak Bilgisi

Ebersberger ve ark. (1999), sıçan dura mater encephali'den SP, CGRP ve prostaglandin E₂ (PGE₂) salınımı sonrası *in vitro* elektriksel ve kimyasal uyarılmayı araştırmışlardır. SP, CGRP ve PGE₂ düzeyleri EIA Kit kullanılarak belirlenmiştir. LOD değeri CGRP için 2 pg/mL, SP ve PGE₂ için 10 pg/mL'dir. SP, CGRP ve PGE₂'nin bazal salınımı sırasıyla 19.3±11 pg/mL, 20.9±12 pg/mL ve 305±250 pg/mL olarak ölçülmüştür.

Frobert ve ark. (1999), CGRP'nin karakterizasyonu ve uygulaması için duyarlı bir rekabetçi immunoassay analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Sıçan CGRP'ye karşı yönelik 30 tane fare monoklonal antikor (mAbs) elde etmişlerdir. Bu antikorlar N-terminal ve C-terminal peptid olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. mAb CGRP-83 capture antikor, mAb CGRP-72 izleyici ve asetilkolinesteraz enzimi ile işaretleme yaparak 2 taraflı immunometrik analiz geliştirilmiştir. Analizin LOD değeri 2 pg/mL'dir. Tüm insan ve murin (fareye ait) CGRP izoformlarında kantitatif ölçümlere imkan sağlamaktadır. Rekabetçi immunoassay yöntem ile ölçülen

calcitonin gene-related peptide-like (CGRP-LI) düzeyleri sıçan beyin ve omurilik dokusunda sırasıyla 7.2 pmol/g ve 368.3 pmol/g ve sıçan beyin ve omurilik dokusunda sırasıyla 6.9 pmol/g ve 334.5 pmol/g olarak ölçülmüştür.

Averbeck ve Reeh (2001), izole sıçan derisinden CGRP, SP ve PGE₂ salınımını uyaran inflamatuvar mediyatörlerin etkileşimini incelemişlerdir. Enzim immunoassay yöntemi kullanarak sıçan sırt derisinin fleplerinden (vücudun bir kısmından kesilip diğer bir kısmına eklenen doku parçası) izole edilen SP, CGRP ve PGE₂ salınımını uyaran asit pH ve bradikinin, serotonin, histamin, prostaglandin arasındaki etkileşimleri araştırmışlardır. CGRP, SP ve PGE₂ için belirlenen tayin sınırları sırasıyla 2 pg/mL, 10 pg/mL ve PGE₂ için 30 pg/mL'dir.

Bondy ve ark. (2003), depresyon hastalarında serum SP düzeylerini analiz etmişlerdir. SP ölçümleri için rekabetçi EIA Kit kullanmışlardır. Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda serum SP düzeyleri 132-458 pg/mL aralığında bulunmuştur. İlaç kullanmayan depresyon hastalarında serum SP düzeyi 200-618 pg/mL bulunmuştur.

Harada ve ark. (2007), nötrofil aktivasyonunun lafutin, H₂-reseptör ile inhibisyonun sıçanlarda duyuşal nöron aktivasyonunun artırılmasının stres-indüklenmiş gastrik mukozal yaralanmaların azaltılmasına katkısını araştırmışlardır. Gastrik CGRP düzeyi spesifik EIA Kit kullanılarak analiz edilmiştir. CGRP analizinin duyarlılığı 10 pg/mL'dir.

Song ve ark. (2006), modifiye edilmiş sandwich enzim immunoassay kullanarak kuru kan noktalarında (dried blood spots) CGRP ölçümü yapmışlardır. Aynı bireylerden alınan serum ve plazma düzeylerini eluat düzeyleri ile karşılaştırmışlardır. Matriks etkisinden kaçınmak için CGRP standart çözeltileri ve kalite kontrol çözeltileri EIA tamponu yerine CGRP plazma/serum içermeyen veya yıkanmış eritrositler ile dilue edilmiş ve yeniden sulandırılmıştır. Serum, plazma ve eluatdaki CGRP ölçümlerinde CGRP EIA kit prosedürü kullanılmıştır. Modifiye edilmiş yeni EIA sistemi CGRP derişimini 3.9-7.8 pg/mL ölçebilecek kadar duyarlı ve spesifiktir. Eluat numunelerindeki CGRP derişimi serum ve plazmadakilere göre biraz daha yüksek bulunmuştur.

Eberhardt ve ark. (2008), dorsal root ve trigeminal ganglia'dan intact izole edilen CGRP salınımını araştırmışlardır. Dorsal root ganglia ve trigeminal ganglia doku numunelerinde ticari EIA Kitler kullanarak SP, CGRP ve PGE₂ düzeylerini belirlemişlerdir. Tayin sınırları SP için: 8 pg/mL, CGRP için: 2 pg/mL ve PGE₂ için 15 pg/mL olarak belirlenmiştir.

Erin ve ark. (2012), kronik gastrit veya ülseri olan hastalarda özellikle SP, CGRP ve VIP nöropeptid düzeylerinin yanı sıra neprilysin düzeylerindeki değışiklikleri incelemişlerdir. EIA yöntemini kullanarak kronik gastrit veya ülser hastalarından alınan biyopsi dokularında SP, CGRP ve VIP peptid düzeylerini belirlemişlerdir. SP için tayin sınırı 10-250 pg/mL, VIP için tayin sınırı 200 pg/mL'dir. Gastrit doku numunelerinde CGRP miktarı tayin edilememiştir.

Beyin Dokusundan P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Ekstraksiyonu ile ilgili Kaynak Bilgisi

Sıçan CGRP Enzim İmmunoanaliz (EIA) Kit (Cayman), beyin-omurilik sıvısı gibi dokular EIA tampon içerisinde 1:20'den daha fazla seyreltilmişse doğrudan analiz edilebilir. Omurilik gibi diğer dokular ekstraksiyon prosedüründen sonra analiz edilebilir. Temel olarak, prosedürde doku 2N asetik asitte homojenize edilir, 90°C'de 10 dk ısıtılır, santrifüjlenir, süzöntü kurutulur ve EIA tamponunda çözülür (http-2).

Frobert ve ark. (1999), CGRP için duyarlı bir sandviç enzim immunoassay yöntemi geliştirerek, karakterizasyonu ve biyolojik numunelerde uygulamasını göstermişlerdir. Beyin ve omurilik ekstrelerindeki uygulama için, beyin minus cerebellum ve omurilik (3g doku için 12 mL 2 M asetik asit) Ultra-Turrax cihazı kullanılarak homojenize edilmiştir. Ekstreler 95 °C'de 10 dk ısıtılmış ve 20000 x g'de 45 dk santrifüj edilmiştir. Büyük proteinlerin çoğu ultrafiltrasyon ile süzöntüden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra filtratlar bölünüp dondurularak kurutulmuş ve -20 °C'de saklanmıştır. Analizden önce EIA tamponu içerisinde çözölmüştür.

Larsson ve Lutz (2000), 10 mg dolayındaki sıçan beyninden sağlanan nöronal doku numunelerini 100 µL 0.1 M HCl ekleyerek homojenize etmişler, santrifüjden sonra supernatani 3 defa 350 µL dietil eter ile muamele etmişlerdir. Sulu faz ayrılarak C18 SPE kolona aktarılmıştır. Kolon 500 µL 0.1% TFA ile yıkandıktan sonra SP ve CGRP, % 0.1 (h/h) TFA içeren 100 µL asetonitril ile ekstre edilmiştir. Ekstre kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve kalıntı 10 µL 10 mM amonyum asetat ile çözölmüştür. Standart peptidlerin çözeltilerini 10 mM amonyum asetat ile hazırlayarak seyreltmışlerdir.

Babu ve ark. (2003), tam tartılmış (423 mg) beyin dokularını 1 M asetik asit (4 mL) içinde süspande ederek 15 dk kaynatmışlardır. Numune oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra homojenize edilmiş ve 4°C'de 20000 x g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılarak alınmış ve pellet tekrar 1 M asetik asit ile yıkanarak santrifüj edilmiştir. Pellet atılmış ve iki süpernatant birleştirilmiştir. Süpernatant liyofilize edilerek pH değeri 8.0 olan fosfat tamponunda çözölmüştür. Çözünmeyen kısım 20000 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilerek atılmış ve çözelti eşit kısımlara ayrılarak analize kadar -20°C'de saklanmıştır. Katı faz ekstraksiyonu için Sep-Pack C18 kartuş kullanılmıştır. Kartuş 1 mL asetonitril, 10-25 mL TFA (%1 h/h) ile koşullandırılmıştır. %1 TFA'nın eşit hacimleri numuneye ve kartuşa uygulanmıştır. Numune kartuşa yüklenmiş ve 10-20 mL %1 TFA ile yıkanmıştır. 3 mL ACN:%1 TFA (60:40, h/h) ile SP kartuştan elüe edilmiş, çözöcö uçurulmuş, liyofilize edilmiş ve fosfat tamponunda yeniden çözöndürölmüştür.

Babu ve ark. (2004)'nın önerdiği yöntemde, yaklaşık ağırlığı 423 mg olan dondurulmuş beyin dokuları hızlıca 1 M asetik asit (4 mL) içerisinde çözöndürölerek, 15 dakika kaynatılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra numune homojenize edilmiş ve 4°C' de 20 dk 20000 x g'de santrifüj edilmiştir. Pellet, 1 M asetik asit ile yıkanmış ve yeniden santrifüjlenmiş, sonuçta oluşan süzöntü biriktirilmiştir. Pellet atılmış ve iki süzöntü birleştirilmiştir.

Süzüntüler liyofize edilmiş ve fosfat tampon sisteminde (pH 8.0) yeniden çözünmüştür. Çözünmeyen maddeler 20 µL 0.1% TFA (v/v) kullanılarak tekrar çözünmüş ve süzüntüler toplanmış ve -20 °C' de saklanmıştır.

Erin ve Clawson (2004), ELISA protokolünü kullanarak kalp, cilt ve akciğer ekstrelerinde SP ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon prosedürü 2 basamaklıdır, asit ekstraksiyonunu kolon ekstraksiyonu izlemektedir. 10 mg dolayında doku ekstresinde SP etkili bir şekilde ölçülmüştür. 5-8 haftalık Balb-c dişi fare dokuları sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve SP ekstraksiyonundan önce -80°C'de saklanmıştır. Buz üzerine konulan dokular 1-2 mm parçalar halinde kesilmiş, tartılmış ve buzda soğutulmuş fizyolojik tamponda (PBS) 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra 100°C'de 30 dakika 1 mL 2 M asetik asit ile inkübe edilmiştir (asit ekstraksiyonu). SP 1 mL (30 mg) Oasis ekstraksiyon kartuşu kullanılarak daha fazla ekstrakte edilmiştir (kolon ekstraksiyonu). Asit ekstraksiyonundan sonra, numuneler oda sıcaklığında 16000 x g'de 3 dk santrifüj edilmiş ve süzüntüler kolon ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Kartuş 1 mL metanol ve 1 mL distile su ile şartlanmıştır. Vakum manifold, numuneleri kartuşun içerisine çekmek için kullanılmıştır. Kartuş 1 kez su ile yıkanmıştır. SP yavaşça (1 dk'dan uzun sürede) 1 mL asetonitril:%1 TFA (60:40) ile elue edilmiştir. Elüsyon tamponu vakum altında buharlaştırılmış ve numuneler 100-600 µL SP ELISA tamponu içerisinde yeniden çözünmüştür.

Beaudry ve Vachon (2006), yaptıkları çalışmada sıçan omuriliği örneklerini 1:5 (a/h) oranında homojenize etmek için % 0.25 (h/h) TFA çözeltisi kullanmışlardır. Numuneler 15 dk ultrasonik banyoda tutulmuş ve 200 µL homojenat, 200 µL iç standart çözeltisi (asetonitril içerisinde hazırlanmış 100 ng/mL reserpin) ile karıştırılmıştır. Numuneler vortekslenmiş ve 12000 x g'de 10 dk santrifüjlenmiş ve süzüntü enjeksiyon vialine analiz için aktarılmıştır.

Wei ve ark. (2006), off-line Kapiler Sıvı Kromatografisi (CLC) ile birleştirilmiş Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometri (MALDI-TOF-MS) ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometri -Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometri (TOF/TOF-MS) kullanarak, mikrodalga ile fikselenmiş sıçan beyin dokusundaki nöropeptidlerin tanımlanması ve miktar tayini için yöntem geliştirmişlerdir. SP miktarı daha önce sıçan *striatumunda* bildirilene göre ~6.8 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu artış mikrodalga ile fikseleme işlemine bağlanmıştır. Mikrodalga ile fikseleme peptidin bozulmasını, agresif ekstraksiyon prosedürlerini ve analizde SP'nin oksidasyonunu önlemiştir. *Striatum* dokusu (20-40 mg) 145 mM KCl, 8 mM SDS ve % 0.25 asetik asit içeren soğuk (4°C) homojenizasyon çözeltisi (0.25 mg/µL) içerisine yerleştirilmiştir. Doku/homojenizasyon çözeltisi 1 saat buzda bekletilmiş ve her 10 dakikada 5 s ultrasonik banyoda tutulmuştur. Homojenat 4°C 20000 x g'de santrifüj edilmiştir. Proteinler ve nöropeptidlerin her ikisini içeren süzüntü doku çöktisinden uzaklaştırılmış ve Microcon Y10 santrifüj filtre kullanılarak filtrelenmiştir. Daha sonra filtre cihazı santrifüje yerleştirilmiş ve 14000 x g'de 45 dk döndürülmüştür. Peptid bakımından zengin filtrat analize kadar 15 µL'lik kısımlar halinde sıvı azot içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

Beaudry ve ark. (2009), izofluran ile derin anestezi yapılmış erkek Sprague-Dawley sıçanların (n = 8) lomber bölgesinden sağladıkları omurilik numunelerini

acilen soğuk hegzanda (kuru buz banyosunda tutulmuş) dondurarak analize kadar -80°C 'de saklamıştır. Bu işleminin ardından dokular tartılarak homojenize edilmiştir. Sıçan omuriliklerine 1:5 (a/h) oranında % 0.25 TFA çözeltisi eklenerek homojenize edilmiştir. Numuneler 15 dk ultrasonik banyoda tutulmuş ve 200 μL homojenat 200 μL iç standart çözeltisi (asetonitril içerisinde hazırlanmış 500 ng/mL tilosin) ile karıştırılmıştır. Numuneler vortekslenmiş ve 12000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve süzüntü analiz için enjeksiyon vialine aktarılmıştır.

Ferland ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada sıçan omuriliklerine 1:5 (a/h) oranında % 0.25 TFA çözeltisi ekleyerek numuneleri homojenize etmişlerdir. Numuneler 20 dk ultrasonik banyoda tutulmuş ve homojenatın 150 μL 'si 150 μL asetonitril ile karıştırılmıştır. Numuneler vortekslenmiş, 12000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süzüntünün 150 μL 'si enjeksiyon vialine aktarılmış ve internal standart çözeltisinin 150 μL 'si eklenmiştir. Vialer kapatılmış ve analizin başlangıcında vortekslenmiştir.

Erin ve ark. (2012), kronik gastrit veya ülseri olan hastalarda özellikle SP, CGRP ve VIP nöropeptid düzeylerinin yanı sıra nefrilisin düzeylerindeki değişiklikleri incelemişlerdir. Biyopsi numuneleri küçük parçalara ayrılmış ve 1 mL %2 asetik asit eklenerek 95°C 'de 10 dk bekletilmiştir. Süzüntü biriktirilmiştir. İlk ekstraksiyon nöronal SP'yi içermektedir. İkinci ekstraksiyonda peptidin non-nöronal bölümü 1 ml %2 asetik asit eklenerek 95°C 'de 50 dk bekletilmiştir. Her iki ekstraksiyona ait süzüntüler biriktirilmiştir. Süzüntüler tamamen kurutulduktan sonra 150-300 μL EIA tamponu içerisinde çözölmüştür.

Pailleux ve ark. (2012)'nin önerdiği yöntemde, fare dokularından tam tartım alınmış, tissue tearor kullanılarak homojenize edilmiş ve ardından 1:5 (a/h) oranında % 0.25 TFA çözeltisi eklenmiştir. Numuneler 20 dk ultrasonik banyoda tutulmuş ve 150 μL homojenat 150 μL asetonitril ile karıştırılmıştır. Numuneler vortekslenmiş ve 12000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatanın 150 μL 'si enjeksiyon vialine aktarılmış, daha sonra iç standart çözeltisinin 150 μL 'si eklenmiştir.

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasallar

Asetik Asit	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Sigma-Aldrich, Amerika
CGRP	: Bachem, Amerika
CGRP Enzim İmmuno Analiz Kit	: Cayman, Amerika
Formik Asit	: Sigma-Aldrich, Amerika
Kromatografik Su	: Merck, Almanya
SP	: Bachem, Amerika
SP Enzim İmmuno Analiz Kit	: Cayman, Amerika
Trifloroasetik Asit	: Sağlık Medikal, Türkiye

Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
ELISA Okuyucu	: Bio Tek-Power Wave XS, ABD
Hassas Terazı	: Mettler Toledo, Türkiye
Homojenizatör	: Potters B. Braun International, Almanya
SK-KS	: Agilent Technologies, LC1100, Almanya Agilent 1100 kolon fırını Agilent 1100 pompa Agilent 1100 oto enjektör Agilent Technologies, MS Trap SL, ABD
SK-KS/KS	: Agilent Technologies, LC1290, ABD Agilent 1260 kolon fırını Agilent 1290 pompa Agilent 1290 oto enjektör Agilent Technologies, 6460 Quadrupole, ABD
Microcon YM10 Filtre	: Sartorius, Almanya
Santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5810R, Almanya
Su Banyosu	: Memmert, WB14, Almanya
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vakumlu Buharlaştırıcı	: CentriVap DNA Vacuum Concentrators, ABD
Vorteks	: Jeio Biotech, Kore
Kolon	: C ₈ (150x2.1 mm, 3.5 µm) Zorbax narrow-bore kolon, Agilent Technologies, ABD
Filtre	: Sağlık Medikal, Türkiye

YÖNTEMLER

Sıvı Kromatografisi-İyon Tuzağı Kütle Spektrometrisi ile Yapılan Ön Çalışmalar

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (SK-KS) temeline dayalı teknikler, peptidlerin biyolojik numunelerdeki kalitatif ve kantitatif analizlerine önemli katkı sağlamaktadır. Deneysel çalışma sürecine başlanırken SP ve CGRP'nin SK-KS analizi ile ilgili mevcut kaynaklar taranmış, Sıvı Kromatografisi-İyon Tuzağı Kütle Spektrometrisi ile SP'nin iyonlaşması, kütle spektrumunun elde edilmesi ve fragmentlerine ayrılması koşulları araştırılmıştır.

SP'nin SK-KS analizine yönelik yapılan ilk deneysel çalışmalarda Beaudry ve ark., (2009) yapmış olduğu çalışmada bildirilen hareketli faz bileşimi temel alınarak uygun derişimde (100 nM) SP çözeltisi hazırlanmış, hareketli faz içeriği ile ilgili gradient koşullar ayarlanarak SP'nin Ayrılmış İyon Kromatogramı (EIC) ve m/z (kütle/yük) spektrumu elde edilmiştir. SP'nin (+2) iyonlaşmasına ait m/z 600.4 değerinde bir pik gözlenmiş, KS parçalanması elde edilmeye çalışılmış fakat stabil bir fragment bulunamamıştır.

Daha sonra çeşitli beyin dokularında (beyin, beyin sapı, trigeminal ganglion) bulunan SP iyonlaşmasına ait m/z 600.4 pikinin olası gözlenebilmesi için TFA ekstraksiyonu (Beaudry ve ark., 2009; Beaudry, 2010) yapılmış, doku matriksinin temizlenmesi için TFA ekstraksiyonun ardından katı faz ekstraksiyon (SPE) (Babu ve ark., 2003) uygulanması uygun görülmüştür. Kaynaklarda yaygın olarak kullanımına rastlanan asetik asit ekstraksiyonu, (Erin ve Ulusoy, 2009; Babu ve ark., 2003) SP EIA Kit prosedüründen yararlanılarak beyin dokusundan SP'yi ekstre etmek için deney planları oluşturularak uygulanmıştır. Ancak dokuların SK-KS analizinde SP'ye ait m/z değerinde pik gözlenememiştir. Cihazın düşük seviyelerde tayin yapmak için yeterli olmadığı düşünülerek Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (SK-KS/KS) analizi ile ilgili çalışma planlanmıştır. SP ve CGRP'nin beyin ve beyin sapı dokusundaki daha sonraki belirleme ve saptama çalışmalarına SK-KS/KS cihazı ile devam edilmiştir.

Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Çalışmaları

Nöropeptid çözeltilerinin hazırlanışı

SP'nin stok çözeltisini hazırlamak için; 1 mg SP tartımı alınarak 1 mL %5 (h/h) asetik asit çözeltisi içerisinde çözünmüştür. Bu çözeltiden 1/10 seyreltmeyle 0.1 mg/mL çözelti hazırlanmıştır. Aynı çözeltiden 10 µL eppendorf vialle alınarak, asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 (h/h) asetik çözeltisi ile 1000 µL'ye tamamlanmıştır.

CGRP stok çözeltisi hazırlamak için; vialin içerisinde yer alan 1 mg CGRP %5 (h/h) asetik asit çözeltisi ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden iki kez seyreltme yapılarak 0.01 mg/mL çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 50 µL eppendorf vialle alınarak, asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 (h/h) asetik çözeltisi ile 200 µL'ye tamamlanmıştır.

Her iki nöropeptidin stok çözeltileri küçük kısımlara ayrılarak, her çalışmada taze çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiler -20 °C'de saklanmıştır.

Doku homojenizasyonu

Beyin ve beyin sapı dokusundan nöropeptidlerin ekstraksiyonu için, anestezi altında alınan doku numuneleri homojenizatör balonu içerisine alınarak, 3 mL 2 M asetik asit ile homojenize edilmiştir. Doku homojenatı su banyosunda 90°C'de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 4°C 4000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak filtreden geçirilmiştir. SK-KS/KS analizi gerçekleştirilmiştir. **Şekil 10**'da doku hazırlama işlem basamakları gösterilmektedir.



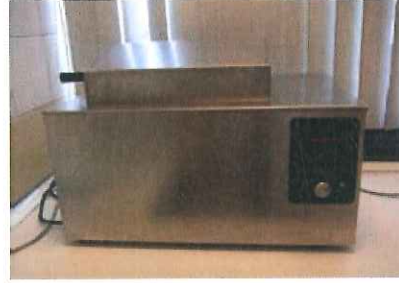
Doku diseksiyonu



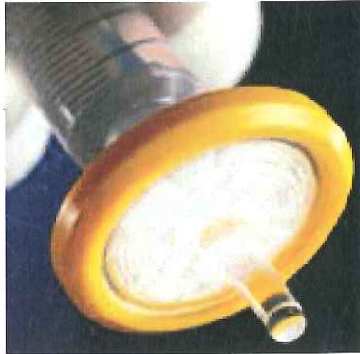
Dokunun 2M asetik asit ile homojenizasyonu



4000 rpm'de 30 dk santrifüj



Termostatlı su banyosunda 90°C'de 10 dk ısıtma



Filtreden geçirme



Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Analizi

Şekil 10. Doku Hazırlama İşlem Basamakları

Kromatografik koşullar

Ayırma işlemlerinde C₈ (150x2.1 mm, 3.5 µm) Zorbax (Agilent) narrow-bore kolon kullanılmıştır. Kolonun ters faz dolgusunun düşük pH'da kararlı olması sentetik, doğal peptidlerin ve proteinlerin tanımlanmasını ve ayrılmasını sağlamaktadır (http-3). Ayırma kolonuna 10 µL numune enjekte edilmiştir. SK-KS/KS sinyallerinin belirlenmesi çalışmalarında ikili gradient hareketli faz sistemi kullanılmıştır. A hareketli fazı % 0.2 (h/h) formik asit içeren saf su, B hareketli fazı ise % 0.2 (h/h) formik asit içeren asetronitril (ACN) olarak hazırlanmış, filtreden süzölmüş ve ultrasonik banyoda 30 dk bekletilerek çözönmüş gazlardan arındırılmıştır. Akış hızı 0.2 mL/dk, kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmışır. Kullanılan gradiyent sistem **Çizelge 2**'de verilmektedir.

Çizelge 2. Kullanılan Gradient Sistemi

Zaman (dk)	A Hareketli Fazı (%)	B Hareketli Fazı (%)
0	90	10
15	55	45
20	40	60
20.01	90	10

Kütle spektrometresi koşulları

KS sinyalleri SP ve CGRP için m/z 100-1400 ve m/z 500-1500 aralığında taranmıştır. ESI'da püskürtücü gaz olarak azot 45 psi basıncında uygulanmıştır. Kurutucu gaz olarak azot kullanılmış ve 300°C'de 5.1 L/dk hızda uygulanmıştır. Sheath gaz olarak azot kullanılmış, 250°C'de 11.0 L/dk hızda uygulanmıştır. İyonizasyon için artı polarite seçilmiştir.

Nöropeptidler için optimizasyon parametreleri

Nöropeptidlerin SK-KS/KS analizinde optimizasyon parametreleri olarak moleküler iyon, fragmentor voltajı, fragman iyon, parçalama enerjisi ve hızlandırıcı voltaj değerlerini belirlemek üzere çalışmalar yapılmıştır.

Moleküler iyon

Numune molekülünün hiç parçalanmadan bir veya birden fazla elektron kaybetmesi veya kazanmasıyla oluşan iyon 'moleküler iyon' olarak adlandırılmaktadır (Hoffmann ve Stroobant, 2007). SP'nin moleküler iyon belirlenmesi çalışmasında MS sinyalleri m/z 100-1400 tarama aralığında, pozitif yönde iyonlaştırılarak MS tarama yapılmıştır.

CGRP için moleküler iyon belirlenmesinde 500-1500 tarama aralığında pozitif yönde iyonlaştırılarak MS tarama modunda çalışılmışır.

Fragmentor voltajı

Kapilerin çıkışına uygulanan voltaj 'fragmentor voltaj' olarak adlandırılmaktadır (http-4). Fragmentor voltajının bulunması SIM modunda gerçekleştirilmiştir. SP için; moleküler iyon (m/z 674.300) ve pozitif polaritede 10-147 V aralığında SIM spektrumu alınarak, en yüksek sinyal şiddetinin elde edildiği 143 V değeri, deneysel çalışma süresince kullanılacak olan fragmentor voltajı olarak belirlenmiştir.

CGRP için, moleküler iyon (m/z 952.200) ve pozitif polaritede 10-300 V aralığında SIM spektrumu alınmıştır. 160 V değeri çalışmada kullanılacak fragmentor voltajı olarak belirlenmiştir.

Fragman iyon ve parçalama enerjisi

Moleküler iyonun fragmentasyonu sonucu oluşan iyonla 'Fragman iyon' denilmektedir (Hoffmann and Stroobant, 2007). Dörtlü kütle analizörlerinde bir tane parçalama hücresi bulunur. Bu hücre genelde silindirik şekilde dizilmiş altı ya da sekiz adet çubuktan oluşur. İyonlar çubukların ortasındaki boşluktan uçar. Parçalama hücresi herhangi bir iyon ayırımı ya da taraması yapmaz, uygulanan elektriksel enerjiyi inert bir gaz aracılığı ile iyonlara aktarır ve iyonların parçalanmasını sağlar (Şener, 2011; Hoffmann ve Stroobant, 2007).

Peptidin bir ucunda serbest α -amino grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunur. Bu uca N-terminal uç denilmektedir. Diğer ucunda ise serbest α -karboksil grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunur. Bu uç C-terminal uç olarak adlandırılmaktadır. Düşük collision-induced dissociation (CID) şartlarında, peptidler fragmentlerine ayrılırlar. Bu ayrılma genellikle yükün bağlı bulunduğu uçtan migrasyonu ile başlar. Bu terim 'hareketli proton hipotezi' olarak adlandırılmakta ve peptid fragmentasyon mekanizmasının temelini teşkil etmektedir. Ancak peptidi oluşturan Arg, Lys, His veya Pro gibi aminoasitlerin konumu ve pozisyonu fragmentasyon prosesini etkilemekte, proton hareketliliğine engel olmaktadır (Schütz ve ark., 2003; Garcia 2005).

Moleküler iyon ve fragmentor voltajı belirlendikten sonra SP için MS sinyalleri 100-1000 tarama aralığında, fragmentor voltajı (143 V), parçalama enerjisi (10, 20, 30 V) değerinde pozitif yönde iyonlaştırılarak fragman iyon taraması yapılmıştır. Parçalama enerjisi 30 V değerinde SP tamamen parçalanmış, fragman iyon elde edilememiştir. Parçalama enerjisinin 20 - 30 V aralığındaki değerleri için tarama yapılmıştır.

CGRP için moleküler iyon (m/z 952.200), tarama aralığı (500-1500), fragmentor voltajı (160 V), parçalama enerjisi (5, 10, 15, 20, 25, 30 V), pozitif polaritede değerlerinde fragman iyon taraması yapılmıştır.

Hızlandırıcı voltaj

Parçalama hücresini oluşturan silindirik altı çubuğun uçları arasında uygulanan voltaj farkı 'Hızlandırıcı voltaj' olarak tanımlanmaktadır (http-4). Hızlandırıcı voltaj belirlemesi için cihaz fragman iyon moduna alınarak, hızlandırıcı voltaj (1, 3, 5 ve 7 V) değerlerinde pozitif yönde iyonlaştırılarak tarama yapılmıştır.

Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi Yönteminin Validasyonu

Doğrusallık

Doğrusallık, geliştirilen yöntemde analit cevabının derişime karşı doğru orantılı olarak değişmesidir. 1 mg/mL derişimde standart SP ve CGRP'nin karışımını içeren çözelti kullanılarak yapılan seyreltmelerle kalibrasyon seti hazırlanmıştır. Seyreltmeler için asetonitril içerisinde hazırlanmış % 0.5 asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. SP ve CGRP karışımının 7 farklı derişimden oluşan (0.585 ng/mL, 5.85 ng/mL, 58.50 ng/mL, 146.18 ng/mL, 292.35 ng/mL, 438.52 ng/mL, 584.70 ng/mL SP derişimleri ve 0.21 ng/mL, 2.1 ng/mL, 21 ng/mL, 51.760 ng/mL, 103.521 ng/mL, 155.28 ng/mL, 207.04 ng/mL CGRP derişimleri) kalibrasyon çözeltisi 3 set halinde hazırlanmıştır. Herbir set için 3 tekrarlı çalışılmıştır.

Belirtilen optimize kromatografik ve kütle spektrometrik koşullarda nöropeptidlerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi ve doğrusallığın değerlendirilmesi amacıyla SP için m/z 674.3 moleküler iyon pikinin Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) sonucu oluşan parçalanma ürünlerinin m/z 600 ve m/z 254.4 EIC pik alanları kullanılmıştır. CGRP için m/z 952.2 moleküler iyon pikinin MRM sonucu oluşan parçalanma ürünü m/z 1214 EIC pik alanları kullanılmıştır.

Doğrusal aralık, yeterli doğruluk ve kesinlikte doğrusallık sağlayan yöntemin alt ve üst sınırları arasında yer alan derişim aralığıdır. SP ve CGRP'nin derişimlerine karşılık gelen pik alanları doğrusal ağırlıklı regresyon (1/x) grafiği çizildikten sonra doğrusal aralık SP için 5.85-438.52 ng/mL ve CGRP için 0.21-155.28 ng/mL olarak belirlenmiştir. Grafik çizimi için GraphPad Prism (Version 6.b) programı kullanılmıştır.

Doğruluk, kesinlik ve tayin sınırı

Analizler sonucu elde edilen değerlerin doğru ve gerçek değere yakınlığının ölçüsü doğruluk olarak tanımlanmaktadır. Aynı yöntemle elde edilen analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı kesinlik olarak tanımlanmaktadır. SP için doğruluk ve kesinliğin belirlenmesi için, 3 farklı derişimde (5.85, 146.18 ve 438.52 ng/mL) hazırlanmış kalite kontrol standart çözeltileri 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır. CGRP için doğruluk ve kesinliğin belirlenmesi için, 3 farklı derişimde (0.21, 51.76 ve 155.28 ng/mL) hazırlanmış kalite kontrol standart çözeltileri 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Belirtilen optimize kromatografik ve kütle spektrometrik şartlarda analizleri gerçekleştirilerek, pik alanlarına göre değerlendirme yapılmıştır.

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyi tayin sınırı olarak tanımlanmaktadır.

Seçicilik

Analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek diğer bileşenlerin yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilebilmesidir. Peptid çözeltilerinin dilüsyonunda kullanılan asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisinin kromatogramları alınarak, SP ve CGRP'ye ait alıkonma zamanında girişim olup olmadığı analiz edilmiştir.

Matriks Etkisi

Analizde istenmeyen analitlerin bulunuşu veya numune içerisindeki girişim yapan diğer bileşenlerden dolayı doğrudan veya dolaylı olarak cihazın vermiş olduğu yanıtın değişmesi matriks etkisi olarak değerlendirilir. Bu amaçla biyolojik numuneye ait kalibrasyon eğrisi ile standart maddenin kalibrasyon eğrisi karşılaştırılır. Matriksin bulunduğu ortamda (beyin ve beyin sapı numunesindeki) peptid için elde edilen pik alanı matriksin bulunmadığı ortamdaki pik alanına oranlanarak matriks faktörü hesaplanır. Matriks faktörünün %BSS (Bağıl Standart Sapma) değeri %15'den büyük olmamalıdır (http-5).

SP ve CGRP için herbir derişime ait doku numunelerinin kalibrasyon eğrisindeki pik alanları standart SP ve CGRP çözeltilerine ait kalibrasyon eğrisindeki pik alanlarına oranlanarak matriks faktörü ve matriks faktörüne ait %RSD değerleri hesaplanmıştır.

Stabilite

Matriks içerisindeki analitin kimyasal stabilitesi özel şartlar altındaki zaman aralıklarında birçok yöntemle değerlendirilmektedir. SP ve CGRP için, beyin ve beyin sapı dokuları, 5.85 ng/mL SP ve 21 ng/mL CGRP çözeltileri ile kısa süreli stabilite (oda sıcaklığı, 12 saat), donma-çözme stabilitesi (3 donma-çözme, -20°C), uzun dönem stabilite (30 gün, -20°C) çalışılmıştır.

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Tayin Koşulları

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Eş Zamanlı Analizi

Standart SP ve CGRP karışım çözeltisiyle yapılan eş zamanlı ayırma ve analizden sonra beyin ve beyin sapı dokusunda standart çözelti çalışma koşullarında SK-KS/KS analizi yapılmıştır.

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Kantitatif Tayini

Kompleks karışımlarda, numunenin içeriğinin bilinmediği, analit dışındaki diğer başka maddelerin de sinyali etkilediği durumlarda standart ekleme metodu olarak bilinen kalibrasyon işlemi kullanılmaktadır. Dokulardaki nöropeptid derişimi standart ekleme metodu kullanılarak belirlenmiştir.

İki tane Wistar sıçandan alınan beyin ve beyin sapı dokuları 6 mL 2 M asetik asit ile homojenize edilmiştir. Doku homojenatı su banyosunda 90°C'de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Microcon YM 10 kDa filtreye alınan homojenat 4°C ve 7160 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Beyin dokusundaki SP ve CGRP nin kantitatif tayinleri standart ekleme yöntemi

ile gerçekleştirilmiştir. Doku süpernatanın üzerine SP ve CGRP'nin karışım çözeltilerinden dört farklı derişimde (5.85 ng/mL, 58.5 ng/mL, 146.18 ng/mL, 438.52 ng/mL SP derişimi ve 2.1 ng/mL, 21 ng/mL, 51.76 ng/mL, 155.28 ng/mL CGRP derişimi) eklenmiştir. Ayrıca doku süpernatanın üzerine asetonitril içerisinde %0.5 asetik asit ilave edilerek kör numune hazırlanmıştır. SK-KS/KS analizi yapılarak, doğrusal ağırlıklı regresyon (1/x) grafiğinde x eksen (derişim) ekstrapole edilerek dokudaki SP ve CGRP derişimleri belirlenmiştir. Beyin dokusunda CGRP derişimi belirlenememiştir.

Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Çalışmaları

Bu bölümde, beyin ve beyin sapı dokularında SP ve CGRP'nin düzeyini belirlemek amacıyla ELISA yöntemiyle yapılan çalışmanın numune hazırlama basamakları hakkında yapılanlar anlatılmaktadır.

Numunelerin hazırlanması

Beyin sapı ve beyin dokuları homojenizatörün haznesine alınarak, 2 mL asetik asit ile homojenize edilmiştir. Doku homojenatları plastik tüplere aktararak 90°C'de 10 dk su banyosunda bekletildikten sonra 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süzüntü SP ve CGRP EIA kit çalışması için 250 µL'lik iki kısım eppendorf viallere aktararak, vakumlu buharlaştırıcı ile 40°C'de çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Kalıntı halinde elde edilen beyin sapı ve beyin dokuları 300 µL EIA tampon çözeltisinde 5 dk vorteksenerek çözülmüştür.

SP Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

SP Enzim Immunoanaliz (EIA) Tampon Çözeltisi

Vial içerisindeki derişik EIA tamponu (10X) 90 mL ultrasaf suda çözülmüştür.

SP Standart Çözeltileri

SP EIA standardı 2 mL EIA tamponu ile seyreltilerek 5 ng/mL derişiminde standart SP çözeltisi hazırlanmıştır. 8 tane eppendorf vial alınarak numaralandırılmıştır. 1. tüpe 900 µL, diğer viallere 500 µL EIA tamponu ilave edilmiştir. 5 ng/mL standart SP çözeltisinden 100 µL alınarak 1. vial aktarılmıştır. Sırasıyla 500 µL çözelti diğer viallere aktararak dilüsyon yapılmıştır.

SP Asetilkolinesteraz (AChE) İzleyici Çözeltisi

Vial içerisindeki SP AChE izleyici 6 mL EIA tampon çözeltisinde çözülmüştür.

SP Antiserum Çözeltisi

Vial içerisindeki SP antiserum 6 mL EIA tampon çözeltisinde çözülmüştür.

Yıkama Tamponu Çözeltisi

5 mL derişik yıkama tamponu (400X) 2 L ultrasaf su ile dilue edilmiş ve 1 mL Polysorbat 20 eklenmiştir.

Ellman's Reaktif

Vial içerisindeki Ellman's reaktifi 20 mL ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Çözeltilisi kararsız olduğu için kullanılmadan kısa bir süre önce hazırlanmıştır.

Reaktif ve numunelerin mikrotitre plağa yerleşim düzeni

SP EIA kiti içerisinde yer alan mikrotitre plak 96 kuyucuktan oluşmaktadır. Analiz sırasında plağı oluşturan striplerin hepsi kullanılmamıştır. Reaktif ve numunelerin plağa yerleşim düzeni **Çizelge 3'**de verilmiştir.

Çizelge 3. P Maddesi için Reaktif ve Numunelerin Mikrotitre Plağa Yerleşim Düzeni

	1	2	3	4	5
A	Blk	S ₁	S ₁	Ö ₁	Ö ₉
B	Blk	S ₂	S ₂	Ö ₂	Ö ₁₀
C	NSB	S ₃	S ₃	Ö ₃	Ö ₁₁
D	NSB	S ₄	S ₄	Ö ₄	Ö ₁₂
E	B ₀	S ₅	S ₅	Ö ₅	Ö ₁₃
F	B ₀	S ₆	S ₆	Ö ₆	Ö ₁₄
G	B ₀	S ₇	S ₇	Ö ₇	Ö ₁₅
H	TA	S ₈	S ₈	Ö ₈	

Blk: (Kör)

NSB: Non-Spesifik Bağlanma

S₁-S₈: Standartlar

Ö₁- Ö₁₅: Örnek

TA: Toplam Aktivite

Reaktiflerin ve numunelerin mikrotitre plağa pipetlenmesi

Reaktif ve doku numunesi çözeltileri hazırlandıktan sonra **Çizelge 4'**de verilen hacimlerde (µL) mikrotitre plağa pipetlenmiştir.

Çizelge 4. P Maddesi İçin Reaktif ve Numunelerin Pipetlenme Hacimleri

Kuyucuk	EIA Tamponu	Standart/Numune	İzleyici	Antikor
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	-	-
NSB	100 µL	-	50 µL	-
B ₀	50 µL	-	50 µL	50 µL
Standart/Numune	-	50 µL	50 µL	50 µL

Plağın inkübasyonu

Plak, plastik film ile kaplanmış ve 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir.

İnkübasyon sonrası

Plak boşaltılarak, 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Ellman's reaktifi her bir kuyucuğa 200 µL eklenmiştir. Plaka, plastik film ile kaplanmış, karanlıkta orbital çalkalayıcıda 90 dk bekletilmiştir.

Absorbans okunması

ELISA cihazında kuyucukların absorbansı 410 nm'de okunmuştur.

CGRP Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Enzim Immunoanaliz (EIA) Çözeltisi

Vial içerisindeki EIA tamponu 90 mL ultrasaf suda çözölmüştür.

CGRP Standart Çözeltileri

CGRP standartı 1 mL EIA tamponu ile sulandırılmıştır. Tamamen çözölmesi için 5 dk beklenmiştir. Hazırlanan bu standartın derişimi 500 pg/mL' dir (S₁). 7 tane eppendorf vial hazırlanmış ve her birine 500 µL EIA tamponu eklenmiştir. S₁' den 500 µL çözelti S₂ tüpüne aktarılmıştır. Sırasıyla 500 µL çözelti aktarılarak dilüsyon yapılmıştır.

Anti-CGRP Asetilkolinesteraz (AChE) İzleyici Çözeltisi

Vial içerisindeki Anti-CGRP AChE izleyici 10 mL EIA tamponu ile sulandırılmıştır. Tamamen çözünene kadar 5 dk beklenmiş ve daha sonra vortekslenmiştir.

Yıkama Tamponu Çözeltisi

1 mL derişik yıkama tamponu 400 mL ultrasaf su ile seyreltilmiş, 200 µL Tween 20 eklenmiş ve manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır.

Ellman's Reaktifi

Vial içerisindeki Ellman's reaktifi kullanılmadan 5 dk önce, 49 mL ultra saf su ve 1 mL derişik yıkama tamponu ile çözelti haline getirilmiştir.

Reaktif ve numunelerin mikrotitre plağa yerleşim düzeni

CGRP EIA kiti içerisinde yer alan mikrotitre plak 96 kuyucuktan oluşmaktadır. Plak kullanılmadan önce her bir kuyucuk 300 µL yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Analiz sırasında plağı oluşturan striplerin hepsi kullanılmamıştır. Reaktif ve numunelerin plağa yerleşim düzeni **Çizelge 5'**de verilmiştir.

Çizelge 5. Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Reaktif ve Numunelerin Mikrotitre Plağa Yerleşim Düzeni

	1	2	3	4	5
A	Blk	S ₁	S ₅	Ö ₁	Ö ₉
B	Blk	S ₁	S ₅	Ö ₂	Ö ₁₀
C	Blk	S ₂	S ₆	Ö ₃	Ö ₁₁
D	Blk	S ₂	S ₆	Ö ₄	Ö ₁₂
E	NSB	S ₃	S ₇	Ö ₅	Ö ₁₃
F	NSB	S ₃	S ₇	Ö ₆	Ö ₁₄
G	NSB	S ₄	S ₈	Ö ₇	Ö ₁₅
H	NSB	S ₄	S ₈	Ö ₈	

Blk: Blank (Kör)

Ö₁- Ö₁₅: Örnek

NSB: Non-Spesifik Bağlanma

S₁-S₈: Standartlar

Reaktiflerin ve numunelerin mikrotitre plağa pipetlenmesi

Reaktif ve doku numunesi çözeltileri hazırlandıktan sonra **Çizelge 6**'da verilen hacimlerde (µL) mikrotitre plağa pipetlenmiştir.

Çizelge 6. Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Reaktif ve Numunelerin Pipetlenme Hacimleri

Kuyucuk	Kör	Non Spesifik Bağlanma	Standart	Numune
Tampon	-	100 µL	-	-
Standart	-	-	100 µL	-
Numune	-	-	-	100 µL
İzleyici	-	100 µL	100 µL	100 µL

Plağın inkübasyonu

Plak, plastik film ile kaplanmış ve 4°C' de gece boyunca bekletilmiştir.

İnkübasyon sonrası

Plaka boşaltılarak, 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Ellman's reaktifi 20 mL ultrasaf su içerisinde çözünerek, her bir kuyucuğa 200 µL eklenmiştir. Plaka, plastik film ile kaplanmış, karanlıkta orbital çalkalayıcıda 30 dk bekletilmiştir.

Absorbans okunması

ELISA cihazında kuyucukların absorbansı 410 nm'de okunmuştur.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sıvı Kromatografisi İyon Tuzağı Kütle Spektrometrisi Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (SK-KS) temeline dayalı teknikler, peptidlerin biyolojik numunelerdeki kalitatif ve kantitatif analizlerine önemli katkılar sağlamaktadır. SP'nin SK-KS analiziyle ilgili deneysel çalışmalar Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezinde (BİBAM) bulunan Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-İyon Tuzağı Kütle Spektrometresi (SK-ESI-IT-KS) ile yapılmıştır. Bu amaca yönelik SP'nin iyonlaşması, kromatografik ve kütle spektrometrik şartların belirlenmesi, SP için kütle spektrumunun elde edilmesi ve fragmentlerine ayrılması koşulları araştırılmıştır. SK-ESI-IT-KS ile yapılan çalışmalar Sıvı Kromatografisi- Tandem Kütle Spektrometri (SK-KS/KS) çalışmalarında kromatografik ve kütle spektrometri koşullarının oluşturulması açısından kolaylık sağlamıştır.

SP'nin SK-KS analizine yönelik yapılan ilk deneysel çalışmalarda Beaudry ve ark., (2009) yapmış olduğu çalışma temel alınmıştır. SP'nin stok çözeltisini hazırlamak için, 1 mg SP tartımı alınarak 1 mL % 0.1 TFA (h/h) çözeltisinde çözünmüştür. Bu çözeltiden 1/10 seyreltme yapılarak % 0.25 TFA-su çözeltisi (h/h) içerisinde SK-KS deneysel çalışmasında kullanılmak üzere 74.2 ng/mL SP çözeltisi hazırlanmıştır. SK-ESI-IT-KS çalışmalarında, 25°C'de, 10 µL numunenin kolona enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemlerinde C₈ (150x2.1 mm, 3.5 µm) Zorbax narrow-bore kolon kullanılmıştır.

SK-KS sinyallerinin belirlenmesi çalışmalarında ikili gradient hareketli faz sistemi kullanılmıştır. A hareketli fazı % 0.2 (h/h) formik asit içeren saf su, B hareketli fazı ise % 0.2 (h/h) formik asit içeren asetonitril (ACN) olarak hazırlanmış, 0.45 µm PTFE (Politetrafloroetilen) filtrede süzölmüş ve ultrasonik banyoda 30 dakika bekletilerek çözünmüş gazlardan arındırılmıştır. Gradyent koşullarına bağlı olarak SP'nin alıkonma zamanı değişmektedir. Uygulanan gradyent elüsyon programı şöyledir: B hareketli fazı, başlangıçta (0 dakika) % 20, 12-15 dakika % 50, 15.50-19 dakika %20 olmaktadır. SP'nin Ayrılmış İyon Kromatogramı (EIC) ve m/z (kütle/yük) spektrumu belirtilen kromatografik koşullarda elde edilmiştir. SP' nin (+2) iyonlaşmaya ait m/z değerlerine ait sinyaller 600.3, 543.8 ve 674.3 olarak gözlenmiştir. Bu değerlerin içerisinde sinyal şiddeti en yüksek olan m/z 600.3 değeridir. Bu değer MS parçalanması yapılmaya çalışılmış fakat stabil bir fragment bulunamamıştır.

Standart çözelti ile yapılan SK-ESI-IT-KS çalışmasında moleküler iyon piki (m/z 600.3) belirlendikten sonra, doku numunelerinde SP'in (+2) iyonlaşmasına ait moleküler iyon pikinin görülmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çeşitli beyin dokularında (beyin, beyin sapı, trigeminal ganglion) SP'yi ekstre etmek için TFA ekstraksiyonu (Beaudry ve ark., 2009; Beaudry, 2010) yapılmış, doku matriksinin temizlenmesi için TFA ekstraksiyonun ardından katı faz ekstraksiyon (SPE) (Babu ve ark., 2003) uygulanması uygun görülmüştür. Kaynaklarda yaygın olarak kullanıldığı görülen asetik asit ekstraksiyonu, (Erin ve Ulusoy, 2009; Babu ve ark., 2003) SP EIA Kit prosedüründen yararlanılarak beyin dokusundan SP'yi

ekstre etmek için deney planları oluşturularak uygulanmıştır. Ancak dokuların SK-KS analizinde SP'ye ait m/z değerinde pik gözlenememiştir.

Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimizasyonu

SK-KS yöntemi kullanılarak moleküler iyonun kütle parçalanmasının yapılamaması ve dokuda moleküler iyon pikinin görülememesi nedeniyle bu cihaz ile yapılan çalışmalara son verilmiştir. Ancak Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometre (SK-KS/KS) yöntemi ile dokularda moleküler iyon pikinin görülebilmesi, bu iyonun parçalanmasıyla oluşan fragman iyonların kantitatif analizinde çok daha düşük derişim düzeylerinde tayin yapma imkanının sağlanabilmesi ve nöropeptid çalışmalarında seçici ve duyarlı yöntem geliştirmeyi sağlaması bakımından SK-KS/KS ile çalışması planlanmıştır. SP ve CGRP'nin standart çözelti, beyin ve beyin sapı dokusundaki belirleme ve saptama çalışmaları ile ilgili deneysel sürece SK-KS/KS cihazı ile devam edilmiştir.

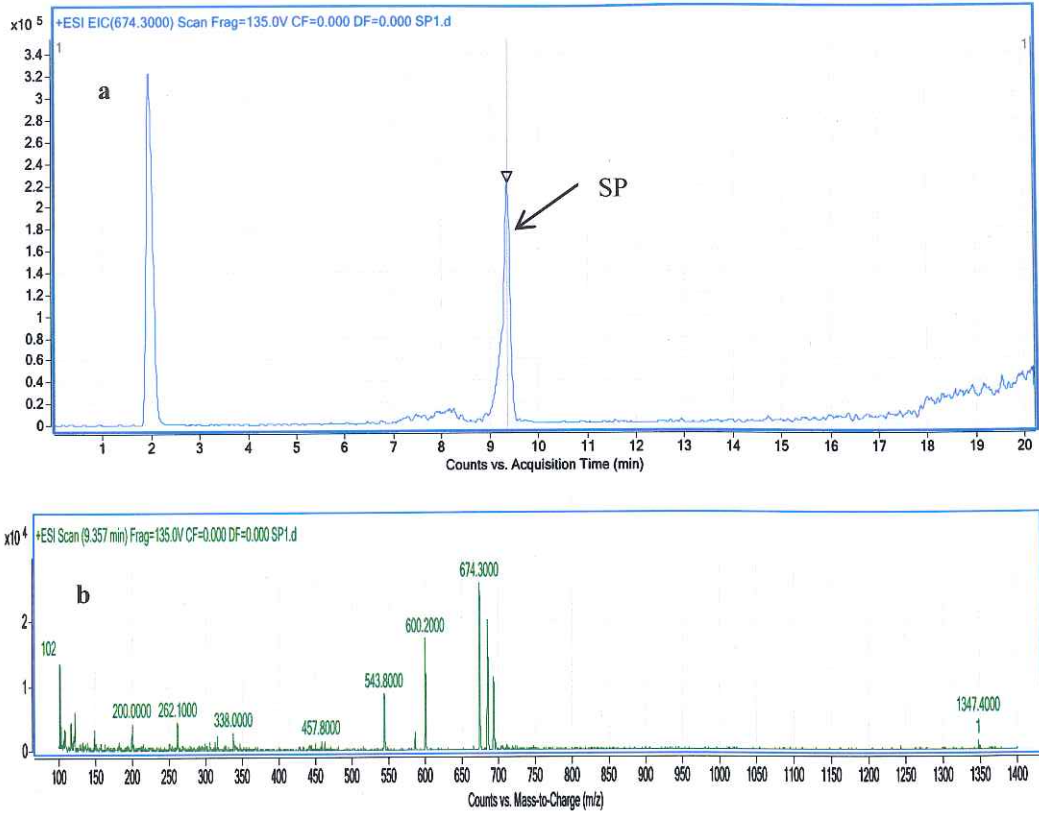
SK-KS çalışmalarında kullanılan ayırma kolonu, standart SP çözeltisi, hareketli faz sistemleri SK-KS/KS'de aynı şekilde kullanılmaya devam edilmiştir. Gradyent elüsyon programında zaman aralıkları ve B hareketli fazının yüzdesi değiştirilerek SP'nin SK-KS/KS analizi için umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Kullanılan gradyent elüsyon programı **Çizelge 7**'de verilmektedir. Aynı gradyent elüsyon programı CGRP'nin analizinde kullanılmıştır.

Çizelge 7. SK-KS/KS Gradyent Elüsyon Programı

Zaman (dk)	A Hareketli Fazı (%)	B Hareketli Fazı (%)
0	90	10
15	55	45
20	40	60
20.01	90	10

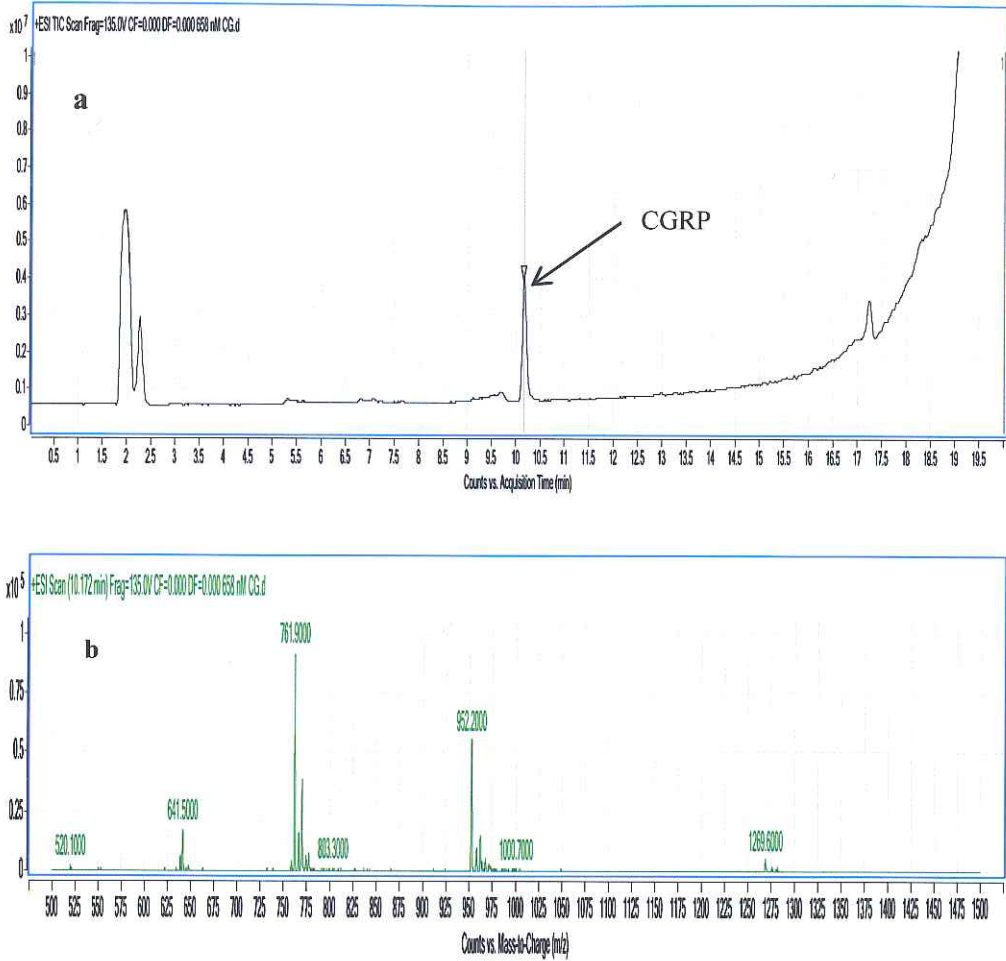
Moleküler iyon

SP'nin moleküler iyonun belirlenmesi için mol kütlelerinin +2 iyonlaşmasını kapsayacak şekilde 100-1400 aralığında kütle taraması yapılmıştır. SP'nin (+2) iyonlaşmasına ait 9.3 dk beliren pikin m/z değeri 674.300 (moleküler iyon) olarak gözlenmiştir. Bu m/z değeri makalelerde SP'ye ait verilen moleküler iyon değeri ile aynıdır. (Beaudry ve Vachon 2006; Beaudry ve ark., 2009). SP' nin Ayrılmış İyon Kromatogramı (EIC) ve moleküler iyonu içeren kütle/yük spektrumu **Şekil 11**'de gösterilmektedir.



Şekil 11. (a) SP'nin m/z 674.300 Değerinde Pozitif İyonlaştırma Ayrılmış İyon Kromatogramı (EIC) ve (b) kütle/yük (m/z) spektrumu

CGRP'nin moleküler iyon pikinin belirlenmesi çalışmasında mol kütesinin iyonlaşma aralığını kapsayacak şekilde 100-1400 aralığında tarama yapılmıştır. CGRP'ye ait literatürde belirtilen (Beaudry ve ark., 2009, Ferland ve ark., 2011) (+3) iyonlaşmasına ait m/z 1269.600, (+4) iyonlaşmasına ait m/z 952.200 ve (+5) iyonlaşmasına ait m/z 761.900 pikleri gözlenmiştir. Sinyal şiddeti yüksek olan m/z 761.900 ve m/z 952.200 değerleri moleküler iyon piki olarak belirlenmiştir. Ancak kalibrasyon işlemleri ve doku analizinde m/z 761.900 moleküler iyonundan elde edilen sinyallerin düşük olması nedeniyle analizlerde 10.1 dk alıkonma zamanında m/z 952.200 değeri moleküler iyon piki kullanılmıştır. **Şekil 12'**de CGRP'nin Toplam İyon Kromatogramı (TIC) ve kütle/yük (m/z) spektrumu gösterilmiştir.



Şekil 12. CGRP'nin (a) Toplam İyon Kromatogramı (TIC) ve (b) kütle/yük(m/z) spektrumu

Fragmentor voltajı

Fragmentor voltajının bulunması Seçici İyon İzleme (SIM) modunda gerçekleştirilmiştir. SP'nin moleküler iyonu (m/z 674.3)'de yapılan SIM taramada en yüksek sinyal şiddetinin elde edildiği 143 V değeri, deneysel çalışmalarda kullanılacak fragmentor voltajı olarak belirlenmiştir.

CGRP'nin moleküler iyon (m/z 952.200) değerinde yapılan SIM taramada, en yüksek sinyal şiddetini veren 160 V değeri çalışmada kullanılacak fragmentor voltajı olarak belirlenmiştir.

Fragman iyon ve parçalama enerjisi

Kullanılan SK-KS/KS cihazının parçalanma enerjisi 0-400 V aralığındadır. SP ve CGRP nöropeptidleri düşük parçalanma enerjisi değerlerinde fragmentlerine ayrılabilmiştir.

SP için moleküler iyonun (m/z 674.3) belirlenmesinin ardından parçalama enerjisiyle fragman iyonlar elde edilmeye çalışılmıştır. Kararlı fragman iyonlar elde etmek için parçalama enerjisinin değeri değiştirilerek kararlı kütle sinyalleri elde edilmeye çalışılmıştır. Parçalama enerjisinin 20 - 30 V aralığındaki değerleri için tarama yapılarak fragman iyonlar olan m/z 600 ve m/z 254.4'e ait S/N pik alanları okunmuştur. SP için parçalama enerjisi 24 V olarak belirlenmiştir.

CGRP için moleküler iyon (m/z 952.200) parçalama enerjisi 25 V değerinde m/z 1214'de fragman iyon sinyalleri elde edilmiştir. Kullanılan SK-KS/KS cihazının parçalanma enerjisi 0-400 V aralığındadır. SP ve CGRP nöropeptidleri düşük parçalanma enerjisi değerlerinde fragmentlerine ayrılabilmiştir. SP ve CGRP için belirlenen fragman iyonlar literatürde belirtilen moleküler iyonun parçalama enerjisiyle elde edilen fragman iyon değerleri ile aynıdır (Beaudry ve Vachon, 2006; Beaudry ve ark., 2009; Ferland ve ark., 2011).

Hızlandırıcı voltaj

SP ve CGRP için çalışmalarımızda kullanacağımız hızlandırıcı voltaj değeri sırasıyla 3V ve 5V olarak belirlenmiştir. **Çizelge 8'**de SP ve CGRP'nin SK-KS/KS için belirlenen optimizasyon parametreleri verilmektedir.

Çizelge 8. P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometri Optimizasyon Parametreleri

Sıvı Kromatografisi	Optimizasyon Parametreleri	SP	CGRP	Agilent 6460 QQQ optimizasyon parametreleri aralıkları
Tandem Kütle Spektrometresi Yönteminin	Moleküler İyon (m/z)	674.3	952.200	2-3000
	Fragman İyon (m/z)	600, 254.4	1214	-
	Fragmentor Voltajı (V)	143	160	0-400
	Çarpışma Enerjisi (V)	24	25	0-250
	Hızlandırıcı Voltaj (V)	3	5	1-7

Validasyonu

Nöropeptidlerin SK-KS/KS'de optimizasyonu tamamlandıktan sonra, SP ve CGRP'nin eş zamanlı analizi için geliştirilen yöntemin geçerli kılınması amacıyla SP ve CGRP'nin karışım çözeltisi hazırlanarak EMEA 2011 biyoanalitik validasyon rehberine uygun olacak şekilde geliştirilen yöntem için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, tayin sınırı, seçicilik, matris etkisi ve stabilite gibi validasyon parametreleri uygulanarak değerlendirilmesi yapılmıştır (http-5).

Doğrusallık

SP ve CGRP'nin doğrusalılık çalışmaları için; 1 mg/mL standart SP ve 1 mg/mL standart CGRP'nin karışım çözeltisi kullanılarak kalibrasyon seti hazırlanmıştır. Seyreltmeler için asetonitril içerisinde hazırlanmış % 0.5 asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. SP ve CGRP karışımının 7 farklı derişimden oluşan (SP için 0.585 ng/mL, 5.85 ng/mL, 58.5 ng/mL, 146.18 ng/mL, 292.350 ng/mL, 438.52 ng/mL, 584.7 ng/ ve CGRP için 0.21 ng/mL, 2.1 ng/mL, 21 ng/mL, 51.760 ng/mL, 103.521 ng/mL, 155.28 ng/mL, 207.04 ng/mL) kalibrasyon çözeltisi 3 set halinde hazırlanmıştır. Her bir set 3 kez tekrar edilerek çalışılmıştır.

Kalibrasyon çalışmasında **Çizelge 8'**de gösterilen SK-KS/KS optimizasyon parametreleri kullanılarak MRM (Çoklu Reaksiyon İzleme) modunda çalışılmıştır. Nöropeptidler için geliştirilen yöntemin doğrusalığının incelenmesi

çalışmalarında, SP ve CGRP için belirlenen fragman iyon pik alanları kullanılmıştır. SP için m/z 600 ve m/z 254.4 EIC pik alanı kullanılmıştır. CGRP için m/z 1214 EIC pik alanı kullanılmıştır.

SP ve CGRP'nin derişime karşılık pik alanı doğrusal ağırlıklı regresyon (1/x) grafiği çizildikten sonra SP için doğrusal aralık 5.85-438.52 ng/mL ve CGRP için: 0.21-155.28 ng/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için GraphPad Prism Version 6.0 programı kullanılmıştır.

Nöropeptidlerin gün içi ve günler arası olarak doğrusallığı incelenmiş ve doğrusal ağırlıklı regresyon (1/x) analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 olasılık düzeyindeki güven sınırları hesaplanmıştır. **Çizelge 9**'da SP ve CGRP'nin gün içi ve günler arası doğrusallığı için yapılan istatistiksel analiz sonuçları sunulmaktadır.

Çizelge 9. P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Doğrusallık Analizi

	SP				CGRP			
	1.gün n=5	2.gün n=5	3.gün n=5	Günler Arası n=15	1.gün n=6	2.gün n=6	3.gün n=6	Günler Arası n=18
Eğim	2.089	2.271	2.289	2.219	23.25	24.07	23.56	23.50
Kesim	-5.360	1.650	-3.595	2.445	2.595	11.75	19.67	13.30
r	0.9966	0.9927	0.9980	0.9967	0.9922	0.9903	0.9923	0.9940
Eğim GA _{%95}	2.016	2.154	2.224	2.143	22.16	22.76	22.42	22.54
Kesim GA _{%95}	11.09	9.518	8.940	9.513	30.18	35.07	13.63	15.69

SP için korelasyon katsayısı 0.9927-0.9980 aralığında değişmektedir. CGRP için; CGRP için; 0.9903-0.9940 aralığında değişmektedir. Korelasyon katsayısı değerleri kaynaklarda bulunan değerler ile uyumludur (Beaudry ve Vachon, 2006; Beaudry ve ark., 2009; Ferland ve ark., 2011).

Doğruluk, kesinlik ve tayin sınırı

SP için doğruluk ve kesinlik, 3 farklı derişimde (5.85, 146.18 ve 438.52 ng/mL) hazırlanmış kalite kontrol standart çözeltileri 3 set ve 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. CGRP için doğruluk ve kesinlik, 3 farklı derişimde (0.21, 21 ve 155.28 ng/mL) hazırlanmış kalite kontrol standart çözeltileri 3 set halinde ve 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. **Çizelge 10**'da SP ve CGRP'nin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları sunulmaktadır.

Çizelge 10. P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptidin Doğruluk ve Kesinlik Parametreleri

	Gün içi				Günler arası		
	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	%Geri Kazanım	%BSS	Bulunan (ng/mL)	%Geri Kazanım	%BSS
SP	5.85	6.32	113.6	7.31	5.83	99.77	14.91
	146.18	145.5	99.54	3.59	143.73	98.32	8.96
	438.52	444.20	101.30	4.84	446.81	101.09	6.09
CGRP	0.21	0.25	119.53	5.7363	0.181	87.597	10.3
	21	24.65	119.07	3.4296	24.75	119.56	3.95
	155.28	150.79	97.106	5.3479	151.55	97.597	5.89

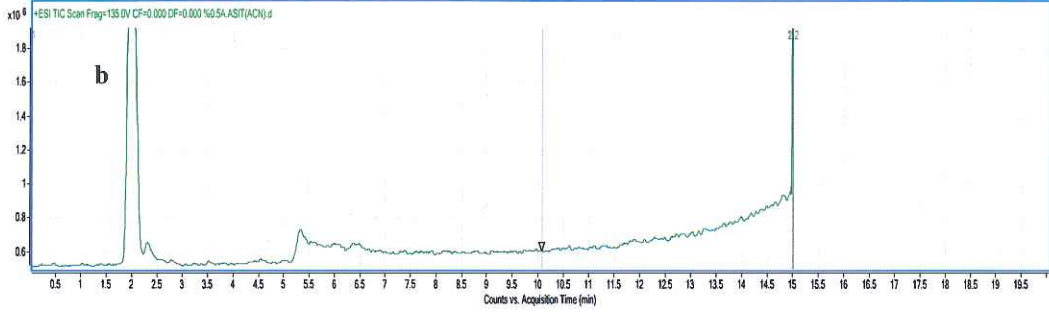
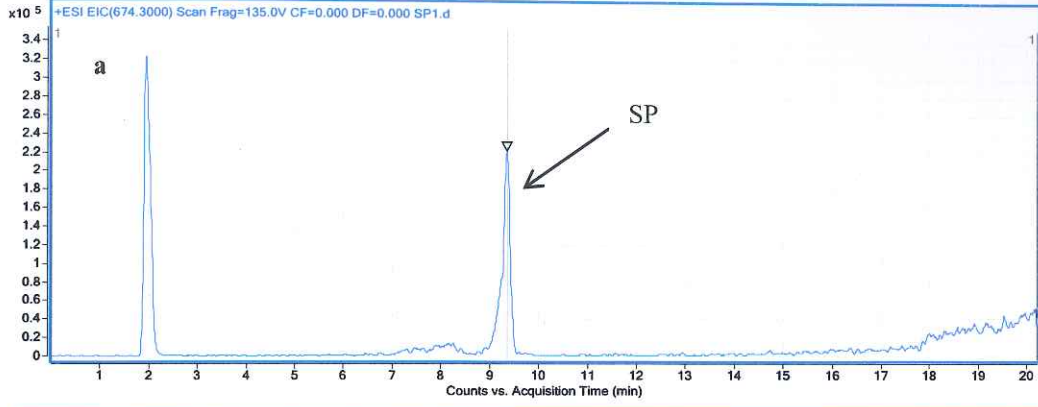
BSS: Bağlı Standart Sapma

SP için, gün içi kesinlik %8'den az ve geri kazanım %99'dan fazla, günler arası kesinlik %15'den az ve geri kazanım %98'den fazla olarak hesaplanmıştır. Doğruluk ve kesinlik değerleri biyoanalitik validasyon rehberindeki bildirilen değerler ile uyumludur (http-5). Yöntemin tayin sınırı SP için 5.85 ng/mL olarak belirlenmiştir.

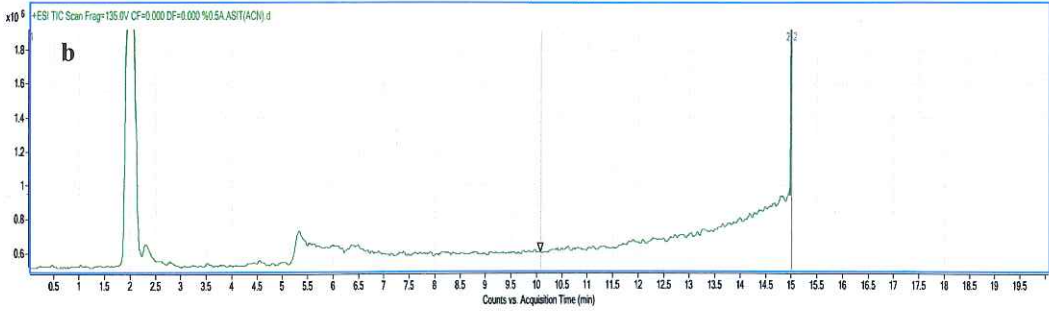
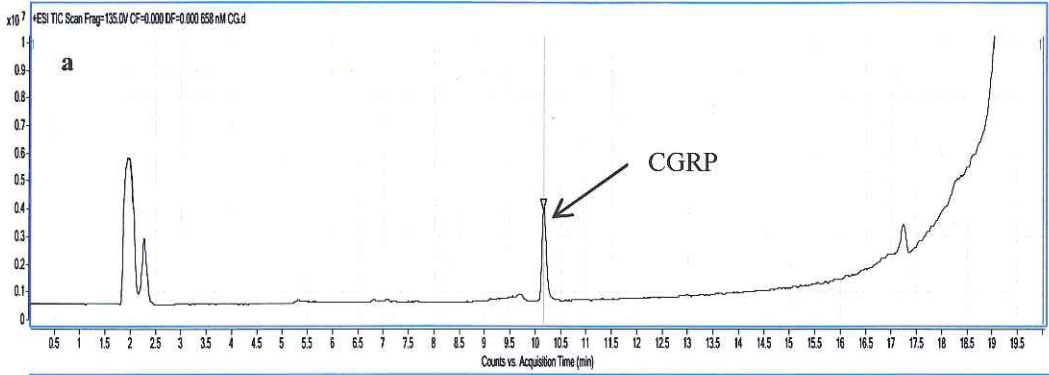
CGRP için; gün içi kesinlik %6'nın altında ve geri kazanım %97'nin üzerinde, günler arası kesinlik %11'in altında ve geri kazanım %87'nin üzerinde bulunmuştur. Doğruluk ve kesinlik değerleri EMEA tarafından yayınlanan biyoanalitik validasyon rehberindeki sınır değerlerle uyumludur (http-5). Yöntemin tayin sınırı CGRP için 0.21 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Seçicilik

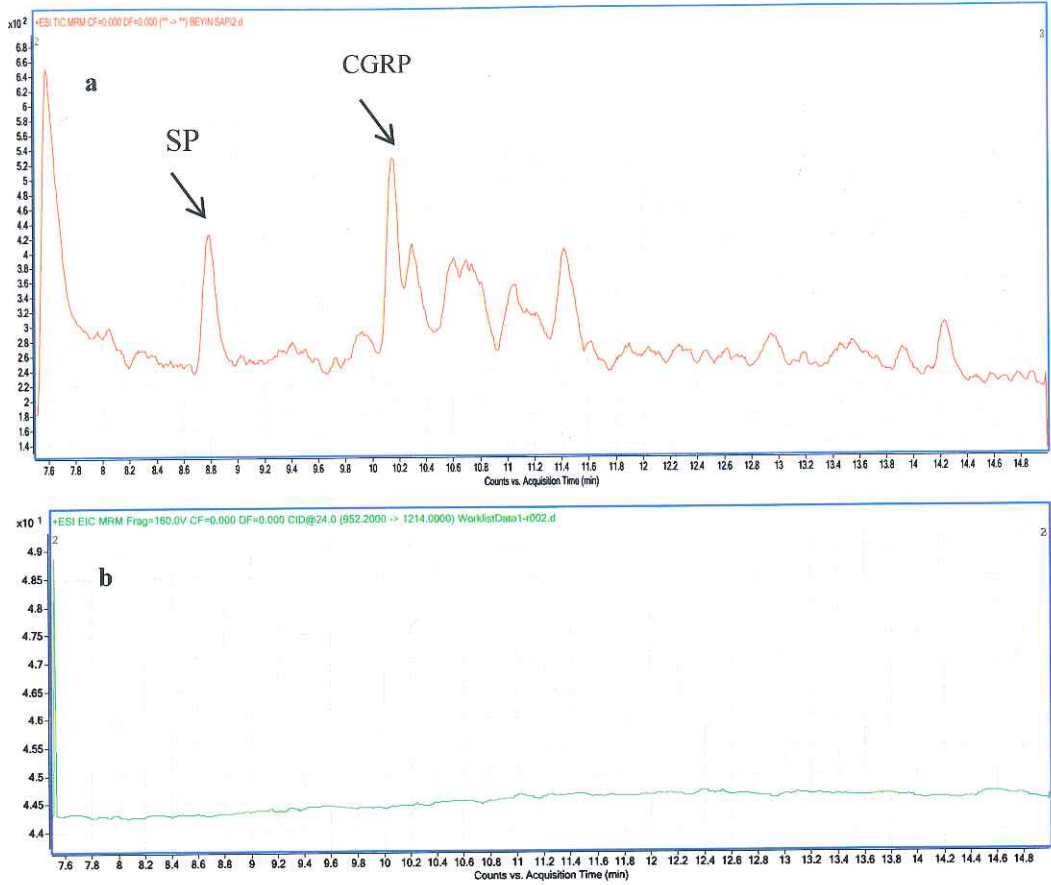
Peptid çözeltilerini seyreltmek için kullanılan asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisinin kromatogramları alınarak, SP ve CGRP'ye ait alıkonma zamanında girişim olup olmadığı analiz edilmiştir. Kör çözeltide girişime rastlanmamıştır. Dokunun homojenizasyonunda kullanılan 2 M asetik asit çözeltisinin kromatogramı alınmıştır. SP ve CGRP'ye ait alıkonma zamanlarında girişime rastlanmamıştır. Yöntemin SP ve CGRP için seçici olduğu söylenebilir. **Şekil 13'**de SP ve asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait EIC kromatogramı görülmektedir. **Şekil 14'**de CGRP ve asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait TIC kromatogramı görülmektedir. **Şekil 15'**de beyin sapı dokusu ve 2 M asetik asit çözeltisinin kromatogramları görülmektedir.



Şekil 13. (a) P Maddesi ve (b) Asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait Toplam İyon Kromatogramı



Şekil 14. (a) Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid ve (b) Asetonitril içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisine ait Toplam İyon Kromatogramı



Şekil 15. (a) Beyin sapı dokusu (b) 2 M asetik asit çözeltisinin TIC kromatogramı

Matriks Etkisi

Matriks etkisinin belirlenmesi için; biyolojik numuneye ait kalibrasyon eğrisi ile standart maddenin kalibrasyon eğrisi karşılaştırılmıştır. Matriksin bulunduğu pik alanı matriksin bulunmadığı pik alanına oranlanarak matriks faktörü hesaplanmıştır. Matriks faktörünün %BSS (Bağıl Standart Sapma) değeri %15'den büyük olmaması gerekmektedir (http-5).

SP ve CGRP için her bir derişime ait doku numunelerinin kalibrasyon eğrisindeki pik alanları, standart SP ve CGRP çözeltilerine ait kalibrasyon eğrisindeki pik alanlarına oranlanarak matriks faktörü ve matriks faktörüne ait %BSS değerleri hesaplanmıştır. Sadece SP'ye ait 5.85 ng/mL derişimde %BSS değeri %15'den büyük bulunmuştur. Bu derişim değeri için matriks etkisi gözlenmiştir. Diğer derişim değerleri validasyon rehberinin bildirdiği değerler ile uyumludur. **Çizelge 11**'de SP ve CGRP için Matriks Faktörü ve %BSS değerleri sunmaktadır.

Çizelge 11. SP ve CGRP İçin Matris Faktörü ve %BSS Değerleri

	Derişim (ng/mL)	Matris Faktörü	%BSS
SP	5.85	2.911	21
	58.50	0.411	12
	146.18	3.126	10.7
	438.50	2.545	6.6
CGRP	2.10	2.014	5.71
	21.10	0.334	2.52
	51.76	2.319	10.05
	155.28	0.157	1.87

Stabilite

SP ve CGRP için, beyin, beyin sapı, 58.5 ng/mL SP ve 2.1 ng/mL CGRP çözeltilerinde kısa süreli stabilite (oda sıcaklığı, 12 saat), donma-çözme stabilitesi (3 donma-çözme, -20°C), uzun dönem stabilite (30 gün, -20°C) çalışılmıştır. Başlangıçta elde edilen pik alanları ile her bir stabilite testi sonunda elde edilen değerler oranlanmıştır. **Çizelge 12**'de doku numunesi ve standart çözeltilerin stabilite testlerine ait geri kazanım değerleri yer almaktadır.

Peptid ve proteinlerde aminoasit kalıntılarındaki oksidasyon, redüksiyon, hidroliz, deaminasyon gibi modifikasyonlar kimyasal olarak kararsız olmalarına neden olmaktadır (Sewald ve Jakubke, 2002). Çalışmamızda stabilite problemini en aza indirmek için, stok çözeltiler küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklanmış, her seferinde taze olarak hazırlanmıştır. Dokular diseksiyon yapıldıktan sonra hemen homojenize edilerek cihazda analizleri yapılmıştır.

Çizelge 12. Doku Numunesi ve Standart Çözeltilerin Stabilite Testlerindeki %Geri Kazanım

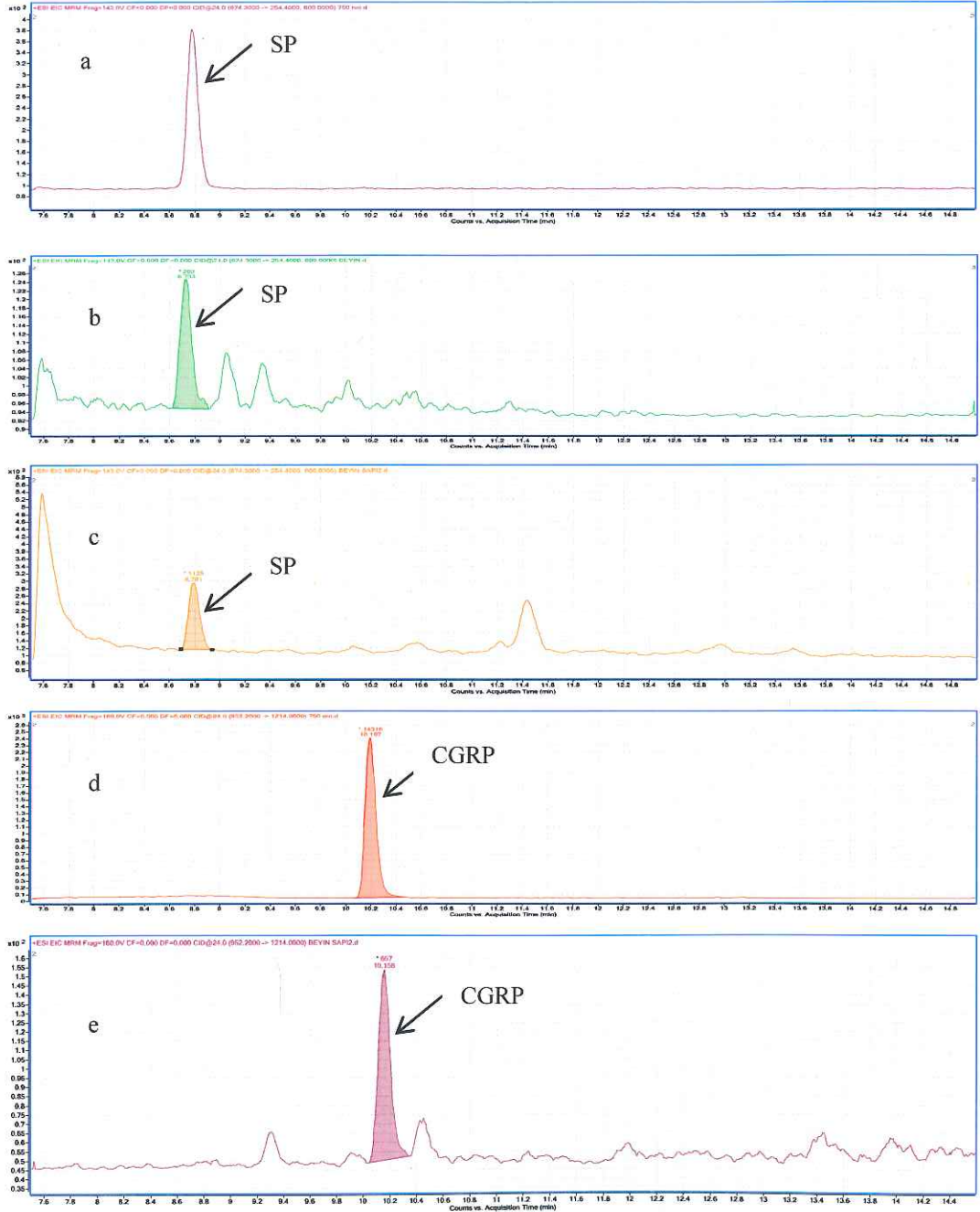
Doku numunesi ve standart çözeltiler	Oda sıcaklığı %Geri kazanım	Donma-çözme %Geri kazanım	Uzun dönem %Geri kazanım
Beyin (SP)	72.3	88.5	37.5
Beyin (CGRP)	98.1	170.2	-
Beyin sapı (SP)	83.7	79.5	18.1
Beyin sapı (CGRP)	129.9	136.7	8.6
58.5 ng/mL SP	116.7	87.5	-
2.1 ng/mL CGRP	158.6	-	-

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi Sonuçları

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Eş Zamanlı Analizi

Standart SP ve CGRP karışım çözeltisiyle yapılan eş zamanlı ayırma ve analizden sonra beyin ve beyin sapı dokusunda standart çözelti çalışma koşullarında SK-KS/KS analizi yapılmıştır.

Beyin ve beyin sapı dokusunda elde edilen SP ve CGRP'ye ait kütle sinyalleri SP ve CGRP'nin standart karışım çözeltisiyle aynı alıkonma zamanlarında gözlenmiştir. **Şekil 16**'da beyin dokusunda SP'ye ait MRM kromatogramı, beyin sapı dokusunda SP ve CGRP'ye ait MRM kromatogramı ve SP ve CGRP karışım çözeltisine ait EIC kromatogramları verilmektedir. SP için alıkonma zamanı 8.7 dk, CGRP için 10.1 dk gözlenmiştir.



Şekil 16. a) Standart SP b) Beyin dokusunda SP c) Beyin sapında SP d) Standart CGRP e) Beyin sapında CGRP EIC MRM kromatogramları

Beyin Dokusunda Nöropeptidlerin Kantitatif Tayini

Numune hazırlama nöropeptidomik analizlerde dikkat edilmesi gereken önemli konulardan birisidir. Numune hazırlığı sırasında peptidazlar serbest bırakılmaktadır. Nöropeptidler hızlıca bozulabilmekte, bu nedenle derişim düzeyi daha da azalmaktadır (Parkin ve ark., 2005). Biyoaktif peptidlerin çoğu önemli proteinler ile karşılaştırıldığında çok düşük düzeylerde bulunmaktadır. Herbir numune hazırlama basamağında peptid derişiminin azalması, son derişimin saptama sınırının altında kalmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ekstraksiyon prosedürleri mümkün olduğunca basit şekilde hazırlanmalıdır (Dijck ve ark., 2011).

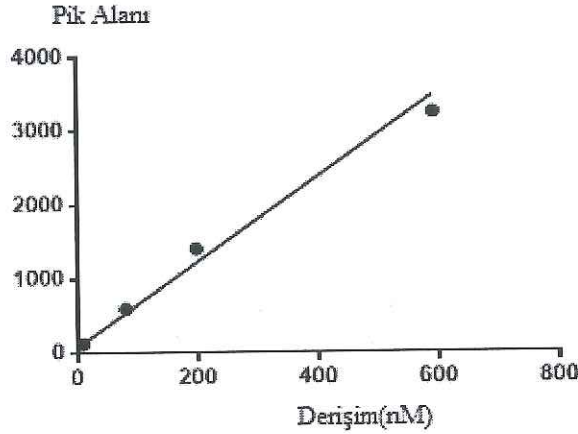
Deney hayvanının ölümü ve doku diseksiyonundan sonra proteazlar hızlıca büyük proteinleri daha küçük fragmentlere parçalamaktadır. Bu protein fragmentleri nöropeptid sinyallerini baskılamakta ve kütle spektrumlarının yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Sturms ve ark., 2010).

Doku numunesinin SK-KS/KS analizi için kaynaklarda verilen doku hazırlama prosedürleri denenmiş ancak SP ve CGRP'ye ait istenilen kütle sinyalleri gözlenememiştir. ELISA kit çalışmasında kullanılan doku prosedürü uygulandığında ise SP ve CGRP'ye ait kütle sinyalleri gözlenmiştir. Kit içerisinde yer alan doku prosedürünün fazla işlem basamağı içermeyen basit bir prosedür ile uygulanması yukarıda söz edilen kaynaklarda belirtilen numune hazırlama ile ilgili bilgileri destekler niteliktedir. Numune hazırlama işlemleri içerisinde yer alan süpernatanın filtreden geçirilmesi basamağında kaynaklarda genellikle Microcon YM 10 membran filtreler kullanıldığı bildirilmektedir (Beaudry ve ark.(2009); Beaudry ve Vachon (2006); Ferland ve ark. (2011); Erin ve ark. (2012), Pailleux ve ark. (2012; Erin ve Ulusoy (2009)). PTFE (Politetrafloroetilen) membranlı filtre kullanılarak, beyin ve beyin sapında SP ve CGRP'ye ait sinyaller gözlenmiştir. Bu filtrelerin Microcon YM 10 filtrele göre maliyeti oldukça ucuz ve kullanımı oldukça kolaydır. Çalışmamızda yalnızca dokuda nöropeptidlerin miktar tayininde Microcon YM 10 filtreler kullanılmıştır. Çünkü peptidlerin filtrede absorblanmaları onların kantitatif tayinlerini zorlaştırmaktadır.

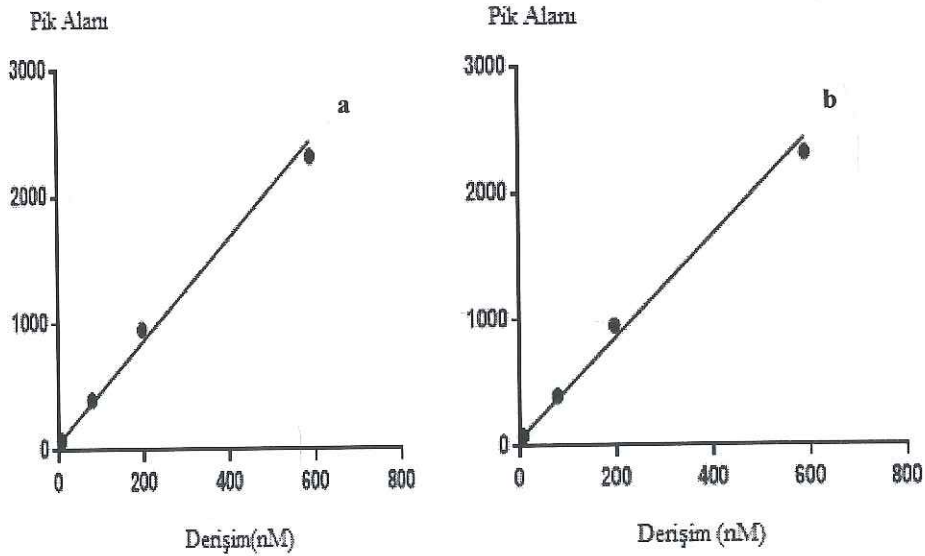
Beyin ve beyin sapı dokusunda nöropeptidlere ait kütle sinyalleri belirlendikten sonra, dokudaki nöropeptid derişimini belirlemek için standart ekleme yöntemi kullanılmıştır.

İki tane Wistar sıçandan alınan beyin ve beyin sapı dokuları 6 mL 2 M asetik asit ile homojenize edilmiştir. Doku homojenatı su banyosunda 90°C'de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Microcon YM 10 Da filtreye alınan homojenat 4°C ve 7160 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Doku süpernatanın üzerine standart çözeltilerden ilave edilerek dört farklı derişimde (5.85 ng/mL, 58.5 ng/mL, 146.18 ng/mL, 438.52 ng/mL SP derişimi ve 2.1 ng/mL, 21 ng/mL, 51.76 ng/mL ve 155.28 ng/mL CGRP derişimi) çözeltili hazırlanmıştır. Ayrıca doku süpernatanın üzerine seyreltme işleminde kullanılan asetonitril içerisinde %0.5 asetik asit ilave edilerek kör numune hazırlanmıştır. SK-KS/KS analizi yapılarak, derişime karşı pik alanı okunmuştur. Doğrusal ağırlıklı regresyon (1/x) grafiğinde x eksenini (derişim) ekstrapole edilerek

dokudaki SP ve CGRP derişimleri belirlenmiştir. Şekil 17’de SP’nin beyin dokusundaki ve Şekil 18’de SP ve CGRP’nin beyin sapı dokusundaki standart ekleme kalibrasyon grafiğı gösterilmektedir. SP’nin beyin dokusundaki standart ekleme kalibrasyon grafiğı doğru denklemi $y=5.668x+50.13$ şeklindedir. SP’nin beyin sapı dokusundaki standart ekleme kalibrasyon grafiğı doğru denklemi $y=5.265x+75.30$ ve CGRP’nin beyin sapı dokusundaki standart ekleme kalibrasyon grafiğı doğru denklemi $y=4.570x+40.88$ şeklindedir. Beyin ve beyin sapı dokularındaki bulunan nöropeptid derişimleri Çizelge 13’de gösterilmektedir.



Şekil 17. Beyin Dokusundaki P Maddesinin Standart Ekleme Kalibrasyon Grafiğı



Şekil 18. Beyin Sapı Dokusundaki a) P Maddesinin b) Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid'in Standart Ekleme Kalibrasyon Grafiğı

Çizelge 13. Beyin ve Beyin Sapı Dokularındaki Nöropeptid Derişimleri (n = 6)

	Beyin (ng/g±SS)	Beyin Sapı (ng/g±SS)
SP	57.95±38.01	415.10±124.80
CGRP	ND	132.07±196.77

SS: Standart Sapma

ND: Saptamadı

Beyin ve Beyin Sapı Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik

Beyin dokusundaki SP için doğruluk ve kesinlik, dokuya 3 farklı derişimde (58.5, 146.16 ve 438.52 ng/mL) çözelti eklenerek çalışılmıştır. SP için; kesinlik %7'den az ve geri kazanım değeri %97'den fazla olarak hesaplanmıştır. **Çizelge 14**'de P Maddesi için doğruluk ve kesinlik değeri gösterilmiştir. Doğruluk ve kesinlik değeri biyoanalitik validasyon rehberindeki sonuçlarla uyumludur (http-5).

Çizelge 14. P Maddesi İçin Beyin Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik Değerleri

	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	%Geri Kazanım	%BSS
SP	58.50	69.91	119.55	6.05
	146.16	145.53	100.57	5.69
	438.52	325.38	97.43	2.22

Beyin sapındaki SP ve CGRP için doğruluk ve kesinlik, dokuya 3 farklı derişimde (58.5, 146.16 ve 438.52 ng/mL SP derişimi ve 21.0, 51.76, 155.28 CGRP derişimi) çözelti eklenerek çalışılmıştır.

SP için; kesinlik %7'den az ve geri kazanım %98'den fazla olarak hesaplanmıştır. CGRP için; kesinlik %13'den az ve geri kazanım %95'den fazla olarak hesaplanmıştır. **Çizelge 15**'de P maddesi ve CGRP için beyin ve beyin sapı dokusundaki doğruluk ve kesinlik değeri gösterilmiştir. Doğruluk ve kesinlik değeri biyoanalitik validasyon rehberindeki sonuçlarla uyumludur (http-5).

Çizelge 15. P Maddesi ve Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Beyin Sapı Dokusundaki Doğruluk ve Kesinlik Değerleri

	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	%Geri Kazanım	%BSS
SP	58.5	59.61	101.64	4.43
	146.16	160.22	109.48	6.83
	438.52	431.41	98.33	0.22
CGRP	21	23.25	112.09	10.96
	51.76	55.18	106.54	4.95
	155.28	148.99	95.93	12.36

P Maddesi Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Sonuçları

Absorbans Değerleri

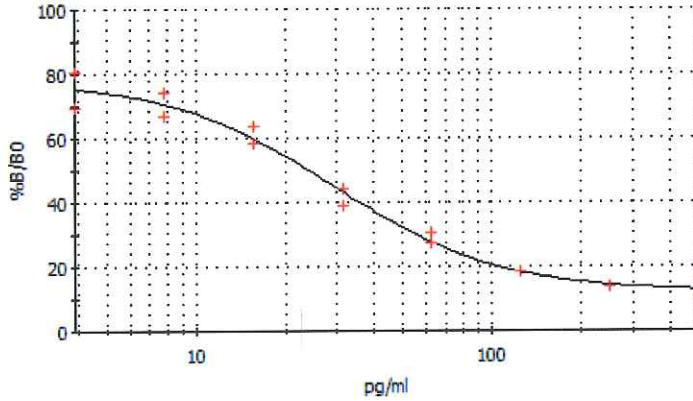
Mikrotitre plakta bulunan ve SP içeren örnekler ELISA cihazında 410 nm dalga boyunda okutulmuştur. **Çizelge 16'**da absorbans değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 16. P Maddesi İçin 410 nm'deki Absorbans Değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.170	0.254	0.219	0.341	0.319	0.215	0.200	0.223	0.224
B	0.169	0.240	0.240	0.355	0.317	0.196	0.193	0.230	0.211
C	0.173	0.263	0.263	0.325	0.314	0.218	0.202	0.220	0.226
D	0.173	0.322	0.306	0.246	0.297	0.214	0.232	0.222	0.233
E	0.638	0.389	0.365	0.348	0.343	0.202	0.245	0.232	0.228
F	0.666	0.485	0.460	0.337	0.205	0.234	0.219	0.222	0.233
G	0.687	0.537	0.501	0.407	0.387	0.184	0.205	0.227	0.216
H	0.846	0.569	0.514	0.248	0.382	0.210	0.219	0.215	0.219

Analiz Sonuçları

Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen derişimleri hesaplamak için 'Myassays Analysis Software' programı kullanılmıştır. **Çizelge 17'**de standart çözeltilerin derişimlerine karşılık gelen %B/B₀ değerleri verilmiştir ve bu değerlerden yararlanılarak **Şekil 19'**da gösterilen P Maddesine ait logaritmik kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu eğriden yararlanarak doku derişimleri belirlenmiştir. Beyin ve beyin sapı için derişim düzeyi kalibrasyon eğrisinin derişim sınırının altında kaldığı için SP düzeyleri hesaplanamamıştır.



Şekil 19. P Maddesi Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Kalibrasyon Eğrisi

Çizelge 17. P Maddesi İçin Standart Çözeltilerin Derişimlerine Karşılık Gelen %B/B₀ Değerleri

Standart	Absorbans	Derişim (pg/mL)	%B/B ₀
Standart 1	0.254, 0.219	500	16.5, 9.4
Standart 2	0.240, 0.240	250	13.7, 13.7
Standart 3	0.263, 0.263	125	18.3, 18.3
Standart 4	0.322, 0.306	62.5	30.4, 27.1
Standart 5	0.389, 0.365	31.3	44, 39.1
Standart 6	0.485, 0.460	15.6	63.6, 58.5
Standart 7	0.537, 0.501	7.8	74.2, 66.8
Standart 8	0.569, 0.514	3.9	80.7, 69.5

Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid (CGRP) Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Sonuçları

Absorbans Değerleri

Mikrotitre plakta bulunan örnekler CGRP içeriği ELISA cihazında 410 nm dalga boyunda okutularak belirlenmiştir. **Çizelge 18'**de elde edilen absorbans değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 18. Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin 410 nm' deki Absorbans Değerleri

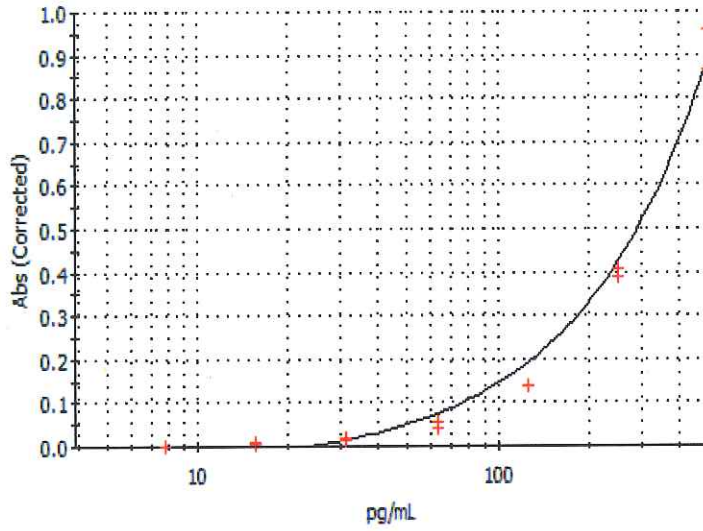
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.139	1.018	0.165	3.665	3.806	3.294	3.365	3.174	2.761
B	0.143	1.107	0.171	3.67	3.489	3.326	3.354	3.08	3.223
C	0.177	0.558	0.154	3.398	3.738	3.129	3.298	3.183	3.285
D	0.143	0.540	0.160	3.588	3.671	3.329	2.649	3.243	3.370
E	0.145	0.291	0.144	3.445	3.764	3.221	3.136	3.236	3.396
F	0.147	0.289	0.151	3.366	3.711	2.912	3.262	3.136	2.334
G	0.144	0.192	0.144	3.72	3.792	3.302	3.298	2.756	3.349
H	0.142	0.206	0.137	3.608	3.49	3.260	2.857	3.341	3.448

Analiz Sonuçları

Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen derişimleri hesaplamak için 'Myassays Analysis Software' programı kullanılmıştır. **Çizelge 19'**da standart çözeltilerin derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri verilmiştir ve bu değerlerden yararlanılarak **Şekil 20'**de gösterilen logaritmik kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu eğriden yararlanarak **Çizelge 20'**de verilen doku örneklerinin derişimleri hesaplanarak ng/g cinsinden dokudaki derişimleri bulunmuştur.

Çizelge 19. Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid İçin Standart Çözeltilerin Derişimlerine Karşılık Gelen Absorbans Değerleri

Standart	Absorbans	Derişim (pg/mL)
Standart 1	1.018, 1.107	500
Standart 2	0.558, 0.540	250
Standart 3	0.291, 0.289	125
Standart 4	0.192, 0.206	62.5
Standart 5	0.165, 0.171	31.3
Standart 6	0.154, 0.160	15.6
Standart 7	0.144, 0.151	7.8
Standart 8	0.144, 0.137	3.9



Şekil 20. Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz (ELISA) Kalibrasyon Eğrisi

Çizelge 20. Doku Örneklerindeki Kalsitonin Gen-İlişkili Peptid Derişimleri (n = 6)

Derişim±SS (ng/g doku)	Beyin Sapı	Beyin
	2351.24±292.49	1567.96±55.47

SS: Standart Sapma

RIA ve ELISA analizleri nöropeptidlerin düzeylerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler duyarlı olmasına rağmen, antiserumların çoğu tek bir peptide özgü değildir ve diğer peptidler ile çapraz reaksiyona girebilmektedir. Ayrıca bu yöntemler ile aynı zamanda sadece belli sayıdaki nöropeptid analiz edilebilmektedir. Peptidlerin tanınmasını sınırlandırmaktadır. Kütle spektrometri kullanarak bir numune de birçok nöropeptidin eşzamanlı tanımlanması ve tayini mümkün olabilmektedir (Dijck ve ark., 2011). Kütle

spektrometri iyonlaşabilen maddelerin hızlı ve duyarlı bir şekilde saptanmasını sağlamaktadır. Fakat spektrum karmaşık olabilmekte ve düşük düzeyde bulunan analit numunedeki diğer bileşenlerden kaynaklanan girişime maruz kalabilmektedir. Kütle spektrumuna dayalı tekniklerin başarılı bir şekilde uygulanması, nöropeptidlerin belirlenmesi ve girişimin en azına indirilebilmesi uygun numune hazırlama yöntemleri ile mümkün olmaktadır (Sturms ve ark., 2010).

SONUÇ ve ÖNERİLER

SK-KS temeline dayalı teknikler, peptidlerin biyolojik numunelerdeki kalitatif ve kantitatif analizleri için duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak kompleks karışımlarda peptidlerin düşük derişim düzeylerinin belirlenmesinde önemli katkılar sağlamaktadır. SP ve CGRP'nin nöropeptid özelik göstermesinden dolayı tıp ve fizyoloji alanlarında hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalar çoğunluktadır. Literatürde peptid düzeylerinin tayini için ağırlıklı olarak enzimatik yöntemlere (RIA veya EIA) dayalı tekniklerin kullanıldığı görülmektedir. SP ve CGRP ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde biyolojik numunelerdeki miktar tayinlerine yönelik geliştirilen analitik yöntemler sınırlıdır. Nöropeptidlerin sinir dokularında düşük derişimlerde bulunmaları nedeniyle analitik yöntem geliştirilmesi zorluklar taşımaktadır.

Kütle spektrometri temeline dayalı nöropeptidomik çalışmalar, sinir bilimindeki endojen nöropeptidlerin biyolojik numunelerde belirlenmesini kapsamaktadır ve sinir bilimleri araştırmalarında giderek artan bir öneme sahiptir. Bu yöntem kullanılarak yeni peptidler keşfedilebilmekte, hastalık modellerine uygulandığında patofizyolojik mekanizmalarda önemli rolleri tanımlanabilmekte ve ilaç hedefleri veya biyoışaretleyici olarak kullanılabilir (Dijck ve ark., 2011; Svensson ve ark., 2007).

Bir örneğin proteomik/peptidomik analizi 4 basamaktan oluşmaktadır; proteinlerin/peptidlerin numuneden ekstraksiyonu, ayırımları, saptanmaları ve ayrılan maddelerin tanımlanmaları, analizleri şeklinde olmaktadır (Baggerman ve ark., 2004). Kütle spektrometri sadece peptid ve proteinlerin moleküler ağırlıklarının yüksek duyarlık, doğrulukla belirlenmesini sağlamakla kalmayıp aynı zamanda onların aminoasit dizilimlerinin belirlenmesini de mümkün kılmaktadır (Hoffmann ve Stroobant, 2007). Tandem KS'de ana kütle m/z 'lerinin, ana kütlelerin parçalanması ile elde edilen parçalarının tayini de yapılabilmektedir. Ana kütlelerin parçalanarak oluşturduğu fragman iyonlar iyi bir kalitatif analiz verisidir. Seçilen ana kütlelerin parçalanarak oluşturduğu fragmanlardan biri ya da birkaçı seçilerek elde edilen veriler kullanılarak çok seçici ve duyarlı kantitatif analiz verisi oluşturulur. Bu yönleriyle seçici, duyarlı, hem miktar tayinlerinde hem de yapı tayinlerinde kullanılan benzersiz bir yöntemdir. Ayrıca Tandem KS'de kompleks karışımdan seçilen ana kütlelerin fragmentasyonunun yapılabilmesi, doku ekstraktlarından peptidlerin 'de nova' dizilimini ayrıntılı kromatografik ayırma olmaksızın mümkün kılmaktadır (Baggerman ve ark., 2004).

Yapılan çalışmada nöropeptidlerin beyin dokularındaki düzeylerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan ELISA ve geliştirilen SK-KS/KS yöntemleri kullanılmıştır. Ülkemizde ilk defa nöropeptidlerin tayini için iki yöntem birlikte kullanılarak, beyin ve beyin sapı dokularında oldukça duyarlı, güvenilir, seçici ve hızlı bir kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir.

C₈ kolon kullanılarak %0.2 formik asit içeren su-ACN gradiyent hareketli faz sisteminde nöropeptidlerin SK-KS/KS yöntemiyle ayrımı, belirleme ve saptama ile ilgili optimum koşulları belirlenerek SP ve CGRP'nin eşzamanlı olarak sırasıyla 8.7 dk ve 10.1 dk alıkonma zamanlarında kromatografik ayrımı

gerçekleştirilmiştir. Yöntemin validasyonu gösterilmiştir. Wistar cinsi sıçanlardan alınan beyin ve beyin sapı dokularında geliştirilen SK-KS/KS yöntemiyle bazal endojen düzeyler belirlenmiştir. Beyin sapı dokusundaki SP ve CGRP bazal endojen derişimler sırasıyla 415.10 ± 124.80 ng/g, 132.07 ± 196.77 ng/g olarak, beyin dokusundaki SP derişimi ise 57.95 ± 38.01 ng/g olarak hesaplanmıştır. Beyin dokusunda CGRP düzeyi yöntemin tayin sınırının altında kaldığı için hesaplanamamıştır. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz yöntemiyle, SP ve CGRP için kit prosedürleri kullanılarak beyin ve beyin sapı dokusundaki derişimleri incelenmiştir. SP düzeyi beyin ve beyin sapında belirlenememiştir. CGRP düzeyi ise beyin sapında 2351.24 ± 292.49 ng/g, beyinde 1567.96 ± 55.47 ng/g olarak belirlenmiştir.

Mevcut literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında sunulan tez çalışmasıyla geliştirilen SK-KS/KS yöntemi ile ilgili olarak şunlar söylenebilir:

- Çalışmada geliştirilen SK-KS/KS yönteminde asetik asit homojenizasyonundan oluşan basit ve tek basamaklı doku prosedürü kullanılmıştır. Literatürlerde önerilen iki basamaklı asetik asit prosedürlerine göre uygulanabilirlik bakımından kolaylık sağlanmıştır.
- Peptid ekstraksiyonu işlemlerinde kullanılan Microcon filtrelerin maliyeti oldukça pahalı ve kullanımı pratik değildir. Çalışmada maliyeti ucuz, erişilebilirliği kolay PTFE filtreler kullanılmıştır.
- Nöropeptidlerin SK-KS/KS analizi için standart çözeltilerin hazırlanmasında kaynaklar % 0.25 TFA-su çözeltisi içerisinde hazırlamayı önermektedir (Beaudry ve ark.(2009); Beaudry ve Vachon (2006); Ferland ve ark. (2011)). Bu çalışmada kullanılan ACN içerisinde hazırlanmış %0.5 asetik asit çözeltisi peptidlerin kütle parçalanması sonucu elde edilen fragman iyonların gözlenmesine katkı sağlamış, standart peptid çözeltileri hazırlanışı bakımından literatüre yenilik getirmiştir.
- C₈ narrowbore kolon kullanılarak literatüre göre daha kısa alıkonma zamanlarda SP ve CGRP'nin analizi gerçekleştirilmiştir (Beaudry ve ark.(2009); Beaudry ve Vachon (2006)).
- Diğer SK-KS/KS yöntemlerinde kullanılan kütle analizörlerinden farklı olarak nöropeptidlerin belirleme ve saptama çalışmalarında üçlü kuadrupol kütle analizörü kullanılmıştır.
- Kaynaklarda yer verilen validasyon parametrelerinden farklı olarak EMEA 2011 biyoanalitik validasyon rehberine göre matriks etkisi araştırılmıştır ([http-5](http://5)).
- SK-KS/KS çalışmalarında iç standart (IS) olarak analizi hedeflenen bileşenlerin izotopları kullanılmaktadır. Bu izotop bileşenlerinin temin etmekteki zorluklar nedeniyle SP ve CGRP izotopları kullanılamamıştır. Geliştirilen SK-KS/KS yönteminin yeterli kesinlik ve doğruluğa sahip olduğunun gösterilemesi nedeniyle literatürde geçen reserpin ve tilosin gibi SK çalışmalarında kullanılan IS'lerin kullanılması tercih edilmemiştir.

- Nöropeptidlerin dokudaki kantitatif tayininde standart ekleme yöntemi kullanılmıştır.
- SK-KS/KS yöntemiyle nöropeptidlerin kantitatif tayini çalışılan doku numunesi bakımından da orijinallik taşımaktadır (Beaudry ve ark.(2009); Beaudry ve Vachon (2006); Ferland ve ark. (2011); Erin ve ark. (2012), Pailleux ve ark. (2012; Erin ve Ulusoy (2009)).

RIA ve ELISA analizleri nöropeptidlerin düzeylerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler duyarlı olmasına rağmen, antiserumların çoğu tek bir peptide özgü değildir ve diğer peptidler ile çapraz reaksiyona girebilmektedir. Çalışmamız kapsamındaki ELISA ölçümlerindeki peptid düzeylerinin SK-KS/KS sonuçlarından fazla çıkması bu bilgiyi doğrulamaktadır. Ayrıca bu yöntemler ile aynı zamanda sadece belli sayıdaki nöropeptid analiz edilebilmektedir. Peptidlerin tanınmasını sınırlandırmaktadır. Kütle spektrometri kullanarak bir numunede birçok nöropeptidin eşzamanlı tanımlanması ve tayini mümkün olabilmektedir (Dijck ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında nöropeptidlerin çok düşük derişimlerde biyolojik numunelerde bulunmalarına rağmen, SP ve CGRP'nin beyin ve beyin sapı dokularında eşzamanlı seçiciliği, duyarlılığı yüksek, hızlı ve güvenilir bir yöntem olan SK-KS/KS analizinin gerçekleştirilmesi hedefine ulaşılmıştır.

SP ve CGRP için geliştirilen oldukça duyarlı, güvenilir, seçici, hızlı bir SK-KS/KS yönteminin biyolojik dokulardaki ölçümlere temel oluşturacağı, sinir bilimleri alanında çalışan araştırmacıların çeşitli hipotezlerinin aydınlatılmasında kullanabileceği tıp ve fizyoloji alanlarında yapılan hastalıkların tanı ve teşhis çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Averbeck, B., Reeh, P.W., Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E2 from isolated rat skin, *Neuropharmacology*, 40, 416–423 (2001).

Babu, C.V.S., Hana, K.Y., Kima, Y., Yooa, Y.S., Determination of Substance P by capillary zone electrophoresis in rat brain, *Microchemical Journal*, 75, 29–37 (2003).

Babu, C.V.S., Lee, J., Lho, D.S., Yoo, Y.S., Analysis of substance P in rat brain by means of immunoaffinity capture and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 807, 307–313 (2004).

Baggerman G., Verleyen P., Clynen E., Huybrechts J., De Loof A., Schoofs L., 2004. "Peptidomics", *Journal of Chromatography B*, 803, 3-16.

Bailey, P.D., *An Introduction to Peptide Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1-10, (1990).

Ban, E., Choi, O.K., Chung, W.Y., Park, C.S., Yoo, E.A., Chung, B.C., Yoo, Y.S., Influence of buffer composition and sample pretreatment on efficiency separation for monitoring neuropeptides in plasma using capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 22, 2173–2178 (2001).

Beaudry, F., Vachon, P., Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 20, 1344–1350 (2006).

Beaudry, F., Ferland, C.E., Vachon, P., Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 23, 940–950 (2009).

Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J.G., Geppetti P., CGRP reseptors in the control of pain and inflammation, *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 9-14 (2009).

Bondy, B., Baghai, T.C., Minov, C., Schu"le, C., Schwarz, M.J., Zwanzger, P., Rupprecht, R., Moller, H.J., Substance P Serum Levels Are Increased in Major Depression: Preliminary Results, *Society of Biological Psychiatry*, 538- 542 (2003).

Büyükcoşkun, N.İ., Stres Ülseri ve Nöropeptidler, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 28(3), 109-113 (2002).

Cavazza, A., Corradini, C., Marini, M., Rodab, L.G., Valentic, A., Capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the evaluation of substance P enzymatic degradation by SaOS-2 human osteosarcoma, *Journal of Chromatography B*, 879, 2501–2506 (2011).

Chappa, A.K., Cooper, J.D., Audusa, K.L., Lunte, S.M., Investigation of the metabolism of substance P at the blood-brain barrier using LC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1409-1415 (2007).

Crowther, J.R., *ELISA Theory and Practice*, Humana Press Inc., 223 sayfa, (1995).

De Felipe., C., Herrero., J.F., O'Brien., J.A., Palmer., J.A., Doyle., C.A., Smith., A.J., Laird., J.M., Belmonte., C., Cervero., F., Hunt., S.P., Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P, *Nature* 392 (6674), 394-7 (1998).

Dijck V.A., Hayakawa, E., Landuyt, B., Baggerman, G., Dam V.D., Luyten, W., Schoofs, L., Deyn, P.P., Comparison of extraction methods for peptidomics analysis of Mouse brain tissue, *Journal of Neuroscience Methods*, 197, 231-237 (2011).

Eberhardt, M., Hoffmann, T., Sauer, S.K., Messlinger, K., Reeh, P.V., Fischer, M., J., M., Calcitonin gene-related peptide release from intact isolated dorsal root and trigeminal ganglia, *Neuropeptides*, 42, 311-317 (2008).

Ebersberger, A., Averbeck, B., Messlinger, K., Reeh, P.V., Release of Substance P, Calcitonin Gene-Related Peptide and Prostaglandin E2 From Rat Dura Mater Encephali Following Electrical and Chemical Stimulation In Vitro, *Neuroscience*, 89, 901-907 (1999).

Edvinsson, L., Uddman, R., 2005. Neurobiology in primary headaches, *Brain Research. Reviews.*, 48, 438-456 (2005).

Edvinsson, L., Villalon, C.M., MaassenVan Den Brink, A., Basic mechanisms of migraine and its acute treatment, *Pharmacology. Therapeutics*, 136, 319-333 (2012).

Erin, N., Clawson A.G., Parameters affecting substance P measurement in heart, lung, and skin, *BioTechniques* 37, 232-239 (2004).

Erin, N., Türker, S., Elpek, Ö., Yıldırım, B., Differential changes in Substance P, VIP as well as neuropeptide levels in patients with gastritis or ulcer, *Peptides*, 35, 218-224 (2012).

Erin, N., Ulusoy, Ö., Differentiation of neuronal from non-neuronal Substance P, *Regulatory Peptides*, 152, 108-113 (2009).

Ferland, C., Pailleux, F., Vachon, P., Beaudry F., Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry, *Neuropeptides*, 45, 423-429 (2011).

Freed, A.L., Cooper, J.D., Davies, M.I., Lunte, M.S., Investigation of the metabolism of substance P in rat striatum by microdialysis sampling and capillary

electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Journal of Neuroscience Methods*, 109, 23–29 (2001).

Frerichs, V.A., Herrmann, J.K., Aguirre, A., Colo'n, L.A., Trace level determination of substance P using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence, *Microchemical Journal*, 78, 135-142 (2004).

Frobert, Y., Nevers, M.C., Amadesi, S., Volland, H., Brune, P., Geppetti, P., Grassi, J., Creminon, C., A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP): Characterization and application, *Peptides*, 20, 275-284 (1999).

Garcia, M.C., The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 825, 111-123 (2005).

Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R., Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache, *Annals of Neurology* 28, 183–187 (1990).

Griffiths, J., A Brief History of Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 80, 5678-5683 (2008).

Guyton R.A, Hall J.E., Sinir sisteminin organizasyonu, sinapsların temel işlevleri ve aracı maddeler, *Tıbbi Fizyoloji*, H. Çavuşoğlu ve B. Çağlayan Yeğen, Nobel Tıp Kitapevleri, 555-584 (2007).

Harada N., Okajima K., Inhibition of Neutrophil Activation by Lafutidine, an H₂-receptor Antagonist, Through Enhancement of Sensory Neuron Activation Contributes to the Reduction of Stress-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats, *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 469–477 (2007).

Ho, T.W., Edvinsson, L., Goadsby, P.J., CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology, *Nature Reviews Neurology*, 6, 573–582 (2010).

Hoffmann, E., Stroobant V., Mass Spectrometry Principles and Applications, John Wiley&Sons, Chichester, 189-213, (2007).

Johansson, P., Almqvist, E.G., Wallin, A., Johansson, J.O., Andreasson, U., Blennow, K., Zetterberg, H., Svensson, J., Cerebrospinal fluid substance P concentrations are elevated in patients with Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 609, 58-62 (2015).

Kennedy, T.R., Watson, J.C., Haskins, E.W., Powell, D.H., Strecker, R.E., In vivo neurochemical monitoring by microdialysis and capillary separations, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 659-665 (2002).

Kim, J.S., Kim, J.E., Kim, S.H., Kim, S.J., Jeon, S.J., Kim, S.H., Joung, Y., Therapeutic effects of neuropeptide substance P coupled with self-assembled

- peptide nanofibers on the progression of osteoarthritis in a rat model, *Biomaterials*, 74, 119-130, 2016.
- Kostel, K.L., Lunte, S.M., Evaluation of capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection for the determination of substance P and its metabolites, *Journal of Chromatography B*, 695, 27-38 (1997).
- Larsson, M., Lutz, E.S.M., Transient isotachopheresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis mass spectrometry for peptide analysis, *Electrophoresis*, 21, 2859-2865 (2000).
- Lavagnini, I., Magno, F., Seraglia, R., *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, John Wiley&Sons, Chichester, 2006.
- Li, M., Shang, Y.X., Wei, B., Yang, Y.G., The effect of Substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration and cytoplasmic calcium concentration in vitro, *Journal of Inflammation*, 8, 1-9, (2011).
- McMaster M.C., *LC/MS A Practical User's Guide*, John Wiley&Sons, New Jersey, 2005.
- Messlinger, K., Fischer, M.J., Lennerz, J.K., Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine, *Keio Journal of Medicine*, 60, 82-89 (2011).
- Murao, N., Ishigai, M., Yasuno, H., Shimonaka, Y., Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up, *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 21, 4033-4038 (2007).
- Pailleux, F., Lemoine, J., Beaudry, F., Quantitative Mass Spectrometry Analysis Reveals that Deletion of the TRPV1 Receptor in Mice Alters Substance P and Neurokinin A Expression in the Central Nervous System, *Neurochemical Research*, 37, 2678-2685 (2012).
- Palmer, J.B.D., Barnes, P.J., Neuropeptides and airway smooth muscle function, *The American Review of Respiratory Disease*, 4, 50-54 (1987).
- Parkin, C.M., Wei, H., O'Callaghan, J.P., Kennedy, R.T., Sample Dependent Effects on the Neuropeptidome Detected in Rat Brain Tissue Preparations by Capillary Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 77, 6331-6338 (2005).
- Phillips, T., Determination of in situ tissue neuropeptides by capillary immunoelectrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 372, 209-218 (1998).
- Phillips, T.M., Wellner, E., Measurement of neuropeptides in clinical samples using chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1111, 106-111 (2006).

Phillips, T.M., Wellner, E.F., Analysis of inflammatory biomarkers from tissue biopsies by chip-based immunoaffinity CE, *Electrophoresis*, 28, 3041-3048 (2007).

Rissler, K., Cramer, H., Engelmann, P., Application of [125I]-[Tyr8]-substance P prepared by the chloramine-T method to receptor-binding experiments after subsequent reduction with mercaptoethanol and purification by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 698, 17-26 (1997).

Schütz, F., Kappt, E.A., Simpsont, R.J., Speed, T.P., Deriving statistical models for predicting peptide tandem MS product ion intensities, *Biochemical Society Transactions*, 31, 479-483 (2003).

Sewald, N., Jakubke H.D., *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, 562 pages, (2002).

Song, E.Y., Dunk, C.V., Kuddo, T., Nelson, P.G., Measurement of CGRP in dried blood spots using a modified sandwich enzyme immunoassay, *Journal of Neuroscience Methods*, 155, 92-97 (2006).

Sturms, R.M., Dowell, J.A., Li, L., Rat Brain Neuropeptidomics: Tissue Collection, Protease Inhibition, Neuropeptide Extraction and Mass Spectrometric Analysis, *Molecular Biology*, 615, 217-226 (2010).

Svensson, M.; Skold, K.; Nilsson, A.; Falth, M.; Nydahl, K., Svenningsson, P.; Andren, P. E. Neuropeptidomics: MS applied to the discovery of novel peptides from the brain, *Analytical Chemistry*, 79 (1), 6-15 (2007).

Şener, E., Bazı Nörokimyasal Maddelerin Sıçan Beyninden Mikrodializ ile Toplanması ve Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini, *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2007).

Şener, E., Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, Kromatografik Sistemler, L. Genç, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi Yayınları, Eskişehir, 123-133, (2011).

Wang, J., Jiang, X., Sturm, R.M., Li, L., Combining tissue extraction and off-line capillary electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for neuropeptide analysis in individual neuronal organs using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a multi-functional agent, *Journal of Chromatography A*, 1216, 8283-8288 (2009).

Wei, H., Nolkrantz, K., Parkin, M.C., Chisolm, C.N., O' Callaghan, J.P., Kennedy, R.T., Identification and Quantification of Neuropeptides in Brain Tissue by Capillary Liquid Chromatography Coupled Off-Line to MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF-MS, *Analytical Chemistry*, 78, 4342-4351 (2006).

Yeşilada, A., Özkanlı, F., Peptit Yapılı İlaçların Rasyonel Tasarımına Yönelik Yeni Gelişmeler, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 33 (3), 157-181 (2004).

Ziganshin, R., Arapidi, G., Azarkin, I., Zaryadieva, E., Alexeev, D., Govorun, V., Ivanov, V., New method for peptide desorption from abundant blood proteins for plasma/serum peptidome analyses by mass spectrometry, Journal of Proteomics, 74, 595-606 (2011).

İnternet Kaynakları

http-1 Rat alpha CGRP, https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1142835.htm, (22.09.2016)

http-2 Rat CGRP EIA kit, <https://www.caymanchem.com/pdfs/589001.pdf>, (18.11.2012)

http-3 Agilent ordering information, <https://www.agilent.com/chem/supplies>, (20.8.2016)

http-4 QQQ Acquisition Tab, mk:@MSITStore:C:\PROGRA~2\Agilent, (26.3.2014)

http-5 Guideline on bioanalytical method validation European Medicines Agency 2011, <http://www.ema.europa.eu>, (27.8.2014).



ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN ARAŞTIRMALARI YEREL ETİK KURULU
BOLU

Sayı : 2010/24
Konu : Sonuç

01.12.2010

Sayın, Doç. Dr. Fatma TÖRE
Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu tarafından 2010/21 no.lu "Superior servikal gangliyonektomi ve 48/80 uygulamasının sıçanlarda trigeminal gangliyon cGRP ve substans P düzeylerine, dura mater mast hücrelerine ve trigeminal nükleus c-fos aktivitesine etkisi" isimli çalışmanız etik olarak uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ayşe KÜNER
(Başkan)

Prof. Dr. Ömer BOZDOĞAN

(YETKİLİ)
Prof. DR. Ertan YETKİN
(Üye)

Doç. Dr. Şeraf KÖYBAŞI ŞANAL
(Üye)

Doç. Dr. Neriman ŞENGÜL
(Üye)

Doç. Dr. Azra BOZCAARMUTLU
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Handan ESER

Avukat Gazanfer GÜNLER
(Üye)

Avukat Ümmügülşün KARABULUT
(Üye)



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Belge No:01-12

Sayın Neva ALASAĞ

07 – 18 Mayıs 2012 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanımı İle İlgili Eğitim Programı” 80 saatlik teorik ve uygulamalarına katılarak tamamlamış ve yapılan sertifikâ sınavını başarıyla geçmiştir.

Prof.Dr. Kevser EROL
Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

Prof. Dr. Hasan GONEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Rektörü



12 Eylül 2013

Poster No: P100

Saat: 16.45-17.15

SUPERİOR SERVİKAL GANGLİYONEKTOMİ VE 48/80 UYGULAMASININ SIÇANLARDA TRİGEMİNAL GANGLİYON cGRP VE SUBSTANS P DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Erkan Kılınc¹, Neva Alasağ², Tuğba Kırboğa¹, Dilek Ak², Fatma Töre¹

¹Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Bolu,

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir

Amaç: Duramaterin nosiseptör aktivasyonu sonucu substans-P (SP) ve kalsitonin gen-ilişli peptid (cGRP) aracılığı ile oluşan nörojenik inflamasyon, migren gibi primer baş ağrılarının fizyopatolojisinden sorumlu tutulmaktadır. Mast hücrelerinin nörojenik inflamasyona katıldığı gösterilmiştir. Migren kronik sempatik yetmezlik olarak tanımlanmaktadır. Uzun süreli sempatektomi uygulanan sıçanlarda duramater mast hücrelerinin aktive olduğu ve içeriklerini değiştirdiği bulunmuştur. Sunulan çalışmada kısa süreli sempatektominin ve güçlü bir mast hücre degranülatörü olan compound 48/80 uygulamasının beyin sapı, duramater ve trigeminal gangliyon SP ve cGRP düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Deneylerde 21 adet Wistar erkek sıçan kullanıldı. Operatör grupta (n=7), anestezi altında boyun orta hat boyunca kesilerek sol superior servikal sempatik gangliyon çıkarıldı. Sham grubundaki (n=7) sıçanların gangliyonları izole edildi fakat bunlar çıkarılmadı. Compound grubuna (n=7) ise mast hücre etkisini göstermek için güçlü bir mast hücre degranülatörü compound 48/80 (2mg/kg ip) uygulanıp 4 saat sonra beyin sapı, trigeminal gangliyonlar ve dura materler alındı. Dokular tartılıp ölçüm zamanına kadar -80°C'de saklandı. Dokulardaki SP ve cGRP konsantrasyonları EIA yöntemi ile ölçüldü. Veriler Mann-Whitney U test ile karşılaştırıldı.

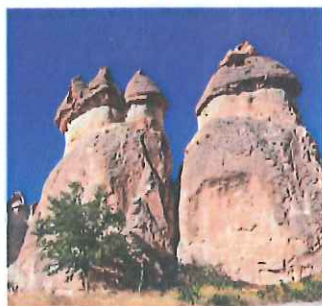
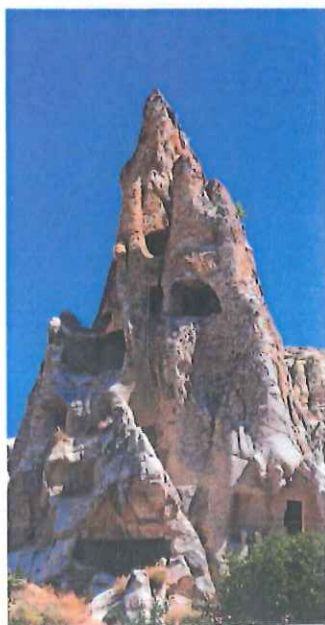
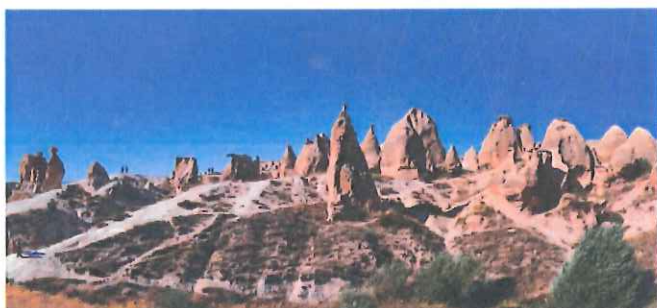
Bulgular: Mast hücre degranülasyonunun indüklendiği sıçanlarda trigeminal gangliyon SP düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artarken duramaterde anlamlı azalma bulundu (p<0,05). Sempatektomi trigeminal gangliyon SP düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdı (p<0,05). cGRP düzeyleri karşılaştırıldığında sempatektomi ipsilateral duramaterde kontrole göre artışa neden olsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sadece beyin sapı örneklerinde cGRP düzeyi, compound 48/80 verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış bulundu (p=0,01).

Sonuçlar: Bu çalışma sempatektominin ve mast hücre degranülasyonunun, meningeal duyuşal afferentlerin nörotransmitterleri olan SP ve cGRP düzeylerini değiştirdiğini göstermiştir. Özellikle trigeminal gangliyon SP düzeyinin artışı meningeal nörojenik inflamasyonu düşündürmektedir. Bu sonuçlar, günümüzde sadece atakların önlenemediği migren baş ağrısının tedavisinde sempatik sinir sistemi ve mast hücreleri ile meningeal duyuşal afferentlerin çift yönlü etkileşiminin göz önünde bulundurulmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.



12th International Symposium On VIP, PACAP And Related Peptides

CAPPADOCIA / TURKEY



September 21-26, 2015

DETERMINATION OF SUBSTANCE P IN RAT BRAIN TISSUES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY IONIZATION-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Neva Alasağ*,

Erol Şener**, Dilek Doğrukol-Ak**

Anadolu University, Health Science Institute, Department of Analytical Chemistry*
and Anadolu University, Pharmacy Faculty, Department of Analytical Chemistry**
26470, Eskisehir- Turkey

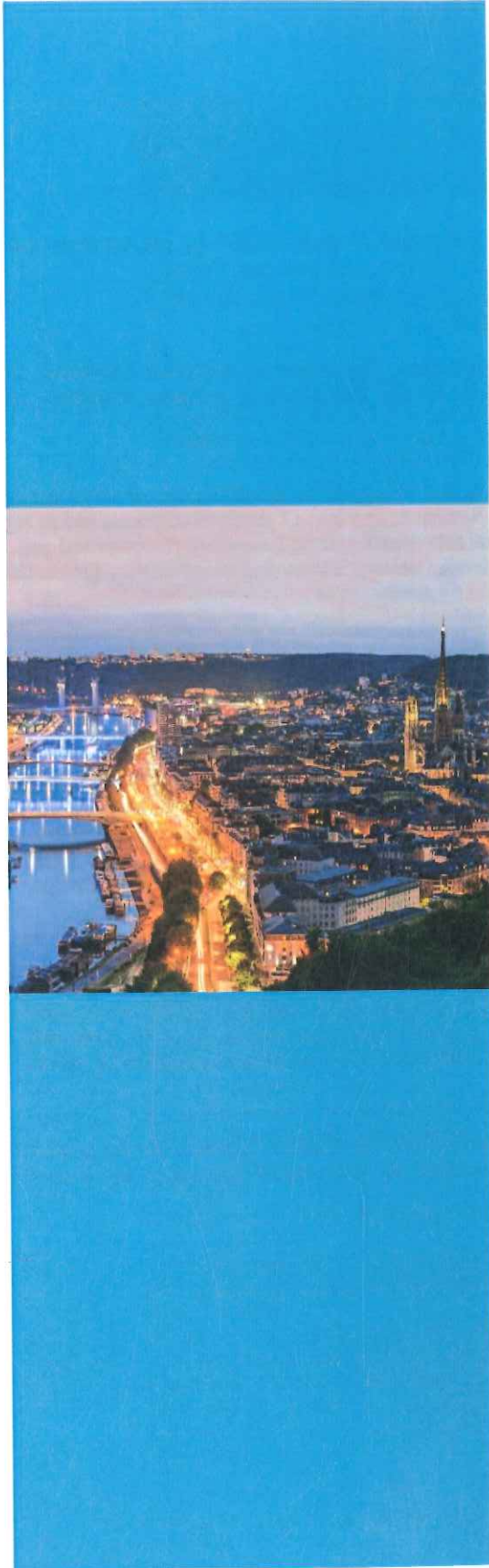
amino acid consist of short-chain polypeptide. Substance P is widely distributed in the central and peripheral nervous systems. In the central nervous system, participates in various behavioral responses and in regulating neuronal survival and degeneration. It is also a role in the regulation of cardiovascular and respiratory function. Substance P is released from the terminals of specific sensory nerves, is found in the brain and spinal cord that is associated with inflammatory processes and pain. The separation and quantification of peptides were the most challenging analytical tasks in complex biological samples. Generally used methods of separations are sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), size-exclusion chromatography (SEC), radioimmunoassay (RIA), capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Recently developed methods such as quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometric (MALDI-MS) approaches or the coupling of electrospray ionization with high performance liquid chromatography led to the development of new LC-ESI-MS/MS techniques for peptide analysis.

The aim of the our study was LC-ESI-MS/MS method for the identification and quantitation of the Substance P in rat brain tissues. A gradient mobile phase used with a Zorbax C₈ 150x2.1 mm with a particle size of 3.5 µm narrow-bore column. Gradient elution mobile phase components consist of % 0.2 formic acid in water (A) and %0.2 formic acid in acetonitrile (v/v) (B). Flow rate was fixed at 0.2 mL/min. SP eluted at 8.7 min. Mass spectra for SP obtained in positive ion mode and the ion transitions occurred m/z 674.3 $\rightarrow$ [600+254.4]. The method was found linear over the analytical range of 7.88-591 ng/mL by using a linear regression (weighted 1/x) with coefficients of correlations (r) ranging from 0,9927-0,9980. The LOQ was 7.88 ng/mL. Precision and accuracy were determined by measuring the concentration of SP in three replicates of quality control standards at three different concentrations (7.88, 197 and 591 ng/mL) for three separate batches. Intra-day precision was <15%, and calculated recovery was >91%. For the inter-day studies precision was 15%, and calculated recovery was >98%. According to the bioanalytical validation guideline published by the FDA, acceptable precision and accuracy results were achieved. This method was applied to rat brain tissues (whole brain and brain stem samples) to measure SP concentration.

Acknowledgement

Substance P is a neuropeptide that belongs to the tachykinin family. It is an 11

This study was supported by the Research Council of Anadolu University for the project (Project Number: 1203S048).



Oral Communications

OC04.03

Simultaneous determination of substance P and CGRP in rat *truncus encephali* tissues

Alasag N¹, Sener E² and Dogrukol-Ak D²

¹ Anadolu University, Health Science Institute, Department of Analytical Chemistry, Eskisehir, Turkey ; ² Anadolu University, Pharmacy Faculty, Department of Analytical Chemistry, Eskisehir, Turkey

Substance P and CGRP are neuropeptides that belongs to the tachykinin and calcitonin family. In the central nervous system, these peptides participate in various behavioral responses and in regulating neuronal survival and degeneration. SP is associated with inflammatory processes and pain. CGRP acts as neuromodulator, but its presence in nervous tissues and blood vessels demonstrates that regulation of many processes.

The aim of the our study was to develop a LC-ESI-MS/MS method for the determination of SP and CGRP from rat brain stem tissues simultaneously. A gradient mobile phase used with a Zorbax C₈ 150x2.1 mm, particle size of 3.5 µm narrow-bore column. Gradient mobile phase, consist of 0.2% formic acid in water (A) and 0.2% formic acid in acetonitrile (v/v) (B). By using flow rate at 0.2 mL/min, SP and CGRP were eluted at 8.7 and 10.1 min respectively. Mass spectrum for SP and CGRP were obtained in positive ion mode and the ion transitions occurred $[M + 2H]^{2+}$ m/z 674.3 → [600.0+254.4] and $[M + 4H]^{4+}$ 952.2 → 1214.0. The method was linear over the range of 5.8-438.5 and 0.2-155.3 pmol/mL for SP and CGRP respectively, with coefficients of correlations (r) ranging from 0.9903-0.9980 by using a linear regression (weighted, 1/x). The LOQ was 5.8 and 0.2 pmol/mL for SP and CGRP, respectively. Precision and accuracy were determined by measuring the concentration of SP and CGRP of quality control standards at three different concentrations (5.8, 58 and 438.5 pmol/mL for SP, n=3), (0.2, 20.7 and 155.3 pmol/mL for CGRP, n=3) with three individual batches, respectively. Intra-day precision was <12.5%, and calculated recovery was >91%. For the inter-day studies precision was <15%, and calculated recovery was >87%. According to the bioanalytical validation guideline published by the ICH, acceptable precision and accuracy results were achieved. This method was applied to rat *truncus encephali* tissues of Wistar rats to measure SP and CGRP concentration. According to the analysis of tissue samples (n=6), the mean values of the basal endogenous concentrations for SP and CGRP were calculated as 308.2±92.6 and 34.75±51.7 pmol/g, respectively.

This study was supported by the Research Council of Anadolu University for the project (Project Number: 1203S048). The authors appreciate the instrumental support of the project number :1301S009

INTERNATIONAL
MULTIDISCIPLINARY SYMPOSIUM ON
DRUG RESEARCH & DEVELOPMENT¹⁵

**P25 DETERMINATION of CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE in RAT
BRAIN STEM TISSUES by LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY
IONIZATION-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Neva Alasağ¹, Erol Şener², Dilek Doğrukol-Ak², Fatma Töre³

¹Anadolu University, Health Science Institute, Department of Analytical Chemistry, 26470 Eskişehir, Turkey

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 26470 Eskişehir, Turkey

³Sanko University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 27090 Gaziantep, Turkey

(nalasa@anadolu.edu.tr)

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a neuropeptide that consist of 37 amino acid and belongs to calcitonin family. CGRP is widely distributed in the nervous and cardiovascular system. It acts as neuromodulator, but its presence in nervous tissues and blood vessels demonstrates that regulation of many processes. A very important function of CGRP is to control blood flow various organs by its potent vasodilatory activity [1]. The separation and quantification of peptides were the most challenging analytical tasks in complex biological samples [2]. Generally used methods of separations are sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), size-exclusion chromatography (SEC), radioimmunoassay (RIA), capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Recently developed methods such as quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometric (MALDI-MS) approaches or the coupling of electrospray ionization with high performance liquid chromatography led to the development of new LC-ESI-MS/MS techniques for peptide analysis [3].

The aim of the our study was LC-ESI-MS/MS method for the identification and quantitation of the CGRP in rat brain stem tissues. A gradient mobile phase used with a Zorbax C₈ 150x2.1 mm with a particle size of 3.5 µm narrow-bore column. Gradient elution mobile phase components consist of % 0.2 formic acid in water (A) and %0.2 formic acid in acetonitrile (v/v) (B). Flow rate was fixed at 0.2 mL/min. and CGRP eluted at 10.1 min. Mass spectra for CGRP obtained in positive ion mode and the ion transitions occurred m/z 952.200→1214. The method was found linear over the analytical range of 0.788-591 ng/mL by using a linear regression (weighted 1/x) with coefficients of correlations (r) ranging from 0.9903-0.9923. The LOQ was 0.788 ng/mL. Precision and accuracy were determined by measuring the concentration of CGRP in three replicates of quality control standards at three different concentrations (0.788, 78.8 and 591 ng/mL) for three separate batches. Intra-day precision was <%12.5, and calculated recovery was >%95. For the inter-day studies precision was <%10, and calculated recovery was >%87. According to the bioanalytical validation guideline published by the FDA, acceptable precision and accuracy results were achieved [4]. This method was applied to rat brain stem tissues to measure CGRP concentration.

References:

- [1] Sewald N., Jakubke H., Peptides: Chemistry and Biology, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, p:443-444.
- [2] Chandramouli K., Qian P., Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity, SAGE-Hindawi Access to Research Human Genomics and Proteomics, 2009:1-22, 2009.
- [3] Ban, E., Choi, O.K., Chung, W.Y., Park, C.S., Yoo, E.A., Chung, B.C., Yoo, Y.S., Influence of buffer composition and sample pretreatment on efficiency separation for monitoring neuropeptides in plasma using capillary electrophoresis, Electrophoresis., 22, 2173-2178 (2001).
- [4] Beaudry, F., Vachon, P., Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry, Biomed. Chromatogr., 20, 1344-1350 (2006).