

**POLİMERİK MEMBRANLARDAN KONTROLLÜ
İNSÜLİN SALIMININ KÜTLE SPEKTROMETRİK
TAYİNİ**

**MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF
CONTROLLED INSULIN-RELEASE FROM POLYMERIC
MEMBRANES**

BUSE KARDELEN VARLIOĞLU

PROF. DR. BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

POLİMERİK MEMBRANLARDAN KONTROLLÜ İNSÜLİN SALIMININ KÜTLE SPEKTROMETRİK TAYİNİ

BUSE KARDELEN VARLIOĞLU

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Nisan 2021, 75 sayfa

Dünya’da diyabet hastası sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastalığa insülin salımından sorumlu olan β hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirememesi ya da yıkımı neden olur. İnsülin hormonunun en önemli görevi karbonhidrat metabolizmasını düzenlemektir. Ayrıca yağ ve protein metabolizması için insülin hormonuna ihtiyaç vardır. Bu nedenle diyabet hastaları, hastalıklarını yönetmek için insülin almak zorundadırlar. Mevcut tedaviler hem psikolojik hem de fiziksel riskler içermektedir. Bu riskleri en aza indirecek ve hastaların yaşam kalitesini yükseltecek yeni tedavilere ihtiyaç vardır. İnsülin hormonu analizlerinde kromatografik yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir.

Tez kapsamında, insülin yüklü polimerik membranlardan, zamana bağlı olarak, insülin salım miktarı kromatografik teknikleri takiben kütle spektrometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Bu membranların insan vücuduna uyumlu şartlar altında salım yapabileceği uygun çözeltiler belirlenmiştir. Basit ve etkili şekilde insan vücuduna yapıştirılarak insülin salımı yapabilen polimerik membranların, ticari olarak üretilebilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda üç farklı insülin yüklü polimerik membran sentezlenmiştir. Hidroksipropil metakrilat ve hidroksipropil metakrilat-kitosan içeren membranların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek, membranlarda yüzey morfolojisi, partikül boyutu, sıcaklık ile bozunma davranışı ve polimerleşme özellikleri göz önünde bulunarak incelenmiştir. MALDI-MS ve ORBITRAP-MS analizleri gerçekleştirilerek membranların üç farklı çözücü içerisinde kalitatif ve kantitatif olarak insülin salım davranışları incelenmiştir.

Bu tez sonunda, Karakterizasyon çalışmalarından elde edilen bilgilerle membranlarda insülin tutulumu kanıtlanmıştır. Hidroksipropil metakrilat-kitosan-insülin içeren membranın hızlı ve yüksek miktarda insülin salımladığı görülürken, hidroksipropil metakrilat-insülin içeren membranın yavaş ve daha stabil insülin salım davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre hidroksipropil metakrilat-insülin içeren membranın kullanılabilirlik açısından daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Polimerik membran, insülin salımı, kütle spektrometrisi

ABSTRACT

MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF CONTROLLED INSULIN-RELEASE FROM POLYMERIC MEMBRANES

BUSE KARDELEN VARLIOĞLU

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

April 2021, 75 pages

The number of diabetes mellitus patients is increasing day by day in the world. This disease is caused by the failure or destruction of β cells responsible for insulin release. The most important task of the insulin hormone is to regulate carbohydrate metabolism. In addition, insulin hormone is needed for fat and protein metabolism. For this reason, diabetics have to take insulin to manage their illness. Current treatments include both psychological and physical risks. New treatments are needed to minimize these risks and improve the quality of life of patients. Chromatographic methods are frequently preferred in insulin hormone analysis. Within the scope of the thesis, the amount of insulin release from the insulin loaded polymeric membrane, depending on time, was measured using mass spectrometry following chromatographic techniques. Suitable solutions were determined that these membranes can release insulin under conditions compatible with the human body. It was aimed to contribute to the commercial production of polymeric membranes that can release insulin effectively by simply adhering to the human body.

For this purpose, three different insulin loaded polymeric membranes were synthesized. The characterization studies of membranes containing hydroxypropyl methacrylate and

hydroxypropyl methacrylate-chitosan have been carried out, and the surface morphology, particle size, temperature degradation behavior and polymerization properties of the membranes have been researched. MALDI-MS and ORBITRAP-MS analyzes, insulin release from membranes in three different solvents was observed qualitatively and quantitatively.

As a result of this thesis, the presence of insulin in the membranes has been proved via the characterization studies. While the membrane containing hydroxypropyl methacrylate-chitosan-insulin was observed to release rapid and high amounts of insulin, it was found that the membrane containing hydroxypropyl methacrylate-insulin showed a slow and more stable insulin release behavior. Accordingly, the membrane containing hydroxypropyl methacrylate-insulin is considered to be more suitable in terms of usability.

Key Words : Polimeric membrane, insulin release, mass spectrometry

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İNSÜLİN HORMONU	3
2.2. DİYABET HASTALIĞI	4
2.2.1. DİYABET HASTALIĞI TÜRLERİ	7
2.2.2. DİYABET HASTALIĞI TEDAVİ YÖNTEMLERİ	14
2.3. POLİMERİK MEMBRANDAN KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI	19
2.4. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ	20
2.4.1. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ CİHAZI BİLEŞENLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİBİ.....	21
2.4.2. İNSÜLİN HORMONUNUN KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZİ	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	31
3.2. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRAN SENTEZİ	31
3.3 İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SU, SODYUM KLORÜR ve FOSFAT TAMPONU İÇERİSİNDE SALINIMI	32
3.3.1. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SU İÇERİSİNDE SALINIMI.....	32
3.3.2. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ İÇERİSİNDE SALINIMI	33

3.3.3. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN pH: 7.4 FOSFAT TAMPONU İÇERİSİNDE SALINIMI	34
3.4. KALİBRASYON DOĞRUSU	34
3.5. MALDI-MS ANALİZ KOŞULLARI.....	35
3.6. ORBİTRAP-MS ANALİZ KOŞULLARI	36
3.7. KÜTLE SPEKTROMETRİK VERİ ANALİZİ.....	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	40
4.1. MEMBRANLARIN KARAKTERİZASYONU	40
4.1.1. FT-IR ANALİZLERİ.....	40
4.1.2. TGA-DTA ANALİZLERİ	42
4.1.3. SEM ANALİZLERİ	44
4.2. SU İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI.....	47
4.3. SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI	52
4.3.1. 0.05 M SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ DENEYLERİ	52
4.3.2. 0.1 M SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ DENEYLERİ	57
4.4. FOSFAT TAMPONU (pH 7.4) İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI	61
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2. 1.	İnsülin Direnci Ve Beta Hücreleri Arasındaki İlişki	11
ŞEKİL 2. 2.	MALDI İyon Oluşum Mekanizması	22
ŞEKİL 2. 3.	Elektrosprey İyonlaşma İşleminde İyon Oluşum Mekanizması	24
ŞEKİL 2. 5.	Orbitrap Kütle Analizörünün Şematik Gösterimi	27
ŞEKİL 2. 6.	Q-Exactive Plus Kütle Spektrometrisinin Şematik Gösterimi	28
ŞEKİL 2. 7.	Q-Exactive Plus Kütle Spektrometrisinin Detaylı Gösterimi	28
ŞEKİL 3. 1.	Standart İnsülin Hormonuna Ait Kalibrasyon Grafiği.....	35
ŞEKİL 3. 2.	(A) Su içerisinde 6saat inkübe edilen I-1 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu (B) Su içerisinde 6 saat inkübe edilen I-2.1 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu (C) Su içerisinde 6saat inkübe edilen I-2.2 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu.....	37
ŞEKİL 3. 3.	(A) 0.1 M Sodyum klorür çözeltisi içerisinde 2 saat süresince inkübe edilen membrandan salınan insüline ait toplam iyon kromatogramı (B) İnsülinin moleküler iyon sinyallerin gözlemlendiği pik bölgesi (C) 0.1 M Sodyum klorür çözeltisi içerisinde 2 saat süresince inkübe edilen membrandan salınan insüline ait kütle spektrumu	39
ŞEKİL 4. 1.	İnsülin içermeyen I-1 Membranı ve I-1 Membranına ait IR Spektrumu	41
ŞEKİL 4. 2.	İnsülin içermeyen I-2 Membranı, I-2.1 Membranı ve I-2.2 Membranlarına ait IR Spektrumu	42
ŞEKİL 4. 3.	İnsülin içermeyen I-1 Membranı ve I-1 Membranına ait TGA Analiz Termogramı	43
ŞEKİL 4. 4.	İnsülin İçermeyen I-2 Membranı, I-2.1 Membranı ve I-2.2 Membranına ait TGA Analiz Termogramı.....	44
ŞEKİL 4. 5.	I-1 Membranı SEM Görüntüleri (A) İnsülin içermeyen I-1 Membranı 100 ve 5 µm (B) I-1 Membranı100 µm 5 µm Büyütme Oranı İle Verilmiştir.....	45
ŞEKİL 4. 7.	I-1 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu.....	48
ŞEKİL 4. 8.	I-2.1 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu....	48
ŞEKİL 4. 9.	I-2.2 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu....	49
ŞEKİL 4. 10.	Su İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salınan insülin Miktarı-Zaman Grafikleri.....	50
ŞEKİL 4. 11.	I-1 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu.....	53
ŞEKİL 4. 12.	I-2.1 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	53
ŞEKİL 4. 13.	I-2.2 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	54

ŞEKİL 4. 14.	0.05M NaCl İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri	55
ŞEKİL 4. 15.	I-1 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	57
ŞEKİL 4. 16.	I-2.1 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	57
ŞEKİL 4. 17.	I-2.2 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	58
ŞEKİL 4. 18.	0.1 M NaCl İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri	59
ŞEKİL 4. 19.	I-1 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	61
ŞEKİL 4. 20.	I-2.1 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	62
ŞEKİL 4. 21.	I-2.2 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu	62
ŞEKİL 4. 22.	Fosfat Tamponu İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait % Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2. 1.	Diyabet Hastalığı Teşhis Testlerine Göre Glikoz Miktarı	7
ÇİZELGE 2. 2.	Diyabet Hastalığının Etiyolojik Sınıflandırılması	8
ÇİZELGE 2. 3.	Diğer Diyabet Hastalığı Türleri Ve Alt Grupları	13
ÇİZELGE 2. 4.	Kütle Spektrometrisi Temel Bileşenleri	21
ÇİZELGE 3. 1.	DeneySEL Akış Şeması.....	30
ÇİZELGE 3. 2.	İnsüline Ait Moleküler İyonların Kütle/Yük Değerleri	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

Å	Amstrong
°C	Celcius
M	Molarite
Mw	Molekül ağırlığı

KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik Basınçlı Kimyasal İyonlaşma
APPI	Atmosferik Basınçlı Fotoiyoniyonlaşma
CID	Çarpışma Kaynaklı Ayrışma
Da	Dalton
ESI	Elektrosprey İyonlaşma
FTMS	Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonansı Kütle Spektrometrisi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü- İnfrared Spektrometresi
HCD	Yüksek Enerjili Çarpışma Ayrışma
IGT	Bozulmuş Glikoz Toleransı
KS	Kistik fibrosiz
LC-MS	Sıvı faz kütle spektrometrisi
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometrisi
m/z	Kütle/ yük

NGT	Normal Glikoz Toleransı
T1D	Tip 1 Diyabet
T2D	Tip 2 Diyabet
mL	mili litre
mg	miligram
TOF	Uçuş Zamanlı
Q	Dört kutuplu
Q-TOF	Dört kutuplu uçuş zamanlı
μm	Mikrometre
μL	Mikro litre
DHB	2,5-dihidroksi benzoik asit
TOF	Uçuş zamanlı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz

1. GİRİŞ

Hormonlar, canlıların yaşamında önemli rollere sahip kimyasal habercilerdir. Hormon mekanizmalarının düzenli çalışması insan vücudunun yapması gereken işlevleri gerçekleştirebilmesi açısından oldukça önemlidir. Vücutta yeterli miktarda olmadıklarında, etkiledikleri mekanizmalardan dolayı insanlarda çeşitli hastalıklar görülmektedir. İnsülin hormonu da insan vücudunda sentezlenen ve vücutta meydana gelen metabolik olaylarda önemli role sahip bir hormondur. İnsülin hormonunun eksikliği ya da yokluğu halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen diyabet hastalığına neden olmaktadır. Yaşamsal önemi olan bu hormonun yeri başka bir madde tarafından doldurulamaz, bu nedenle vücutta salgılanmadığı durumlarda hormonun dışarıdan vücut içerisine alınması hayatın devamlılığı açısından önemlidir.

Günümüzde diyabet hastaları, hastalıklarının durumuna göre deri altı enjeksiyonu ya da oral yolla alınan diyabet ilaçları sayesinde yaşamlarını sürdürmektedirler. Ancak tedavi süreci kişinin yaşamı boyunca devam etmelidir. Oral yolla ilaç kullanmak ya da enjeksiyon tedavisi kişinin sağlık durumuna göre belirlenmektedir, bu nedenle tedavi yöntemi bir seçenek değil doktor tarafından belirlenen bir zorunluluktur. Hastaların sürekli olarak ilaçlara erişimleri olmalıdır. Aynı zamanda hapları yutarken zorlanmamalı, iğneden korkmamalı, doğru şekilde iğne vurulmayı öğrenmeli, sürekli olarak iğne vurulmanın yan etkilerinden fiziksel ve psikolojik olarak etkilenmemelidirler. Tedavi sürecinin hayat boyu devam ettiği ve diyabet hastalığının tedavisinin hastaya uygun şekilde yapılmadığında meydana gelebilecek diğer komplikasyonlar düşünüldüğünde bu tedavi yöntemleri her hasta için uygun değildir. Bu nedenler hastaların sağlıklarını belli bir seviyede tutarken aynı zamanda yaşam kalitelerini de en az düzeyde etkileyecek yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Günümüzde kişiye yönelik tedavi uygulanmasının başarısı görülmüş ve tedavi yöntemleri seçerken hastanın yaşam koşulları da göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır. Hastaların karşılaştıkları acıyı azaltmak ve kanda bulunan glikoz miktarının ani olarak değişmesinin önüne geçmek hasta için daha iyi bir tedavi ortamı oluşturacaktır. Bu amaç doğrultusunda içerisinde insülin hormonu bulunan polimerik membranların farklı ortam koşullarında kontrollü olarak zamana bağlı şekilde insülin salımı miktarı kütle spektrometrisi aracılığıyla incelenmiştir. Polimerik membranın kullanılacağı

optimum koşullar belirlenmiştir. Bu sayede, ticari olarak diyabet hastalığı tedavisinde kullanılabilir, pratik ve etkin insülin salımı yapabilen bantların geliştirilmesine olanak sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSÜLİN HORMONU

Hormonlar, ilk olarak Ernest Starling tarafından vücudun farklı bölümlerinin büyümesini ve faaliyetlerini kontrol eden, kan yoluyla hücreden hücreye aktarılan kimyasal haberciler olarak tanımlanmıştır [1]. 20. Yüzyılın başlarında Starling'in tanımından sonra bu konuda yapılan araştırmalar, hormonların salınmaması, az miktarda ya da çok miktarda salınmasının çeşitli hastalıklara yol açtığını göstermiş ve hormonların insan hayatında sahip olduğu önemin anlaşılmasını sağlamıştır.

Pankreas üzerinde 1869 yılında keşfedilmiş Langerhans adacıkları bulunur, Laguesse bu adacık hücrelerinin bir iç salgı ürettiğini keşfetmiştir ve 1911 yılında Bensley tarafından yapılan çalışmalar pankreasın endokrin sistemin bir parçası olduğunu kanıtlamıştır [2]. Hormonlar kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldığında, peptid yapısındaki hormonlardan olan insülin, glukagon ve somatostatin hormonları Langerhans adacıklarında üretilir. Bu adacıklar üzerinde bulunan her bir hücre tipi tek bir hormonun üretiminden sorumludur. Glukagon hormonu pankreas üzerinde bulunan alfa (α) hücrelerinde üretilirken, insülin hormonu beta (β) hücrelerinde üretildiği, depolandığı ve vücudun ihtiyacı olduğunda salınımının yapıldığı gözlemlenmiştir. Glukagon hormonu kandaki şeker miktarını artırıcı şekilde davranırken insülin hormonunun salınımını azaltıcı yönde bir etki gösterir [3].

20. yüzyılın ortalarında moleküler biyolog Frederick Sanger, keşfedilen ilk peptid hormonu olan insülin hormonunun, aminoasit dizilimini çözmüş ve 1958 yılında çalışmalarından dolayı Kimya alanında Nobel Ödülü almıştır. İnsülin hormonu, insanlarda metabolizma faaliyetlerinin düzenlenmesinde önemli görevlere sahip hormonlardan biridir. İnsülin hormonunun molekül ağırlığı 5,8 kDa'dır. A zinciri üzerinde 21 aminoasit, B zinciri üzerinde ise 30 aminoasit bulunmaktadır. A ve B zincirleri birbirlerine iki disülfid bağı aracılığıyla bağlıdır ve disülfid bağları sistin aminoasitleri arasında oluşmuştur. Ayrıca insülin hormonu yapısında A zinciri üzerinde bir adet zincir içi disülfid bağı bulunmaktadır [4-6]. İnsülin hormonunun preproinsülin ve proinsülin olmak üzere iki tane öncü molekülü vardır. Preproinsülin, proinsülin oluşumunun öncü molekülüdür ve proinsülin, insülin hormonun öncü molekülüdür. İnsülin hormonu A ve B zinciri şeklinde sentezlenmeyip, tek bir zincir olan proinsülinin

A zincirinde bulunan NH₂ ucu ile B zincirinde bulunan COOH ucu, C-peptid olarak bilinen bir peptid ile bağlanmasıyla oluşmuştur. İnsanlarda C-peptid grubunda 35 aminoasit bulunmaktadır [7, 8]. Proinsülin hormonundan insülin hormonu sentezi sırasında meydana gelen bir mutasyon canlılarda diyabet hastalığına yatkınlığa neden olabilir. Proinsülin hormonu senteziyle ilgili yapılan bir deneyde ailesel bağları olan bireylerde kanda yüksek miktarda proinsülin bulunması hastalığı incelenmiş ve proinsülin hormonu sentezi gerçekleşirken C-peptid ve insülin molekülü arasında meydana gelen bir mutasyonun karbonhidrat toleransını etkilediği gözlemlenmiş ve bu durum diyabet hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [9].

İnsülin hormonu hem uyarıcı hem de engelleyici görevleri olan bir hormondur. En önemli görevi karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesidir, bunun yanı sıra yağ ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynar. Glikoz alımını ve lipid sentezini uyarır. Lipoliz, proteoliz, glikojenoliz, glukoneogenez ve ketogenez gibi parçalanma süreçleri insülin hormonunun kontrolünde gerçekleşir [10, 11]. İnsan metabolizmasında, insülin hormonunun sahip olduğu görevler kişinin yaşamının sürekliliği açısından önemlidir, bu nedenle eksikliği ya da az salgılanması kanda bulunan glikoz miktarının artmasına neden olur ve bu durum diyabet hastalığı olarak adlandırılır. Diyabet hastalığı tedavi edilmediğinde kişinin ölümüne yol açabilecek ciddi bir hastalıktır.

2.2. DİYABET HASTALIĞI

Doğumdan itibaren insanlar yaşamlarını sürdürebilmek için beslenmek zorundadırlar. Vücutlarının ihtiyacı olan enerjiyi, besinler yardımıyla alırlar. Bedensel ve zihinsel gelişimin tamamlanması ve sağlıklı bir yaşamın sürdürülebilirliği için bebeklikten itibaren tüketilen gıdaların türü ve miktarı çok önemlidir. Sağlıklı beslenen insanların yaşam kalitesi yükselir, hastalıklara yakalanma oranları azalır, sağlıklı bir vücuda ve zihne sahip olurlar. Sağlıklı beslenme ile yeterli ve doğru miktarda alınan besinler insan vücudunun ihtiyacı olan enerjiyi sağlamanın yanı sıra hastalıklara karşı direnç kazanılmasına, vitaminlerin ve minerallerin vücuda alınmasına, organların sağlığını korumasına, hücre yenilenmesi ve dokuların onarımının sağlanmasına vb. yardımcı olmak gibi birçok göreve sahiptirler. İnsanların her an sağlıklı besinlere ulaşamaması, sağlıklı yiyecekleri hazırlamanın uzun zaman alması, ekonomik açıdan sağlıklı beslenmenin daha pahalı olması, hazır gıdaların kolay ulaşılabilir olması gibi sebepler

nedeniyle insanların beslenme düzenleri yeniden şekillenmiş ve kızartmalar, dondurulmuş gıdalar ve fastfood ürünlerin tüketiminin artmasına neden olmuştur. Bu sağlıksız beslenme ortamı insanların temel enerji kaynakları olan karbonhidratları, yağları ve proteinleri farklı oranlarda tüketmelerine ve genellikle dengesiz beslenmenin bir sonucu olarak hastalıklara sebep olmuştur.

Besinler tüketildikten sonra sindirim süreci başlar. Sindirim süreci alınan besinlerin parçalanmasına ve insanın ihtiyacı olmayan kısmın vücuttan uzaklaştırılmasına kadar geçen süreçtir. Bu süreç içerisinde karbonhidratlar, yağlar ve proteinler vücudun ihtiyacı olan enerjiyi karşılamak üzere parçalanırlar ve kan yoluyla hücrelere aktarırlar. Karbonhidratlar, şeker diye adlandırdığımız (monosakkaritlere) glikoz ve türevi yapılara parçalanırlar. Kanda bulunan glikoz miktarı arttığında pankreas üzerindeki beta hücrelerinden insülin hormonu salgılanır ve bu hormonun etkisiyle, kandaki glikoz miktarını azaltmak amaçlanır.

Diyabet hastalığı, insülin hormonunun eksikliğinden, yeterli miktarda salınamamasından ya da insülin hormonunun etkinliğinden kaynaklı olarak kanda bulunan şeker miktarının düzenlenememesine (hiperglisemi) neden olan metabolik bir durumdur. Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2019 verilerine göre; her 11 yetişkinden birinde diyabet hastalığı görülmektedir. Ayrıca 2040 yılına gelindiğinde her 10 yetişkinden birinin diyabet hastalığına yakalanacağı tahmin edilmektedir. 2019 verilerini incelediğimizde; diyabet hastalığı ve bu hastalığın neden olduğu semptomlardan kaynaklı olarak yaklaşık 4,2 milyon yetişkin hayatını kaybetmiştir. 2019 yılında Dünya genelinde diyabet hastalığı incelendiğinde yetişkinlerde (20-79 yaş), 463 milyon kişinin diyabet hastası olduğu bilgisinden yola çıkarak yapılan istatistiki çalışmalarda hastalık ile ilgili önlemler alınmazsa 2030 yılında hasta sayısının 578 milyon ve 2045 yıllarında ise 700 milyon diyabet hastasının olacağı öngörülmüştür. Bu sonuca göre, diyabet hastası sayısı 2019 yılına göre yaklaşık % 51' lik artış gösterecektir. Aynı zamanda 2045 yılında Türkiye'de 20-79 yaş aralığındaki yaklaşık hasta sayısının 10.4 milyona ulaşacağı ve Türkiye'nin diyabet hastalığının en yaygın olduğu 10 ülkeden biri haline geleceği ön görülmektedir [12]. Hastalığın önlenme çalışmalarının yapılması çok önem arz etmekle birlikte, var olan ve gelecekte hastalanma potansiyeli olan insanlar için daha iyi tedavi yöntemlerine yönelmek, hastaların yaşam kalitelerini korumaları ve belki de yükseltmeleri açısından hayati öneme sahiptir. Diyabet hastalığı, Dünya genelindeki her yaş grubundaki insanı, cinsiyet, ırk ayırt etmeden etkileyebilecek bir hastalıktır. Tedavisi hastada ömür boyu

takip edilmesi, sürekli doktor kontrollerine ihtiyaç duyulması ve diyabet hastalığının uzun vadeli etkileri düşünüldüğünde hastalığın tedavi sürecinin iyi takip edilmesi ve mümkün olduğunca kandaki şeker miktarının normal seviyelerde tutulmasının sağlanmalıdır. Hastanın süreç boyunca daha az yıpranmasına ve hastalığı en az acılı şekilde geçirilmesine katkı sağlayacak çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Diyabet hastalığı kilo kaybı, bulanık görme, poliüri (sık idrara çıkma), polidipsi(aşırı susuzluk) ve bazen obezite gibi belirtilerle varlığını gösterir [13].

İnsülin hormonunun salınımında ya da işlevinde bir bozukluk meydana geldiğinde, insan metabolizmasında sahip olduğu görevlerde de aksaklıklar ve bozukluklar olabilir. Bu durumda diyabet hastalığının yanı sıra başka hastalıklar da meydana gelebilir. Uzun süreli diyabet hastalarında mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar görülmektedir. Kalp ve kan damarları, sinirler, böbrekler ve gözler diyabet hastalığından etkilenir. Uzun süreli diyabet hastalarında; görme kaybı, böbrek yetmezliği, ayak ülseri, Charcot eklemi, uzuvların amputasyonu, cinsel işlev bozukluğu, gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler septomlar gözlemlenebilir [13]. Görme kaybı, diyabetik nöropati ve diyabetik nefropatiler mikrovasküler komplikasyonlardır. Uzun süreli diyabet hastalığı, 20-74 yaş aralığındaki yetişkinlerde görme kaybının artma nedenidir. Aynı zamanda kronik böbrek yetmezliğinin bir nedeni de, diyabetik nefropatidir ve böbrek yetmezliği hastalığının en sık oluşum nedeni diyabet hastalığıdır. Diyabetik nöropatiler, diyabetin sinirler üzerindeki etkisinden kaynaklı heterojen bir hastalık grubudur. Makrovasküler komplikasyonlar kalp ve damarlarda meydana gelen hastalıkları anlatmaktadır [14, 15]. Bu komplikasyonların etkilerini azaltmak ya da meydana gelmemelerini sağlamak için kanda bulunan şeker miktarının kontrolünün sağlanması önemlidir.

Diyabet hastalığının varlığını anlamak için birçok farklı test uygulanabilir. Açlık plazma glikozu testi (FPG) 8 saat boyunca kalori alınmadığında, oral glikoz tolerans testi 2 saatlik açlık sonrasında, A1C testi (son 3 ayda hemoglobine bağlanan serbest şeker miktarını tespit eder), klasik hiperglisemi semptomları olan hastada rastgele plazma glikozu değerinin ölçülmesi ile diyabet hastalığı teşhis edilebilir [16].

ÇİZELGE 2. 1. Diyabet Hastalığı Teşhis Testlerine Göre Glikoz Miktarı [16]

TEST	GLİKOZ MİKTARI
AÇLIK PLAZMA GLİKOZU	≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
ORAL GLİKOZ TOLERANSI	≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
A1C	≥ %6.5 (48mmol/mol)
RASTGELE GLİKOZ MİKTARI ÖLÇÜMÜ	≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

Çizelge 2.1’ de diyabet hastalığı için yapılan testler ve glikoz miktarları verilmiştir. Ölçümler bu değerlerden fazla olduğunda diyabet hastalığı varlığı kanıtlanmış olur [16]. Diyabet hastalığının ve türünün belirlenmesi tedavi olanağı sağladığı için hastanın yaşam kalitesinin yükselmesine olanak sağlar, aynı zamanda diyabet hastalığının neden olabileceği diğer hastalıklar için önlem alınabilmesine yardımcı olması açısından çok önemlidir. Diyabet, genel bir adlandırma olup hiperglisemiye sebep olan birçok alt gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplardan en yaygın olarak karşılaşılanlar tip 1 diyabet (T1D) ve tip 2 diyabet (T2D) hastalığıdır. Alt gruplar birbirlerinden kesin olarak ayrılmamıştır. Bu gruplar dışında kalan diyabet hastalığı türleri vardır [17].

2.2.1. DİYABET HASTALIĞI TÜRLERİ

Hiperglisemi (kandaki şeker değerinin yüksekliği) tüm diyabet hastalığı türlerinin ortak özelliğidir. Diyabet hastalığı, hastalığın oluşma sebebine bağlı olarak alt gruplara ayrılır. Diyabet hastalığının alt gruplarının bilinmesi, tedavi sürecinin doğru yönlendirilmesine olanak sağlar [18].

ÇİZELGE 2. 2. Diyabet Hastalığının Etiyolojik Sınıflandırılması [13]

TİP 1 DİYABET HASTALIĞI	<ul style="list-style-type: none">• İmmunolojik• İdiyopatik
TİP 2 DİYABET HASTALIĞI	<ul style="list-style-type: none">• Tipik• Tipik olmayan
GESTASYONEL DİYABET HASTALIĞI	
DİĞER SPESİFİK DİYABET HASTALIĞI (Diğer hastalıkların sonucu olarak, Dolaylı yoldan maruz kalınan)	<ul style="list-style-type: none">• Beta hücrelerinin genetik yıkımı• İnsülin salgımadaki genetik bozukluk• Ekzokrin pankreas hastalıkları• Endokrinopatiler• İlaç ya da kimyasal kaynaklı• Enfeksiyonlar• İmmun aracılı diyabetin nadir formları• Genetik sendromlarla ilişkili diyabet hastalığı

2.2.1.1. TİP 1 DİYABET HASTALIĞI

Pankreatik beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu insülin eksikliğinden kaynaklanan hiperglisemi ile tip 1 diyabet (T1D) hastalığı meydana gelir. Çocukluk çağında meydana gelen en yaygın endokrin ve metabolik hastalıktır. Semptomlar başlamadan uzun süre önce otoantikörler oluşmaktadır ve bu otoantikörler otoimmünite gelişiminin

biyobelirteçleridir [19, 20]. Diyabet hastalığı teşhisi konulduktan sonra, diyabet hastalığıyla ilişkili otoantikörlerin varlığı kontrol edilerek otoimmün kaynaklı T1D teşhis edilir, böylece hastanın tip 1 diyabet mi yoksa tip 2 diyabet mi olduğuna karar verilir [18]. Tip 1 diyabet hastalığı ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda yaş, cinsiyet, ırk, genotip, coğrafi konum gibi faktörlere göre hasta sayısındaki değişim gözlemlenmektedir [21]. Kişide T1D hastalığı gelişmesinde hem çevresel hem de genetik faktörler etkilidir [22]. Yaşamın sürdürülebilmesi için insüline bağımlılık vardır. Beta hücresi yıkım hızı değişkendir, çocuk ve gençlerde beta hücresi yıkımı yetişkinlere göre daha hızlıdır. Ayrıca, çocuk ve gençlerde ketoasidoz varlığı diyabet hastalığı belirtisi olabilir [16]. T1D hastalığı ilerledikçe, hastadaki C-peptid seviyesi düşük miktardadır, ayrıca hasta dışarıdan insülin almaya bağımlı hale gelir. İdiyopatik tip 1 diyabet hastalığının ise nedeni bilinmemektedir, bu hastalarda bağışıklık tepkileri ya da otoimmün yıkım gözlenmediği halde ketoasidoz varlığı ve kesin bir insülin hormonu yoksunluğu vardır ve genellikle kalıtsal olarak genlerle aktarılır [13, 19]. Ketoasidoz varlığı ve C-peptid seviyesindeki düşüş tip 1 diyabet hastalarında yaygın olarak görülse de, tip 2 diyabet hastalarında da bulunabileceğinden hastalığın sınıflandırılmasında kullanılmamalıdır [23]. Haşimato tiroidi ve Addison hastalığı gibi hastalıklara sahip bireyler arasında Tip 1 diyabet hastalığı yaygın olarak görülmektedir [24].

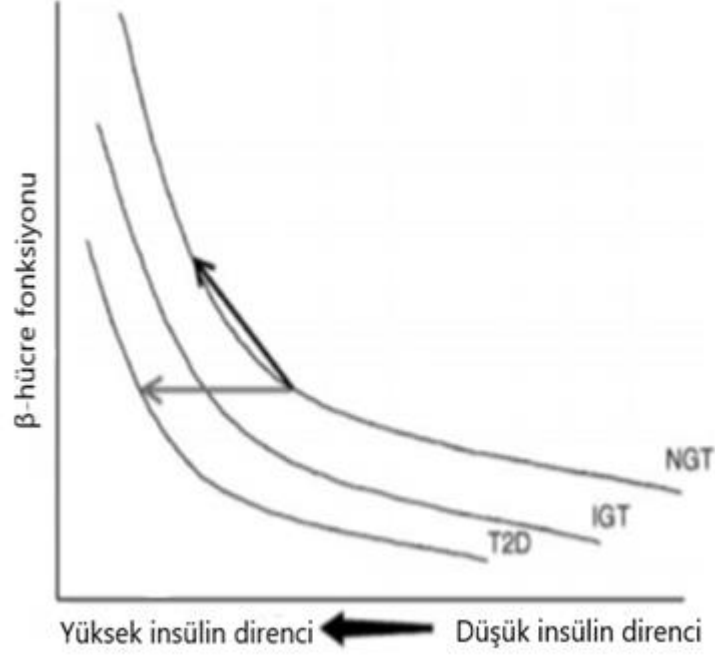
2.2.1.2. TİP 2 DİYABET HASTALIĞI

Dünya genelinde en yaygın diyabet hastalığı türü tip 2 diyabet hastalığıdır ve hastaların %90'lık kısmını kapsamaktadır.

İnsülin direnci ve metabolik sendrom özelliklerine bağlı olarak tip 2 diyabet (T2D) hastalığı ortaya çıkar [20]. Düşük insülin duyarlılığı ve orta derecede insülin salınım sorunu vardır [18]. Bu gruptaki hastaların bazıları insüline ihtiyaç duymazken, bazıları dışarıdan insülin hormonu almak zorundadır. T2D hastalığında insülin salınımı kusurludur ve insülin direncini azaltmak için yeterli değildir. Hiperglisemi uzun bir süre içerisinde gelişir ve diyabet semptomları hastalığın teşhis edilebileceği kadar belirgin değildir, bu nedenle hastalığın teşhis edilmesi zordur. Yaş, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği hastalığın gelişmesi için etken olabilir. Bu hasta grubunda çevresel sinir sistemi bozuklukları, görme problemleri, damar tıkanıklığı gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar görülebilir. Genetik faktörlerin T2D hastalığında etkili olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir [13].

İnsülin hormonu vücut yağ kütlesiyle orantılı olarak vücutta dolaşıma katılır ve kan-beyin bariyerini biyolojik aktivitesini koruyacak şekilde geçerek beyine ulaşır. Beyin insülin hormonuna duyarlılık göstermektedir. Beyindeki leptin hormonu, insülin hormonu ve besinlerle ilgili sinyaller, beyinin vücutta yağ içeriği ve insülin duyarlılığı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Merkezi sinir sistemine giden sinyallerdeki bir bozulma kilo alımına, obeziteye ve insülin direncine sebep olmaktadır. İnsülin sentezinde meydana gelen bir sorun/bozulma beyine ve diğer organlara insülin hormonunun iletiminin azalmasına sebebiyet verebilir ve bu durum tip 2 diyabet hastalığının gelişimine yol açabilir. Ayrıca obezite ile leptin ve insülin hormonları arasında ilişki bulunmaktadır ve obezite insülin duyarlılığında bozulmaya sebebiyet verebilir, bu durumda kan plazmasındaki glikoz seviyesi artar ve kişilerde diyabet hastalığı ortaya çıkar [25-27].

Beta hücre fonksiyonundaki azalma, insülin direncindeki artış ve tip 2 diyabet (T2D) arasında bir ilişki görülmektedir (Şekil 2.1). Bireyde normal miktarda beta hücresi bulunduğu ve normal glikoz miktarı bulunuyorsa, normal glikoz toleransı (NGT) gözlenmiş ve siyah okla gösterilmiştir, ancak beta hücre fonksiyonunun yeterli olmaması ve bozulmuş glikoz toleransına (IGT) sahip bireyde insülin direncinin arttığı durumda kişide normal glikoz toleransı yerine bozulmuş glikoz toleransı gerçekleşir ve gri okla gösterildiği gibi bu tip 2 diyabet hastalığının gelişimine yol açar. Kilo verme, egzersiz ve insülin duyarlılığı düşük insülin direncine, ergenlik, obezite, insülin reseptörlerinde meydana gelen bir bozulma, steroid ilaçları ve antipsikotik ilaçlar yüksek insülin direncine sebep olabilir [28].



ŞEKİL 2. 1. İnsülin Direnci Ve Beta Hücreleri Arasındaki İlişki Bireylere damar içi insülin yüklemesi yapılmış ve Y ekseninde beta hücrelerinin cevap fonksiyonu, X ekseninde ise insülin direnci ifade edilmiştir [28].

2.2.1.3. GESTASYONEL DİYABET HASTALIĞI

Diyabet teşhisinin hamilelik sırasında konulduğu ya da hamilelik sırasında başlayan değişken karbonhidrat toleransına dayalı diyabet hastalığıdır. Hamilelik sırasında insülin kullanımı ve diyetler yardımıyla kontrol altında tutulması sağlanır. Hamileliğin ilk zamanlarında normal glikoz toleransı olması, ilerleyen süreçte diyabetin gelişip gelişmeyeceğini belirlemez. Hamilelik öncesinde tip 2 diyabet hastalığı olanlar, obez insanlar, yaşlı kadınlar, belirli yüksek riskli etnik gruplardan olan kadınların hamilelikte hiperglisemiyle karşılaşma açısından en riskli gruptur [29-31].

Hamilelerde diyabet hastalığının teşhis ve tedavi edilmesi hem anne hem de bebek için çok önemlidir. Eğer hasta tedavi edilmezse anne için sağlık problemleri meydana gelebilir, aynı zamanda bebeğin hipoglisemi olarak bilinen düşük kan şekeri ile dünyaya gelme ihtimali oluşur [32].

- Şeker yükleme testinde hastaya 50 gram glikoz içirilir (şekerli su) 1saat sonra plazmadaki glikoz miktarı ölçülür, glikoz seviyesi 140 mg/dL (7.8 mmol/L) altındaysa normal kabul edilir, üstündeyse gerekli koşullar sağlanarak 3 günlük 100 gram glikoz yüklemesi yapılarak test tekrarlanır ve açlık plazma glikoz

miktarı 1, 2 ve 3. Saatlerde plazma glikoz miktarı ölçülür. Açlık durumunda >95mg/dL(5.3 mmol/L), 1. Saatte >180mg/dL(10.0 mmol/L), 2. Saatte >155mg/dL (8.6mmol/L) ve 3. Saatte >140mg/dL (7.8 mmol/L) plazma glikoz değerlerinden herhangi iki sonucun fazla çıkması durumunda hastada gestasyonel diyabetin varlığı teşhis edilir.

- Oral glikoz tolerans testinde açlık kan şekeri ölçümleri 100mg/dL ve 126mg/dL olan bireylerde yapılır, en az 8saatlik olmak üzere bütün gece açlık sonrasında, 75g glikoz yüklemesi yapılır, açlık 1.saat ve 2.saatte plazma glikoz miktarı ölçülür. Açlık ≥ 92 mg/dL (5.1 mmol/L) 1.saat ≥ 180 mg/dL (10.0 mmol/L) ve 2.saat ≥ 153 mg/dL (8.5 mmol/L) plazma glikoz şekerinin bu değerlerden büyük çıkması durumunda kişiye gestasyonel diyabet teşhisi konur [13, 29, 32].

2.2.1.4. DİĞER ÖZGÜN DİYABET HASTALIĞI TÜRLERİ

Çizelge 2.3. de belirtilen diyabet hastalığı türleri diğer diyabet hastalığı gruplarına hastalığın oluşma nedeninin daha farklı olmasından dolayı girmeyen diyabet hastalıklarıdır. Alt gruplarda belirtilen hastalıklar, ilaçlar gibi vücut dışından gelen etkilere maruz kalmak sonucunda diyabet hastalığının gelişimi gözlenebildiği gibi vücuttaki genetik yıkım ya da bozukluk kaynaklı da diyabet hastalığı gelişimi gözlemlenmektedir.

ÇİZELGE 2. 3. Diğer Diyabet Hastalığı Türleri Ve Alt Grupları [13]

ETİYOLOJİK OLARAK DİĞER DİYABET HASTALIĞI TÜRLERİ	ALT GRUPLARI
BETA HÜCRELERİNİN GENETİK YIKIMI	<ul style="list-style-type: none"> • MODY 1 • MODY 2 • MODY 3 • MODY 4 • MODY 5 • MODY 6 • MODY 7 • GEÇİCİ YENİ DOĞAN DİYABETİ • KALICI YENİ DOĞAN DİYABETİ • DİĞER TÜRLER
İNSÜLİN SALIMINDAKİ GENETİK BOZUKLUK	<ul style="list-style-type: none"> • TİP A İNSÜLİN DİRENCİ • LEPRİKONİZM • RABSON-MENDENHALL SENDROMU • LİPOATROFİK DİYABET • DİĞER TÜRLER
EKZOKRİN PANKREAS HASTALIKLARI	<ul style="list-style-type: none"> • PANKREATİT • TRAVMA / PANKREATEKTOMİ • NEOPLAZİ • KİSTİK FİBROZ • HEMOKROMATOZ • FİBROKALSÜLOZ PANKREATOPATİ • DİĞER TÜRLER
ENDOKRİNOPATİLER	<ul style="list-style-type: none"> • AKROMEGALİ • CUSHİNG SENDROMU • GLUKAGONOM • FEOKROMOSİTOMA • HİPERTİROİDİZM • SOMATOSTATİNOMA • ALDOSTERONOMA • DİĞER TÜRLER
İLAÇ YA DA KİMYASAL KAYNAKLI	<ul style="list-style-type: none"> • VACOR • PENTAMİDİN • NİKOTİNİK ASİT • GLUKOKORTİKOIDLER • TİROİD HORMONU • DİAZOKSİT • B-ADRENERJİK AGONİSTLER • TİAZİDLER • DİLANTİN • G-İNERFERON • DİĞER TÜRLER
ENFEKSİYONLAR	<ul style="list-style-type: none"> • KONJENİTAL KIZAMIKÇIK • SİTOMEGALOVİRÜS • DİĞER TÜRLER
İMMUN ARACILI DİYABETİN NADİR FORMLARI	<ul style="list-style-type: none"> • STİFF-PERSON SENDROMU • ANTI-İNSÜLİN RESEPTÖR ANTİKORLARI • DİĞER TÜRLER
GENETİK SENDROMLARLA İLİŞKİLİ DİYABET HASTALIĞI	<ul style="list-style-type: none"> • DOWN SENDROMU • KLİNEFELTER SENDROMU • TURNER SENDROMU • WOLFRAM SENDROMU • FRIEDREİCH ATAKSİSİ • HUNTINGTON KORE • LAURENCE-MOON-BİEDL SENDROMU • MİYOTONİK DİSTROFİ • PORFİRİ • PRADER-WİLLİ SENDROMU

2.2.2. DİYABET HASTALIĞI TEDAVİ YÖNTEMLERİ

İnsülin hormonu metabolik süreçlerin yönetiminde görev almaktadır ve normal şartlarda hayat boyu insan vücudunda salgılanması gereken bir hormondur, bu nedenle diyabet hastalığı kesin tedavisi uygulanan bir hastalık değil, yaşam boyu kontrol altına alınması gereken bir hastalıktır. Günümüzde kişiselleşmiş tedaviye yönelimler artmış hastanın yaşam kalitesini belli bir standardın üzerinde tutarak, hastaya en az acılı ve en etkili tedavi yöntemi uygulanarak hastalık süreci kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Hastanın tedaviye uygulayabilecek durumda olması, hastanın yaşı, kan şekeri düzeyi, beslenme alışkanlığı, diyabet hastalığının türü ve hastalığın hangi aşama da olduğuna göre insülin terapisi, anti diyabetiklerin kullanımı, tıbbi beslenme tedavisi, fiziksel aktivite gibi tedavi yöntemleri bir arada ya da ayrı ayrı hastaya uygulanabilir. Bu süreçler içerisinde kişinin psikolojik durumu da sık sık kontrol edilmeli gerekirse destek alması sağlanmalıdır.

Fiziksel aktivite, diyabet hastalarının hepsinde yararlı olmamakla birlikte doktor kontrolünde ve doktorun önerdiği şekilde yapılması gereken yardımcı bir tedavidir. Fiziksel aktivite sırasında vücuda daha fazla oksijen gider ve besinlerin parçalanması sonucu oluşan şeker kaslar tarafından kullanılır. Kandaki şeker miktarının azalması hipoglisemi ihtimalinin ortaya çıkmasına neden olur, bu nedenle her hasta için uygulanan bir yöntem değildir.

Tip 1 diyabet hastalarında vücutlarında yeterli insülin olmadığında hipoglisemi riski oluşur, tip 2 diyabet hastalarında ise insülin duyarlılığını arttırabilir ve yüksek kan şekeri değerlerinin normal aralığa gelmesine yardımcı olur. Düzenli fiziksel aktivite, tip 2 diyabet hastalarının karbonhidrat metabolizmalarının uzun süreli olarak kontrol altında tutulmasına yardımcı olur [33].

Tıbbi beslenme tedavisi, diyabet hastaları için en önemli konulardan biridir. Diyabet hastalığının tedavisinde glisemik indekse göre yani besinlerin kan şekeri üzerine etkilerine göre tedavi uygulanır. Glisemik indeksi çok yüksek gıdaların tüketimi insüline olan ihtiyacında fazla olmasına neden olur. Beslenme, diyabetli ve diyabet olma ihtimali olan hastalar için hastalığın kontrolü açısından önemlidir. Kardiyovasküler hastalıklar, obezite gibi diyabet hastalığını etkileyebilecek ya da diyabet hastalığından etkilenebilecek durumların oluşmaması ya da oluşumunun geciktirilmesine yardımcı etkisi vardır. Hastanın genel sağlığını belli bir düzeyde tutmak için doktor kontrolünde diyet programları hazırlanmalıdır. Hastanın yaşı, hastalığın kaç yıldır ve hangi tip olduğu,

başka hastalıklarının olup olmamasına göre kişiye özel günlük bir diyet programı hazırlanmalıdır [34].

Hastaların diyabet ile en uygun koşullarda yaşamasının yolu kanlarındaki glikoz miktarını normal kan şekeri düzeyinde tutmalarıdır. Düzenli bir beslenme ve fiziksel egzersiz programı buna yardımcı olur. Hastaların bu programları uygularken hastalıklarının türüne ve şiddetine göre anti diyabetik ilaçlar ya da insülin tedavisi alması gerekebilir. Bu tedaviler işe yaramadığında ise sağlıklı bir pankreasın nakli ile hasta da diyabet hastalığı tedavi edilir.

Oral antidiyabetik ilaçlar, plazma glikoz değerini normal aralıkta tutmak için kullanılan ağız yoluyla alınan ilaçların genel adıdır. Bu ilaçlar farklı şekillerde etki edebilirler. İnsülin salgılanmasını arttırma, vücudun insüline duyarlılığı arttırma veya karbonhidrat emilimini azaltıcı şekilde etki gösterebilirler [35]. Hastanın sağlık durumuna göre ilaç seçimi yapılır. İlaçların etkinliği, kullanımlarının güvenli olması, yan etkilerinin derecesi, hipoglisemi ya da hiperglisemiye neden olma ihtimali ya da sıklığı hasta için büyük önem arz etmektedir. İlacın çok az yan etkisi bulunabilir ancak bu yan etkilerin hastanın sağlığına çok büyük olumsuz etkileri olabilir ya da çok sayıda ancak hastanın yaşamını çok az etkileyecek düzeyde yan etkiler bulunabilir. Bu nedenle hastanın daha güvenli bir süreç geçirmesi için yeni ilaç çalışmaları günümüzde de devam etmektedir.

2.2.2.1. İNSÜLİN TERAPİSİ

Farklı tarzda insülin tedavi yöntemleri hastanın insülin ihtiyacına ya da hastanın kullanabilecek yeterlilikte sahip olmasına bağlı olarak uygulanmaktadır. Tip 1 diyabet hastalığının tedavisinde dışarıdan insülin alımı zorunludur. Tip 1 diyabet hastalığı dışındaki diyabet hastalıklarında ise gerekli durumlarda dışardan insülin hormonu alınımı yapılabilmektedir. Tip 2 diyabet hastaları için dışarıdan insülin hormonu alınması her koşulda zorunlu değildir ancak hastalığın teşhisinden hemen sonra kısa süreli ve yoğun şekilde insülin tedavisi uygulanması hastanın uzun bir süre anti diyabetik ilaç kullanmadan normal kan şekerini koruyabilmesine yardımcı olduğu ve beta hücrelerinde iyileşme meydana geldiği gözlenmiştir [36, 37].

İnsülin tedavisi uygulamalarında; genel olarak insülin iğneleri, insülin kalemleri ve insülin pompası olmak üzere üç farklı tip uygulama seçeneği bulunmaktadır. Bu üç uygulama deri altına insülin hormonu enjeksiyonu yapılması amacıyla kullanılabilir. Düzenli olarak kanda bulunan şeker miktarının ölçülmesi ve takip edilmesi enjeksiyonun

dozajını ayarlamak açısından önem arz etmektedir. Hastanın bu ekipmanları kullanabilmesi için uzmanlar tarafından insülin dozunun nasıl ayarlanacağını, deri altı enjeksiyonunun vücudun hangi bölgesine ve en doğru şekilde nasıl yapılabileceği gibi doğru ve etkili enjeksiyon için önemli hususlar hastaya öğretilmelidir.

Farklı yaş gruplarındaki insanlar, farklı miktarda insüline ihtiyaç duymaktadır. Çocuk ve bebeklerin ihtiyaç duyduğu insülin miktarı çok düşükken, genç ve yaşlılar daha yüksek dozda insüline ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle doz ayarlamalarında en çok zorlanan grup bebekler ve çocuklardır. Bu gruptaki hastalar için insülin dozunda yapılan en ufak hatanın bile büyük riskleri vardır. Yapılan bir çalışmada, deri altı enjeksiyonun da kullanılan insülin iğneleri, insülin kalemleri ve insülin pompalarının, 1 birim, 2 birim ve 5 birim olmak üzere üç farklı dozda insülin enjeksiyonunda doğruluk ve hassasiyetleri incelenmiştir. En düşük dozda üç grup arasında en kötü yöntemin insülin iğneleri ve en iyi yöntem insülin kalemleri olduğu gözlemlenmiştir. 2 birimlik doz ile yapılan deneyde insülin iğnelerinin yine en kötü yöntem olduğu belirlenmiştir ancak diğer iki yöntem arasında belirgin fark gözlemlenmemiştir ve en yüksek dozda üç yönteminde doğruluklarını birbirine yakın olduğu bulunmuştur. Cihazların hassasiyetleri incelendiğinde ise insülin pompalarının en hassas cihaz olduğu ancak diğer cihazların hassasiyetleri arasında belirgin fark olmadığı gözlemlenmiştir [38]. Bu çalışma göz önünde bulundurulduğunda farklı dozlar için farklı cihazların kullanımının önemi belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır. Farklı markalardaki cihazlarda bile doğruluk ve hassasiyet açısından fark bulunabilmektedir. Bu nedenle diyabet hastaları yaşlarına göre farklı cihazların kullanımını öğrenmek zorundadır. Bu durum hastanın yeni cihazı kullanmaya alışma süresi boyunca kan şekeri değerinde dalgalanmalara yol açarak hastanın hayat konforunu etkileyebilir.

İnsülin analogları değişikçe etki etmeye başlama süreleri ve etki etme süreleri de değişim göstermektedir. Kısa etkili, hızlı etkili, orta etkili, uzun etkili gibi farklı etki etme sürelerine sahip insülin analoglarının yanı sıra karışım halinde kullanılan insülin analogları da mevcuttur. İnsülin analogları, tedavinin yapılacağı hastanın yaşı, sağlık durumu, alerjik reaksiyon gösterme ihtimali gibi bireysel özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmelidir. Bu özellikler ilacın aktivitesinin başlama süresini, ilacın etki süresini etkileyebilecek unsurlar arasındadır. Ayrıca hasta farklı bir insülin analogu kullandığında kan şekeri kontrolünde değişiklikler meydana gelebilmektedir, bu nedenle

hastanın uzun süreli kullanımına uygun insülin analogunun seçilmesi oldukça önemlidir [39].

İnsülin iğneleri; en geleneksel insülin enjeksiyonu yöntemidir. Hastaların insülin iğnelerini kendileri kullanabilmeleri için nasıl kullanacaklarına dair eğitim almaları gerekmektedir. Şırıngalar aracılığıyla farklı hacimlerde insülin deri altına enjekte edilebilir. Şırıngaları tek kullanımlıdır. İğnelerin birden fazla kez kullanımı enfeksiyon riskini ortaya çıkarır ya da başka birinin iğnesinin kullanılması kan yolu ile bulaşan hastalıklar açısından risk teşkil etmektedir. İğne ucunun bükülmesi, kırılması gibi ihtimallerde göz önünde bulundurulduğunda insülin iğnesi kullanan diyabet hastaları enfeksiyonlara daha açık hale gelebilir ve deride yırtılmalar, morarmalar, şişmeler hatta deri iltihaplanması gibi cilt hastalıklarıyla karşılaşabilirler. Kullanılan iğnelerin doğrudan çöpe atılması da başka insanlar açısından risk teşkil etmektedir. Bu nedenle doğru şekilde atılma prosedürleri izlenmelidir [39].

İnsülin kalemi, insülin iğnelere göre hem kullanım açısından hem de taşınabilirlik açısından daha iyi bir yöntemdir. Kalem ucundaki iğneler tek kullanımlıdır ve birden fazla kullanıldığında insülin iğnelerinde yaşanan sağlık problemleriyle karşılaşılma ihtimali vardır. insülin kalemleri uygulanması, çok az ya da hiç eğitim almadan yapılabilmesi açısından avantajlıdır.

Amerika Birleşik Devletlerinde insülin iğneleri ve insülin kalemlerinin kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada, hastaların kullandıkları insülin analogu türünü değiştirmeden tedavilerini iki farklı cihazla sürdürmeleri isteniyor. Belirlenen sürenin yarısında insülin iğnesi, diğer yarısında insülin kalemi kullanmaları sağlanıyor. Deney sonunda hastaların fiziksel durumunu takip için, tedavi memnuniyet anketi kapsamında testler yapılıyor ve hastalar iki cihaz arasında hangisini tercih edeceklerine dair bir ankete katılıyorlar. Çalışma sonucunda insanlar insülin kalemi kullanmayı tercih ettiğini ve bunun sebebinin kolay taşınabilir, kolay saklanabilir ve toplum içerisinde daha rahat kullanılabilir olması olduğunu belirtiyor [40].

İnsülin kalemlerinin uygulanmasında kalemin tutuluşu, kalem ucundaki iğnenin uzunluğu, uygulama açısı, kalemin enjeksiyon süresi, uygulama bölgesindeki derinin doğru şekilde kıvrılıp kıvrılmaması, uygulama bölgesinin değişim zamanı gibi unsurlar önem arz etmektedir. İnsülin kalemleri, insülin iğnelere göre daha iyi bir yöntem olsa da hastanın dikkat etmesi gereken çok fazla unsur bulunmaktadır. Uyulması gereken

kuralların çokluğu, uygulama sırasında yapılabilecek hatalarında çokluğu anlamına gelmektedir. Diyabet hastalığının komplikasyonlarından bir tanesi de görme bozukluğudur. Hastalık öncesinde ya da hastalık sonrasında görme bozukluğu yaşayan insanların doz ayarlamaları, kalemin tutuluşu, kalem ucundakini iğnenin takılıp çıkarılması gibi konularda problem yaşayabilme ihtimalleri vardır. Yanlış insülin kalemi seçimi de eksik dozda insülin uygulanmasına ya da insülinin vücuda enjekte edilememesi gibi sorunlara neden olabilir.

İnsülin pompası, sürekli subkutan insülin enjeksiyon türlerinden biridir, kan şekerinin düzenli ölçülmesini sağlayan sayaçlara sahiptir ve veriler sonucunda pompa sayesinde vücuda insülin salımı yapılmaktadır. Tip 1 diyabetli ve tip 2 diyabetli hastaların kullanımına uygundur. İnsülin pompalarının kullanımında pompa arızası, infüzyon setinin tıkanması, insülinin stabilize olmaması, kullanıcı ya da cihaz kaynaklı az ya da çok insülin infüzyonu gibi problemler kullanan hastaların yaşamlarında ölümle sonuçlanabilecek önemli riskler oluşturmaktadır [41]. Klasik iğne ile tedaviye göre daha iyi bir yöntem olmasına karşın hastanın deri altına yerleştirilen iğneye hasta vücuduna giden borular yardımıyla ile pompalama yapılır. Hastaların pompanın kullanımı ve diyabet hastalığının yönetimi hakkında teknik bilgi sahibi olması gerektirmektedir, bu nedenle her yaştan hastanın kolaylıkla kullanabileceği bir aparat değildir. Elektronik bir alet olduğu için bozulmalar meydana gelebilir, su ile temasından her zaman kaçınmak gerekir, pompa setinin düzenli aralıklarla değişmemesi sonucu vücuttan ayrılma ihtimali ortaya çıkabilir. Bu gibi sebepleri düşündüğümüzden hastanın yaşam konforunu olumsuz etkileyici özellikleri çok fazladır. Aletteki bir bozulma sonucu az ya da çok insülin hormonu salgılandığında hastanın kan şekeri çok yükselebilir ya da çok düşebilir, bu durum hastanın sağlığını olumsuz etkiler, komaya hatta ölümlere sebep olabilir. Kullanan kişi yüzme, duş almak gibi durumları sınırlı zaman aralığında yapmak zorundadır, çünkü hasta uzun süreli olarak pompadan ayrılmamalıdır. Aynı zamanda dışarıdan bir boru yardımıyla vücuda insülin gitmektedir, burada meydana gelen bir tıkanma ya da borunun bir yere takılması gibi olumsuz etkilerle karşılaşılma ihtimali vardır.

İnsülin tedavisinde kullanılan yöntemlerin birbirlerine göre hem iyi hem de kötü yönleri bulunmaktadır. Tedavi yöntemleri arasında hastanın durumuna en uygun yöntem doktor tarafından hastanın en iyi şekilde tedavi alması için seçilir. Ancak bu yöntemi seçerken hastanın ihtiyacı olan insülini alması temelli tedavinin uygulanması hastanın psikolojik ve fiziksel durumunu koruması açısından yetersiz kalabilir. Bu nedenle tedavi yöntemi

seçiminde hastanın yaşam öyküsü de göz önünde bulundurulmalıdır. Hasta ihtiyacı olan insülini alıyor mu? Hasta hiperglisemi ya da hipoglisemiye ne sıklıkla maruz kalıyor? İnsülin alma yöntemi hastanın sosyal hayatını olumsuz etkiliyor mu? Tedaviyi toplum içerisinde uygularken rahatsız oluyor mu? Seyahatleri sırasında tedaviyi uygulamakta sorun yaşıyor mu? Bunlar gibi sorular hastanın tedavi yönteminden ne kadar memnun olduğunu ölçmek için kullanılabilir.

Unutkanlık, görme problemi, el titremeleri gibi sorunlar insülin terapisinde hastanın karşılaşılabileceği ve doğrudan tedaviyi olumsuz etkileyecek durumlardır. Bütün enjeksiyon yöntemlerinde ufak bir dikkatsizlik sonucu deri altına hava enjekte edilmesi ihtimali her zaman vardır. İnsülin türlerinin karıştırılarak kullanıldığı tedavilerde iğne ucunda sızıntı olması ya da iğnede hava kabarcığı kalması, hastanın yanlış oranda insülin alması demektir. İnsülin kalemi uygulayan hastalarda iğnenin kalem ucunda unutulması kalem içerisine hava girmesine neden olabilir. Enjeksiyon konusunda yeterince eğitim almamış olmak sinir veya damar üzerine enjeksiyon yapmaya neden olabilir, bu durumda hastada başka komplikasyonlar meydana gelebilir. Vücutta enjeksiyon bölgeleri sınırlıdır, şişlik kızarıklık ya da yanlış uygulama sonucu bir bölgenin bir süre kullanılamaz olması, diğer bölgelerinde sık kullanımdan dolayı zarar görmesine neden olabilir. Saat farkı olan yerler arasında seyahat eden kişiler için doz ayarlamaları gereklidir ve doz arttırılması ya da azaltılması konusunda hastalar zorluk yaşayabilir. Seyahat sürecinde bir aksaklık olması, hastanın ilacına ulaşamamasına neden olup, hastanın tedaviden mahrum kalmasına yol açabilir. Hastanın bozulmuş, donmuş ya da karışmamış insülini vücuduna enjekte etme ihtimali vardır. Bu sebepler göz önünde bulunarak hastanın insülin ihtiyacını en doğru şekilde karşılarken aynı zamanda hastaya en az psikolojik etkisi olan ilaçların üretilmesi ihtiyacı vardır.

2.3. POLİMERİK MEMBRANDAN KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI

Günümüzde; hastalıkların tedavisi için klasik yöntemlerin yanı sıra polimer bazlı kontrollü ilaç salım sistemleri de yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu alanda farklı polimerik membranlar sentezlenerek, farklı ilaçların salınımları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Dağıtımsal ve zamansal olarak salım yapan iki farklı tür salım mekanizması vardır. Dağıtımsal sistemlerde, ilacın vücutta aktif olduğu bölgeye salım yapması amaçlanır. Zamansal sistemlerde ise ilacın tedavi sırasında spesifik zamanlarda ve ya uzun süreli olarak salım yapması amaçlanmıştır [42].

İnsülin hormonunun, polimerik malzemelerden kontrollü salınımını inceleyen [43], [44], [45] gibi çalışmalarda mevcuttur. Bu çalışmalarda glikoza duyarlı fizyolojik pH' ta insülin salınımı, yapay pankreasta polimerik jel yardımıyla insülin salınımı, oral yolla alınan insülin içeren polimerik kapsülün salım yapılması istenen yere kadar korunmasını sağlayan pH temelli salınımı gibi vücuda farklı şekillerde etki edecek ve kontrollü şekilde insülin salınımı yapabilecek farklı polimerik yapıdaki malzemeler incelenmiştir.

Klasik diyabet hastalığı tedavilerin de kullanılan yöntemler belirli şartlara bağlı olarak spesifik bir zamanda ilacın alınmasına dayanmaktadır. İlaç kullanımının hasta da yarattığı konfor eksikliklerinin yanı sıra uzun süreli olarak kontrol altına alınamayan glikoz miktarı değişikliklerine neden olabilir. Polimer temelli tedavilerin diyabet hastalarına uygulanabilir duruma gelmesi tedaviden maksimum düzeyde verim alınmasına yardımcı olacaktır. Tedavinin en az olumsuz yan etkiye sahip olmasını amaçlayan bu yöntem, aynı zamanda kişiselleşmiş tedavinin de yaygınlaşmasına katkı sağlayabilir.

2.4. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

Goldstein katot ışınlarıyla olan çalışmalarında, katot ışını tüpünde gazların bulunmasının katot ışınlarının beklenen davranışında sapmalara neden olduğunu gözlemledi. Katot ışını tüpüyle çalışmalar yapan Wilhelm Wein, manyetik ve elektriksel alan etkisinde katot ışınlarının normal hareketine ters yönde saptığını gözlemledi. J.J. Thomson katot ışınları tüpünü daha düşük basınçta çalıştırarak Wein'in deneyini geliştirdi ve iyonik halde bulunan atom ya da moleküllerin fotoğraf plakası üzerinde kendi yollarını izlediğini ayrıca aynı hız ve kütle/yük (m/z) oranına sahip olmayan parçacıkların plakanın farklı yerlerine çarptığını gözlemledi. İyonlardan oluşan pozitif ışınların spektrumlarının aşırı derecede hassas ölçüm yapılabilmesi ve yöntemin analiz edilen gazın saflığından bağımsız olması kimyasal analizler için avantajlı olduğunu göstermiş, Neon atomunun ^{20}Ne ve ^{22}Ne halinde izotoplarını bu yöntem sayesinde bulmuş ve kütle spektrometrisinin temellerini oluşturmuştur [46]. Thomson ile birlikte çalışan Francis William Aston ilk kütle spektrometrisini o zaman ki adıyla kütle spektrografını icat etmiş ve atomların izotoplarının kütlelerini ölçmüştür. Bu çalışmasından dolayı 1922 yılında kimya alanında Nobel ödülü almıştır [47].

İzotopların kütlelerinin ölçülmesi kütle spektrometrisinin ne kadar hassas ölçüm kabiliyetine sahip olduğunun göstergesidir. Az miktardaki numuneleri bile analiz edebilmesi ve sahip olduğu bu yüksek hassasiyet sayesinde ilk ortaya çıktığı günden

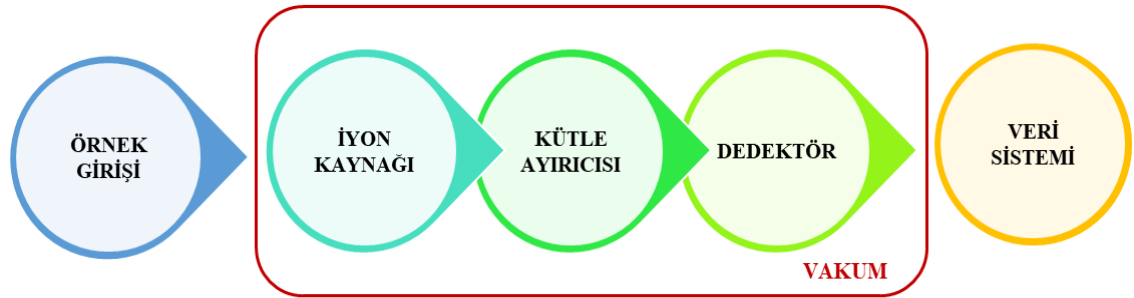
bugüne kadar kimya, tıp, eczacılık, gıda ve daha birçok alanda kullanılmış ve gün geçtikçe gelişmeye ve kullanım alanını arttırmaya devam eden bir analitik teknik haline gelmiştir.

Atom ya da molekülleri iyonik hale getirerek, kütle/yük (m/z) oranlarına göre kütlelerine ayıran ve onlar hakkında yapısal bilgiler veren analitik yöntem kütle spektrometrisi (MS) denir [48]. Bu analitik yöntem, hem organik hem de inorganik türleri, hangi kimyasal fazda olduklarına bakmaksızın, nitel ve nicel olarak analiz edebilme yetisine sahiptir [49].

2.4.1. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ CİHAZI BİLEŞENLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİBİ

Genel olarak bir kütle spektrometrisi cihazı iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere yüksek vakum altında olan üç bileşenden oluşur. Bunlara ek olarak bir örnek giriş bölgesi ve veri işletim sistemi ile birlikte genel bir kütle spektroskopisi meydana gelir.

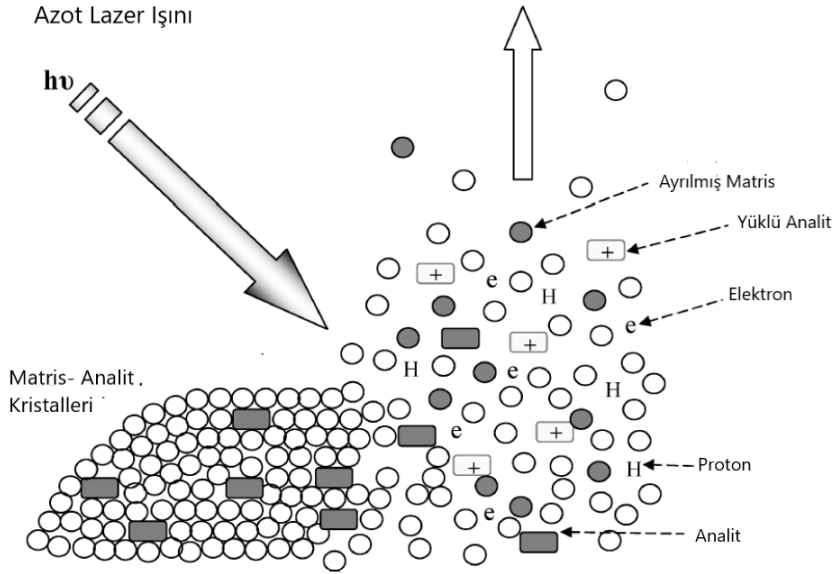
ÇİZELGE 2. 4. Kütle Spektrometrisi Temel Bileşenleri



Örnek girişi, katı, sıvı ya da gaz halinde bulunan numunenin cihaza verildiği kısımdır. Cihaz içerisinde numune ilk olarak iyon kaynağına gider, oradan kütle ayırıcısına ve en son dedektöre ulaşır ve analiz tamamlanır, veri sistemi sayesinde spektrumlar elde edilir ve yorumlanır. İyon kaynağı, numunenin iyonik hale geçmesini sağlar, kütle ayırıcısı, elektrik ya da manyetik alan etkisiyle m/z oranlarına göre iyonik haldeki numuneyi ayırır, dedektör farklı zamanda ulaşan iyonların tayinini gerçekleştirir. Analitin cihaza girişi gerçekleştiikten sonra analit, dedektöre ulaşana kadar yüksek vakumda yani düşük basınçta olan ortamda bulunur, bu ortam analitin herhangi bir çarpışma gerçekleştirmeden analiz edilmesine olanak sağlamaktadır.

2.4.1.1. İYON KAYNAĞI

Geçmişten günümüze kadar molekülleri iyonlaştırmak amacıyla kullanılan çok çeşitli iyon kaynakları mevcuttur. Uçucu türler ve uçucu olmayan türlerin iyonlaşmasında farklı iyon kaynakları kullanılır. Uçucu olmayan türleri iyonlaştırma sırasında karşılaşılan en büyük sorun moleküllerin üç boyutlu yapılarını koruyarak moleküler parçalanmanın meydana gelmediği iyonlar elde etmektir. Bu sorunu gidermek amaçlı yumuşak iyonlaştırma yaparak, molekülleri parçalamayan ve moleküllerin üç boyutlu yapılarını koruyan yöntemler tercih edilmektedir. Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) ve Elektrosprey iyonizasyon (ESI) yaygın olarak kullanılan yumuşak iyon kaynaklarıdır. MALDI iyon kaynağı kullanılarak analiz edilecek örnekler katı fazda olurken, ESI kaynağı kullanılarak analiz edilecek örnekler çözelti halinde yani sıvı fazdadır. MALDI de tek yüklü iyonlar oluşurken, ESI ise çok yüklü iyonlar oluşmaktadır [50].



ŞEKİL 2. 2. MALDI İyon Oluşum Mekanizması [50]

Şekil 2.2 'de gösterildiği gibi Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI) yönteminde numune uygun bir çözücü de çözülür daha sonra uygun bir matris kullanılarak MALDI plakasına uygulanır. Plaka üzerinde örnek ve matris kurduğunda kristal bir yapı haline gelir. Lazer ışını kristale çarptığında, lazer enerjisi matris tarafından absorbe edilir ve numunedeki analitlerde desorpsiyon ve iyonlaşma gerçekleşir [50].

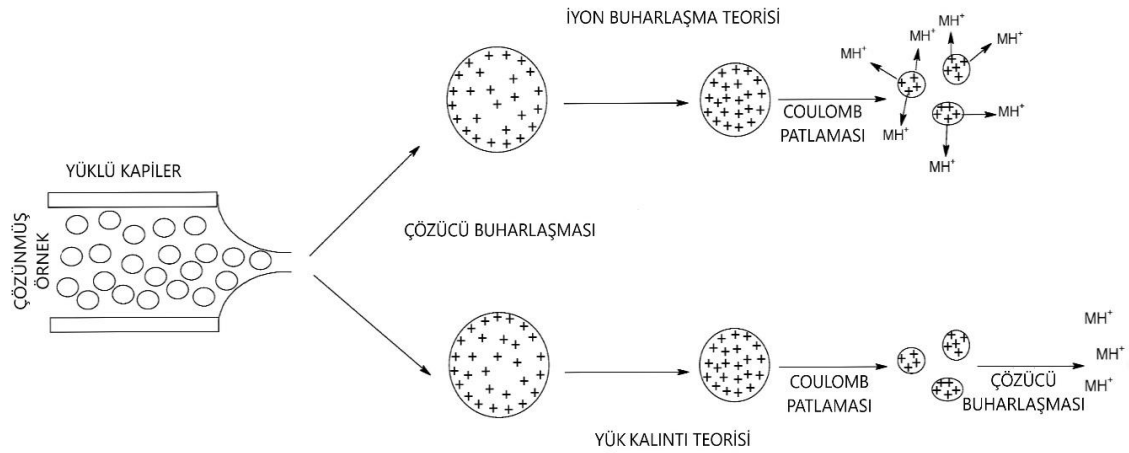
MALDI-MS analizlerinin en önemli kısmı örnek hazırlama kısmıdır. Hazırlanan örnekler genellikle bir matris yardımıyla plakalara uygulanır. Matrisler analitlerin iyonlaşma verimliliğini arttırmak için kullanılır. Analitler matrislerin etkisinden dolayı kümelenmezler, bu nedenle daha kolay iyon haline geçebilirler. Genellikle asidik yapıdaki organik moleküller matris olarak kullanılmaktadır. Kullanılan lazerin dalga boyunda yüksek absorpsiyon yapabilen pozitif iyon modunda proton verebilen matrisler tercih edilir. Analite uygun matris seçimi yapılması daha iyi spektrumlar elde etmek için gereklidir. MALDI-MS kütle spektrometrisi ile protein, polimer, oligonükleotidler, metaller gibi farklı içeriklere ve özelliklere sahip maddeler analiz edilebilir, bu nedenle analiz edilecek maddeyle uyumlu matris seçimi yapılmalıdır. Peptit ve protein temelli maddelerin analizinde sıklıkla kullanılan matrislerden biri 2,5 Dihidroksibenzoik Asit (DHB) dir. 1fmol tayin sınırına, tekrarlı atışlarda kullanılabilirliğe sahip olmasının yanı sıra anorganik yapıda bulunan tuz, deterjan ve tamponların kontaminasyonlarına karşı duyarsızdır [51]. Birçok matris hazırlama metodu bulunmaktadır. Bu metodlardan biri olan ‘dried droplet’ kurutulmuş damlacık metodu en yaygın olarak kullanılan katı matris hazırlama yöntemlerinden biridir. Uygun çözeltiler kullanılarak hazırlanan matris örnek ile farklı oranlarda karıştırıldıktan sonra yeni çözeltiden 1 µL alınarak MALDI plakasına uygulanır. Plaka üzerinde bulunan damlacıklar oda sıcaklığında kuruduktan sonra MALDI-MS cihazı ile analiz edilebilir.

Sıvı faz kütle spektrometrisinde (LC-MS) sistemlerinde mobil fazın kütle spektrometrisi cihazına yönlendirmek aynı zamanda uçucu olmayan ve kırılğan türlerin, bir sıvıdaki çözünen maddelerin, kütle analizine hazırlanması için vakumda iyonlarına dönüşümüne olanak sağlamalıdır.

Makromoleküllerin ısıtılıp buharlaştırılarak gaz fazına geçirilmesi süresince makromoleküllerin bozulduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine Dole ve arkadaşları makromoleküllerin bozulmadan gaz fazına geçirilmesi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Elektrosprey yardımıyla püskürtülen çözücünün tamamen buharlaştırılması ve Faraday kafesinde doğru akımın ayarlanması ile elektrik yüklü bozulmamış makromoleküllerin oluşacağını düşünülüyordu ve bu çalışma sonucunda elektrosprey iyon kaynağı ortaya çıkmıştır [52].

Elektrosprey iyonlaşmada iki farklı iyon oluşum teorisi vardır. Bunlardan biri iyon buharlaşma teorisi, diğeri ise yük kalıntı teorisidir. İyon buharlaşma teorisi genellikle düşük m/z oranına sahip iyonlar için tercih edilirken yük kalıntı teorisi çok yüksek m/z

oranına sahip iyonlar için tercih edilmektedir [53]. İyon buharlaşma teorisine göre elektrosprey iyonlaşmada iyon oluşumunda numune, atmosferik basınç altında bir iğne yardımıyla elektrosprey iyon kaynağına enjekte edilir, numune sürekli püskürtülür ve iğneye yüksek elektrik potansiyeli uygulanarak yüklü damlacıklar oluşturulur, elektriksel olarak sürüklenen damlacıklar, sıcak bir nötr gaz (genellikle azot gazı) yardımıyla buharlaştırılır. Damlacıklar parçalanır ve iyon kaynağı içerisinde hareket ederken sürekli olarak küçülür, iyonlar arasındaki itici kuvvetler (coulomb patlaması) yardımıyla çözücünün yüzey gerilimini aşan iyonlar gaz fazında desorbe olur [54, 55]. Yük kalıntı teorisi ise, çözücünün damlacıklarının coulomb patlaması ile sürekli parçalandığı ve buharlaştığı, en sonunda çok yüklü iyonların olduğu iyon oluşum mekanizmasıdır [52, 55, 56].



ŞEKİL 2.3. Elektrosprey İyonlaşma İşleminde İyon Oluşum Mekanizması [50]

Şekil 2.3.' de iyonlar pozitif yüklü olarak gösterilmiştir ve negatif iyon modu içinde aynı mekanizma kullanılabilir. Şekil 2.3' de gösterildiği gibi numune çözeltisi yüklü kapiler arasından geçer ve nitrojen akışı yardımıyla buharlaşan yüklü damlacıklar oluşurlar. Coulomb patlaması sonucu yüksek yüke sahip damlacıklar daha küçük damlacıklara bölünürler. İyonlar, iyon buharlaşma teorisine göre yüzeyden desorbe edilir ya da çözücü, yük kalıntı teorisine göre tamamen buharlaştırılır ve yüklü iyonlar elde edilir [50].

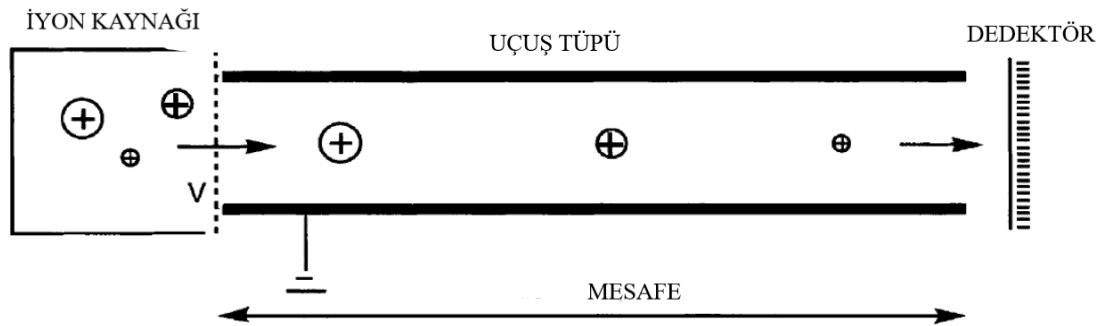
Yumuşak iyonlaştırma yöntemlerini kullanarak iyonlaştırma yapan ve sıvı faz kütle spektrometrisinde kullanılabilen iyonlaştırma yöntemleri; elektrosprey iyonlaşma (ESI), atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaşma (APCI) ve atmosferik basınçlı fotoiyonlaşma (APPI) yöntemleridir. Bu yöntemler arasından elektrosprey iyonlaşma ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaşma yöntemleri LC-MS sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [57].

Elektrosprey iyonlaştırma inorganik maddeler, polimerler, peptitler, proteinler gibi çok çeşitli maddelerin iyonlaştırılmasında kullanılabilir [58]. Bu iyonlaştırma kaynağının birçok olumlu özelliği bulunmaktadır. Elektrosprey iyonlaştırma yöntemi kullanılarak yapılan kütle spektrometrisi uygulamalarında ana türlerde minimum parçalanma olduğu, analit konsantrasyonu ve analit boyutu açısından hassas olduğu, yüksek molekül ağırlıklı polar atom ya da türleri doğallıklarını koruyabildiği, çoklu yüklü iyonlar oluşturabildiği ve rastgele hatayı önemli ölçüde azaltabildiği gözlemlenmiştir [59].

2.4.1.2. KÜTLE AYIRICISI

İyonlaşarak gaz fazına geçen farklı kütlelerdeki iyonların m/z oranlarına bağlı olarak birbirlerinden ayrıldığı bölümdür. Kütle analizörleri farklı ayırma prensiplerinden yararlanırlar ancak hepsi bu ayırma işlemini yaparken elektriksel ve manyetik alandan yararlanmaktadır. Kütle ayırıcıları tek başlarına kullanılabildikleri gibi ikinci bir kütle ayırıcısının bulunduğu hibrit olarak adlandırılan sistemler şeklinde de kullanılabilir.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi cihazlarıyla yapılan akademik çalışmalarda orbitrap ve bir hibrit sistemi olan dört kutuplu uçuş zamanlı (quadrapol- time of flight) (Q-TOF) kütle analizörleri yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu analizörler, hem nicel hem de nitel analizler için kullanılabilir [60].

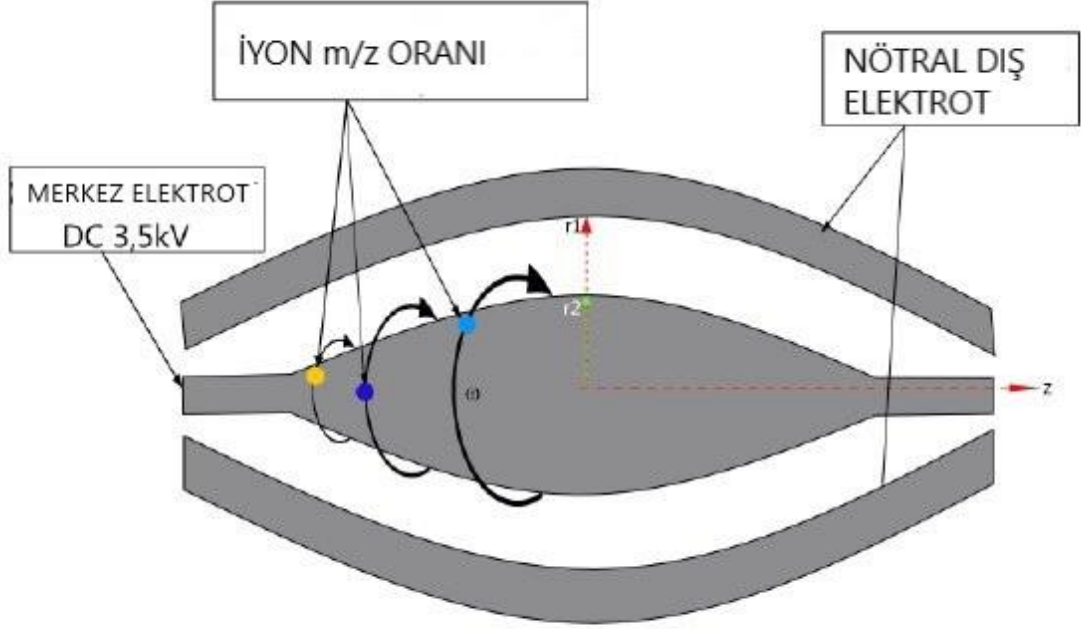


Şekil 2. 4. TOF Kütle Spektrometresi Şematik Gösterimi [61]

MALDI iyon kaynağıyla en çok kullanılan kütle ayırıcısı TOF (uçuş zamanlı) kütle ayırıcısıdır. Analizöre gelen iyonların m/z oranlarını belirlemek için sahip oldukları hızları kullanır. Bir elektrik potansiyeli yardımıyla sabit bir kinetik enerjiye hızlandırılır, detektöre uçuş sürelerinin farklı olmasıyla iyon analizlerini gerçekleştirir [62].

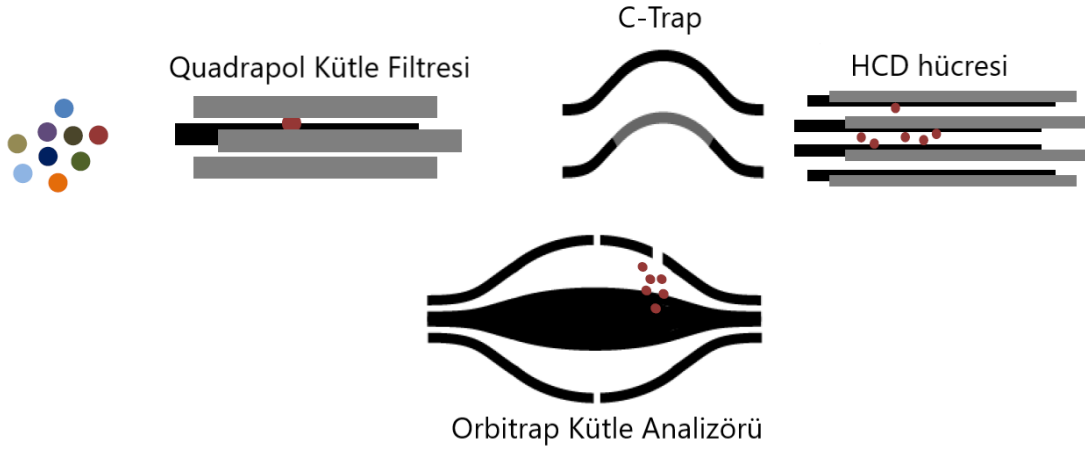
Makarov'un fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonansı kütle spektrometrisini (FTMS) geliştirme çabaları sonucu orbitrap kütle analizörü ortaya çıkmıştır. Orbitrap kütle analizöründe dış elektrotlar elektriksel olarak izole edilmiştir. Merkezi elektrot tuzak sistemini bir arada tutar ve dielektrik uç ayırıcılar yardımıyla merkez elektrodu hizalar. Etrafında dış elektrotlar bulunur ve elektriksel olarak izole haldedirler. Dış elektrotlar ve merkez elektrotlar arasına bir voltaj uygulandığında elektriksel alan oluşur. Bu elektriksel alan doğrusaldır ve bu yönde harmonik salınımlar meydana gelmesine neden olur. Elektriksel alanın radyal bileşeni iyonları merkezi elektroda doğru çekmektedir. Merkez elektrotlar ve dış elektrotlar arasındaki hacme iyonlar enjekte edilir. Bu alanda bulunan iyonlara bir voltaj uygulandığında, dış elektrotlar ve merkez elektrotlar arasında oluşan elektrik alan ve merkezkaç kuvvetlerinin etkisiyle, iyonlar tuzak sisteminin içerisinde dairesel bir spiral üzerinde kalırlar. Aynı zamanda, elektrotların şeklinden kaynaklı eksensel elektrik alan, iyonları tuzagın en geniş kısmına iterek harmonik salınımlara neden olur ve dış elektrotlar bu eksensel salınımların görüntü akımı tespiti için alıcı plakalar olarak kullanılırlar. Burada elde edilen görüntü akımı dedektör yardımıyla dijitalleştirilir ve kütle spektrumuna dönüştürülür [63].

Orbitrap kütle analizöründe radyal ve açısal frekans kütleyle bağlıdır, eksensel frekans ise enerjiden ve iyonların uzaysal yayılımından tamamen bağımsızdır. Enerji bağımsızlığı, kütle doğruluğu ve kütle çözünürlüğü açısından yüksek performanslı kütle analizlerinin gerçekleşmesine yardımcı olur. Bu durumun sonucu olarak Orbitrap yüksek doğrulukla alanın tanımlanabilmesinin etkisiyle 150 000 'e kadar yüksek kütle çözünürlüğü, m/z oranında tuzaklama potansiyelinin bağımsızlığı nedeniyle yüksek kütlelerde uzayda artan şarj kapasitesi açısından avantaj sağlamaktadır [64].

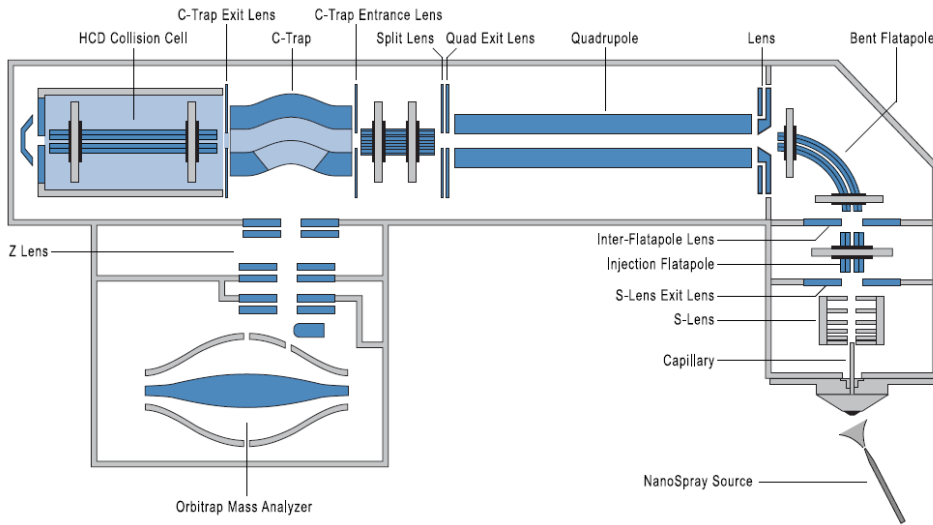


ŞEKİL 2. 5. Orbitrap Kütle Analizörünün Şematik Gösterimi [65]

Orbitrap kütle spektrometrisi hibrit sistemi şeklinde geliştirilen birçok kütle spektrometrisi cihazının temel parçasıdır. Orbitrap kütle analizörü kullanılarak geliştirilen Q-Exactive Plus kütle spektrometrisi (Quadrapol (Dört kutuplu)-Orbitrap kütle spektrometrisi) cihazı akademik ve klinik araştırmalar başta olmak üzere toksikoloji, gıda ve çevre araştırmaları, ilaç geliştirme çalışmaları, doğal protein komplekslerinin analizi ve proteomiks gibi farklı alanlarda yapılan çalışmalarda tercih edilen bir cihaz haline gelmiştir. Hem kalitatif hem de kantitatif analizlerde kullanılabilir. Standart bir Q-exactive plus kütle spektrometrisi cihazı, 200 m/z 'de ayırıcılık 140 000, iç kalibrasyon ile < 1 ppm kütle doğruluğu, m/z 50-6000 kütle aralığı, çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) ve yüksek enerjili çarpışma ayrışma (HCD) kaynaklarının kullanımı gibi özelliklere sahiptir [66].



ŞEKİL 2. 6. Q-Exactive Plus Kütle Spektrometrisinin Şematik Gösterimi [67]



ŞEKİL 2. 7. Q-Exactive Plus Kütle Spektrometrisinin Detaylı Gösterimi [67]

Dört kutuplu filtre sisteminin orbitrap kütle analizörüyle kullanılması hızlı analiz yapabilme olanağı sağlamıştır. Uzayda ayırma özelliği MS ve MS/MS aralıklarını yüksek çözünürlükte analiz etme yeteneği kazandırmıştır [67].

Q Exactive plus cihazında analiz esnasında; elektrosprey iyonlaşma ile atmosferik basınçta oluşan iyonlar cihaz içerisine girdiğinde bir kapiler tüpünden geçerek S-Lens bölgesine ulaşırlar ve S-Lens bölgesinde vakum altına alınırlar, S-Lens bölgesinden çıkan iyonlar eğimli flatapole bölgesinde çarpışmalı soğutmadan sonra kütle seçiliminin olduğu quadrupole kütle filtresine gelir, daha sonra HCD hücresinin önünde bulunan kavisli bir yakalama sistemi olan C-Trap bölgesine gelirler ve gazla doldurulmuş halde olan ve C-

trap bölgesinden ince bir zarla ayrılan HCD hücresine geçiş yaparlar, HCD hücresinde iyonların parçalanması gerçekleşir, bu parçalanmadan sonra toplanan iyonlar tekrar C-Trap bölgesine gelirler ve buradan orbitrap kütle analizörüne ilerlerler ve orbitrap kütle analizöründe iyonların analizi gerçekleştirilir [67, 68].

2.4.2. İNSÜLİN HORMONUNUN KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZİ

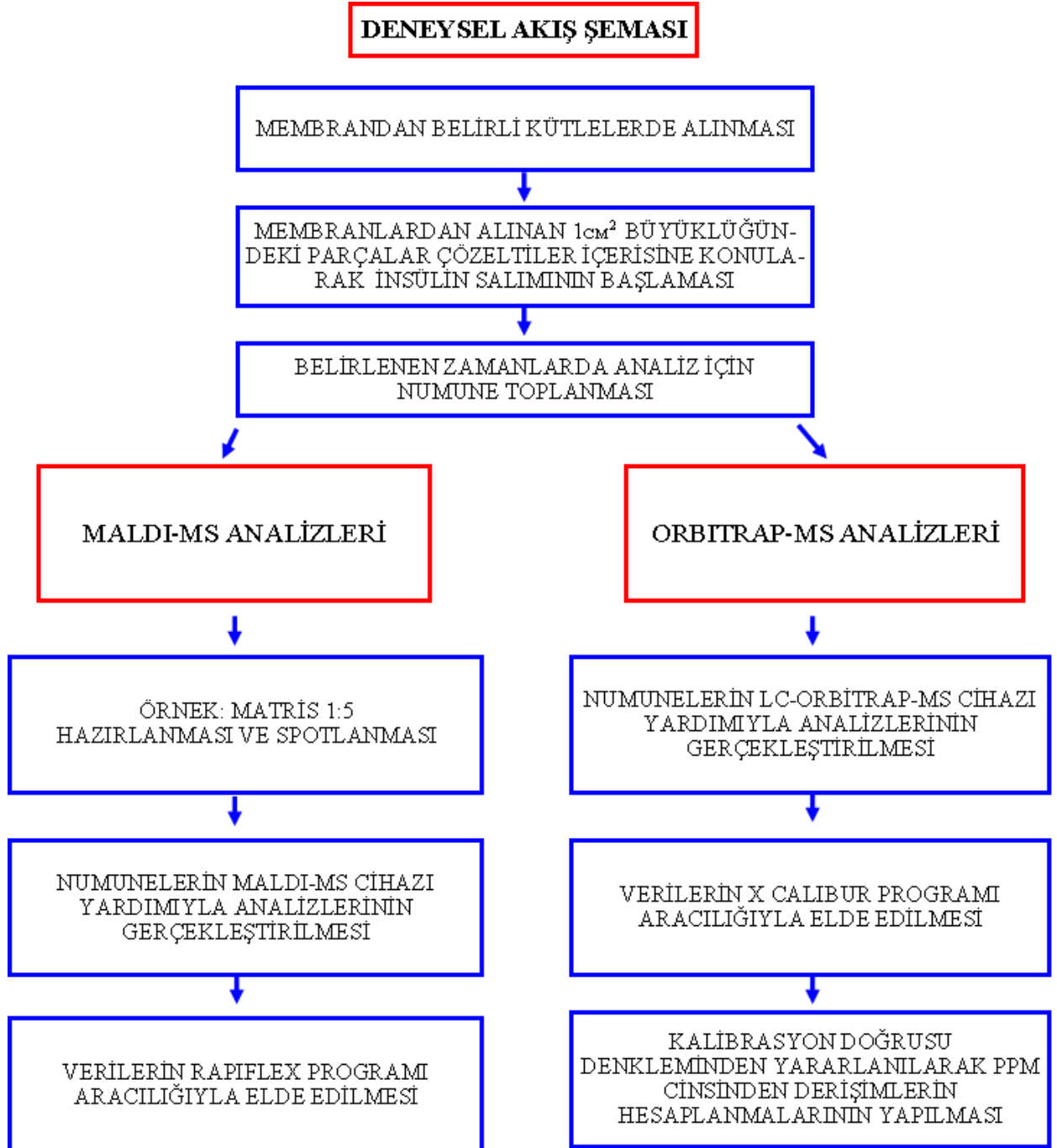
İnsülin hormonunun ve insülin çeşitlerinin (analoglarının) kütle spektrometrik yöntemlerle tayin edilmesi, başta tıp alanında yapılan ilaç geliştirme çalışmaları olmak üzere, klinik araştırmalar, doping kontrol çalışmaları, adli tıp çalışmaları gibi farklı alanlar için öneme sahiptir. Numune hazırlama kolaylığı, az miktarda numunenin analiz için yeterli olması, analiz sürelerinin kısa olması, sonuçların yüksek güvenilirlikte ve doğrulukta olması ve hem kantitatif hem de kalitatif örnek analizlerinin yapılabilmesi kütle spektrometrisinin tercih edilebilirliğini arttırmıştır. Farklı kütle spektrometrik yöntemler ve cihazlar kullanılarak insülin hormonu ve insülin hormonunun analoglarını içeren birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara; insülin hormonu ve insülin hormonunun analoglarının benzerlik ilişkilerini, hormonların yapısını, insanlarda insülin hormonlarının seviyesinin ölçülmesi [69], sporcularda uyuşturucu testlerinde ve adli tıpta insülin hormonu ve insülin analoglarının hızlı tayini [70, 71] gibi farklı amaçlara yönelik çalışmalar örnek olarak gösterilebilir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen polimerik membranlardan zamana bağlı olarak insülin salımı ölçümleri oldukça hassas tayinler gerektirmektedir. Bunun sebebi, salım yapılan insülin miktarının oldukça düşük olması ve bu miktarın yüksek doğrulukta tayininin gerçekleştirilmesinin gerekliliğidir. Bu da ancak kütle spektrometrik bir cihaz kullanılarak mümkün kılınır. Ayrıca, salım ortamında bulunan başka kimyasalların yapabileceği girişim ihtimalleri göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla kütle spektrometrik cihazlar arasında da çok yüksek ayırıcılığa ulaşabilen ve yine çok yüksek kütle doğruluğunda analiz yapabilen orbitrap kütle spektrometresi cihazının kullanılması kaçınılmazdır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

İnsülin tedavisine ihtiyaç duyan diyabet hastaları yeterli miktarda ve ihtiyaçları olduğu zamanda insülin hormonu takviyesi almalıdırlar. Tez kapsamında; farklı çözelti ortamlarında polimerik membranlardan zamana bağlı olarak kontrollü insülin salım miktarı kütle spektrometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Deneysel çalışma sürecinde izlenen yol akış şeması ile gösterilmiştir.

ÇİZELGE 3. 1. Deneysel Akış Şeması



Analiz süresince; 5807.57 Da molekül ağırlığına sahip olan insülin hormonunun iyonlarına ait kütle/yük değerleri takip edilmiştir.

Kütle spektrometrik çalışmalara ek olarak analizlerde kullanılan membranların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Membranlar 10 mp basınç altında 37°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Membranların karakterizasyonu amaçlı FT-IR (fourier dönüşümlü infrared spektrometresi), TGA (termogravimetrik analiz) ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizleri yapılmıştır.

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

İnsan insülin (Mw 5807.54 Da) Sigma-Aldrich (St. Louis MO ABD) firmasından satın alınmış, NaCl (sodyum klorür) sigma firmasından, H₃PO₄ (orto-fosforik asit, %85) sigma-aldrich firmasından, Na₃PO₄ (sodyum fosfat,%96) Aldrich firmasından, formik asit (FA, %98-100) Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Deiyonize su Expe-Ultrapure Water System (Mirae St Co. Güney Kore) cihazı kullanılarak elde edilmiş.

3.2. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRAN SENTEZİ

Prof. Dr. M. Yakup ARICA ve Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU tarafından sentezlenmiştir.

Biyoaktif madde olarak insulinin salımında destek materyali olarak kullanılmak üzere poli(hidroksipropil metakrilat) ve poli(hidroksipropil metakrilat)-kitosan polimerleri (sırası ile I-1 ve I-2) UV-ışığı fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. İnsulinin kontrollü salımının incelenmesi için polimerik taşıyıcı desteklere biyoaktif madde matriks içi tutuklama yolu ile yüklenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, poli(hidroksipropil metakrilat) ve poli[(hidroksipropil metakrilat)/kitosan] polimeri metilen bisakrilamit ve amonyum persülfat varlığında, 2-hidroksipropil metakrilat monomeri ve/veya kitosan polimer çözeltisi ve belirli miktarda insulinin karıştırılması ile formülasyonları aşağıda verilen I-1, I-2.1 ve I-2.2 polimerleri elde edilmiştir. Sentezlenen membranlar azot atmosferi altında, 25 °C sıcaklıkta 30 dakika süre ile UV-ışığı altında sentezlenmiştir.

- **I-1 formülasyonu**

3 ml hidroksipropil metakrilat + 1,5 ml etilalkol + 0,5 ml metilen bisakrilamit (10 mg) + 0,5 ml (pH'sı 7,4 tamponunda çözülmüş 6 mg) insülin + 0,5 ml amonyum persülfat (1 mg) + 10 µl tetrametilen etilendiamin

- **I-2.1 formülasyonu**

2,5 ml hidrokisipropil metakrilat + 0,5 ml kitosan (%1'lik) + 1,5 ml etilalkol + 0,5 ml metilen bisakrilamit (10 mg) + 0,5 ml (pH'sı 7,4 tamponunda çözünmüş 6 mg) insülin + 0,5 ml amonyum persülfat (1 mg) + 10 µl tetrametilen etilendiamin

- **I-2.2 formülasyonu**

2,5 ml hidrokisipropil metakrilat + 0,5 ml kitosan (%1'lik) + 1,5 ml etilalkol + 0,5 ml metilen bisakrilamit (10 mg) + 0,5 ml (pH'sı 7,4 tamponunda çözünmüş 12 mg) insülin + 0,5 ml amonyum persülfat (1 mg) + 10 µl tetrametilen etilendiamin

3.3 İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SU, SODYUM KLORÜR ve FOSFAT TAMPONU İÇERİSİNDE SALINIMI

İnsülin yüklü polimerik membranları, insanların günlük yaşamda kullanılacağı göz önünde bulundurulduğunda, membranın uygulanacağı ortam koşulları belirlenerek membran inkübasyonlarının gerçekleştirildiği çözeltiler seçilmiştir. Bu çözeltiler içerisinde insülin salınımlarının gerçekleştirilmesinin ardından kütle spektrometrik analizler yapılmıştır.

3.3.1. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SU İÇERİSİNDE SALINIMI

Tartılan membranlar belirli hacimlerde su içerisinde inkübe edilmiştir. İnsülin yüklü polimerik membranların analiz için hazırlanmasında kullanılan membran ağırlıkları ve su hacimleri aşağıda verilmiştir.

I-1 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki deiyonize su içerisine konulmuştur.

I-2.1 membranı: 0.10 gram insülin yüklü polimerik membran, 1mL hacimdeki deiyonize su içerisine konulmuştur.

I-2.2 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki deiyonize su içerisine konulmuştur.

37 °C sıcaklıkta bulunan su banyosu içerisinde 140 rpm de çalkanarak membran içerisindeki insülinin su içerisinde salınımı gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak membrandan salınan insülin miktarını ölçebilmek için membran su içerisindeki

inkübasyonundan sonra 2. saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat, 12. saat, 24. saat ve 48. saatlerde analiz için membran bulunan çözeltiden numune alımı gerçekleştirilmiştir. Membran bulunan sudan 100µL alınmıştır ve alınan 100µL hacimdeki her örnek içerisine 2µL formik asit eklenmiştir. Her örnek alımında membran yeni bir 2mL hacmindeki deiyonize su içerisine konulmuştur. Böylece aşırı doygun çözelti ortamı oluşması engellenmiştir. Analiz edilene kadar örnekler sıcak su banyosunda 140 rpm hızda çalkalanmaya devam etmiştir.

3.3.2. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ İÇERİSİNDE SALINIMI

İnsülin yüklü polimerik membranların insülin salım davranışını incelerken gerçek hayatta kişilerin kullanımına uygunluğunu belirlemek için membranı deriye yapıştırdığımızda membranın karşılaşıcağı ilk ortam olan ‘Ter’ diye adlandırılan vücut sıvısını yansıtmaları için sodyum klorür çözeltisi seçilmiştir. Terin büyük bir kısmı sudan oluşmaktadır ve geri kalan kısımda elektrolitler bulunmaktadır. İnsan terinde sodyum, klor, potasyum, magnezyum gibi elektrolitler bulunur. Bu elektrolitler arasında terdeki temel iyonlar sodyum (Na⁺) ve klor (Cl⁻) iyonlarıdır [72]. Kistik fibrozis gibi bazı hastalıklar terde bulunan sodyum klorür iyon derişimi, sağlıklı insanda bulunan iyon derişimine göre farklılık göstermektedir [73]. Bu nedenle sağlıklı ve hasta bireylerde insülin yüklü polimerik membranın kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla 0.05 M ve 0.1 M olmak üzere iki farklı derişimde sodyum klorür çözeltisi hazırlanmıştır. Analizde kullanılan membran ve çözelti miktarları ayrı ayrı listelenmiştir.

I-1 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

I-2.1 membranı: 0.10 gram insülin yüklü polimerik membran, 1mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

I-2.2 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

37 °C sıcaklıkta bulunan su banyosuna konularak 140 rpm de çalkalanmış ve membran da bulunan insülinin çözelti içerisine salımı sağlanmıştır. Belirli saatlerde, çözeltiden analiz için 100 µL alınmış ve alınan örnek içerisine 2µL formik asit eklenmiştir. Alınan

örnekler analize kadar su banyosunda karıştırılmaya devam etmiştir. Her örnek alımında 2mL' lik yeni çözeltiler kullanılarak membranın salınımının devamlılığı sağlanmıştır.

3.3.3. İNSÜLİN YÜKLÜ POLİMERİK MEMBRANIN pH: 7.4 FOSFAT TAMPONU İÇERİSİNDE SALINIMI

Membranların vücut içerisinde kullanılabilir olup olmadığını test etmek amacıyla pH: 7.4 olan bir tampon çözeltisi kullanılması tercih edilmiştir. Sodyum fosfat ve orto-fosforik asit kullanılarak pH 7.4 olan 50mM derişimde fosfat tamponu hazırlanmıştır. Analizde kullanılan membran ve çözelti miktarları ayrı ayrı listelenmiştir.

I-1 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

I-2.1 membranı: 0.10 gram insülin yüklü polimerik membran, 1mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

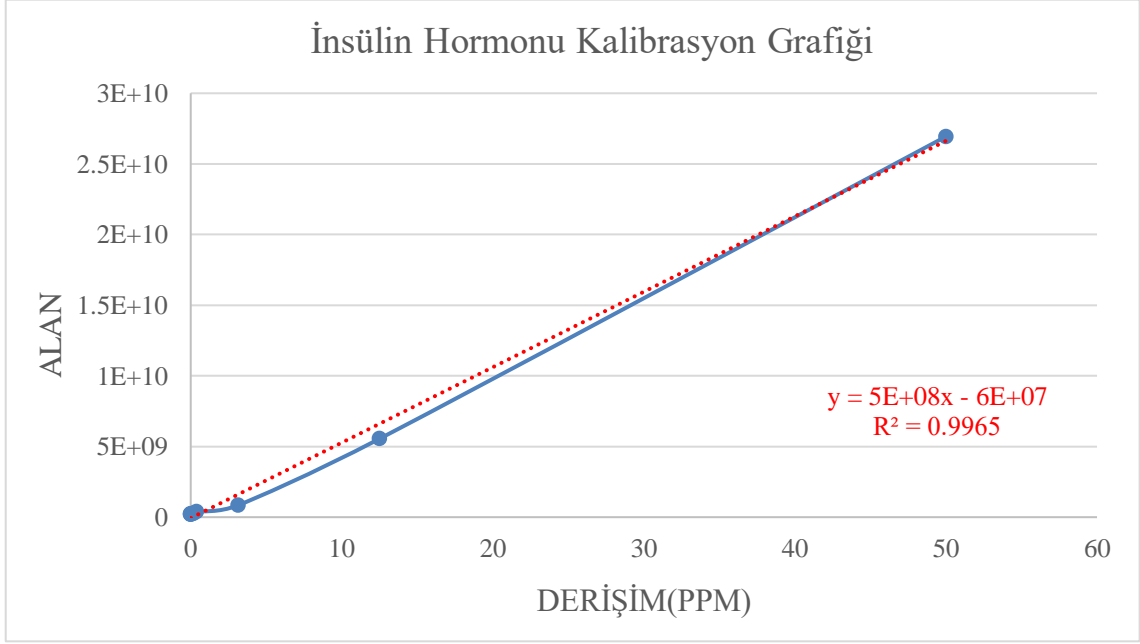
I-2.2 membranı: 0.05 gram insülin yüklü polimerik membran, 2mL hacimdeki sodyum klorür çözeltisi içerisine konulmuştur.

37 °C sıcaklıkta bulunan su banyosunda 140 rpm hızda karıştırılarak belirli saatlerde çözelti içerisinden 100µL alınmıştır. Bu 100µL'lik örnek çözeltisi içerisine 2µL formik asit eklenmiştir. Her örnek alımından membran yeni bir 2mL' lik fosfat tamponu çözeltisi içerisine konulmuştur. Örnek çözeltileri cihazda analiz edilene kadar su banyosunda muhafaza edilmiştir.

3.4. KALİBRASYON DOĞRUSU

1 mg insan insülini 1 mL su içerisinde çözüldü ve çözelti içerisine 4 µL formik asit eklendi. Hazırlanan 1000 ppm derişimdeki stok çözeltisi, %50 asetonitril, %50 su ve %1 formik asitten oluşan seyreltme çözeltisi yardımıyla 50 ppm ve daha düşük derişimler de çözeltiler hazırlanılmasında kullanıldı. Farklı derişimler de hazırlanan çözeltilerden 100 µL alındı, çözeltilere 4 µL formik asit eklendi ve analiz edildi. Orbitrap-MS cihazıyla analiz edilen standart insülin çözeltileri için toplam iyon kromatogramda insülin hormonuna ait kütlelerin pikleri izlenildi. Belirlenen derişimlere karşılık gelen insülin

pikleri altında kalan alan kullanılarak kalibrasyon doğrusu grafiği çizildi ve doğru denkleminde ulaşıldı.



ŞEKİL 3. 1. Standart İnsülin Hormonuna Ait Kalibrasyon Grafiği

Doğru denklemi yapılan analizlerde elde edilen alan değerleri kullanılarak membranın salım yaptığı insülin miktarının ppm cinsinden hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.5. MALDI-MS ANALİZ KOŞULLARI

- DHB Matrisinin Hazırlanması (10 mg/mL): 10mg 2,5 dihidroksibenzoik asit (DHB) katısı, su/asetonitril/TFA (50:50:0,1; v/v) ile hazırlanan 1mL hacimdeki çözelti içerisinde çözülmüştür.

Polimerik membranların inkübasyonu tamamlandıktan sonra kurutulmuş damlacık metodu kullanılarak analiz için ayrılan örnek çözeltileri ve DHB matrisi ile 1:5 (v/v) oranında karıştırılmıştır ve çözeltiden 1 µL hacminde alınarak MALDI plakası üzerinde bulunan bölgelere uygulanmıştır. Kristal oluşumu gözlemlendikten sonra Bruker RapifleX MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) sistemi yardımıyla analiz edilmiştir. Veri analizleri Bruker firması tarafından sağlanan FLEXANALYSIS programı yardımıyla yapılmış ve şiddet - m/z değerlerinin yer aldığı kütle spektrumu elde edilmiştir.

3.6. ORBİTRAP-MS ANALİZ KOŞULLARI

Polimerik membran içerisindeki insülinin su, sodyum klorür çözeltisi ve fosfat tamponu içerisinde salımı sonucunda analize hazır hale gelmiş ve analizi için kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Q exactive plus kütle spektrometrisi cihazına online olarak bağlı olan sıvı kromatografisi (Dionex, UltiMate 3000 RSLCnano sistem) yardımıyla cihaza örnek girişi yapılmıştır. NanoLC cihazında mobil faz olarak A ve B olarak adlandırılan iki çözelti kullanılmıştır. A çözeltisi içerisinde %0.1 formik asit bulunan su ve B çözeltisi içerisinde %0.1 formik asit bulunan asetonitril (ACN) çözeltisidir.

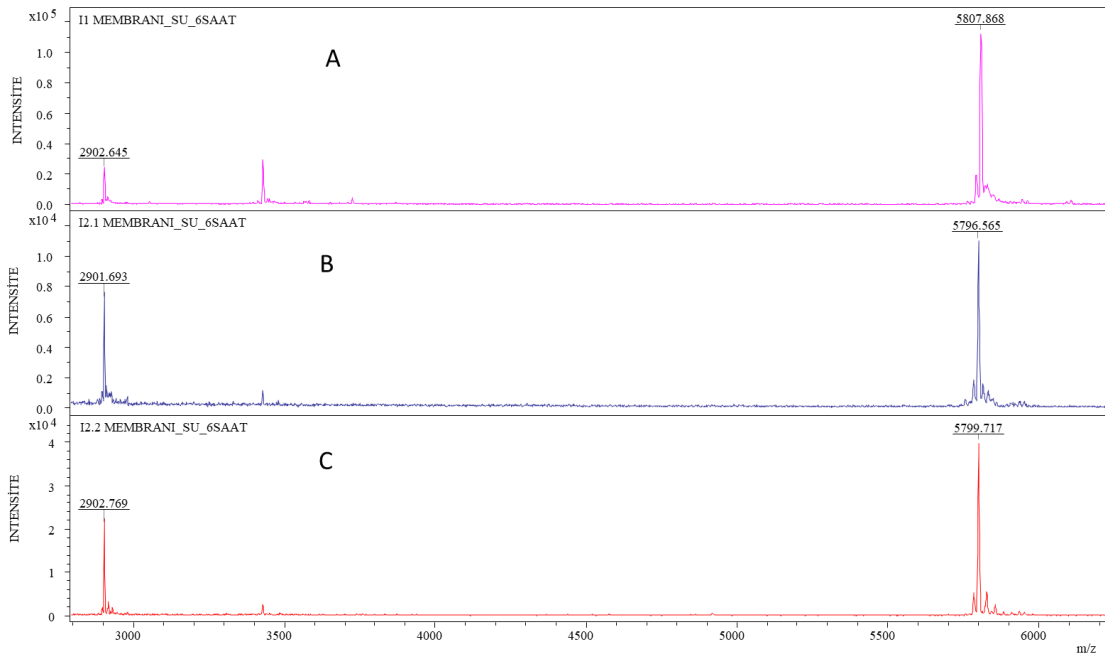
İnsülin içeren çözeltiler analizin hemen öncesinde speedvac yardımıyla karıştırıldıktan sonra her çözeltiden 5 µL hacimde örnek kolona yüklenmiştir. Miktarı %5 ile %90 arasında gradientli olarak değişen B çözeltisi ve A çözeltisi kullanılarak elüsyon gerçekleştirilmiştir. 35 dakikalık analiz süresi boyunca mobil fazın akış hızı 0.250 µl/dk dır. Analizler pozitif iyon modunda, 50 cm kolon (EASY-Spray kolon, 50 cm uzunluğunda, 75µm iç çap, pepMap C18, 2µ partikül, 100 Å gözenek büyüklüğü) kullanılarak yapılmıştır. Kütle spektrometrisinin ayırıcılık değeri 70 000 ve tarama aralığı 500-2000 m/z olarak ayarlanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler X Calibur programı aracılığıyla toplam iyon kromatogram incelenerek değerlendirilmeye alınmıştır. Her bir analiz sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramında moleküler iyon sinyal pikinin altında kalan alanı kullanarak salımı gerçekleşen insülin miktarı kantitatif olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar için kalibrasyon doğrusundan elde edilen alana karşı-insülin salım derişimi eşitliğinden yararlanılmıştır.

3.7. KÜTLE SPEKTROMETRİK VERİ ANALİZİ

Her analiz verisi 2 mL çözelti içerisinde 0.10 gram membran bulunduğu koşula göre normalize edilerek sonuçlar verilmiştir. Analizlerde kullanılmak üzere sentezlenen membranların toplam ağırlıkları hesaplanmıştır. Eğer 0.1g membran kullanılırsa, I-1: I-2.1: I-2.2 membranlarından elde edilen parça sayısında sırasıyla 1:1:2 oranı mevcuttur. Matris-destekli Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi cihazında yapılan analizlerde üç farklı insülin yüklü polimerik membran kullanılmıştır. Membranlar su, sodyum klorür ve fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde inkübasyonu sonrasında belirli saatlerde alınan örnekler, DHB matrisi kullanılarak analiz edilmiştir.

Flexanalysis programı aracılığıyla veri analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler refletron mod ve pozitif iyon modunda yapılmıştır.

Şekil 3.2 de görüldüğü gibi insüline ait moleküler iyon piki (M^+) izlenerek kullanılan üç farklı insülin yüklü polimerik membranın insülini salımladığı kanıtlanmıştır. Spektrumlarda m/z değeri 5800 civarında gözlemlenen piklerin insülinin moleküler iyon pikine ait olduğu gözlenmektedir. MALDI-MS ile normalde tek yüklü iyonların oluşumu gözlenebilmektedir ancak spektrumlarda gözlemlenen düşük şiddetteki 2900civarında bulunan piklerin insülinin +2 yüklü iyonları olduğunu söyleyebiliriz.

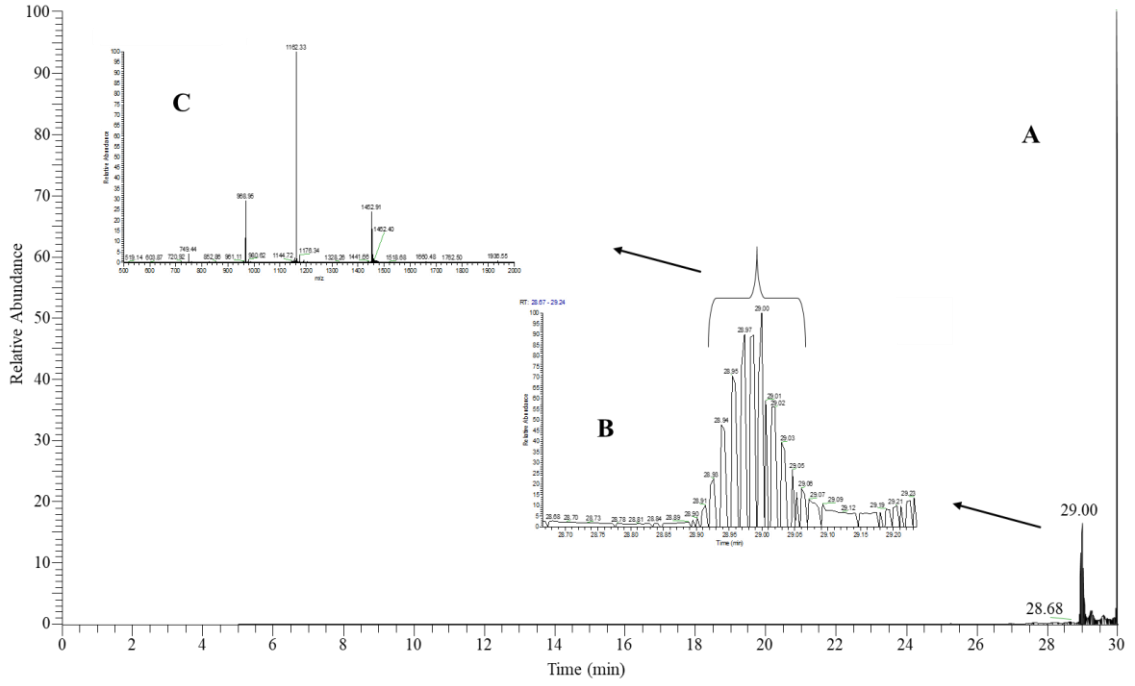


ŞEKİL 3. 2. (A) Su içerisinde 6saat inkübe edilen I-1 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu (B) Su içerisinde 6 saat inkübe edilen I-2.1 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu (C) Su içerisinde 6saat inkübe edilen I-2.2 membranına ait MALDI-MS analizi kütle spektrumu

ÇİZELGE 3. 2. İnsüline Ait Moleküler İyonların Kütle/Yük Değerleri

Öncü İyon	m/z (Da)
$(M+H)^+$	-5808.5
$(M+2H)^{2+}$	~2904.7
$(M+3H)^{3+}$	~1936.8
$(M+4H)^{4+}$	~1452.8
$(M+5H)^{5+}$	~1162.5
$(M+6H)^{6+}$	~968.9
$(M+7H)^{7+}$	~830.6
$(M+8H)^{8+}$	~726.9
$(M+9H)^{9+}$	~646.2

ORBİTRAP-MS cihazı ile yapılan deneyler de, Şekil 3.3 de açıklandığı şekilde her bir örnek analizinden sonra Xcalibur programı kullanılarak toplam iyon kromatogramları elde edilmiştir. Bu kromatogramların kütle spektrumları incelenmiştir (şekil 3.2.C). Bu spektrumlarda izlenen insülin hormonuna ait moleküler iyon sinyallerinin kütleleri çizelge 3.1 de verilmiştir. Kromatogram üzerinde bu sinyallerin gözlemlendiği bölgeler belirlenerek insülin salım miktarına ulaşmamızı sağlayacak pik alanları belirlenmiştir. Bu alanlar kalibrasyon grafiğinden elde edilen eşitliğe yerleştirilerek alana karşılık gelen insülin salım derişimleri hesaplanmıştır.



ŞEKİL 3. 3. (A) 0.1 M Sodyum klorür çözeltisi içerisinde 2 saat süresince inkübe edilen membrandan salınan insüline ait toplam iyon kromatogramı (B) İnsülinin moleküler iyon sinyallerin gözlendiği pik bölgesi (C) 0.1 M Sodyum klorür çözeltisi içerisinde 2 saat süresince inkübe edilen membrandan salınan insüline ait kütle spektrumu

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. MEMBRANLARIN KARAKTERİZASYONU

Sentezlenen membranların karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi için FT-IR, TGA ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

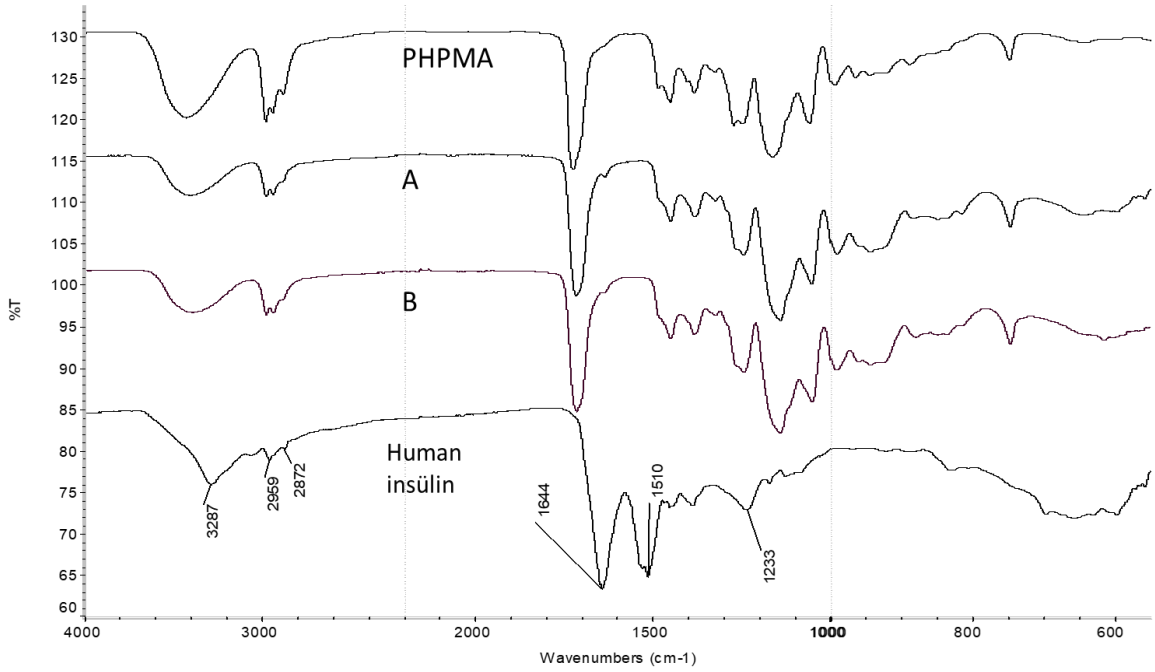
Karakterizasyon analizlerinin hepsinde kullanılan kodlamalar aşağıda listelenmiştir.

- **A:** I-1 membranının insülin içermeyen hali (3 ml hidrokispropil metakrilat + 1,5 ml etilalkol + 0,5 ml metilen bisakrilamit (10 mg) + 0,5 ml amonyum persülfat (1 mg) + 10 µl tetrametilen etilendiamin)
- **B:** I-1 membranı
- **Z:** I-2 membranının insülin içermeyen hali (2,5 ml hidrokispropil metakrilat + 0,5 ml kitosan (%1'lik) + 1,5 ml etilalkol + 0,5 ml metilen bisakrilamit (10 mg) + 0,5 ml amonyum persülfat (1 mg) + 10 µl tetrametilen etilendiamin)
- **Y:** I-2.1 membranı
- **X:** I-2.2 membranı

4.1.1. FT-IR ANALİZLERİ

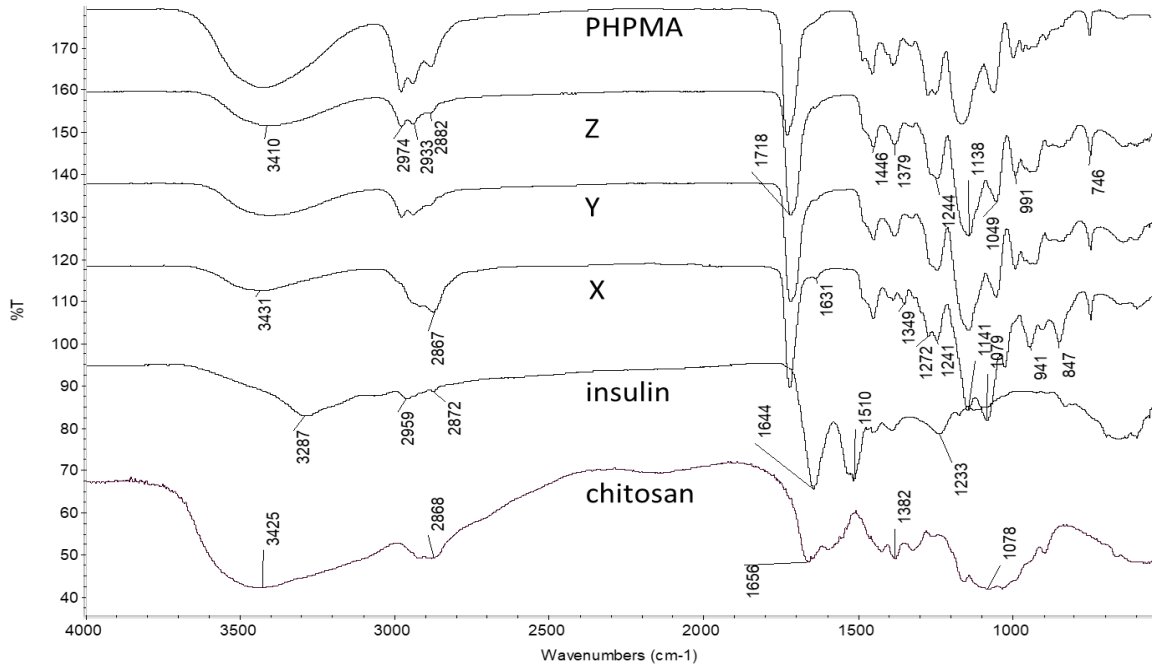
32 tarama 4 cm^{-1} çözünürlükte, Nicolet IS10 FTIR spektrometre (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak kurutulup toz haline getirilmiş I-1 ve I-2 membranlarının (I-2.1 ve I-2.2) infrared spektrumları yapılan analizlerle elde edilmiş ve incelenmiştir. İnsüline ait karakteristik pikler $1656,33\text{ cm}^{-1}$ 'de amid I'in C-O gerilmesinden kaynaklı bir tepe ve $1537,81\text{ cm}^{-1}$ 'de orta şiddetde bir tepe noktası, amid-II'nin N gerilme ve N-H bükülmesinden kaynaklanmaktadır [74]. Membranların sentezi sırasında poliaktif destek metaryeli olarak kullanılan hidrokispropil metakrilat 3450 cm^{-1} O-H bandı ve anhidrit yapılar karşılık gelen 1805 cm^{-1} omuz görünümü tespit edilmiştir [75]. Buna ek olarak sentezlenen I-2 membranında kitosan maddesi bulunmaktadır. Kitosan'a ait olabilecek karakteristik pikler $3427,73\text{ cm}^{-1}$ (O-H esneme ve N-H esneme, örtüşme), $2922,49$ ve $2859,82\text{ cm}^{-1}$ (C-H esneme), $1652,90\text{ cm}^{-1}$ (NH_2 deformasyonu), $1154,09\text{ cm}^{-1}$ 'deki (köprü-O gerilme) ve $1092,74\text{ cm}^{-1}$ (C-O uzama) temel karakteristik pikleri

gözlemlenmiştir [74]. Belirtilen üç madde ve bunlara ait karakteristik pikler analiz sırasında takip edilecektir.



ŞEKİL 4. 1. İnsülin içermeyen I-1 Membranı ve I-1 Membranına ait IR Spektrumu

Spektrumda bulunan PHPMA (poli- hidroksipropil metakrilat) 'a ait tepe noktalarının (3450 cm^{-1} ve 1805 cm^{-1}) hem insülin içermeyen I-1 membranında (A) hem de I-1 membranında (B) varlığının görülmesi polimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Bu durumun yanı sıra sentez sırasında kullanılan insan insüline ait karakteristik piklere infrared spektrumunda gözlemlenememiştir. Polimer sentezinde kullanılan malzemelerin miktarına baktığımızda sentez sırasında kullanılan hidroksipropil metakrilat miktarının yanında kullanılan insülin miktarı çok azdır. Bu nedenle insülin molekülüne ait piklere rastlanılmamış olunabileceği düşünülmüştür.

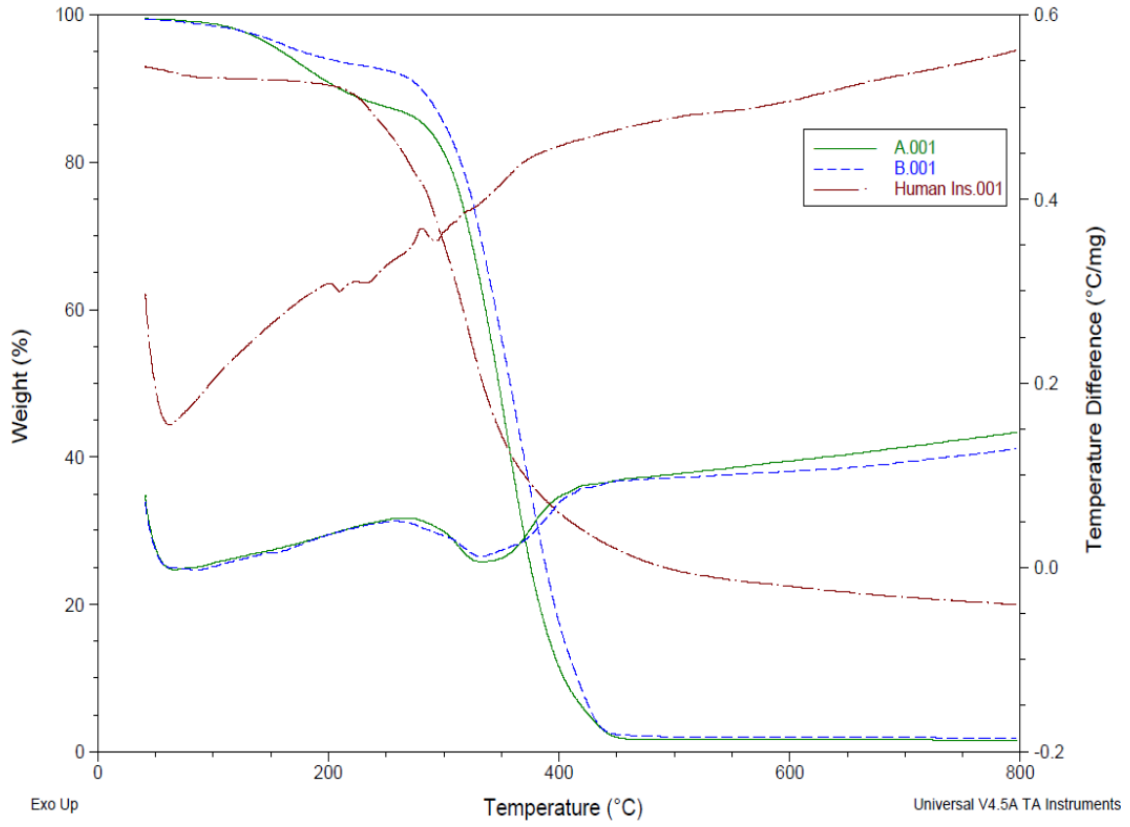


ŞEKİL 4. 2. İnsülin içermeyen I-2 Membranı, I-2.1 Membranı ve I-2.2 Membranlarına ait IR Spektrumu

I-2 membranında ek olarak takip edilebilecek kitosan maddesi bulunmaktadır, bu nedenle izlenen piklere eklenmiştir. Poli- hidroksipropil metakrilat'a ait pikleri insülin içermeyen I-2 membranında (Z), I-2.1 membranında (Y) ve I-2.2 membranında (X) izleyebilmekteyiz. Ancak kitosan ve insülin kaynaklı karakteristik pikler tam olarak izlenememektedir. Bu durum I-1 membranında da gözlemlediğimiz gibi sentezde kullanılan diğer maddelerin hidroksipropil metakrilat miktarına göre oranı %1 in altındadır, bu nedenle hidroksipropil metakrilat piklerinin, diğer maddelere ait piklerin baskılanmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

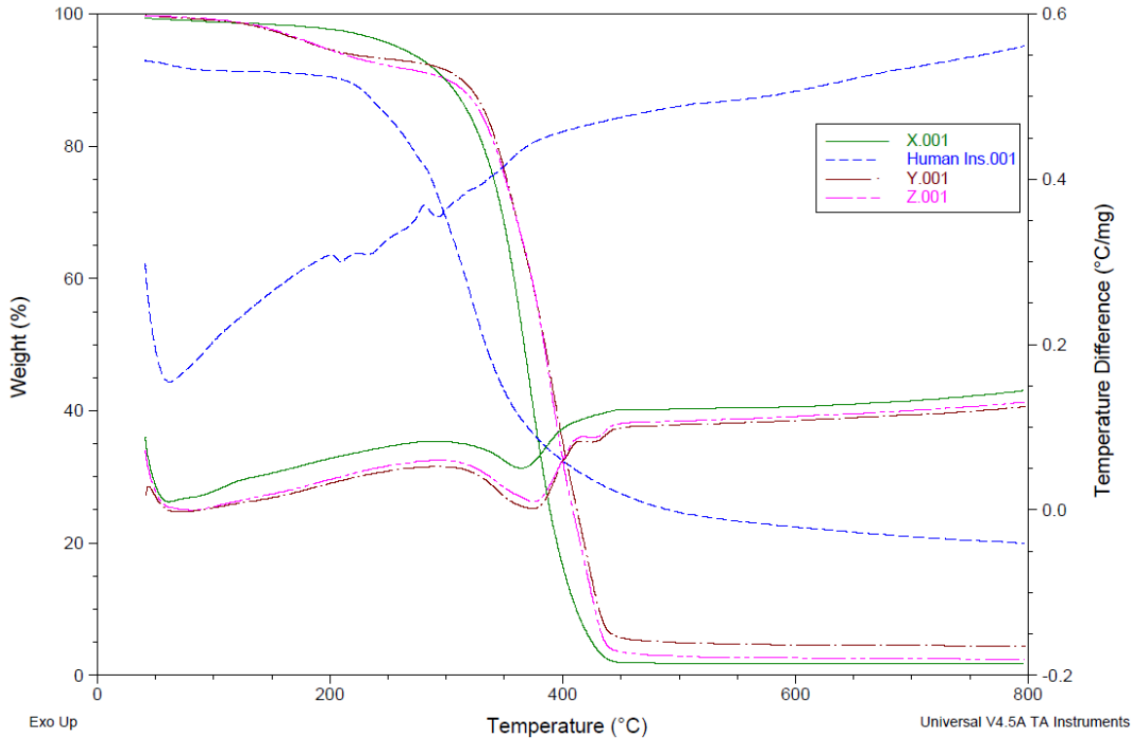
4.1.2. TGA-DTA ANALİZLERİ

Kurutulup toz haline getirilmiş I-1, I-2 membranları ve insan insülini TGA (SDT Q600 V20.9 Build 20) kullanılarak analiz edilmiştir. İnsan insülininden yaklaşık 3 mg kullanılırken membran örnekleri 11-15 mg ağırlığındadır. Toz halindeki örnekler, 40 °C-800 °C sıcaklık aralığında azalan % ağırlık olarak ölçülmüştür. Analizler 10 °C/dak. ısıtma hızında, azot gazı atmosferinde yapılmıştır. Buna ek olarak erime, kaynama, parçalanma gibi endotermik ya da ekzotermik değişimlerin izlenebildiği DTA (diferansiyel termal analiz) verileri de alınmıştır.



ŞEKİL 4.3. İnsülin içermeyen I-1 Membranı ve I-1 Membranına ait TGA Analiz Termogramı

TGA analiz ait termogramı incelediğimizde, 100 °C civarında sadece insülinde çok az bir kayıp görülmektedir. Bunun nedeninin su çıkışı olabileceği düşünülmektedir. 100 °C ve 450 °C aralığında kütle azalışları görülmektedir. İnsülin içermeyen I-1 membranı (A) ve I-1 membranında (B) 175-300 °C bölgesinde görülen bozulmanın farklı % ağırlık değerine sahip olması I-1 membranının, insülin içermeyen I-1 membranından farklı olan insülinde kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda DTA analizleri takip edildiğinde insülinde endotermik bozulmaların olduğu görülmektedir. İnsülin içermeyen I-1 membranı ve I-1 membranlarında endotermik bozulmanın olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).



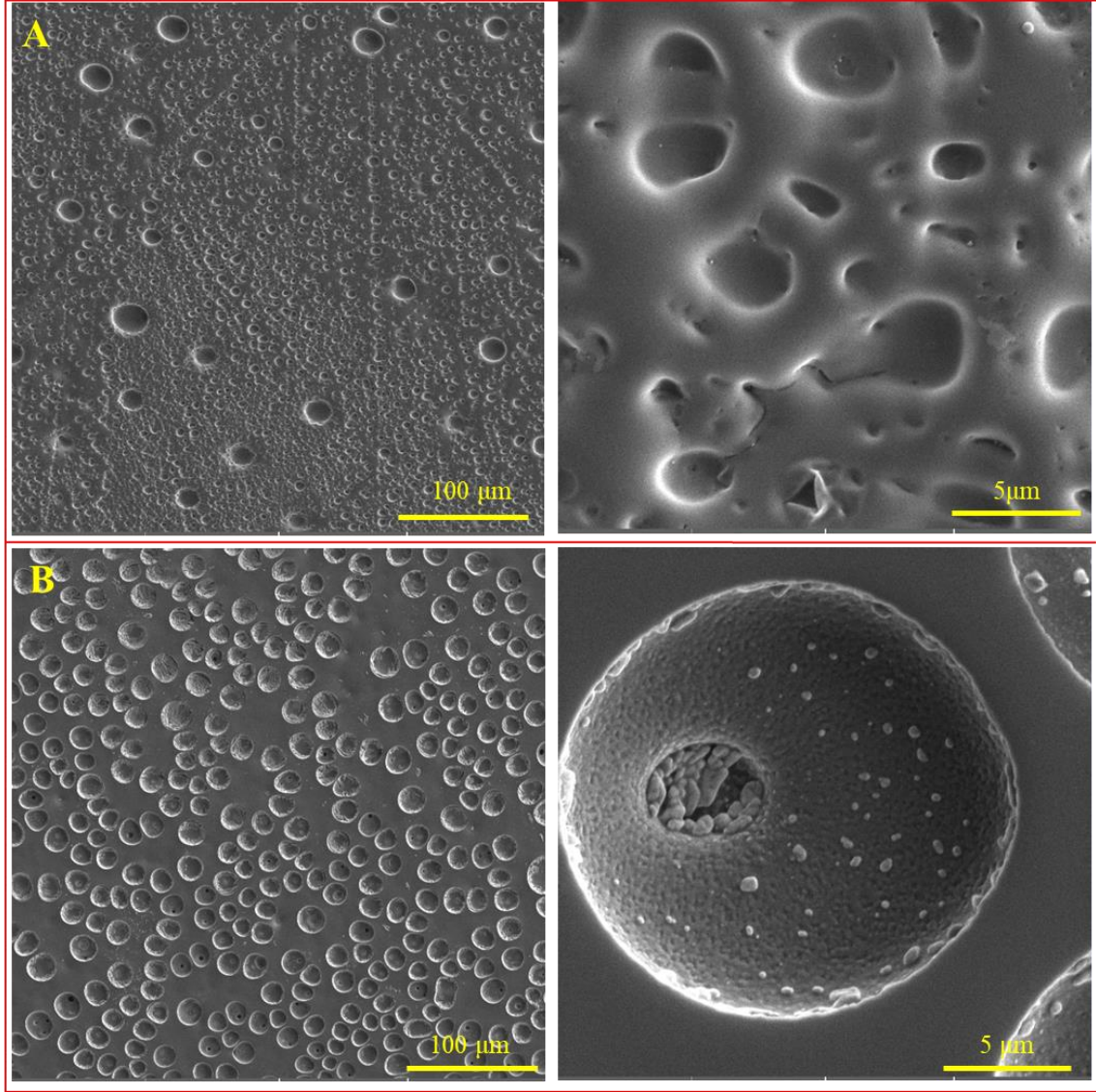
ŞEKİL 4.4. İnsülin İçermeyen I-2 Membranı, I-2.1 Membranı ve I-2.2 Membranına ait TGA Analiz Termogramı

Şekil 4.4’ de I-2.1 ve I-2.2 membranlarına ait termogramında 100 °C ve 450 °C aralığında kütle değişimi görülmektedir. 175-350 °C bölgesinde görülen bozulmada insülin içermeyen I-2 membranı (Z), diğer membranlara göre daha fazla kütle kaybına uğramıştır. Bu durum göz önüne alındığında I-2.1 (Y) ve I-2.2 (X) membranlarında bulunan insülinin etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. I-2.2 membranına ait termogramın insüline olan benzerliği açıktır ancak insülinde keskin bir düşüşün gerçekleştiği 250-300 °C bölgesinde I-2.2 membranı daha yumuşak şekilde kütle kaybına uğramıştır. Bunun sebebinin I-2.2 membranının yapısında bulunan polimerik malzemeden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir. I-2.2 ve I-2.1 membranları arasındaki farkın ise insülin miktarının artmasıyla meydana geldiği kanısına varılmıştır.

4.1.3. SEM ANALİZLERİ

Taramalı elektron mikroskobu (Tescan, GAIA 3) yardımıyla kurutulan membranların yüzey analizleri gerçekleştirilerek yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinmek amaçlanmıştır. Membranlar 500x (100 µm), 2000x (20 µm) ve 10000x (5 µm) olmak üzere üç farklı büyütme ile SEM görüntüleri alınmıştır. Analiz edilen iki membranın da

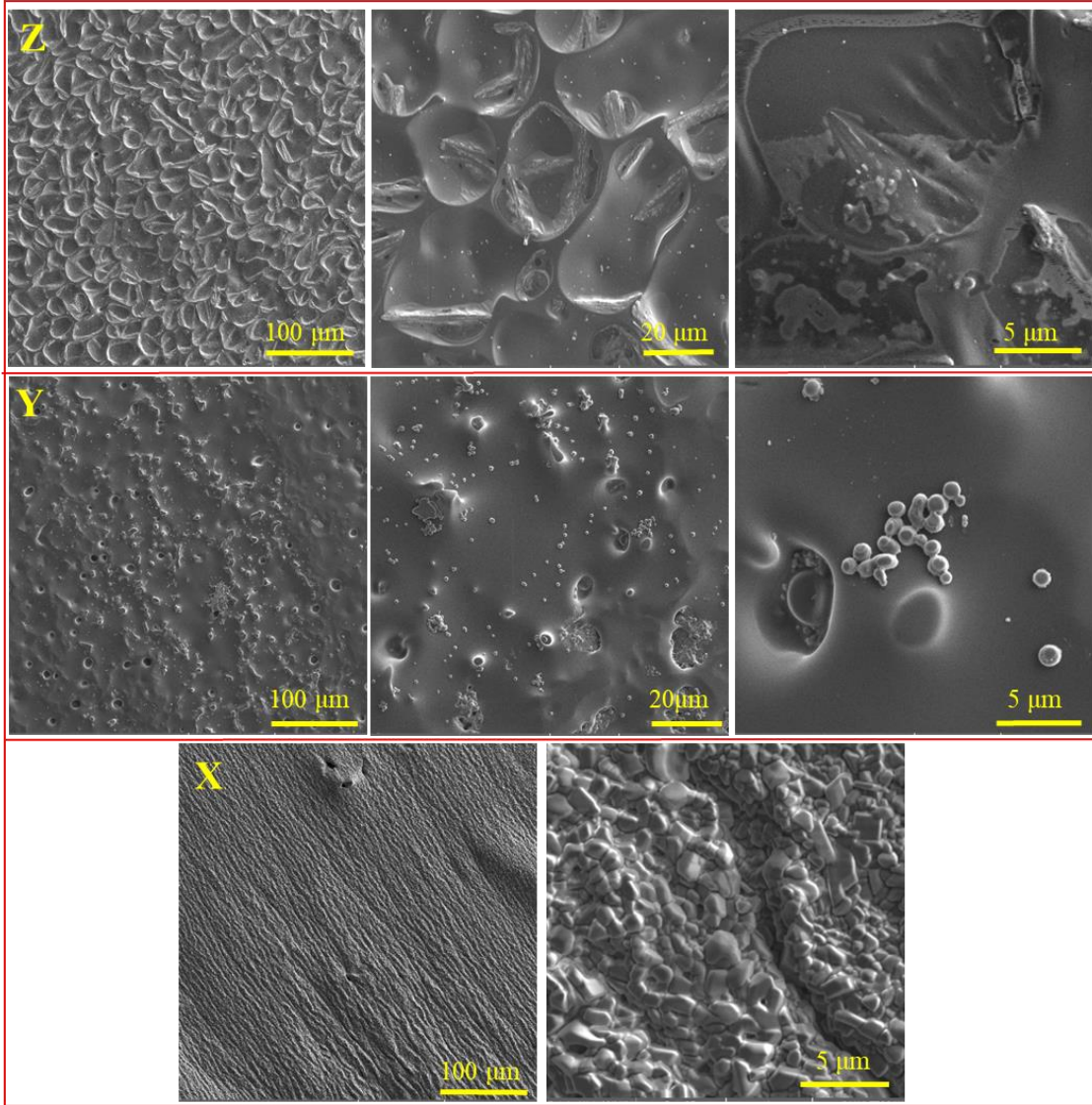
yüzeysel morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra insülin eklenen ve insülin eklenmeyen membranlar arasındaki farklılıklar gözlemlenmiştir.



ŞEKİL 4. 5. I-1 Membranı SEM Görüntüleri (A) İnsülin içermeyen I-1 Membranı 100 ve 5 µm (B) I-1 Membranı 100 µm 5 µm Büyütme Oranı İle Verilmiştir.

Şekil 4.21 de gösterilen A görüntüleri insülin içermeyen I-1 membranına aitken B görüntüleri insülin içeren I-1 membranına aittir. Bu maddelerin iki farklı büyütme oranıyla yüzeyleri incelenmiştir. I-1 membranı için yüzeyde dairesel partiküllerin varlığından bahsedilebilir. A görüntüsünde 100 µm büyütme de heterojen partikül dağılımına ve partikül boyutuna sahiptir. İnsülin içermeyen I-1 membranının 5 µm boyutundaki görüntülerinde gözenek olduğu düşünülebilecek bölgeler bulunmaktadır. Aynı maddeye ait 100 µm büyütme oranında bu gözenekler görülmemiştir. B görüntüsünde daha homojen partikül boyutu ve dağılımı mevcuttur. A ve B görüntülerini

birlikte değerlendirirsek 100µm büyüklüğindeki alanda gözlemlenen B görüntüsünde dairesel partikül miktarının A görüntüsüne göre azaldığı ve B görüntüsünde partikül boyutunun A görüntüsüne göre arttığı tespit edilmiştir. Bu durumun I-1 membranında insülin tutulumu olduğunu kanıtladığı düşünölmektedir. Başlangıç partiküllerine (insülin içermeyen I-1 membranına) insülin tutulumu gerçekteştikten sonra partiküllerde şekilsel bir değişiklik görölmemiştir.

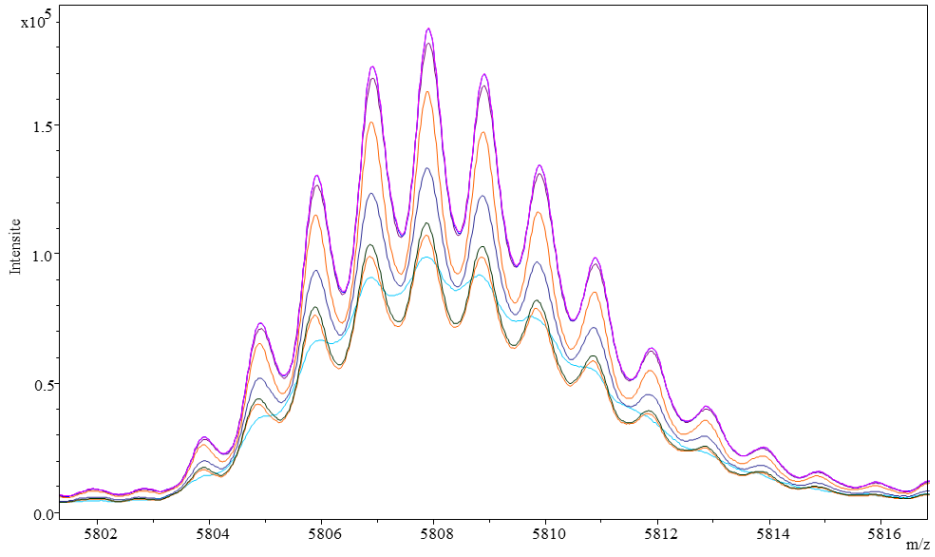


şEKİL 4. 6. I-2 Membranı SEM Görüntüleri (Z) İnsülin içermeyen I-2 Membranı 100µm, 20µm ve 5µm (Y) I-2.1 Membranı 100µm, 20µm ve 5µm (X) I-2.2 Membranı 100µm ve 5µm Büyütme Oranı İle Verilmiştir.

I-2 membranının üç farklı büyütme oranına ait SEM görüntüleri mevcuttur. Z insülin içermeyen I-2 membranına ait görüntülerde sürekli ve belirsiz şekle sahip yüzey varlığını göstermektedir. İnsülin içermeyen I-2 membranının, insülin içermeyen I-1 membranından farkı yapıda bulunan kitosandır. İki yapıdaki yüzeyin birbirinden tamamen farklı olması kitosan kaynaklı olabilir. Y görüntülerinde I-2.1 membranına ait görüntüleri incelediğimizde yüzeyde çukur bölgeler bulmaktadır, bu bölgelerin gözenek ya da sadece yüzeydeki çukurluk mu olduğuna karar verilememiştir. Buna ek olarak yapıda kümelenmeler olduğu görülmektedir. Bu kümelenmeler yapıya insülin tutulumunun homojen olarak gerçekleşmediğini göstermektedir. I-2.2 membranına ait X görüntülerinde yüzeyin tamamen belirsiz şekilli partiküller tarafından kaplandığı görülmektedir. I-2.2 membranında (X) yüzeyde görülen mikro yapı, insülin içermeyen I-2 membranından (Z) ve I-2.1 membranından (Y) tamamen farklıdır. Bu membranın içeriğinde sadece insülin miktarının fazla olduğunu göz önünde bulundurursak yapıdaki insülin konsantrasyonunun yüzey morfolojisini tamamen değiştirdiği gözlemlenmektedir. Bu değişime göre yapının insüline doyduğunu söyleyebiliriz.

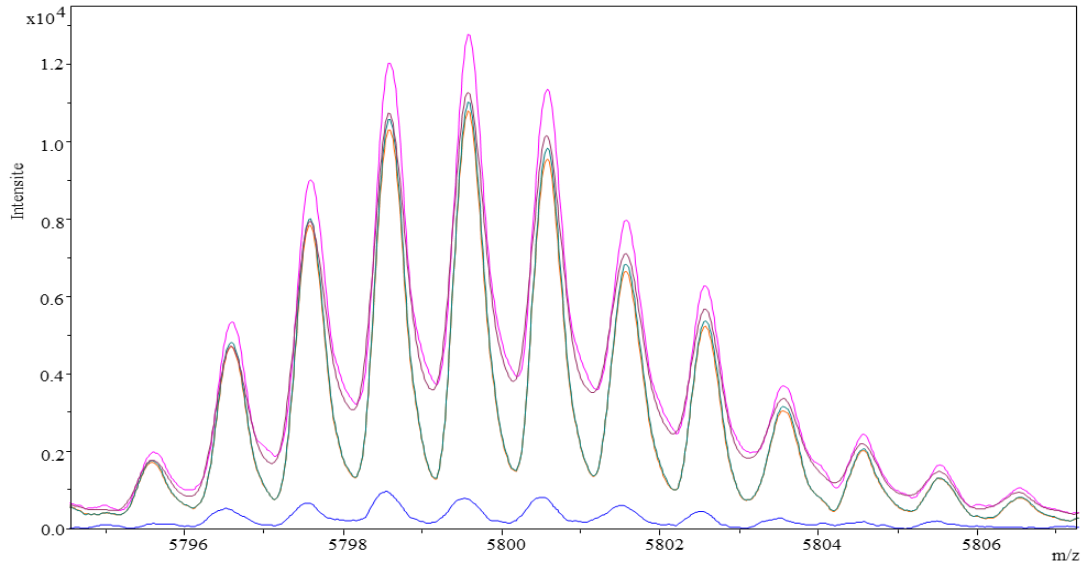
4.2. SU İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI

MALDI-TOF-MS cihazı kullanılarak kalitatif olarak gözlemlenen insülin hormonuna ait moleküler iyon pikleri izlenmiştir. Kantitatif analiz sürecinde; düşük derişimler de yüksek hassasiyet ve doğrulukta analiz yapabilen LC- ORBİTRAP-MS cihazı kullanılmıştır. Elde edilen veriler X CALIBUR programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Ortalama alan değerleri bulunmuştur. Ortalama alan değerleri kalibrasyon grafiğinden elde edilen eşitliğe yerleştirilerek tek tek derişim değerleri hesaplanmıştır. Bulunan derişim değerlerinden yararlanılarak derişim-zaman grafiği çizilmiştir.



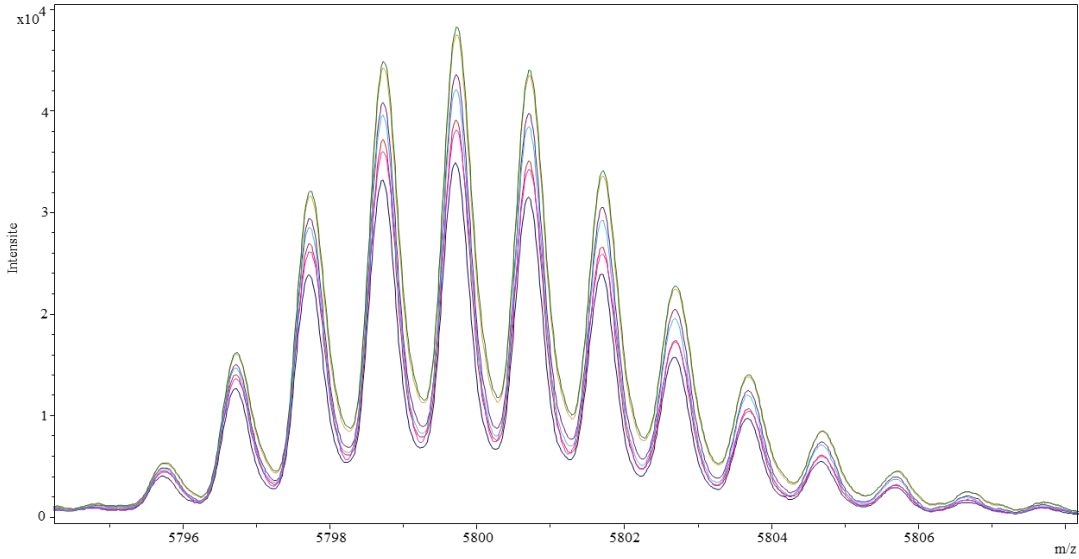
ŞEKİL 4. 7. I-1 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.7 de insülin hormonuna ait moleküler iyon pikinde I-1 membranının su çözeltisi içerisindeki salımı gözleendiğinde 48 ve 72. Saatlere ait spektrumlar çakışmaktadır yani aynı şiddet değerlerine sahiptir. Bunun yanı sıra diğer saatlere ait şiddet değerleri birbirine yakınlık göstermektedir.



ŞEKİL 4. 8. I-2.1 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

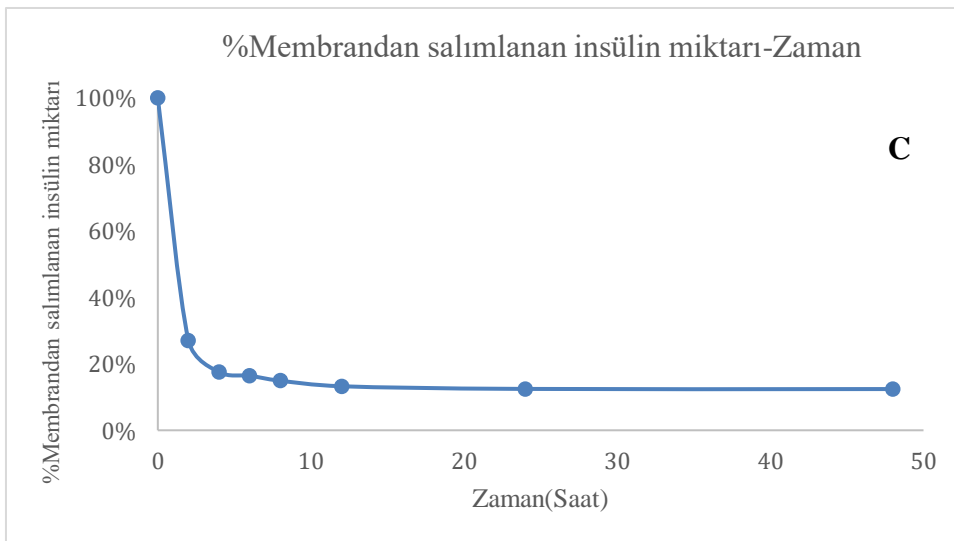
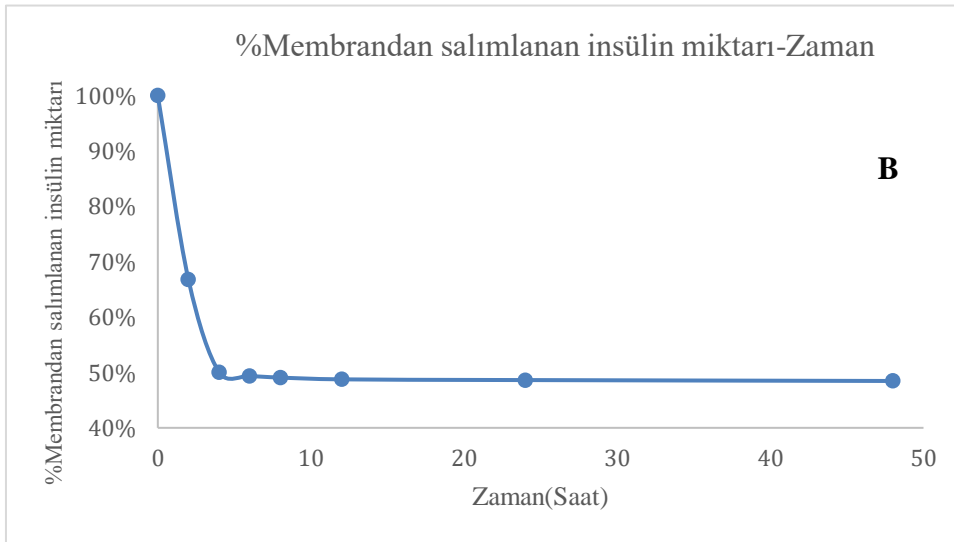
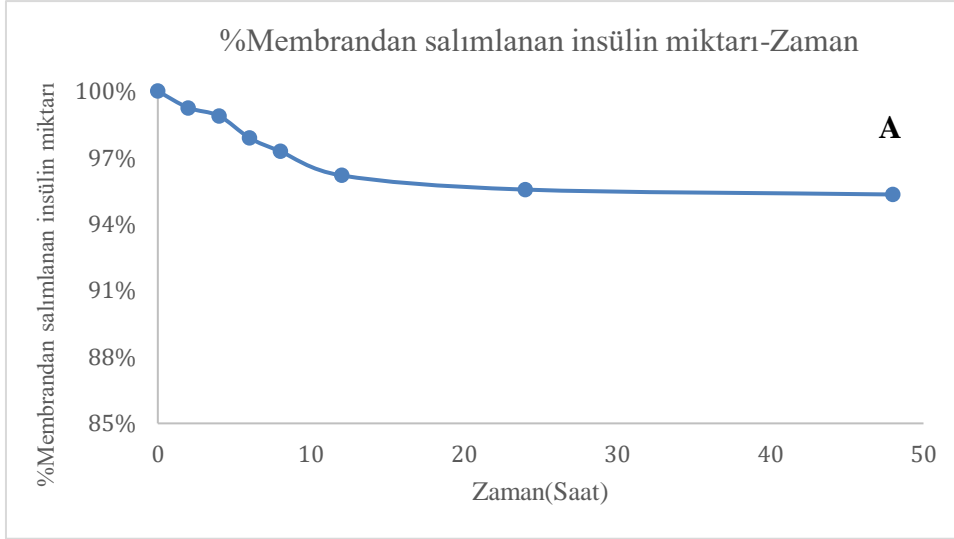
Şekil 4.8’ de membrandan 6.saat hariç takip edilen zamanlarda elde edilen insülinin moleküler iyon pikinin 2 ile 24 saat arasında izlenmesine dair spektrum mevcuttur. İlk iki saat dışındaki sürelerde şiddet değerlerinin birbirlerine yakınlığı dikkat çekmektedir.



ŞEKİL 4.9. I-2.2 Membranının Su İçerisinde İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.9 ile gösterilen spektrumda insülin hormonunun 48 saatlik süre içerisinde salımlanmasını göstermektedir. Şekil 4.8 de belirtilen I-2.1 membranı ile şekil 4.3 de belirtilen I-2.2 membranı arasında 1:2 insülin oranı bulunmaktadır ve bu durumun insülin hormonunun moleküler iyon pikinin intensite değerine yansıdığı görülmektedir.

Su içerisinde salımlanan insülin yüklü polimerik membranlarla yapılan MALDI-TOF-MS analizlerinden elde edilen spektrum incelendiğinde üç membran içinde geçerli olacak şekilde insülinin moleküler iyon pikine ait şiddet değerlerinin, membranın çözelti içerisinde inkübasyon sürelerinin artmasına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.



ŞEKİL 4. 10. Su İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salımlanan insülin Miktarı-Zaman Grafikleri

Su içerisinde insülin yüklü polimerik membranın inkübasyonu sonucunda ORBITRAP-MS analizleri sonucunda elde edilen verilere bağlı olarak Şekil 4.10 da görülen grafikler hazırlanmıştır. Bu grafikleri incelediğimizde 0.10 gram insülin yüklü polimerik membran içerisinde olması gereken insülin miktarları %100 kabul edilerek % membran dan salımlanan insülin miktarları zamana bağlı olarak gözlemlenmiştir.

I-1 membranının salım aralıkları incelendiğinde 48 saatlik sürede membran içerisinde bulunan insülinin neredeyse %5 kadarı salımlanmıştır. 4-6 saat ve 8-12 saat aralığında %1 kadar insülin salımlanmıştır. Membrandan izlenen saatler içerisinde salım miktarı %1'in üzerine çıkmamıştır (Şekil 4.10.A). I-2.1 membranında ilk 4 saatte incelenen diğer zamanlara göre daha hızlı insülin salımı gerçekleştiği gözlemlenirken, 2-4 saat aralığında salımlanan insülin miktarının ilk iki saate göre neredeyse yarıya düştüğü gözlemlenmiştir, 4 saat sonunda membran içerisinde bulunan insülinin %50'sinin su içerisine salımlandığı görülmektedir. 4-48 saat aralığındaki sürede salımlanan insülin miktarı %2 kadardır. Bu veriden yola çıkarak I-2.1 membranının su içerisinde sahip olduğu insülinin büyük bir kısmını ilk 4 saatlik süre de salımladığını daha sonra çok düşük hızda salım yapmaya devam ettiğini söyleyebiliriz (Şekil 4.10.B). I-2.2 membranın da ilk 2 saatte membran içerisinde bulunan insülinin %63 kadar büyük bir miktarı inkübasyon sonunda su çözeltisinde salımlandığı gözlemlenmiştir. 2-4 saat aralığında salımlanan insülin miktarı %9.5 olduğu görülürken, 4-48 saat aralığında membranda bulunan insülinin %5'i salınmıştır (Şekil 4.10.C).

Su içerisindeki inkübasyonları sonucunda; MALDI-MS analizleriyle elde edilen sürekli salım yapıldığına dair ön görüşü ORBITRAP-MS analizlerinde membranlardan salımlanan insülin miktarlarının kantitatif olarak tayin edilmesiyle doğrulanmıştır. I-1 membranı I-2.1 ve I-2.2 membranlarına göre daha yavaş salım yapmakta ve I-2.1 membranı da I-2.2 membranından daha yavaş salım yapmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda I-1 membranı diğer membranlardan daha uzun süreli olarak kullanılabilir.

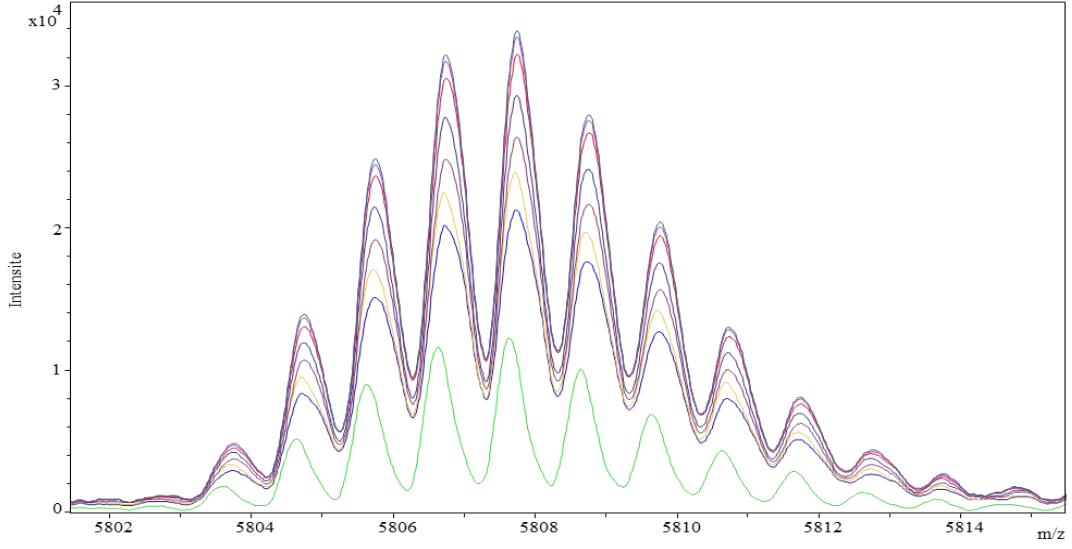
4.3. SODYUM Klorür ÇÖZELTİSİ İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI

Ter içerisinde su dışında en yüksek miktarda bulunan elektrolitler sodyum ve klor elementidir. Ter testi olarak adlandırılan ve kistik fibrosiz hastalığının tanısında kullanılan testte de bu iki elektrolitin miktarı ölçülmektedir. Kistik fibrosiz (KS) hastalarında ter ile birlikte daha fazla elektrolit atılmaktadır.

Polimerik membranı deriye yapıştırdığımızda membranın ilk karşılaştığı çözeltilerden biri de sodyum klorür çözeltisi olacaktır. Polimerik membranın sodyum klorür içerisindeki davranışı, vücuda yapıştırıldığında karşılaşacağımız davranışıyla benzerlik gösterecektir. Bu nedenle iki farklı sodyum klorür çözeltisi içerisinde polimerik membranların salım davranışı kütle spektrometrik yöntemlerle incelenmiştir.

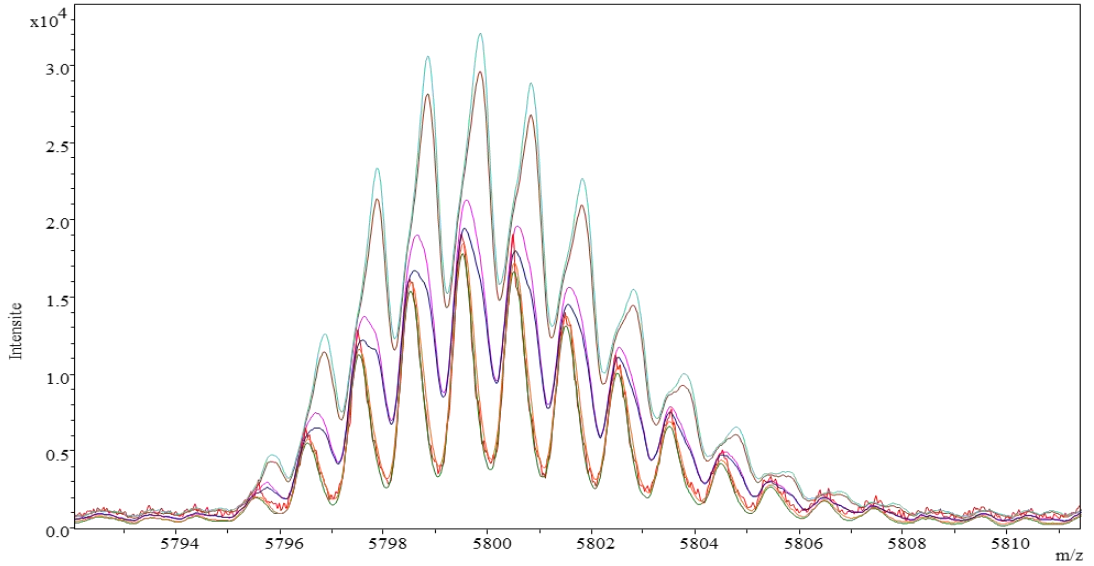
4.3.1. 0.05 M SODYUM Klorür ÇÖZELTİSİ DENEYLERİ

Belirli bir kütle de tartılan membranların 0.05 M derişimde hazırlanan çözelti içerisindeki salım miktarı ölçülmüştür. Analizlerde MALDI-MS ve ORBITRAP-MS cihazları kullanılmıştır. MALDI-MS cihazına ait flexanaysis programında elde edilen verilerde insülinin moleküler iyon piki izlenmiştir. ORBITRAP-MS analizleri sonucunda TIC (total iyon kromatogram) kullanılarak alan değerleri belirlenmiş ve belirtilen saat için ortalama alan değerleri hesaplanmıştır. Ortalama alan değerleri, standart insülin çözeltisinden elde edilen kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak, belirtilen zamanlarda membranın salım miktarı elde edilmiştir. 0.10 gram membrandan salımlanabilecek toplam insülin miktarı kullanılarak membranın 0.05 M sodyum klorür çözeltisindeki inkübasyonunda insülin salım davranışı grafiklerle gösterilmiştir.



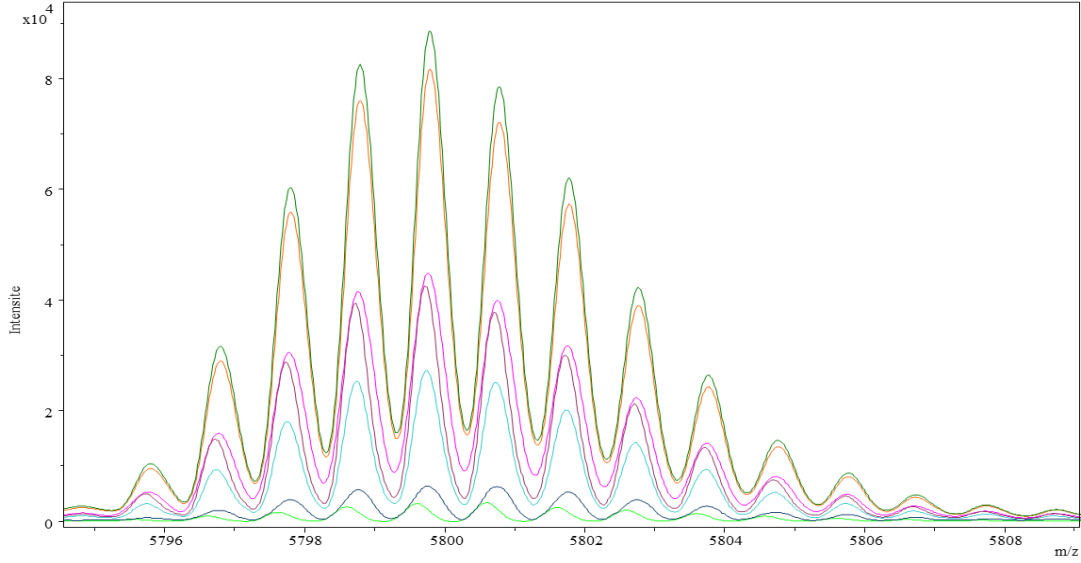
ŞEKİL 4. 11. I-1 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

2-72 saat aralığındaki süre boyunca 0.05 M NaCl çözeltisinde inkübe edilen I-1 membranından salımlanan insüline ait moleküler iyon pikleri zamana bağlı olarak artan şiddet değeri ile gözlenmektedir. 24, 48 ve 72. saatlere ait pik şiddetleri birbirleriyle tamamen çakışmasa da yakınlık göstermektedir. 4-24 saat aralığındaki pik şiddetlerini incelediğimizde inkübasyon süresinin artmasıyla pik şiddetleri arasında benzer bir artış bulunduğu söylenebilir.



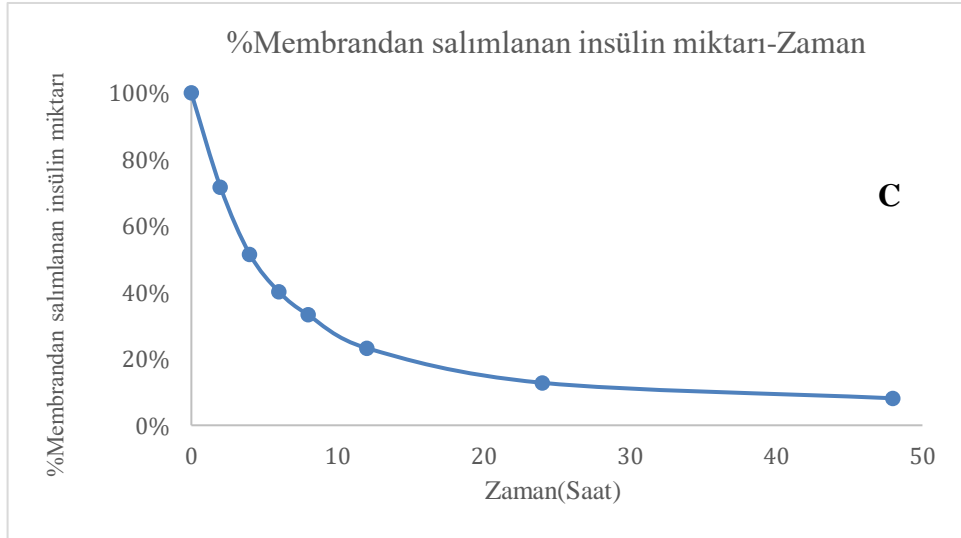
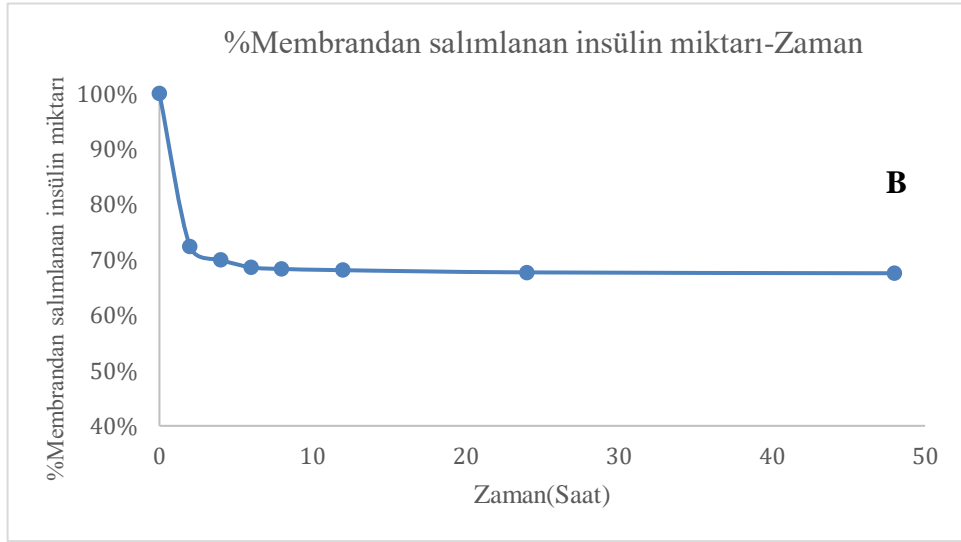
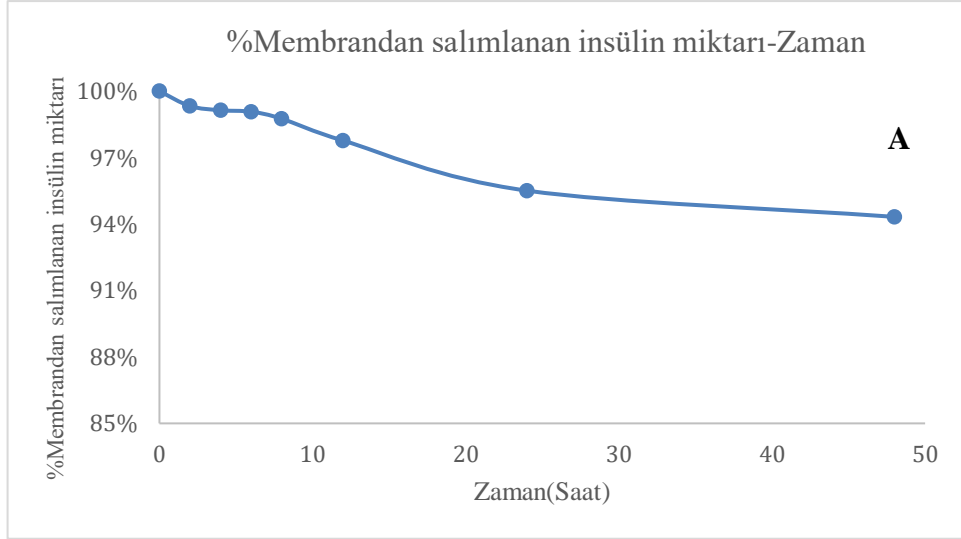
ŞEKİL 4. 12. I-2.1 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.12’ de sodyum klorür çözeltisi içerisinde 48 saatlik süre de gözlemlenen I-2.1 membranının moleküler iyon piki vardır. 2-8 saat arasındaki şiddet değerleri yakınlık göstermektedir.



ŞEKİL 4. 13. I-2.2 Membranının 0.05 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.13’de I-2.2 membranına ait spektrumda 48 ve 72.saat değerleri birbiriyle tam olarak örtüştüğü için 72. Saate ait pikler verilmemiştir. 48. Saatte inkübasyona ait olan spektrumda şiddet değerinin I-1 ve I-2.1 membranlarına ait şiddet değerlerinden iki kattan daha fazla bir artış gösterdiği gözlemlenmektedir. Ancak I-1 ve I-2.1 spektrumlarına göre zamana bağlı olarak gözlemlenen pik şiddetlerinde farklılıklar mevcuttur.



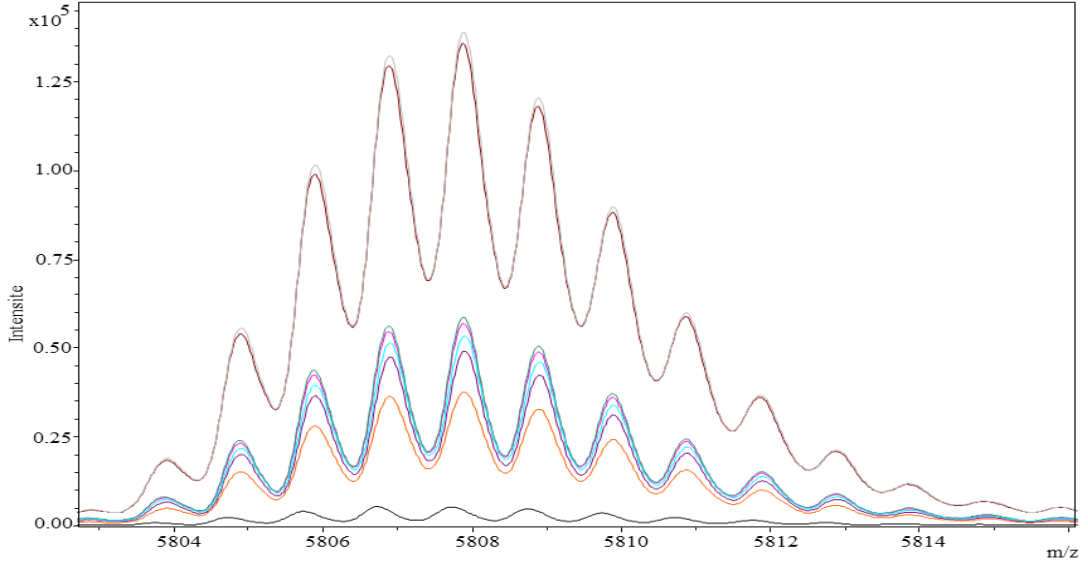
ŞEKİL 4.14. 0.05M NaCl İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri

0.05 M sodyum klorür çözeltisi içerisinde inkübe edilen membranların ORBITRAP-MS analiz verileri şekil 4.14' de gösterilmektedir. 0.10g membranın kullanıldığı durumda teorik olarak salımlanması düşünülen insülin değeri baz alınarak grafikler çizilmiştir.

I-1 membranına ait salım davranışı incelendiğinde membranda bulunan insülinin yaklaşık %6 kadarının 0.05 M sodyum klorür çözeltisi içinde salımlandığı görülmektedir. Membranın kullanımında avantaj olarak görülebilecek bir husus olarak 0-12 ve 12-24 saatleri arasında salımlanan insülin miktarı sırasıyla %3.3 ve %2.6 gibi birbirine yakın olması gösterilebilir. 24 saatlik süre içerisinde salımlanan insülin miktarı 12 saatlik periyotlar halinde bakıldığında eşit denebilecek düzeydedir (Şekil 4.14.A). I-2.1 membranına ait 48 saatlik sürede % salımlanan insülin grafiğinde, ilk iki saatlik süre içerisinde insülin salımının %28 olduğu gözlenmektedir. Buna karşın 2-48 saatleri arasında membrandan sadece %5 insülin salımlanmıştır. 6-48 saat aralığında ölçüm alınan saatler arasında neredeyse %0.27'lik bir insülin salım davranışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.14.B). I-2.2 membranının 48 saatlik sürede % membrandan insülin salım grafiğinde bu süre içerisinde membranda bulunan insülinin %92 gibi büyük bir kısmını salımlandığı gözlenmiştir. 0-2 saatlik sürede %29.5 miktarda insülin salımlanmıştır. 2-4 saat aralığında membranda bulunan insülinin %20'si 4-6 saat aralığında ise %11'i kadar insülin salımlanmaya devam etmiştir.. Bunun yanı sıra, 0-4 saat arasında membranda bulunan insülinin %51'i salımlandığı, 4-12 saat aralığında ise membranda bulunan insülinin %26'sının salımlandığı görülmüştür. 12-24 saat aralığında membrandan %10.4 insülin salımlanmıştır. Bu durum göz önünde bulundurulursa membranın ilk 4 saatte membranda görülen insülin salım davranışı, sonraki 8 saatte neredeyse yarı yarıya azalmıştır. İzlenen sonraki zaman dilimlerinde salım yavaşlayarak devam etmiştir (Şekil 4.14.C).

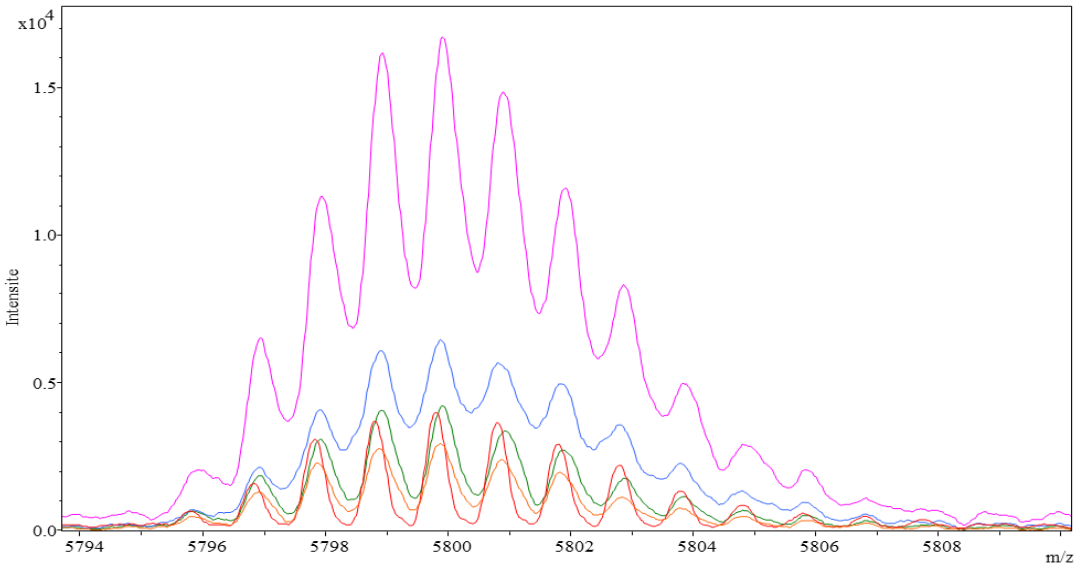
Analiz edilen üç membranın salım hızlarını karşılaştırsak, en hızlı salım yapan membran I-2.2 membranı iken, en yavaş salım hızına sahip membran I-1 membranıdır. I-2.1 membranında kullanılan insülin miktarı ile I-2.2 membranında kullanılan insülin miktarı arasında orantısal bir ilişki olmasına rağmen bu durumun insülinin salımlanma eğilimine yansımadağı görülmektedir.

4.3.2. 0.1 M SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ DENEYLERİ



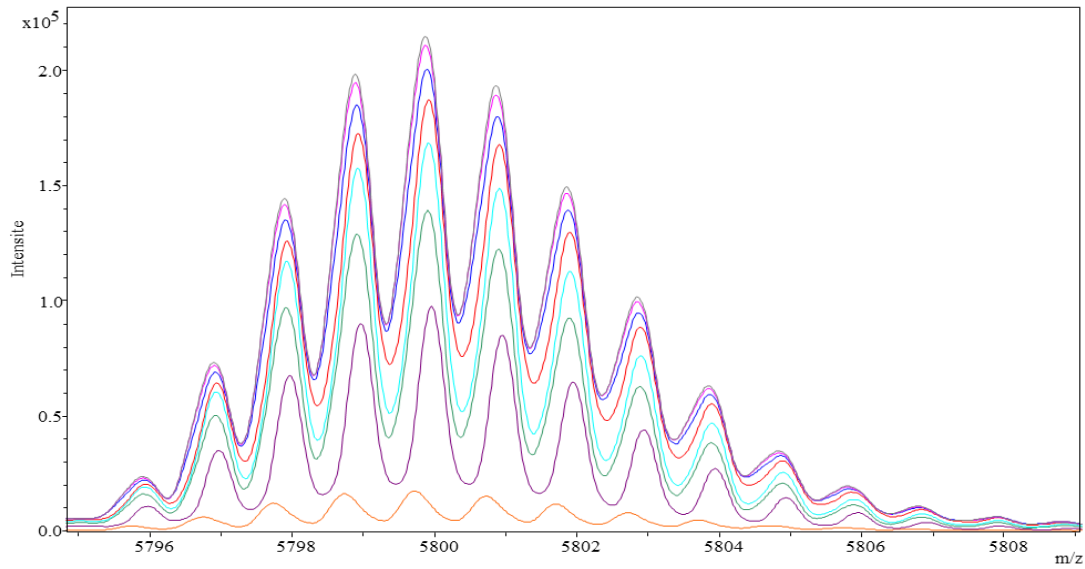
ŞEKİL 4. 15. I-1 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.15’de gösterilen I-1membranından 72 saatlik sürede salımlanan insüline ait moleküler iyon pikleri incelendiğinde 4-24 saatleri arasında iyon şiddetleri Şekil 4.11 ile gösterilen 0.05 M NaCl çözeltisinde salımlanan insülinin şiddet değerine göre daha yüksek şiddet değerleri gözlemlenmektedir.



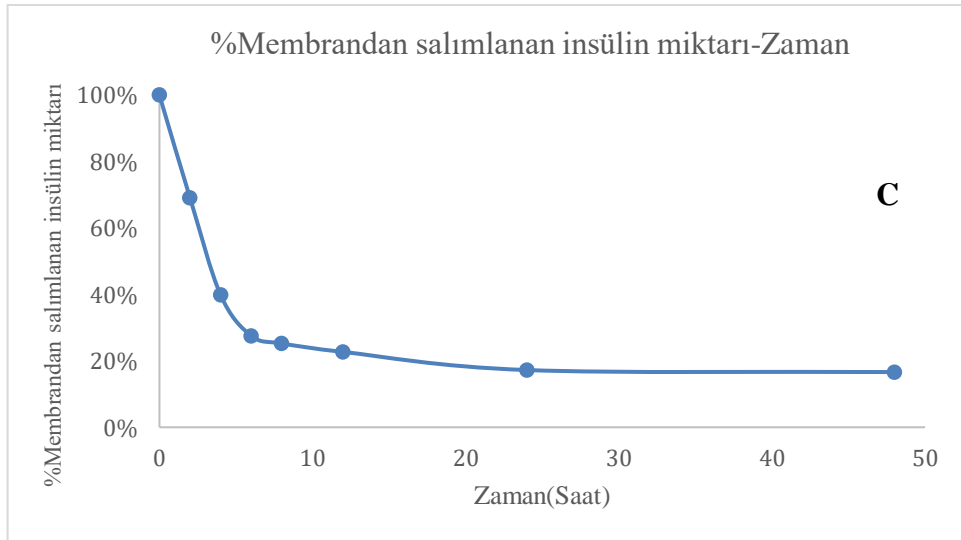
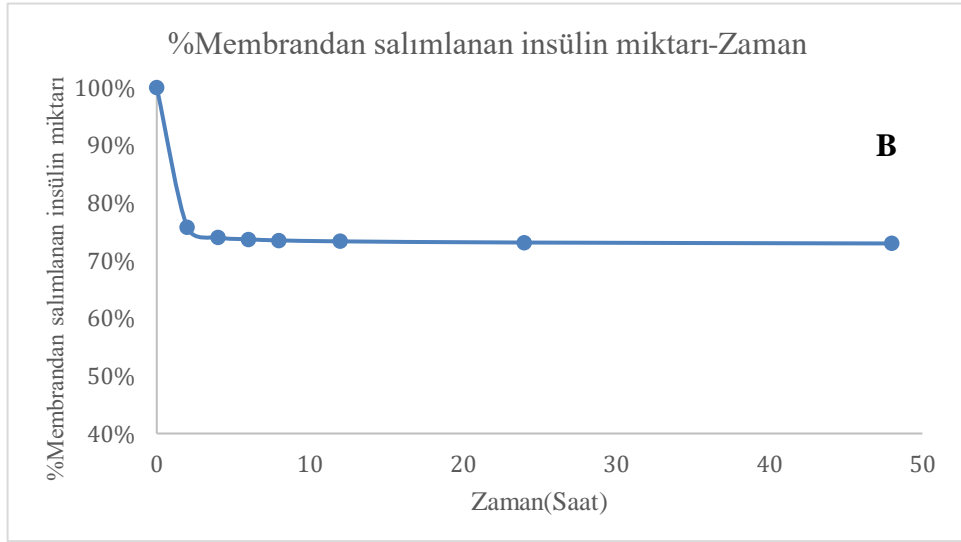
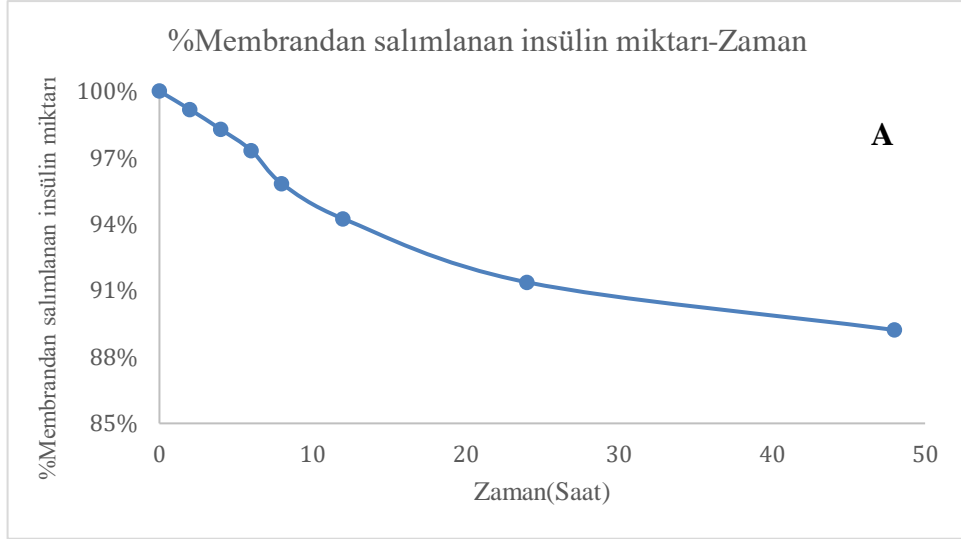
ŞEKİL 4. 16. I-2.1 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.16, I-2.1 membranının 48saatlik süre içerisindeki salıma aittir. Bu süre içerisinde 6.saate ait insülin salımını kanıtlayacak moleküler iyon piki görülmemiştir. Aynı zamanda 2 ve 4 saatlerine ait spektrumlarda çakışma meydana geldiği için 4.saate ait kütle spektrumu eklenmemiştir. Şekil 4.12 ile gösterilen 0.05M NaCl içerisinde insülin salımına ait kütle spektrumları ile karşılaştırıldığında daha düşük şiddete pikler mevcuttur. Bu durum girişim yapan türlerin varlığından, ortamda bulunan NaCl derişiminden kaynaklanmış olabilir, şekilde gösterilen spektruma bakarak bu konu hakkında net bir bilgi vermek mümkün olmayacaktır.



ŞEKİL 4. 17. I-2.2 Membranının 0.1 M NaCl Çözeltisi İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.17' de 72 saatlik süre içerisinde salımlanan insülin hormonuna ait moleküler iyon pikleri bulunmaktadır. 2 saat ve sonrasında izlenen saatlerde pik şiddetleri arasındaki fark giderek azalmıştır. I-2.1 membranına ait spektrum (Şekil 4.16) ile karşılaştırırsak I-2.2 membranına ait insülin piklerinin daha şiddetli olduklarını gözlemleyebiliriz.



ŞEKİL 4. 18. 0.1 M NaCl İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait %Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri

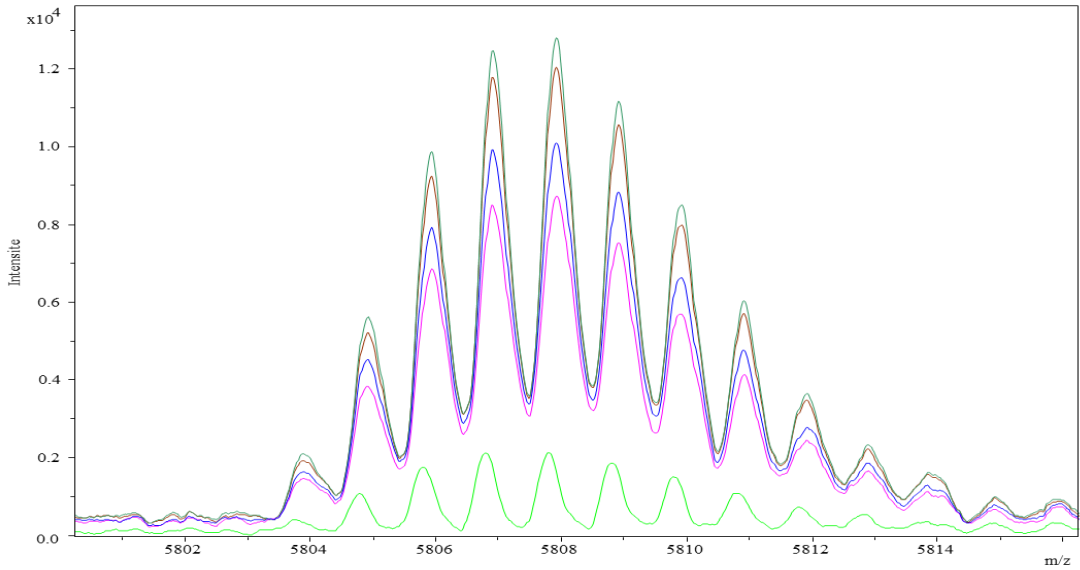
Şekil 4.18' de 0.1 M sodyum klorür çözeltisinde inkübe edilen üç membranin ORBITRAP-MS analizleri sonunda elde edilen %membrandan insülin salım grafikleri mevcuttur. I-1 membranında zamana bağlı olarak salımlanan insülin miktarı, toplam insülinin yaklaşık %11'i kadardır. 0-12 ve 12-24 saat aralığında sırasıyla %5.8 ve %2.9 oranında insülin salımı gerçekleşmiştir. 24-48 saat aralığında bu oran %2.15'e kadar düşmüştür. Bu durumda 0.1 M sodyum klorür içerisinde I-1 membranından salımlanan insülin miktarının 48 saatlik süre içerisinde yavaş yavaş azaldığını söyleyebiliriz (Şekil 4.18.A). Aynı zamanda 0.05 M NaCl çözeltisi içerisinde salımlanan insülin miktarı (%5.7) ile karşılaştığımızda sodyum klorür derişimi arttığında salımlanan insülin miktarı da neredeyse aynı oranda artmıştır bu durum göz önünde bulundurulduğunda kistik fibrosiz hastaları gibi normalden daha fazla terleyen insanların I-1 membranını kullanabileceklerini söyleyebiliriz. I-2.1 membranının salım davranışını incelediğimizde ilk 2 saatte membran içerisinde bulunan insülinin %24'ünü salımladıktan sonra izlenen 2-48saatlik süre içerisinde membranda bulunan insülinde sadece %2.8'i salımlanmıştır.2 saat sonunda insülin salım miktarında hızlı ve ani bir düşüş olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.18.B). 48 saatlik sürede membranda bulunan insülinin %27'si salımlanmıştır ve bu 0.05 M NaCl çözeltisinde 2 saat içinde salımlanan insülin miktarından daha azdır. İki farklı derişimde salımlanan I-2.1 membranları arasında orantısal bir ilişki kurulamamıştır ancak sodyum klorür derişiminin yüksek olduğu durumda membrandan salımlanan insülin miktarının azaldığı görülmektedir. I-2.2 membranının içerisinde bulunan insülinin %83.4 kadarını salımladığı görülmektedir. 0-2 saatte %31 insülin ve 2-4 saat aralığında ise %29 insülin salımı gerçekleşmiştir. İlk 4 saat içerisinde membrandan insülin salım davranışı benzerlik göstermektedir. 4-48 saat aralığında ise membrandan %23'lük bir insülin salımı gerçekleşmiştir. Bu durumda 4 saatten sonra membranın insülin salımının daha yavaş olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.18.C). Aynı membranı 0.05 M NaCl çözeltisi içerisindeki davranışı ile karşılaştırsak, 0.1 M NaCl çözeltisinde 48 saatte daha az insülin salımı yaptığını söyleyebiliriz.

0.1M NaCl çözeltisinde I-2.2 membranı 48saatlik sürede, membran içerisinde bulunan insülinin %83.4 kadarını salımlarken, I-1 membranı sahip olduğu insülinin sadece %11'ini salımlayarak en düşük miktarda insülin salımı yapan membran olmuştur. İki farklı derişimde membran davranışlarını ele aldığımızda sadece I-1 membranı 0.05M ve 0.1M derişimde benzer insülin salım davranışı göstermektedir.

4.4. FOSFAT TAMPONU (pH 7.4) İÇERİSİNDE POLİMERİK MEMBRANDAN İNSÜLİN HORMONU SALIMI

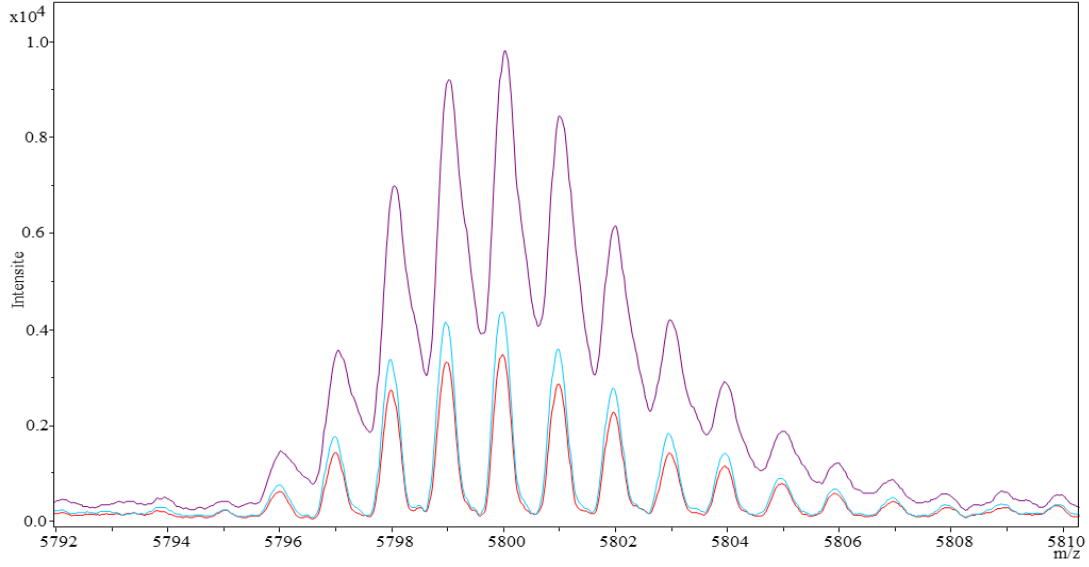
Vücudumuzda dolaşan kanın sağlıklı insanlarda pH değeri 7.4 civarında olduğu bilinmektedir. Bu pH değeri 7'nin altına düştüğünde kanın asitlik değeri artar ve bu durum çeşitli hastalıklara neden olabilir yani olağanüstü durumlar dışında vücutta kanın pH değeri 7.4 civarındadır.

Vücuttaki kan ortamının bir göstergesi olarak pH değeri 7.4 olan fosfat tamponu çözeltisi içerisinde insülin yüklü polimerik membranın, insülin salım davranışı MALDI-MS ve ORBITRAP-MS cihazları kullanılarak incelenmiştir.



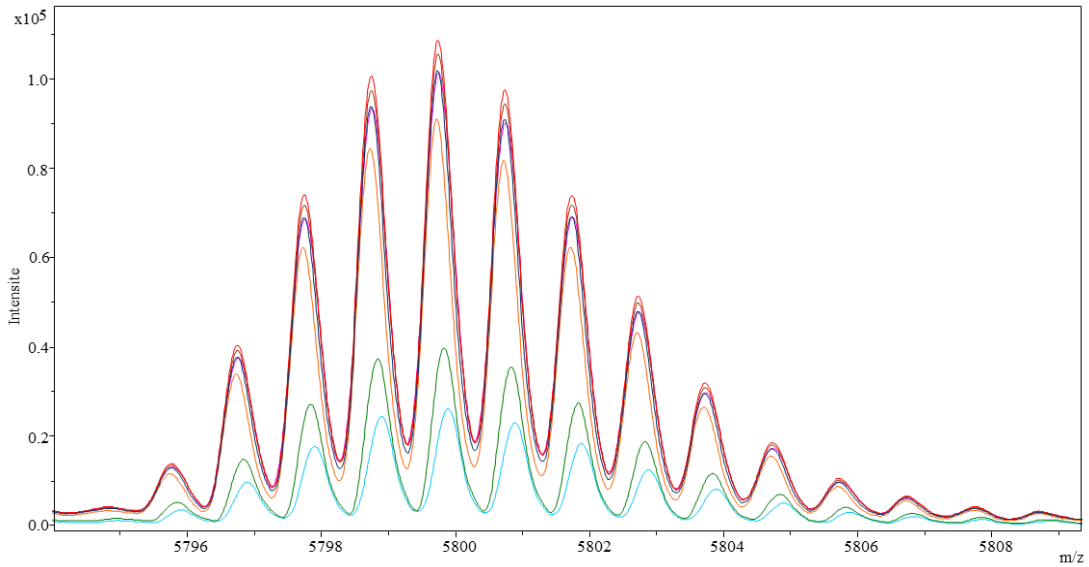
ŞEKİL 4. 19. I-1 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

I-1 membranın MALDI-MS spektrumunda 4-24 saat aralığındaki sonuçlar mevcuttur. 4.saate ait şiddet değeri diğer zamanlara göre daha düşüktür.



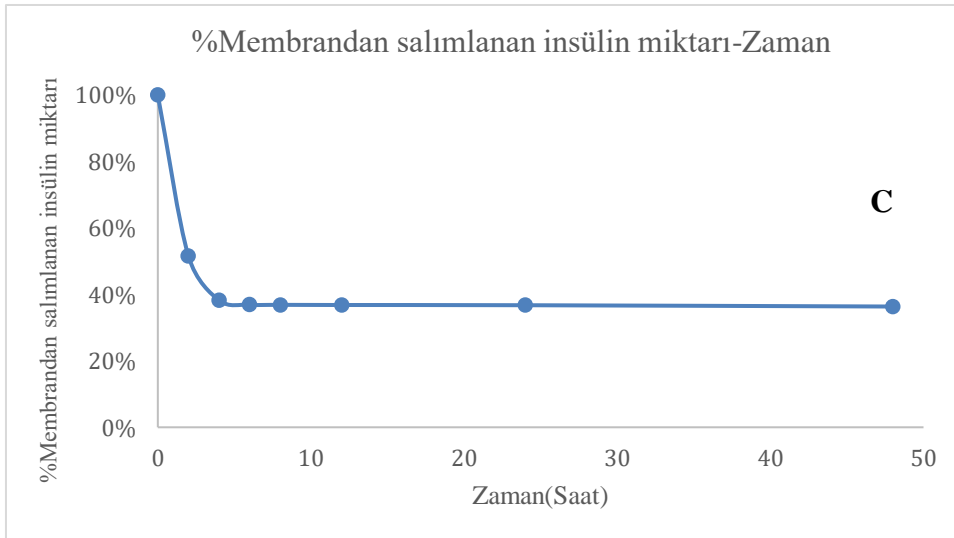
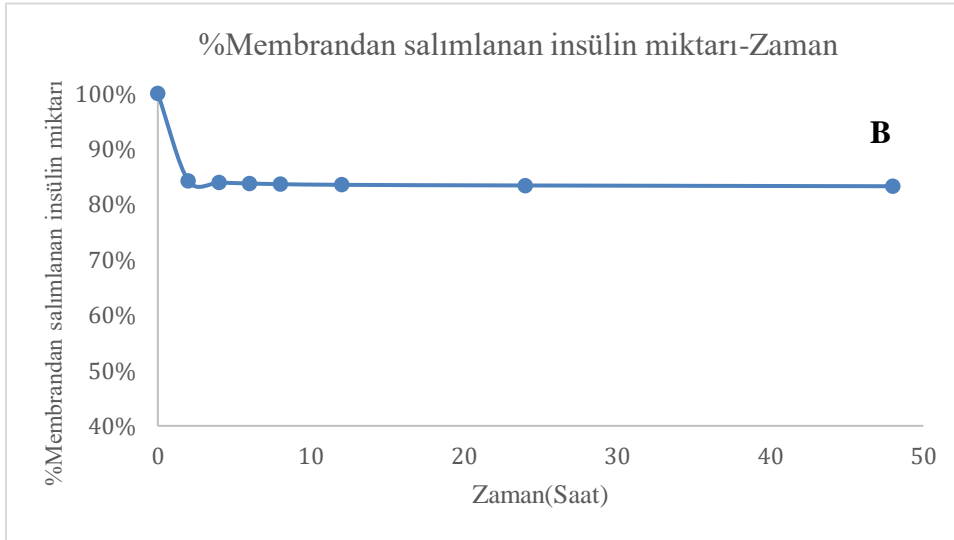
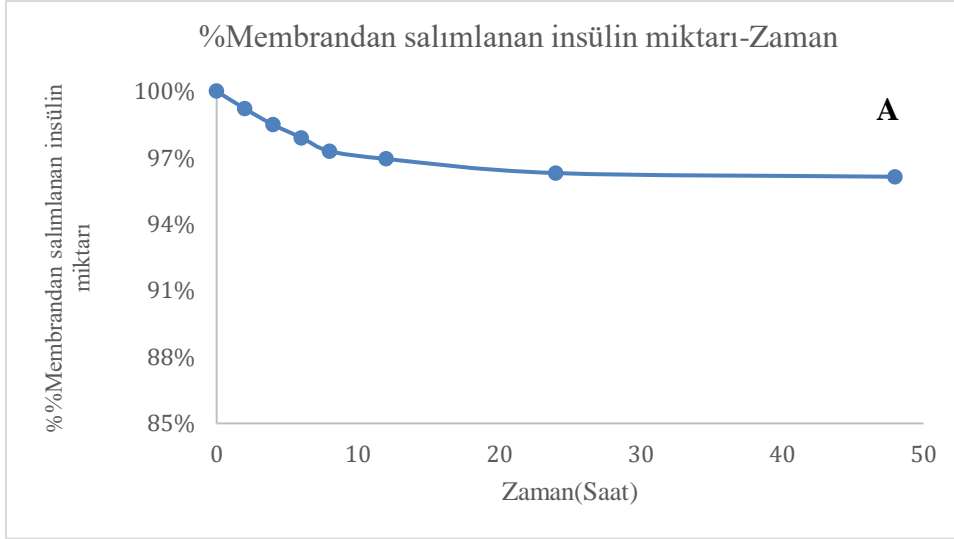
ŞEKİL 4. 20. I-2.1 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

Şekil 4.20 ile gösterilen I-2.1 membranının fosfat tamponu içerisindeki salımına ait veriler 2-4 ve 24 saatte membranın salım davranışını göstermektedir. 2-72 saat aralığında takip edilen diğer saatlerde (6-8-12-48-72.saatler) insülinin moleküler iyon pikine rastlanmamıştır. MALDI-MS sonuçlarına gözlenmeyen saatlerde insülin salımının devam edip etmediği bilinmemektedir.



ŞEKİL 4. 21. I-2.2 Membranının Fosfat Tamponu İçerisindeki İnkübasyonuna Ait MALDI-MS Spektrumu

I-2.2 membranının 2-48saatler arasında izlenmesiyle elde edilen MALDI-MS verileri Şekil 4.21 ile gösterilmiştir. 12 ve 24 saatlerine ait salımlanan insülinin moleküler iyon pikinin şiddet değerleri aynıdır.



ŞEKİL 4. 22. Fosfat Tamponu İçerisinde Çözünen (A) I-1 Membranına (B) I-2.1 Membranına (C) I-2.2 Membranına Ait % Membrandan Salımlanan İnsülin Miktarı-Zaman Grafikleri

Şekil 4.22’de fosfat tamponu içerisinde inkübe edilen membranların ORBITRAP-MS analizleri sonunda çizilen grafikler mevcuttur. I-1 membranını incelediğimiz de içerisinde bulunan insülinin yaklaşık %4 kadarını salımladığı görülmektedir. 0-8 saat aralığında %2.7 insülin salınımı gerçekleştirilirken, 12-48 saat aralığında %0.8 insülin salımı gerçekleştirmiştir (Şekil 4.22.A). Toplam salımlanan insülin miktarı I-1 membranının diğer çözücüler içerisinde salımladığı insülin miktarlarına göre en az olanıdır. I-2.1 membranı 48 saatlik sürede %16.8 insülin salımı gerçekleştirmiştir. 0-2 saat aralığında yaklaşık salımlanan insülin miktarı %15.8’dir.. Buna göre insülin salımının aniden azaldığını söyleyebiliriz (Şekil 4.22.B). I-2.2 membranını incelediğimizde, membranda bulunan insülinin %62.6 kadarını 48 saatlik süre içerisinde salımladığı görülmektedir, salımlanan insülinin yaklaşık %48.5 kadarı ilk iki saat içerisinde salımlanmıştır. 2-4 saat aralığında yaklaşık %13 insülin salımlanmıştır. 6-48 saat aralığında %0.58 insülin salımladığı görülmektedir (Şekil 4.22.C). Fosfat tamponu içerisinde membranların salım davranışlarını incelediğimizde bütün membranlarda ani bir salım davranışı değişikliği meydana geldiğinden bahsedebiliriz.

5. YORUM

- Infrared spektrumlarında insülin varlığı membranlar içerisinde bulunan insülin oranının düşük olmasından dolayı kanıtlanamamıştır ancak polimerizasyonun gerçekleştiği gözlemlenmiştir.
- Termogramlar insülin yüklü olmayan membranlar ile insülin yüklü membranlar arasında % ağırlık farklılıkları bulunduğunu kanıtlamıştır. Bu durumda yapıya insülin tutulumunun gerçekleştiği söylenebilmiştir.
- Sem görüntülerinde sentezlenen I-1 ve I-2 membranlarının yüzey morfolojisinin birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir. İnsülin miktarının iki katına çıkmasının yüzey morfolojisini değiştirdiği kanıtlanmıştır.
- Polimerik membranlardan kontrollü ilaç salım çalışmalarında, sıklıkla tercih edilen maddelerden biri de insülin salınımidir. Yapılan çalışmalarda [76-78] insülin enjeksiyonunun olumsuz etkilerinden uzaklaşmak amaçlı oral yolla alınan polimerik malzemelerden insülin salınımı yapan sistemler kurulmak istenmiştir. Bu nedenle genellikle polimerik malzemelerden insülin salımında pH etkisi vurgulanmış ve analizlerde UV-görünür bölge spektrometresi ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tercih edilmiştir. Literatürde bulunan polimerlerden insülin salımıyla ilgili laboratuvar ortamında yapılan (in vitro) çalışmalardan farklı olarak, kütle spektrometrik yöntemler kullanılarak membranların fizyolojik pH'ta salımları incelenmiştir.
- MALDI-MS analizlerinde zamana bağlı olarak her membranın her çözücü içerisinde insülin salımı gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır. İnsülinin moleküler iyon pikinin yanı sıra +2 iyon yüklü hali de gözlemlenmiştir.
- Salım hızında aniden değişiklik meydana gelmesi membranın kullanılmak istediği durumlarda ani insülin artışlarına sebep olabilecektir. Daha önce bahsedilen mevcut tedavi yöntemlerinin de en büyük dezavantajlarından biri bu durumun yaşanması sonucunda hastanın karşılaştığı zorluklardır. Bu nedenle yavaş ama istikrarlı olarak polimerik membrandan insülin salımının yapıldığı şartların ve bu şartlarda çalışan uygun membranın kullanılabilirliği diğer membranlara göre daha fazla olacaktır. I-1, I-2.1 ve I-2.2 membranları arasında daha yavaş ve izlenen süre boyunca benzer salım davranışına sahip membran **I-1** membranıdır.
- I-1 membranında sodyum klorür çözeltisi derişiyile doğru orantılı olacak şekilde insülin salım miktarında değişim olduğu görülmektedir.

- I-2.1 membranında su içerisinde 4 saatte diğer çözücüler içerisinde 2 saatlik süre içerisinde diğer saatlere oranla yüksek miktarda insülin salımı yapıldığı görülmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda hızlı salım yapan insülin analogları gibi davrandığı söylenebilir.
- I-2.2 membranında içerisinde bulunan insülinin %64 - %92 arasında değişen bir kısmını 48 saatlik süre içerisinde salımladığı gözlemlenmiştir. Su içerisinde 6, fosfat tamponu içerisinde 8 saat sonrasında salım miktarının ani azalması görülmektedir. Buna karşın sodyum klorür çözeltileri içerisinde inkübasyonunda membrandan insülin salım miktarında yavaş bir azalma varlığı dikkat çekmektedir.
- İnsülin yüklü polimerik membranların farklı çözeltiler içerisindeki salım miktarları en çok salım yapandan en az salım yapana göre sıralanırsa, sırasıyla

I-1 membranı: 0.1 M sodyum klorür çözeltisi, 0.05 M sodyum klorür çözeltisi, su ve fosfat tamponu

I-2.1 membranı: su, 0.05 M sodyum klorür çözeltisi, 0.1 M sodyum klorür çözeltisi ve fosfat tamponu

I-2.2 membranı: 0.1M sodyum klorür çözeltisi, su, 0.05M sodyum klorür çözeltisi ve fosfat tamponu şeklindedir.

- İleri ki çalışmalarda polimerik membranın serum içerisinde insülin salım davranışı gözlemlenerek fizyolojik ortamdaki insülin salımı incelenecektir.
- Tez kapsamında, mevcut olarak uygulanmakta olan insülin tedavilerinin dezavantajlarını ortadan kaldıracak ve ticari olarak üretilebilecek, insülin salımı yapabilen bantların geliştirilmesine olanak sağlayacak bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Henderson, J., *Ernest Starling and 'Hormones': an historical commentary*. Journal of endocrinology, 2005. **184**(1): p. 5-10.
2. Lazarow, A., *Cell types of the islets of Langerhans and the hormones they produce*. Diabetes, 1957. **6**(3): p. 222-232.
3. David Nelson , M.M.C., *Lehninger Principles of Biochemistry*. fourth ed. chapter 23. 2004: Freeman, W.H. and Company, New York. 902-904.
4. Weiss, M., D.F. Steiner, and L.H. Philipson, *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships*, in *Endotext [Internet]*. 2014, MDText. com, Inc.
5. Sanger, F., *Chemistry of insulin*. British medical bulletin, 1960. **16**(3): p. 183-188.
6. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID 126843196, C. accessed on Apr. 26, 2020.
7. Lipkind, G. and D.F. Steiner, *Predicted structural alterations in proinsulin during its interactions with prohormone convertases*. Biochemistry, 1999. **38**(3): p. 890-896.
8. Sperling, M.A., et al., *CHAPTER 19 - Diabetes mellitus*, in *Pediatric Endocrinology (Fourth Edition)*, M.A. Sperling, Editor. 2014, Content Repository Only! p. 846-900.e1.
9. Gruppuso, P.A., et al., *Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin*. New England Journal of Medicine, 1984. **311**(10): p. 629-634.
10. Sonksen, P. and J. Sonksen, *Insulin: understanding its action in health and disease*. British journal of anaesthesia, 2000. **85**(1): p. 69-79.
11. Hormone Health Network."Insulin | Endocrine Society." Hormone.org, E.S., 26 April 2020, <https://www.hormone.org/your-health-and-hormones/glands-and-hormones-a-to-z/hormones/insulin>. november 2018.
12. Saeedi, P., et al., *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas*. Diabetes research and clinical practice, 2019. **157**: p. 107843.
13. Association, A.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care, 2014. **37**(Supplement 1): p. S81-S90.
14. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes—2010*. Diabetes care, 2010. **33**(Supplement 1): p. S11-S61.
15. Melendez-Ramirez, L.Y., R.J. Richards, and W.T. Cefalu, *Complications of type 1 diabetes*. Endocrinology and Metabolism Clinics, 2010. **39**(3): p. 625-640.
16. Association, A.D., 2. *Classification and diagnosis of diabetes*. Diabetes care, 2017. **40**(Supplement 1): p. S11-S24.
17. Organization, W.H., *Classification of diabetes mellitus*. 2019.
18. Leslie, R.D., et al., *Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment*. Diabetologia, 2016. **59**(1): p. 13-20.
19. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nature reviews Disease primers, 2017. **3**(1): p. 1-17.

20. Tuomi, T., et al., *The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity*. The Lancet, 2014. **383**(9922): p. 1084-1094.
21. Maahs, D.M., et al., *Epidemiology of type 1 diabetes*. Endocrinology and Metabolism Clinics, 2010. **39**(3): p. 481-497.
22. Serrano - Rios, M., A. Goday, and T. Martinez Larrad, *Migrant populations and the incidence of Type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish - heritage countries in Latin America*. Diabetes/metabolism research and reviews, 1999. **15**(2): p. 113-132.
23. Pinhas-Hamiel, O., L.M. Dolan, and P.S. Zeitler, *Diabetic ketoacidosis among obese African-American adolescents with NIDDM*. Diabetes care, 1997. **20**(4): p. 484-486.
24. Craig, M.E., et al., *Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story*. Pediatric diabetes, 2013. **14**(3): p. 149-158.
25. Schwartz, M.W. and D. Porte, *Diabetes, obesity, and the brain*. Science, 2005. **307**(5708): p. 375-379.
26. Woods, S.C., et al., *Insulin and the blood-brain barrier*. Current pharmaceutical design, 2003. **9**(10): p. 795.
27. Porte, J., Daniel, *Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2001. **17**(3): p. 181-188.
28. Ize-Ludlow, D. and M.A. Sperling, *The classification of diabetes mellitus: a conceptual framework*. Pediatric Clinics, 2005. **52**(6): p. 1533-1552.
29. Metzger, B.E., *Summary and recommendations of the third international workshop-conference on gestational diabetes mellitus*. Diabetes, 1991. **40**(Supplement 2): p. 197-201.
30. Landon, M.B. and S.G. Gabbe, *Gestational Diabetes Mellitus*. Obstetrics & Gynecology, 2011. **118**(6): p. 1379-1393.
31. Alberti, K.G.M.M. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation*. Diabetic Medicine, 1998. **15**(7): p. 539-553.
32. ANONİM. <https://www.tjod.org/gebelikte-seker-yukleme-testi/>. [cited 2020 05].
33. Association, A.D., *Physical activity/exercise and diabetes*. Diabetes care, 2004. **27**(suppl 1): p. s58-s62.
34. Evert, A.B., et al., *Nutrition Therapy for Adults With Diabetes or Prediabetes: A Consensus Report*. Diabetes Care, 2019. **42**(5): p. 731-754.
35. Ayvaz, G., G. AYVAZ, and U.D.E. KAN, *Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi*. Diyabet ve Obezite, 2010: p. 8.
36. Kramer, C.K., B. Zinman, and R. Retnakaran, *Short-term intensive insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. The lancet Diabetes & endocrinology, 2013. **1**(1): p. 28-34.
37. Weng, J., et al., *Effect of intensive insulin therapy on β -cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial*. The Lancet, 2008. **371**(9626): p. 1753-1760.

38. Keith, K., D. Nicholson, and D. Rogers, *Accuracy and precision of low-dose insulin administration using syringes, pen injectors, and a pump*. *Clinical pediatrics*, 2004. **43**(1): p. 69-74.
39. Association, A.D., *Insulin administration*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(suppl 1): p. s106-s107.
40. Korytkowski, M., et al., *A multicenter, randomized, open-label, comparative, two-period crossover trial of preference, efficacy, and safety profiles of a prefilled, disposable pen and conventional vial/syringe for insulin injection in patients with type 1 or 2 diabetes mellitus*. *Clinical therapeutics*, 2003. **25**(11): p. 2836-2848.
41. Heinemann, L., et al., *Insulin pump risks and benefits: a clinical appraisal of pump safety standards, adverse event reporting, and research needs: a joint statement of the European Association for the Study of Diabetes and the American Diabetes Association Diabetes Technology Working Group*. *Diabetes care*, 2015. **38**(4): p. 716-722.
42. Uhrich, K.E., et al., *Polymeric systems for controlled drug release*. *Chemical reviews*, 1999. **99**(11): p. 3181-3198.
43. Shiino, D., et al., *Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH*. *Journal of controlled release*, 1995. **37**(3): p. 269-276.
44. Vernon, B., K. Sung Wan, and B. You Han, *Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer gel*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1999. **10**(2): p. 183-198.
45. Lowman, A.M., et al., *Oral delivery of insulin using pH - responsive complexation gels*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999. **88**(9): p. 933-937.
46. *Mass spectrometry's beginnings*, in *Mass Spectrometry: A Foundation Course*, K. Downard, Editor. 2004, The Royal Society of Chemistry. p. 1-9.
47. 2020., T.N.P.i.C.N.o.N.M.A.W.A. *Francis W. Aston Biographical*. [cited 2020 April]; Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1922/aston/biographical/>.
48. De Hoffmann, E., *Mass spectrometry*. *Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.
49. Kaklamanos, G., E. Aprea, and G. Theodoridis, *Chapter 9 - Mass Spectrometry*, in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Y. Picó, Editor. 2012, Academic Press: Boston. p. 249-283.
50. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2009. **44**(3): p. 210-230.
51. Cole, R.B., *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*. 2011.
52. Dole, M., et al., *Molecular beams of macroions*. *The Journal of chemical physics*, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
53. Baldwin, M.A., *Mass spectrometers for the analysis of biomolecules*. *Methods in enzymology*, 2005. **402**: p. 3-48.
54. Iribarne, J. and B. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets*. *The Journal of chemical physics*, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.

55. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
56. GRIFFITHS, W.J., et al., *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry*. Biochemical Journal, 2001. **355**(3): p. 545-561.
57. Korfmacher, W.A., *Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery*. Drug discovery today, 2005. **10**(20): p. 1357-1367.
58. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass spectrometry reviews, 2009. **28**(6): p. 898-917.
59. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**(1): p. 37-70.
60. Himmelsbach, M., *10 years of MS instrumental developments—impact on LC–MS/MS in clinical chemistry*. Journal of Chromatography B, 2012. **883**: p. 3-17.
61. Downard, K., *Mass spectrometry: a foundation course*. 2007: Royal Society of Chemistry.
62. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Analytical chemistry, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
63. Zubarev, R.A. and A. Makarov, *Orbitrap mass spectrometry*. 2013, ACS Publications.
64. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of mass spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
65. do Nascimento, R.F., *Advances in chromatographic analysis*. 2017: Avid Science.
66. *Orbitrap LC-MS Comparison Chart*. [cited 2020 01.12]; Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms/orbitrap-lc-ms-comparison-chart.html?SID=fr-Orbitrap-1>.
67. Michalski, A., et al., *Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(9): p. M111.011015.
68. Olsen, J.V., et al., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Molecular & cellular proteomics, 2009. **8**(12): p. 2759-2769.
69. Stöcklin, R., et al., *A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry*. Diabetes, 1997. **46**(1): p. 44-50.
70. Thevis, M., et al., *Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography– tandem mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2006. **78**(6): p. 1897-1903.
71. Thomas, A., W. Schänzer, and M. Thevis, *Determination of human insulin and its analogues in human blood using liquid chromatography coupled to ion mobility mass spectrometry (LC - IM - MS)*. Drug Testing and Analysis, 2014. **6**(11-12): p. 1125-1132.

72. Costill, D., *Sweating: its composition and effects on body fluids*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1977. **301**(1): p. 160-174.
73. Hall, S., D. Stableforth, and A. Green, *Sweat sodium and chloride concentrations—essential criteria for the diagnosis of cystic fibrosis in adults*. Annals of clinical biochemistry, 1990. **27**(4): p. 318-320.
74. Mukhopadhyay, P., et al., *Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: in vitro and in vivo studies in diabetic animal model*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(1): p. 376-382.
75. Demirelli, K., et al., *Investigation of the thermal decomposition of poly (2-hydroxypropyl methacrylate)*. Polymer degradation and stability, 2002. **78**(2): p. 333-339.
76. Kumar, A., P. Thakur, and A. Kumar, *In Vitro Evaluation of Insulin Release from Chitosan-Alginate Macrobeads*. Journal of Pharmaceutical Innovation, 2021: p. 1-9.
77. Bao, X., et al., *pH-responsive hydrogels based on the self-assembly of short polypeptides for controlled release of peptide and protein drugs*. Journal of Polymer Research, 2019. **26**(12): p. 1-10.
78. Momoh, M.A., et al., *Pharmacodynamics and pharmacokinetics behaviour of insulin from PEGylated-mucin microparticles coated with pH sensitive polymer: Preparation and characterization*. Materials Today Communications, 2020. **25**: p. 101539.