# NÖROPATİK AĞRIDA KULLANILAN PREGABALİN ETKİN MADDESİNİN FARKLI ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLİP VALİDE EDİLMESİ VE TAVŞANLARDA KULLANIMI ESNASINDAKİ METABOLOM PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

**Burak BAYRAK**

**Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı**
**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**Doktora Tezi-2024**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

# NÖROPATİK AĞRIDA KULLANILAN PREGABALİN ETKİN MADDESİNİN FARKLI ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLİP VALİDE EDİLMESİ VE TAVŞANLARDA KULLANIMI ESNASINDAKİ METABOLOM PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

**Burak BAYRAK**

**Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı**
**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı**
**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM**
**2024**

# İÇİNDEKİLER

**İÇİNDEKİLER** ..... **I**

**TEŞEKKÜR** ..... **V**

**ÖZET**……. ..... **VI**

**ABSTRACT** ..... **VII**

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **VIII**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **IX**

**TABLOLAR DİZİNİ** ..... **XI**

**1. GİRİŞ**……..... **1**

**2. GENEL BİLGİLER** ..... **2**

2.1. Nöropatik Ağrı ..... 2

2.2. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları ..... 4

2.3. Gabapentinoidler ..... 5

2.3.1. Gabapentin ..... 7

2.3.2. Pregabalin ..... 8

2.3.2.1. Pregabalinin Farmakokinetiği ..... 9

2.3.2.2. Pregabalinin Etki Mekanizması ..... 11

2.3.3.3. Pregabalinin İlaç Etkileşimi ..... 15

2.3.3.4. Pregabalinin Yan Etkileri ..... 16

2.3.3.5. Pregabalinin Endikasyonları ve Dozlaması ..... 16

2.3.3.6. Pregabalinin Müstahzarları ..... 17

2.3.3.7. Pregabalinin Kötüye Kullanımı ..... 17

2.4. Metabolomiks ..... 18

2.4.1. Metabolomiksin Tarihçesi ..... 19

2.4.2. Metabolomikste Kullanılan Biyoakışkanlar ve Dokular ..... 19

2.4.2.1. İdrar ..... 20

2.4.2.2. Serum ve Plazma ..... 21

2.4.2.3. Beyin Omurilik Sıvısı ..... 21

2.4.2.4. Tükürük ..... 22

2.4.2.5. Primer ve İmmortal Hücreler ..... 22

2.4.2.6. Dokular ..... 23

2.4.3. Kütle Spektroskopisi Temelli Metabolomiks ..... 23

2.5. Kromatografi ..... 25

2.6. Spektroskopi ..... 26

2.7. Validasyon ..... 29

2.8. Literatür Özetleri ..... 30

2.8.1. Pregabalinin Türevlendirilmediği Yöntemler ..... 31

2.8.1.1. HPLC ile Geliştirilen Yöntemler ..... 31

2.8.1.2. Spektroskopi Temelli Geliştirilen Yöntemler ..... 33

2.8.2. Pregabalinin Türevlendirildiği Yöntemler ..... 33

2.8.2.1. HPLC ile Geliştirilen Yöntemler ..... 33

2.8.2.2. Spektroskopi Temelli Geliştirilen Yöntemler ..... 37

**3. MATERYAL VE METOD ..... 44**

3.1. Kullanılan Kimyasallar ..... 44

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Programlar ..... 44

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması ..... 46

3.4. Plazma Örneği Toplanması ..... 47

3.5. Metabolomik Çalışma İçin Plazma Örneklerinin Hazırlanması ..... 47

3.6. Metabolit Profilleme ve İstatistiksel Analiz ..... 47

3.7. Deney Tasarımı ..... 48

3.7.1. Türevlendirme Prosedürün Faktörleri ve Deney Tasarımı ..... 48

3.7.2. HPLC Mobil Faz Deney Tasarımı ..... 49

3.8.Türevlendirme Prosedürü ..... 51

3.9. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi ..... 52

3.10. Kromatografik Koşullar ..... 53

3.11. Deney Tavşanları ..... 55

3.12. Validasyon Parametreleri ..... 56

3.12.1. Doğrusallık ..... 56

3.12.2. Doğruluk ..... 57

3.12.3. Kesinlik ..... 57

3.12.4. Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection) ..... 57

3.12.5. Miktar Tayin Sınırı (Limit of Quantification) ..... 57

3.12.6. Stabilite ..... 58

**4. BULGULAR ..... 59**

4.1. UV-Vis Spektrofotometri Bulguları ..... 59

4.1.1. Merkezi Bileşik Tasarımı Sonuçları ..... 59

4.1.2. Validasyon Parametreleri ..... 62

4.1.2.1. Doğrusallık ..... 62

4.1.2.2. Gözlenebilme ve Miktar tayin sınırı (LOD ve LOQ) ..... 63

4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik ..... 64

4.1.2.4. Stabilite ..... 64

4.1.3. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ..... 64

4.2. HPLC-UV ve HPLC-FLD Bulguları ..... 65

4.2.1. Yöntem Optimizasyonu Sonuçları ..... 65

4.2.2. NMR Yorumlamaları ..... 69

4.2.3. Validasyon Parametreleri ..... 72

4.2.3.1 Doğrusallık ..... 72

4.2.3.2. Gözlenebilme ve Miktar Tayin Sınırı (LOD ve LOQ) ..... 72

4.2.3.3. Doğruluk ve Kesinlik ..... 73

4.2.4. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ..... 73

4.3. Metabolomiks Çalışmasının Bulguları ..... 74

**5. TARTIŞMA ..... 81**

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 91**

**KAYNAKLAR ..... 93**

**EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu ..... 118**

**EK-2. Etik Kurul Onay Formu ..... 119**

# TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen eşime, aileme, çalışma arkadaşlarıma, eğitim hayatımda ve çalışmalarımda bana yardımcı olan bölümdeki diğer hocalarıma teşekkür ederim,

Ayrıca bu çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne de teşekkür ederim.

**Burak BAYRAK**

# ÖZET


**Nöropatik Ağrıda Kullanılan Pregabalin Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini için Analitik Yöntemlerin Geliştirilip Valide Edilmesi ve Tavşanlarda Kullanımı Esnasındaki Metabolom Profilinin Belirlenmesi**

**Amaç:** Bu çalışmada, çeşitli pregabalin içeren farmasötik formülasyonlarda analitik yöntemlerle miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve kronik pregabalin kulllanımında plazmada meydana gelen metabolomik değişim incelenmiştir.

**Materyal ve Metot:** Pregabalinin kromofor grubunun bulunmaması dolayısıyla 2- naftil aldehit ile türevlendirme yapılarak görünür hale getirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerde 221 nm seçilmiştir. Birinci türev spektrofotometri yönteminde ise dalga boyu 236 nm olarak belirlenmiştir. HPLC-UV analizlerinde 275 nm'de HPLC-FLD analizlerde ise eksitasyon ve emisyon dalga boyu olarak 221 ve 353 nm seçilmiştir. Tavşan plazmasının analizi için Q-TOF kütle spektrometresi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Geliştirilen yöntemlerimizin uygun doğruluk ve kesinlik değerlerine sahip oldukları gösterildi. Metabolomiks çalışmasında ise geliştirilen modelimiz 10666 metabolitten 207 tanesi istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. Bunların 95 tanesinin aşağı yönlü 112 tanesinin yukarı yönlü olarak değiştiği bulundu.

**Sonuç:** Geliştirilen UV spektroskopisi ve birinci türev spektroskopisi yöntemlerinin dökme ve farmasötik formülasyonlarda pregabalinin miktar tayini için güvenilir ve geçerli bir yaklaşım sağlamıştır, HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemlerinin hem farmasötik formülasyonlarda hem de dökme çözeltilerde pregabalini belirlemek için etkili, hassas ve güvenilir olduğu bulunmuştur. Pregabalin uygulaması öncesi ve sonrası tavşan plazmalarında belirgin metabolit farklılıkları gözlemlenmiştir. PLS-DA skor grafikleri, iki grup arasında önemli bir metabolomik ayrışmayı ortaya koymuştur. ROC eğrileri, modelin yüksek özgüllük ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiş, AUC değerleri kalibrasyon ve çapraz doğrulama setleri için sırasıyla 1.00 ve 0.9989 olarak bulunmuştur. Yapılan metabolit ve yolak analiziyle pregabalinin metabolom profilinde oluşturduğu farklılıklar, yan etkileri ve bağımlılık metabolizmasının değerlendirilmiştir.



**Anahtar Kelimeler:** Analitik yöntem geliştirilmesi, HPLC, metabolomiks, pregabalin, spektrofotometri, validasyon

# ABSTRACT

**Development and Validation of Analytical Methods for the Quantification of the Active Ingredient Pregabalin Used in Neuropathic Pain in Different Environments and Determination of Metabolome Profile During Use in Rabbits**

**Aim:** The aim of this study was to develop analytical methods for the quantification of various pregabalin-containing pharmaceutical formulations and to investigate metabolomic changes in plasma during chronic pregabalin use.

**Material and Method:** Since pregabalin has no chromophore group, it was rendered visible by derivatisation with 2-naphthyl aldehyde. For spectrophotometric measurements, 221 nm was chosen. In the first derivative spectrophotometry method, the wavelength was determined as 236 nm. In HPLC-UV analyses, 275 nm and in HPLC-FLD analyses, 221 and 353 nm were selected as excitation and emission wavelengths. Q-TOF mass spectrometer was used for the analysis of rabbit plasma.

**Results:** Our developed methods were shown to have appropriate accuracy and precision. In the metabolomics study, 207 out of 10666 metabolites were found to be statistically significant by our developed model. Of these, 95 were found to vary downward and 112 upward.

**Conclusion:** The developed UV spectroscopy and first derivative spectroscopy methods provided a reliable and valid approach for the quantification of pregabalin in bulk and pharmaceutical formulations, HPLC-UV and HPLC-FLD methods were found to be efficient, sensitive and reliable for the determination of pregabalin in both pharmaceutical formulations and bulk solutions. Significant metabolite differences were observed in rabbit plasma before and after pregabalin administration. PLS-DA score plots revealed a significant metabolomic segregation between the two groups. ROC curves showed that the model had high specificity and selectivity, with AUC values of 1.00 and 0.9989 for the calibration and cross-validation sets, respectively. The metabolite and pathway analysis evaluated the differences in the metabolome profile, side effects and addiction metabolism of pregabalin.



**Key Words:** Analytical method development, HPLC, metabolomics, pregabalin, spectrophotometry, validation

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|---|---|---|
| **ATP** | : | Adenozin trifosfat |
| **BOS** | : | Beyin omurilik sıvısı |
| **BSS** | : | Bağıl standart sapma |
| **CCD** | : | Yanıt yüzeyi yasarımı (central composit desing ) |
| **DSÖ** | : | Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) |
| **EAAT** | : | Uyarıcı amino asit taşıyıcısı (Excitatory Amino Acid Transporter) |
| **FDA** | : | Gıda ve İlaç Dairesi |
| **FLD** | : | Floresan dedektörü |
| **g** | : | Gram |
| **GABA** | : | Gamma-Aminobutirik asit |
| **HMDB** | : | İnsan metabolomu veritabanı (Human Metabolome Database) |
| **HPLC** | : | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| **ICH** | : | Uluslararası uyumlaştırma konferansı |
| **İTK** | : | İnce tabaka kromatografisi |
| **KEGG** | : | Kyoto genler ve genom ansiklopedisi |
| **LOD** | : | Miktar tayin sınırı |
| **LOQ** | : | Gözlenebilme sınırı |
| **mL** | : | Mililitre |
| **NAD+** | : | Nikotinamid adenin dinükleotid |
| **NADPH** | : | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| **PLS** | : | Kısmi en küçük kareler |
| **PLS-DA** | : | Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi |
| **QC** | : | Kalite kontrol |
| **QC-SVR** | : | Kalite kontrol destek vektör regresyonu |
| **$R^2$** | : | Determinasyon katsayısı |
| **ROC** | : | Alıcı işletim karakteristiği (Receiver Operating Characteristic) |
| **UV** | : | Ultraviyole dedektörü |
| **VGCC** | : | Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları |
| **µg** | : | Mikrogram |
| **$\alpha_2\delta$** | : | Alfa-2-sigma |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil No** **Sayfa No**

**Şekil 2.1.** Voltaj kapılı kalsiyum kanalının alt birimlerinin görünümü ..... **5**

**Şekil 2.2.** GABA, mirogabalin, gabapentin ve pregabalinin yapısal karşılaştırması ..... **6**

**Şekil 2.3.** Kütle analizatörünün şematik diyagramı ..... **24**

**Şekil 2.4.** Elektromanyetik spektrum diyagramı ..... **27**

**Şekil 2.5.** Elektromanyetik ışının madde ile etkileşimleri ..... **27**

**Şekil 3.1. a)** 400 MHz $^{1}$H-NMR spektrumu ve $D_2O$ çözücüsünde pregabalin-naftil iminin 100 MHz $^{13}$C-NMR spektrumu; **b)** Pregabalin-naftil iminin IR spektrumu .. **51**

**Şekil 3.2.** Pregabalin ve 2-naftil aldehit arasında gerçekleşen reaksiyonun şeması ..... **52**

**Şekil 3.3.** Pregabalin-naftaliminin farklı çözücü karışımları içindeki UV-Görünür bölge spektrumu ..... **53**

**Şekil 3.4.** Asetonitril-su (50:50,h/h) ortamında Pregabalin-naftil imin türevinin spektrumu ..... **53**

**Şekil 3.5.** Pregabalin-naftil imin türevinin; **a)** UV spektrumu spektrumu; **b)** Floresans spektrumu ..... **54**

**Şekil 3.6. a)** Pregabalin kullanımından önce tavşan plazmasının kromatogramı; **b)** Pregabalin kullanımı sonrası tavşan plazmasının kromatogramı; **c)** Tavşan plazmasının kütle kromatogramı ..... **55**

**Şekil 4.1.** Türevlendirme reaksiyonu sonuçların regresyon analizi grafiği ..... **61**

**Şekil 4.2.** Merkezi kompozit tasarım için üç boyutlu yanıt yüzeyleri: **a)** $K_2CO_3$ derişimi (mmol)-Sıcaklık (° C); **b)** $K_2CO_3$ derişimi (mmol)-Etanol hacmi (mL); **c)** Sıcaklık(° C)- Etanol hacmi (mL) ..... **61**

**Şekil 4.3. a)** UV-Spektrofotometri için standart çözeltilerin spektrumu; **b)** Spektrofotometri için kalibrasyon eğrisi; **c)** Birinci türev spektroskopisi için standart çözeltilerin spektrumu; **d)** Birinci türev spektroskopisi için kalibrasyon eğrisi ..... **63**

**Şekil 4.4.** Mobil faz sonuçların regresyon analizi grafiği..... **68**

**Şekil 4.5.** Merkezi kompozit tasarım için tepki yüzeyleri: **a)** Metanol miktarı (%)-Dalga Boyu (nm); **b)** Metanol miktarı (%)-Sıcaklık (C°); **c)** Dalga Boyu (nm)-Sıcaklık (C°)..... **68**

**Şekil 4.6.** Pregabalin-naftil imin türevinin floresans spektrumu ..... **69**

**Şekil 4.7.** Pregabalin'in $D_2O$ çözücüsünde 400 MHz $^{1}$H-NMR spektrumu ve 100 MHz $^{13}$C-NMR spektrumu ..... **70**

**Şekil 4.8.** Pregabalin-naftil iminin $D_2O$ çözücüsü içinde 400 MHz $^{1}$H-NMR spektrumu ve 100 MHz $^{13}$C-NMR spektrumu ..... **72**

**Şekil 4.9.** Bütün numunelerin toplam iyon kromatgoramları ..... **75**

**Şekil 4.10.** PLS-DA modeline göre gizli değişkenlerin scor plot tablosu ..... **76**

**Şekil 4.11.** PLS-DA modeli için permütasyon testi..... **77**

**Şekil 4.12.** Veri seti ve çapraz doğrulama örnekleri için ROC eğrileri..... **77**

**Şekil 4.13.** Metabolitlerin yolak analizi..... **78**

**Şekil 4.14.** Yolak analizlerine göre hastalık benzerlik tablosu..... **79**

**Şekil 4.15.** Log2fold ve on tabanında log pvalue ye göre çizilen volkano grafiği ..... **80**

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo No** **Sayfa No**

**Tablo 2.1.** Pregabalinin fizikokimyasal özellikleri ..... **8**

**Tablo 2.2.** Pregabalinin farmakokinetik parametreleri ..... **11**

**Tablo 2.3.** HPLC-UV ve HPLC-FLD ile yapılan pregabalinin türevlendirildiği analitik yöntemler..... **36**

**Tablo 2.4.** Spektroskopi temelli pregabalinin türevlendirildiği analitik yöntemler..... **42**

**Tablo 3.1.** Kullanılan kimyasallar ve çözücüler..... **44**

**Tablo 3.2.** Türevlendirme koşullarının belirlenmesi için seçilen faktörler..... **49**

**Tablo 3.3.** Türevlendirme reaksiyonu için 17 bağımsız çalışma parametresi..... **49**

**Tablo 3.4.** Kromatografik koşulların belirlenmesi için seçilen faktörler..... **50**

**Tablo 3.5.** Mobil faz seçimi için 17 bağımsız çalışma parametresi..... **50**

**Tablo 3.6.** Tavşan ilaç dozaj tablosu..... **56**

**Tablo 4.1.** Üç parametreli merkezi kompozit tasarımı ve verim sonuçları..... **59**

**Tablo 4.2.** Yanıt yüzeyi tasarımının ANOVA analizi sonuçları..... **60**

**Tablo 4.3.** UV-Gör. Bölge Spektrofotometre ve birinci türevinin yöntem şartları..... **61**

**Tablo 4.4.** Analitik yöntemlerin parametreleri..... **62**

**Tablo 4.5.** Yöntemin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6) ..... **64**

**Tablo 4.6.** Farmasötik formülasyondaki pregabalinin analitik geri kazanım değerleri (n=3)..... **65**

**Tablo 4.7.** Üç parametreli merkezi kompozit tasarımı ve pik alanı sonuçları ..... **66**

**Tablo 4.8.** HPLC için geliştirilen merkezi kompozit tasarım ANOVA analizi sonuçları ..... **67**

**Tablo 4.9.** HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntem şartları ..... **69**

**Table 4.10.** HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemlerinin parametreleri ..... **73**

**Table 4.11.** Yöntemlerin doğruluk ve kesinlik sonuçları ..... **73**

**Table 4.12.** İki tablet formülasyonunda pregabalinin geri kazanımı ..... **74**

**Table 4.13.** En büyük p değerine sahip ilk yirmi metabolit ..... **80**

# 1. GİRİŞ

Nöropatik ağrı, sinir sistemi hasarına bağlı olarak ortaya çıkan ve tedavi edilmesi zor olan bir ağrı türüdür. Bu tür ağrıların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biri olan pregabalin, sinir iletimini modüle ederek ağrıyı hafifletir. Pregabalin, antiepileptik ve anksiyolitik etkileriyle de bilinmekte olup, özellikle nöropatik ağrı yönetiminde önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Ancak, pregabalinin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı biyolojik ve farmasötik ortamlarda miktar tayinlerinin hassas yöntemlerle yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma, pregabalin etkin maddesinin çeşitli ortamlardaki miktar tayini için yüksek hassasiyete sahip analitik yöntemler geliştirip valide etmeyi ve kronik kullanım durumunda tavşan plazmasındaki metabolomik profili belirlemeyi amaçlamaktadır. Günümüzde, pregabalinin miktar tayini için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiş olsa da farklı ortamlar ve koşullar altında daha hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliği devam etmektedir. Özellikle pregabalinin uzun süreli kullanımının metabolomik etkileri üzerine çalışmalar bulunmamaktadır; bu çalışma, alandaki bilgi eksikliğini gidermeye yönelik önemli bir katkı sağlamayı hedeflemektedir.

Bu tez çalışması, hem miktar tayini için yeni analitik yöntemler geliştirip bunların validasyonunu sağlayarak hem de pregabalinin kronik kullanımının metabolom profili üzerindeki etkilerini inceleyerek mevcut literatüre yenilikçi bir bakış açısı sunmaktadır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Nöropatik Ağrı

Somatosensoriyel sistem, vücudun pozisyonunu ve hareketini algılayarak çevreyle etkileşimini sağlayan bir sistemdir. Günlük aktiviteler ya da acil durumlardan kaçınmak gibi durumlarda rol alarak vücudu yönlendirir. Bu sistem dışardan gelen dışsal ve vücuttan gelen içsel uyaranları algılayarak yorumlar. Bu sistem dokunma, basınç, ağrı, sıcaklık, konum, hareket ve titreşim algılarını toplayarak işlemektedir. Bu sistem beş reseptör türünden oluşmaktadır. Bunlar soğuk veya sıcak uyaranlara yanıt veren termoreseptörler, mekanik uyaranlara yanıt veren mekanoreseptörler, kimyasal bileşenlere cevap veren kemoreseptörler, kaşıntı uyaranlarına tepki veren pruriseptörler ve ağrı uyaranlarına tepki veren nosiseptörlerdir. Yaralanma veya herhangi bir hasar durumunda, önce nosiseptörler olarak da bilinen birinci sıradaki nöronlar aktive edilir. Bu nosiseptörler, ağrı sinyallerinin iletilmesinden sorumludur. Bu sistemdeki lezyonlar veya hastalıklar, sinir sisteminde omuriliğe ya da beyne giden sinir iletiminde düzensizliklere neden olmaktadır (Colloca ve ark., 2017).

Ağrı, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği tarafından "gerçek veya potansiyel doku hasarıyla ilişkili veya buna benzer hoş olmayan bir duyusal ve duygusal deneyim" olarak tanımlanmaktadır (Raja ve ark., 1939). Kötü bir deneyim olmasına rağmen vücut bütünlüğünün korunması için gereklidir. Genellikle yaralanma ve travma sonucu gelişen ve üç aydan kısa olan ağrılara akut ağrı, bu doku hasarının geçmemesi halinde devam eden ve üç aydan fazla süren tekrarlayan ağrılara kronik ağrı denilmektedir (Treede ve ark., 2015). Küresel prevalansının %20 olduğu düşünülmektedir (Shupler ve ark., 2019; Zelaya ve ark., 2020). ABD'de yapılan bir araştırmaya göre ağrı tedavisi maliyetinin kalp hastalıkları, kanser ve diyabet harcamalarından daha yüksek maliyetli olduğu gösterilmiştir (Gaskin ve Richard., 2012). Nöropatik ağrı, genellikle işlev kaybı, kaygı,

depresyon, rahatsız uyku ve bozulmuş biliş gibi diğer sorunlarla ilişkili olduğundan, yaşam kalitesini önemli ölçüde bozabilir.

Kronik ağrılar içerisinde tedavisi en zor olanlardan biri hastaların yaklaşık %7-10'unda ortaya çıkan nöropatik ağrıdır (Van Hecke ve ark., 2014). Somatosensoriyel sistemdeki lezyonlar veya hastalıklar sonucunda sinir sisteminde yaralanmalar meydana gelir. Bu yaralanmalar düzensiz sinir iletimlerine neden olmaktadır (Colloca ve ark., 2017). Bu sinir yaralanmaları sonucunda lezyon bölgelerindeki nöronlarda, bağışıklık hücrelerinde ve glial hücrelerde sinyal dalgalanmaları meydana gelir (Mapplebeck ve ark., 2017). Nöronlarda, bağışıklık hücrelerinde ve glial hücrelerde sinir hasarı sonucunda periferden omuriliğe anormal girdiler gönderilir. Bu sistemde hasar olan bütün hastalarda nöropatik ağrı görülmez. Ancak nöropatisi olan hastalarda tipik olarak yanma ve ağrılı olmayan hafif temaslardan bile ağrı semptomları görülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması için hastalığın basit tanı kriterlerinin olmaması dolayısıyla hastalığın insidansı ve prevelansı tam olarak bilinmemektedir. Kronik nöropatik ağrı insidansının Birleşik Krallık'ta % 10-14, ABD'de %10-12 olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (DiBonaventura ve ark., 2017; Fayaz ve ark, 2016). Dünya genelinde ise insidansının %7-10 olduğu bildirilmiştir (Colloca ve ark., 2017). Nöropatik ağrı kadınlarda ve elli yaş üstü insanlarda daha fazla görülmektedir, ayrıca ağrılar bel, ayak ve bacak gibi alt ekstremitelerde ve boyunda görülmektedir (Bouhassira ve ark., 2008).

Ağrı yönetiminde genellikle semptoların tedavisine odaklanılmaktadır, bunun sebebi ağrının nadiren tedavi edilmesidir. Tedavide birinci basamak ilaçlar arasında pregabalin, gabapentin, seratonin geri alım inhibitörleri ve çeşitli trisiklik antidepresanlar bulunur (Attal, 2019). Trisiklik antidepresanlar aşırı doz intiharı ve hastalarda bilişsel bozulmalara yol açtığı için tercih edilmemektedir (Hennemann-Krause ve Sredni, 2016).

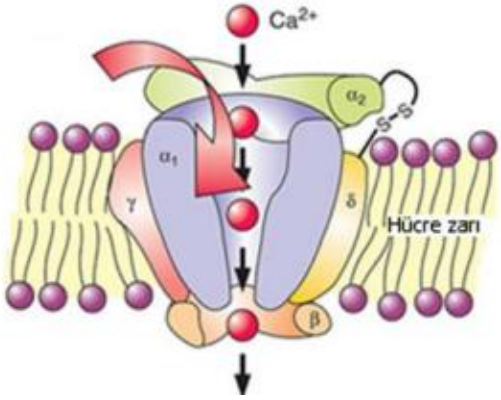
Ayrıca kardiyovasküler sistemdeki kan akışını azalttığı için bazı hasta gruplarında da kullanılmamaktadır (Rowbotham, 2015). Seratonin geri alımını bloke eden ilaçlar potansiyel yan etkileri ve yoksunluk sendromu nedeniyle tercih edilmemektedir (Fava ve ark., 1997; Gong ve ark., 2021). Pregabalin veya gabapentinin trisiklik antidepresanlarla veya opioidlerle beraber kullanımı monoterapiye göre daha etkilidir, hatta kullanılması gereken pregabalin veya gabapentin dozunda da azalma sağlamaktadır (Finnerup ve ark., 2015). İkinci ve üçüncü basamak ilaçların haricinde omurilik stimülasyonu, transkraniyal ve epidural stimülasyon, derin beyin stimülasyonu gibi girişimsel tedavi yöntemleri de bulunmaktadır (Shinu ve ark., 2022).

### 2.2. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum, canlı hücrelerin fonksiyon ve yapılarını sürdürebilmeleri için gerekli bir iyondur. Kalsiyum iyonları hücrede sinyal iletimi, kas kasılması, nörotransmitter salınımı ve hücresel büyüme gibi çeşitli ve önemli rollerde görev almaktadır. Kalsiyum kanalları, $Ca^{2+}$ akımını düzenleyerek hücre içi metabolik olayları regüle ederler. İyon kanalları, hücre membranında bulunan ve membran iyon geçirgenliğini düzenleyen protein yapılardır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları (VCGG) da bunlardan biridir. Farklı iyon türlerinin geçişini düzenleyerek hücredeki elektriksel aktiviteler koltrol edilir. Voltaj kapılı $Ca^{2+}$ kanalları, membran depolarizasyonuna yanıt olarak $Ca^{2+}$'nin hücrelere girişine aracılık eder. Elektrofizyolojik çalışmalar L-, N-, P-, Q-, R- ve T tipi olarak adlandırılan farklı $Ca^{2+}$ akımlarını ortaya koymaktadır (Catterall, 2000).

VCGG farklı alt birimlerden oluşan kompleks protein yapılardır. Bu kanallar beş alt birimden oluşmaktadır. Bu birimler alfa-1($\alpha_1$), alfa-2($\alpha_2$), beta ($\beta$), sigma ($\delta$) ve gamadan ($\gamma$) oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Mustafa, 2018; Zamponi ve ark., 2015). Bu yapılardan on adet $\alpha$-1 alt birimi, dört adet alfa-2-sigma ($\alpha_2\delta$) kompleksi, dört adet $\beta$ alt birimi ve iki adet $\gamma$ alt birimi olduğu bilinmektedir (Catterall, 2000). Bu protein

yapılarının alt dallarından olan $\alpha_2\delta$-1 bölgesi, epilepsi çeşitlerinde ve kronik nöropatik ağrıda kullanılan gabapentinoidlerin terapötik hedefidir (Zamponi ve ark., 2015).



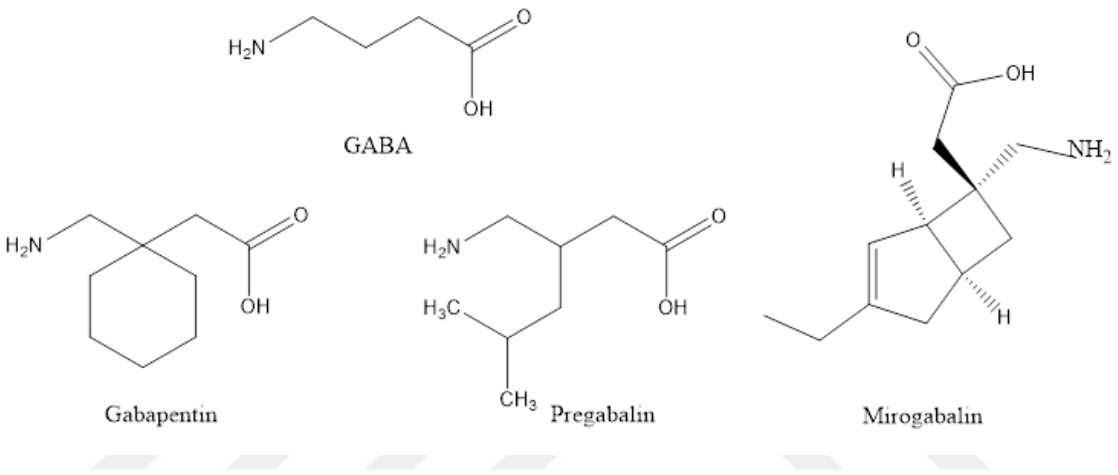

**Şekil 2.1.** Voltaj kapılı kalsiyum kanalının alt birimlerinin görünümü

Gabapentinoid ilaçların hedefi olan α2δ bölgesini dört ilgili protein ailesi temsil etmektedir. Bunlar $\alpha_2\delta$ tip 1, $\alpha_2\delta$ tip 2, $\alpha_2\delta$ tip 3 ve $\alpha_2\delta$ tip 4 proteinleridir. Bu proteinler amino asit ve modifikasyon açısından birbirlerine benzerdir. $\alpha_2\delta$-2, $\alpha_2\delta$-3 ve $\alpha_2\delta$-4 proteinlerinin $\alpha_2\delta$-1 proteinleriyle benzerliği sırasıyla %54, %26 ve %25'tir (Cantí ve ark., 2003). $\alpha_2\delta$-1 ve $\alpha_2\delta$-2 beyin ve kalp dahil birçok dokuda bulunmaktadır. $\alpha_2\delta$-3 beyne özgü olarak bulunmaktayken, $\alpha_2\delta$-4 endokrin dokularda ve beyinde düşük miktarda bulunmaktadır (Cantí ve ark., 2003). $\alpha_2\delta$-2 geninin silinmesi sonucunda nöbet duyarlılığının artması ve ani nöbet oluşumuna yol açtığını gösteren çalışmalar vardır (Barclay ve ark., 2001; Ivanov ve ark., 2004).

### 2.3. Gabapentinoidler

Gabapentinoidler, $\gamma$-aminobütirik asit (GABA) türevi olan ilaçlardır. 1970'lerde nörolojik bozuklukların tedavisi için ilaç keşif çalışmaları sırasında ortaya çıkmışlardır (Thorpe ve Taylor, 2007). GABA inhibisyonunun nöbetlere neden olan kilit nörotransmitter olduğu bilinmekteydi. Bu yüksek afiniteli GABA bağlanma bölgeleri, dorsal omurilik ve beyin boyunca mevcuttur. Ancak, kan-beyin bariyerini geçemeyen gabapentinoidlerin biyoyararlanımının artırılması için karbon omurgasına eklemeler

yapılmıştır. Bu ilaçlar yapısal olarak GABA ile benzer olmalarına rağmen, GABA reseptörü üzerinden etki etmemektedirler (Şekil 2.2). Gabapentinoidler VGCC'yi inhibe ederek çalışırlar (Calandre ve ark., 2016). Gabapentinoidler, dorsal boynuzdaki pre-sinaptik terminallerde $\alpha_2\delta$-1 birikimini inhibe eder ve hayvan modellerinde ağrılı uyaranlara yanıtı azaltır (Bauer ve ark., 2010). Gabapentinoidler, astrositlerden türetilen trombospondinin $\alpha_2\delta$-1'e bağlanmasını bloke ederek yeni uyarıcı sinapsların oluşumunu engeller (Park ve ark., 2016).




**Şekil 2.2.** GABA, mirogabalin, gabapentin ve pregabalinin yapısal karşılaştırması

Gabapentinoidler benzer etki mekanizmalarını paylaşırlar ancak farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler. Epilepsi çalışmalarına dayalı olarak, pregabalin ve gabapentinin EC50 değerlerinin sırasıyla yaklaşık 9.77 ve 23.9 mg/mL olduğu tahmin edilmiştir, bu da pregabalinin gabapentinden yaklaşık 2.4 kat daha güçlü olduğunu göstermektedir (Bockbrader ve ark., 2010). Pregabalin, yüksek dozlarda bile kalsiyum kanallarını tamamen bloke etmediği için aşırı doz vakalarında da güvenlikli kullanımı olan bir ilaçtır (Ben-Menachem, 2004). Pregabalin ve gabapentin düşük protein bağlanması, renal atılım ve ilaç-ilaç etkileşimleri olmaması yönünden birbirine benzerdir (Bockbrader ve ark., 2010). Ancak pregabalinin emiliminin hızlı ve yüksek olması, $\alpha_2\delta$ alt birimine altı kat daha güçlü bağlanması, zirve derişiminin gabapentinden üç kat daha fazla olması nedeniyle daha fazla tercih

edilmektedir. Pregabalinin nöropatik ağrı tedavisinde analjezik olarak iki ila dört kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Bryans ve Wustrow, 1999).

Gabapentinoidlerin kötüye kullanım eğilimi, ilk olarak 2010 yılında İsveç advers olay raporlama sistemine gönderilen on altı pregabalin kötüye kullanımı raporuyla ortaya çıkmıştır (Schwan ve ark., 2010). Gabapentinoidin yanlış kullanımı/istismarının altında yatan nedenler tam olarak anlaşılamamıştır ve arzu edilen etkiler, kullanıcılar arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Öfori ya da diğer değişen bilinç durumlarına ulaşmak için kötüye kullanımın yanı sıra yeterince tedavi edilmemiş veya tanı konmamış tıbbi durumları kendi kendine tedavi etmek için ilacın kötüye kullanımı yer almaktadır. Gabapentinoidin istismarı, son yıllarda artan bir eğilim göstermektedir. gabapentinoid kötüye kullanımının sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, toplumda daha fazla farkındalık ve düzenleme gereksinimini gündeme getirmektedir.

### 2.3.1. Gabapentin

GABA kan beyin bariyerini geçemediği için pasif difüzyonla bu engeli aşan lipofilik bir GABA analoğu olan gabapentin geliştirilmiştir (Satzinger, 1994). 1987 yılında yapılan çalışmada fokal ve jeneralize kontrolsüz epilepsisi olan hastalarda gabapentin kullanımı sonucunda nöbet sıklığında yaklaşık %30'luk bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Crawford ve ark., 1987). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1993 yılının Aralık ayında erişkin hastalarda fokal nöbetler için adjuvan antiepileptik ilaç olarak onay aldı (Williams ve ark., 2023). Anksiyete ve panik bozukluklarına karşı da faydalı olduğu önerilmiştir, ancak bu hastalıkların tedavisi için yüksek dozlarda kullanılması gerekmektedir (Serpell ve Pain, 2002). Gabapentinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Gabapentin, GABA analoğu olmasına rağmen GABA metabolizmasını, taşınmasını veya GABA reseptörlerini etkilemez. Bazı çalışmalar, gabapentinin postsinaptik nörotransmitter salınımında yer alan $\alpha_2\delta$ alt birimini içeren VDCC inhibe ettiğini öne sürmektedir (Tran-Van-Minh ve Dolphin, 2010). Gabapentinin

yan etkileri arasında yorgunluk, ataksi, baş ağrısı, kilo alımı, ishal, çift görme, baş dönmesi, bacak ödemi, titreme ve kusma bulunmaktadır (Morris III, 1995).

### 2.3.2. Pregabalin

Pregabalinin IUPAC adı (3S)-3-(aminometil)-5-metilhekzanoik asittir ve kimyasal formülü C8H17NO2'dir. Beyaz kristal yapıdaki bu bileşiğin molekül ağırlığı 159.229 g/mol olup, farmakolojik olarak aktif izomeri S formudur. Pregabalin, vigabatrin ve gabapentin gibi GABA analoğu bir bileşiktir. Pregabalinin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.1'de sunulmuştur (Wesche ve Bockbrader, 2005; Bockbrader ve ark., 2010).

**Tablo 2.1.** Pregabalinin fizikokimyasal özellikleri

| **Pregabalinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri** | **Değerleri** |
|---|---|
| **Molekül kütlesi (g/mol)** | 159.23 |
| **pKa** | 4.2 |
| **pKb** | 10.6 |
| **Çözünürlüğü (suda) (mg/mL)** | 32.1 |
| **Kaynama noktası (°C)** | 274 |
| **Erime noktası (°C)** | 186-188 |
| **$\lambda_{max}$ (nm)** | 180 |

Gabapentinin daha güçlü bir alternatifi olarak tasarlanmıştır. GAMA-GABA inhibisyonu, nöbetlere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bilinen bir inhibitör nörotransmitterdir. Ancak kan-beyin bariyerini geçemediği için biyoyararlanımını artırmak amacıyla çeşitli lipofilik gruplar eklenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda gabapentin ve pregabalin ilaç molekülleri keşfedilmiştir (Satzinger, 1994). Pregabalin yapısal olarak gabapentin ile ilişkilidir. Pregabalin kan beyin bariyeri boyunca difüzyonu kolaylaştırmak için 3- konumunda substitiye edilen bir lipofilik GABA analoğu olarak tasarlanmıştır. Pregabalinin tasarlanmasında GABA molekülünden yola çıkıldığı için S-[+]-3-izobütilgaba olarak da adlandırılmaktadır.

Pregabalin, Aralık 2004'ten itibaren Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından diyabetik periferik nöropati ve postherpetik nevralji ile ilişkili nöropatik ağrının tedavisi için onaylanmış ve 2005 yılından itibaren kısmi başlangıçlı nöbetleri olan erişkinlerde kullanım amacıyla pazarlanmaya başlanmıştır (Tassone ve ark., 2007). Pregabalin GABA ile yapısal olarak ilişkili olmasına rağmen etkisini GABA reseptörleri üzerinden göstermemektedir (Ben-Menachem, 2004; Spina ve Perugi, 2004). Yani yapısal bir benzerlik vardır ancak fizyolojik olarak bu iki molekül arasında benzerlik yoktur. Pregabalin başlıca epilepsi, nöropatik ağrı ve genel anksiyete bozukluklarında olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Huckle, 2004). Endikasyon dışı kullanımı; bipolar bozukluk, karmaşık bölgesel ağrı sendromu, dikkat eksikliği bozukluğu, huzursuz bacak sendromu, periyodik uzuv hareketi, uyku bozuklukları, baş ağrıları, alkol yoksunluk sendromu, kronik sırt ağrısı, fibromiyalji, viseral ağrı ve akut postoperatif ağrı gibi çok çeşitli durumların yönetimini içerir (González-Bueno ve ark., 2015).

Pregabalin kan-beyin bariyeri ve hücre zarını, L-amino asit taşıma sistemi olan özel L-transport sistemi ile geçmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda pregabalinin bağlanma kapasitesinin önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir. Pregabalin farelerinin korteksinde %84, hipokampusda %80, kaudat putamende %66, lomber dorsal boynuzda %70 ve beyincikte %37 oranında bağlanma göstermektedir (Lotarski ve ark., 2014).

#### 2.3.2.1. Pregabalinin Farmakokinetiği

Suda yüksek oranda çözünen pregabalin bağırsakta hızla emilmektedir ve yaklaşık bir saat içerisinde en yüksek kan derişim oranına çıkmaktadır. İnce bağırsaktaki emilimin yanı sıra kolonun çıkan kısımlarında da pregabalin emilimi vardır (Bockbrader ve ark., 2000; Chincholkar, 2020). Pregabalin ile tadavi edilen hastalarda pregabalinin

farmakokinetiğinin doğrusal olduğu bulunmuştur (Bockbrader ve ark., 2010). Pregabalinin gıdalarla bir etkileşimi yoktur, bu nedenle gıdalarla birlikte tüketilmesi halinde emilimi etkilenmemektedir (Bockbrader ve ark., 2010).

Pregabalin oral kullanım sonrasında plazma maksimum derişimine 1.3 saatte ulaşır ve doruk plazma derişimi yaklaşık %90'dır (Corrigan, 2001; Bockbrader ve ark., 2010). Yüksek yağlı kahvaltı ile normal bir kahvaltı yapan bireyler arasında yapılan çalışmada iki grup arasındaki gözlemler benzer olarak bulunmuştur. Yağlı kahvaltı tüketiminde emilim hızı azalsa da emilim kapsamı üzerinde etkisi yok denecek kadar azdır. Gıda tüketiminde farklılık olarak $C_{max}$ seviyesi %25-35 oranında azaldığı ve $T_{max}$ süresinin yaklaşık üç saate çıktığı bildirilmiştir (Bockbrader ve ark., 2010, Bockbrader ve ark., 2010).

Plazma proteinlerine bağlanmayan pregabalinin diğer ilaçlarla bir etkileşimi yoktur. Pregabalin ana sitokrom P450 sistemi izoenzimlerini inhibe etmez veya indüklemez; bu nedenle, nadiren hepatik disfonksiyonla ilişkilidir. LAT-1 tarafından kan-beyin bariyerinden aktif olarak taşınır (Takahashi ve ark., 2018). Suda oldukça iyi çözünen pregabalinin dağılım hacmi 0.5 L/kg'dır (Bockbrader ve ark., 2010). Tek doz pregabalin uygulanmasından ardından alınan beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde pregabalin derişiminin %1 ile %30 arasında bulunduğu gösterilmiştir. BOS pregabalin doz zirve derişiminin daha geç olduğu ve daha yavaş azaldığı bulunmuştur (Ben-Menachem ve ark., 1992). Tek dozlamadan sonra 24 saatlik bir sürede uygulanan pregabalin dozunun %0.2'si anne sütüne geçmektedir ve yine maksimum pik derişimi ulaşma süresi düşük ve gecikmelidir (Lockwood ve ark., 2016).

Pregabalin insanlarda çok düşük miktarda metabolize olmaktadır. Karaciğerde çok az metabolizması vardır. N-metillenmiş bir türevi olan metaboliti, alınan pregabalinin yaklaşık %1'ini oluşturur (Corrigan, 2001; Einarsdottir ve ark., 2008).

Pregabalinin eliminasyon yolu idrarla atılmasıdır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük olan pregabalinin %98'i değişmemiş olarak idrarla atılır (Sweetman, 2009). Kreatin klerensi 100 mL/dk olan hastalarda pregabalinin böbrek klerensi, glomerüler filtrasyon hızından (~70 mL/dk) daha az olarak bulunmuştur. Bu değerler tübüler yeniden emilimi gösterir. Yani pregabalin için renal klirens değeri glomerüler filtrasyon hızından daha düşüktür, bu da renal klirenste tübüler bir yeniden emilim sürecinin rol oynadığını gösterir (Wesche ve Bockbrader, 2005). Eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 6.3 saattir, 24-48 saat içinde kararlı duruma ulaşmaktadır (Bockbrader ve ark., 2010). Birikme, olumsuz etkilere yol açan böbrek yetmezliğine neden olabilir (Chincholkar, 2020).

Pregabalinin farmakokinetik parametreleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Pregabalinin farmakokinetik parametreleri

| Farmakokinetik Parametreler | Değerleri |
|---|---|
| **Tmax (saat)** | 1 (0.7-1.3) |
| **T ½ (saat)** | 6 (5.5-6.7) |
| **Biyoyararlanım** | > %90 |
| **Plazma proteinlerine bağlanması** | %1 |
| **Böbrek atılımı** | %92-99'u değişmeden atılır |
| **Dozlama (mg/gün)** | 150-600 |
| **Farmakokinetik** | Doğrusal |

#### 2.3.2.2. Pregabalinin Etki Mekanizması

Pregabalin, yapısal benzerliklerine rağmen GABA reseptörlerine bağlanmaz, ancak voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının (VDCC) α2δ-1 alt birimine yüksek bir afiniteyle bağlanarak etkisini gösterir (Gee ve ark., 1996). Pregabalinin S-izomeri, R-izomerine göre yaklaşık 10 kat daha yüksek afiniteye sahiptir ve epilepsi hayvan modellerinde önemli derecede etkili olduğu bildirilmiştir (Taylor ve ark., 1993).

Pregabalin, merkezi sinir sisteminde glutamat, noradrenalin, P maddesi, serotonin ve dopamin salınımını azaltır (Dooley ve ark., 2000; Fink ve ark., 2002). Pregabalinin birinci etkisi, α2δ bölgesine bağlanarak kalsiyum akışını azaltması ve dolayısıyla sinaptik

salınımı engellemesi yoluyla gerçekleşir (Taylor, 2004). α2δ bölgesinin nörotransmiter salınımını %80 oranında artırdığı gösterilmiştir (Hoppa ve ark., 2012). Pregabalinin bu bölgeye bağlanması, kalsiyum akışını azaltarak glutamat, noradrenalin ve P maddesi gibi nörotransmiterlerin salınımını engeller.

Pregabalin, P/Q, N ve L-tipi voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının α2δ (α2δ-1 ve α2δ-2) alt birimlerine spesifik olarak bağlanarak kalsiyum kanal antagonistidir (Gong ve ark., 2001; Li ve ark., 2006; Yada ve ark., 2007). Mutant farelerde yapılan çalışmalar, pregabalinin analjezik etkisinin α2δ-1 alt birimine bağlanmasına bağlı olduğunu göstermiştir (Lotarski ve ark., 2011). Farklı bölgelerde pregabalinin afinitesinin değiştiği ve korteks (%84), hipokampus (%80), kaudat putamen (%66), lomber dorsal boynuz (%70) ve beyincikte (%37) farklı bağlanma oranları sergilediği bulunmuştur (Mj, 2006).

Pregabalinin analjezik etkisinin, VDCC'nin α2δ-1 alt birimine bağlanarak sinaptik iletimi ve nörotransmiter salınımını azaltmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. İn vitro çalışmalarda pregabalinin, yapay olarak uyarılan kalsiyum akışını on ila otuz dakika içinde azalttığı ve nörotransmiter salınımını engellediği gözlenmiştir (Li ve ark., 2004). Ayrıca, yüksek dozlarda bile kalsiyum kanallarını tamamen bloke etmediği için güvenlik profili yüksektir (Ben-Menachem, 2004).

Bauer ve arkadaşları (2009), pregabalinin nöropatik ağrıda α2δ-1'in plazma membranındaki ekspresyonunu azalttığını ve presinaptik terminalde trafiğini bozarak nörotransmiter salınımını ve spinal duyarlılığı düşürdüğünü göstermiştir. Pregabalin uygulamasının omurilik dorsal boynuzunda yukarı regüle edilmiş CaV α2δ-1 ekspresyonunu kısmen tersine çevirdiği rapor edilmiştir (Li ve ark., 2004). Bu nedenle, pregabalinin VDCC α2δ-1 alt birimine bağlanarak anterograd trafiği bozması ve sinaptik iletimi inhibe etmesi, nörotransmiter salınımının ve spinal duyarlılığın azalması yoluyla analjezik etkisini sağladığı sonucuna varılmıştır.

İkinci etki yolunu glutamat taşıyıcıları üzerinden gösterir. L-Glutamat, memeli merkezi sinir sistemindeki başlıca uyarıcı nörotransmiterdir ve sinaptik veziküllerde depolanır. Nöronların ve glial hücrelerin plazma membranında bulunan uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAAT'lar), glutamatın etkisini hızla sonlandırır ve hücre dışı derişimini eksitotoksik seviyelerin altında tutar (Nakamura ve ark., 1993). Beş $Na^+$ bağımlı glutamat taşıyıcısı (EAAT 1-5) arasında, EAAT3'ün pregabalinin hedefi olduğu bulunmuştur (Shigeri ve ark., 2004). Normal koşullarda, EAAT3'ün çoğu sitozolde bulunur, normal koşullarda EAAT3'ün sadece %20'si plazma membranında saptanır. (Danbolt, 2001; Kugler ve Schmitt, 1999). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, pregabalinin, derişime bağlı olarak EAAT3'ün sitozolden plazma membranına geçişini arttırdığını göstermiştir. Pregabalin aracılığıyla nöronların plazma membranında ve glial hücrelerde EAAT3 ekspresyonundaki artış, uyarıcı nörotransmitter glutamatın fonksiyonel yanıtını önemli ölçüde azaltabilir. Bu bulgular, pregabalinin EAAT3 üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır (Ryu ve ark., 2012). Daha önceki çalışmalar, EAAT3 aktivitesinin ve ekspresyonunun, PKC ve PI3K gibi hücre içi sinyal yolakları tarafından güçlü bir şekilde düzenlendiğini göstermiştir (Davis ve ark., 1998; Krizman-Genda ve ark., 2005).

Pregabalin VGCC'yi bloke eder ve kalsiyum akışı azalarak sinapsta glutamat salınımını azaltır. EAAT'lerin aktivitesi pregabalin tarafından artırılır. Bu artış glutamatın sinaptik miktarında daha da azalmaya sebep olur. Azalan glutamat seviyeleri uyarıcı nörotransmitterlerin bağlandığı reseptör olan N-Metil-D-Aspartik Asit aktivasyonunu inhibe eder ve sinaptik ateşlenmede azalma meydana gelir. Pregabalin ayrca nöronal uyarılmayı engelleyerek $K_{ATP}$ kanallarını aktive eder.

Üçüncü etki mekanizması olarak, pregabalin kalsiyum kanallarını hedef alır. Pregabalinin analjezik etkilerinden sorumlu olabilecek bir diğer mekanizma ise $K_{ATP}$ kanalları da dahil olmak üzere farklı potasyum kanallarını modüle etme yeteneğidir. $K_{ATP}$

kanalının açılmasının, nöronal uyarılabilirliği azaltarak ve omurilikte P maddesi gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınımını inhibe ederek anti-nosiseptif etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (Soares ve ark., 2000). Kweon ve arkadaşları, sıçanlarda formalin testinde pregabalinin anti-nosiseptif etkisini göstermiştir. Pregabalinin, spinal subaraknoid boşluğa kateterizasyon yoluyla intratekal uygulanmasının, doza bağlı olarak formalin kaynaklı kaçınma davranışını azalttığı gösterilmiştir. Ancak, oral antidiyabetik ilaç olan glibenklamid uygulaması pregabalinin analjezik etkisini tersine çevirmiş ve pregabalinin sıçan formalin testindeki anti-nosiseptif etkisinin azaltmıştır. Pregabalinin $K_{ATP}$ kanallarını aktive ederek analjezik etkiler oluşturabileceği durumlarda, glibenklamid bu kanalları inhibe ederek pregabalinin bu etkisini tersine çevirebilir. Bu da $K_{ATP}$ kanallarının, pregabalinin analjezik mekanizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürür. (Kweon ve ark., 2011). Önceki çalışmalar, pregabalinin $K_{ATP}$ kanallarını aktive ettiğini göstermiştir; bu da pregabalinin bağlanma bölgesinin esas olarak hücre içi alanda olabileceğini düşündürmektedir (Huang ve ark., 2006). Ayrıca, pregabalinin dorsal kök gangliyonu nöronlarına hücre içi veya hücre dışı uygulanmasının $K^+$ akımlarını artırdığı gösterilmiştir, bu da pregabalinin etkilerinin hem hücre içi hem de hücre dışı hedef bölgeleri kapsayabileceğini düşündürmektedir (McClelland ve ark., 2004). Pregabalin aracılığıyla artan $K^+$ akımı, sıçan neokortikal dokusunda norepinefrin ve glutamat salınımını azaltarak nöronal uyarılabilirliği düşürebilir (Dooley ve ark., 2000).

Pregabalin, dördüncü etkisini GABA üzerinden gösterir. Yapısal olarak GABA'ya benzer olmasına rağmen, pregabalinin GABA'ya metabolize olmadığı ve GABA reseptörlerine doğrudan bağlanma afinitesi göstermediği bulunmuştur (Lanneau ve ark., 2001). Pregabalin, GABA'yı taklit etmediği gibi, GABA reseptörlerinin farmakolojik etkilerini de doğrudan artırmamaktadır. Bu durum, GABA reseptörleri üzerindeki

doğrudan ya da dolaylı etkilerin pregabalinin farmakolojik etkilerine önemli bir katkı sağlamadığını göstermektedir. Ayrıca, pregabalin ve gabapentin in vitro çalışmalarda GABA taşınmasını engellememiştir (Su ve ark., 2005). Bu bulgular, nöropatik ağrının hafifletilmesinde pregabalin ile GABA arasında önemli bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ancak, bazı raporlar yüksek dozlarda pregabalinin, glutamik asit dekarboksilaz aktivitesini artırarak nöronal dokulardaki GABA içeriğini yükseltebileceğini ve bunun nöronal uyarılabilirliği azaltarak pregabalinin nöropatik ağrıyı hafifletmesine katkıda bulunabilecek alternatif bir mekanizma olduğunu öne sürmektedir (Bialer ve ark., 2007; Taylor ve ark., 1992).

Pregabalinin etki merkezi periferde değil merkezi sinir sisteminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Martinez ve arkadaşları, streptozotosin kaynaklı diyabetik periferik nöropati ve travmatik yaralanma (spinal sinir ligasyonu) dahil iki modelde nöropatik ağrının tedavisinde pregabalinin merkezi ve çevresel etkilerini karşılaştırmışlardır. İntranazal veya intratekal yöntemlerle uygulanan yeterli pregabalin dozlarının, hem spinal sinir ligasyonu hem de diyabetik periferik nöropati modellerinde dokunsal allodini ve termal aşırı duyarlılığı iyileştirdiği gösterilmiştir. Buna karşın, pregabalinin periferik sinir seviyesinde uygulanması her iki modelde de ağrı davranışını hafifletmemiştir, bu da pregabalinin etkisinin periferik değil merkezi sinir sisteminde olduğuna işaret etmektedir (Martinez ve ark., 2012).

#### 2.3.3.3. Pregabalinin İlaç Etkileşimi

Pregabalin, %90’dan fazla sistemik emilime sahiptir ve gastrointestinal motiliteyi etkileyen ilaçlar ya da çeşitli diğer ajanlar tarafından etkilenmemektedir. Ayrıca, ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 enzimlerini inhibe etmez. Sitokrom P450'yi etkilemediği için, pregabalin ile diğer ajanlar arasında, ilaç-ilaç

etkileşimlerinin inhibisyon veya indüksiyona bağlı olarak meydana gelmesi beklenmez (Perucca, 2006).

#### 2.3.3.4. Pregabalinin Yan Etkileri

Genel olarak olumlu bir yan etki profiline sahiptir. Pregabalin, gabapentinden daha güçlü ve daha az yan etki oluşturmaktadır (Ben-Menachem, 2004). Pregabalinin yan etkileri doza bağımlıdır ve geri dönüşümlüdür (Eisenberg ve ark., 2007). Baş dönmesi, pregabalinin en sık bildirilen yan etkisidir ve bunu, tedaviyi bırakmanın en sık nedeni olan somnolans (uyuklama) takip etmektedir (Bockbrader ve ark., 2010). Pregabalinin diğer olası yan etkileri arasında periferik ödem, ağız kuruluğu, kilo alımı, enfeksiyon, iştah artışı ve kabızlık yer alır (Hoppe ve ark., 2008; Toth, 2014). Opioidlerle beraber kullanılması halinde solunum depresyonu (Gomes ve ark., 2017), sosyalleşme, öfori, sakinlik ve rahatlama duygularını uyardığı ve diğer ilaçların psikoaktif etkilerini artırabildiği bildirilmiştir (Smith ve ark., 2012). Genel olarak, pregabalin uygulaması sırasında en sık bildirilen yan etkiler baş dönmesi ve somnolandır.

#### 2.3.3.5. Pregabalinin Endikasyonları ve Dozlaması

Kısmi nöbet, nöropatik ağrı ve yaygın anksiyete bozukluğu gibi patolojik durumların tedavisinde kullanılabilir (Zareba ve Treatment, 2008). Ayrıca pregabalinin alkol tedavisinde de kullanılabileceğini öne süren çalışma vardır (Di Nicola ve ark., 2010).

Epilepsi tedavisinde kullanım kolaylığı da önemli bir husustur çünkü çoğu hasta yıllarca hatta on yıllar boyunca tedaviye ihtiyaç duyacaktır ve sıklıkla birkaç farklı antiepileptik ilaçları aynı anda almaları gerekecektir. Kullanılan antiepileptik ilaçlarda çeşitli olumsuzluklar bulunmaktadır. Bunlar arasında hepatik metabolizma ve/veya protein bağlanmasından kaynaklanan ilaç etkileşimleri, dozlama problemleri, dozlama titrasyonundaki zorluk, serum ilaç derişiminin takip edilmesi bulunmaktadır. Bu

sebeplerden dolayı bu ilaçların günlük hayatta kullanımında sorunlar oluşmaktadır. Kanıtlanmış güvenliği ve tolere edilebilirliği ile birlikte pregabalin en güvenilir ilaçlardan biridir.

Yeni başlayan hastalarda tedavi dozlaması günde iki defa 75 mg veya üç defa 50 mg olarak başlanmaktadır. Bu doz, tolere edildiği gibi, etkinliğe bağlı olarak 1-2 hafta boyunca günde iki kez oral olarak 150 mg'lık bir doza kademeli olarak artırılır. Bireysel farklılıklar ve ilaç tolare edilmesi durumuna göre 600 mg'a kadar çıkarılabilmektedir. Çoğu hasta için pregabalin dozlaması 300 veya 600 mg/gün olarak optimize edildiğinde en etkilidir, ancak bazı hastalar daha düşük dozlarla iyi sonuç verebilir (Toth, 2014). Pregabalin kullanımında ağrıda iyileşme görülmeden önce bu ilaçları sekiz hafta boyunca kullanılması ve bırakılırken pregabalin için dozun her hafta 50 ila 100 mg/gün düşürülmesi muhtemelen güvenli olacaktır.

#### 2.3.3.6. Pregabalinin Müstahzarları

Dünya çapında 60'tan fazla ülkede Lyrica® ticari adıyla satılmaktadır. Türkiye'de çeşitli firmalar tarafından çeşitli ticari adlarla satışı gerçekleştirilmektedir. Bu müstahzarların içerdikleri pregabalin miktarları 25-300 g aralığında değişmektedir. Piyasada satılan pregabalinin çeşitli formlarda müstahzarları bulunmaktadır. Bu formlar tablet, film tablet, kapsül, sert kapsül, sert jelatin kapsül, efervesan ve oral çözeltidir.

#### 2.3.3.7. Pregabalinin Kötüye Kullanımı

Kötüye kullanım durumlarında, ilacı reçetesiz kullanan veya bağımlılığı olan bireyler, tıbbi olmayan amaçlarla ilacı yüksek dozlarda burundan (intranazal) veya intravenöz yolla uygulayabilmektedir. İlacın kötüye kullanım potansiyelinin belirlenmesi, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine dayanan, klinik ve preklinik çalışmaları içeren karmaşık bir süreçtir (Panel, 2003). Klinik çalışmalarda pregabalin ile tedavi edilen hastaların %1-10'unda geçici öfori duygularının oluştuğu

gözlenmiştir, bu durum pregabalinin kötüye kullanımındaki endişelerin haksız olmadığını göstermektedir (Schjerning ve ark., 2016). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından geliştirilen ICD-10 ve DSM-IV gibi sistemlerin madde kötü kullanımını değerlendiren çeşitli parametreleri bulunmaktadır, ancak bu parametreler pregabalinin kötüye kullanımının değerlendirilmesinde yeterli değildir.

Gabapentinoidler nörolojik sorunlarda birinci basamak olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kötüye kullanım potansiyellerinin, dopaminerjik sistem üzerindeki etkileri ve GABA-mimetik özelliklerine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Pregabalin ve gabapentin, düşük protein bağlanma oranı, renal atılım ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin olmaması açısından benzerdir (Bockbrader ve ark., 2010). Ancak pregabalin, hızlı ve yüksek emilimi, α2δ alt birimine gabapentine kıyasla altı kat daha güçlü bağlanması ve zirve ilaç derişiminin gabapentinden üç kat daha fazla olması nedeniyle daha yüksek suistimal potansiyeline sahiptir (Bockbrader ve ark., 2010; Jones ve Sorkin, 1998; Schifano, 2014). Ayrıca pregabalinin, dozdan bağımsız olarak %90'ın üzerinde biyoyararlanıma sahip olması, bağımlılar tarafından daha fazla tercih edilmesine neden olmaktadır (Bockbrader ve ark., 2010). Pregabalin, 2017 yılında dünya genelinde en çok satılan ilaçlardan biri olmuştur (Urquhart, 2018). Ancak, 2019 yılında DSÖ Uyuşturucu Bağımlılığı Uzman Komitesi, pregabalinin kötüye kullanım, bağımlılık ve zarar verme potansiyeli nedeniyle halk sağlığı üzerindeki etkilerinin izlenmesi gerektiğini belirterek, pregabalinin reçetelendirilmesi konusunda dikkatli olunmasını önermiştir. Pregabalin reçetesi verilmesi gerektiğinde, özellikle madde kullanım öyküsü olan yüksek riskli bireylerde dikkatli izleme yapılmalıdır.

### 2.4. Metabolomiks

Omiks stratejileri hücrede bulunan biyomolekülleri tanımlamayı ve çeşitli biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda çok miktarda veri üretmeyi amaçlayan

çalışma alanlarıdır. Molekül ağırlığı 1000 dalton'dan küçük olan biyomoleküller metabolit olarak adlandırılmaktadır. Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır.

### 2.4.1. Metabolomiksin Tarihçesi

Metabolomik kavramlarını içeren ilk çalışma 1948 yılında Williams ve ark. tarafından kağıt kromatogramlarının kullanıldığı bir çalışmadır (Williams ve Kirby, 1948). Metabolomik terimi, 1998'de yayınlanan bir inceleme makalesinde Steven Oliver tarafından bir genin silinmesi veya aşırı ekspresyonu sonucunda metabolitlerin derişimindeki değişiklikleri ifade etmek için kullanılmıştır (Oliver ve ark., 1998). Metabolom terimi bu nedenle bir organizmanın ifade ettiği tüm metabolit setini ele almak için kullanılır. 1999'da Nicholson ve ark. "Canlı sistemlerin fizyopatolojik uyaranlara veya genetik modifikasyonlara dinamik çok parametreli metabolik cevabının kantitatif ölçümü" anlamında metabolomik terimini kullanmışlardır. (Nicholson ve ark., 1999). 2001 yılında metabolomikler Fiehn tarafından "Numunelerin köken ve biyolojik uygunluklarına göre hızlı bir şekilde sınıflandırılması." olarak metabolik parmak izi tanımını kullanmışlardır (Fiehn, 2001). Link ve ark. yüksek çözünürlüklü kütle spektrofotometresi ile bakteri hücrelerinde "Birkaç saat içinde birkaç saniyelik döngülerle yüzlerce metabolitin izlenmesi" şeklinde kullanılan gerçek zamanlı metabolom profili terimini kullanmıştır (Link ve ark., 2015).

### 2.4.2. Metabolomikste Kullanılan Biyoakışkanlar ve Dokular

Çalışma numuneleri genel olarak iki kategoriye ayrılabilir: metabolik olarak aktif numuneler ve metabolik olarak aktif olmayan numuneler. Metabolizmanın durdurulması gerektiğinde, numuneler genellikle salin veya fosfat tamponlu çözeltiyle yıkandıktan

sonra sıvı azotla hızla dondurulur (Castro ve ark., 2015). Örnek toplama sürecinde belirli hedeflerin karşılanması önemlidir. Metabolomik çalışmalarda numuneler üzerinde etkili olan yaklaşım türü (hedeflenmiş veya hedeflenmemiş), kullanılacak numune türü, örneklem büyüklüğü ve saklama koşulları gibi faktörler önceden belirlenmelidir.

İkinci olarak "Hedeflenmiş Metabolomiks" ve "Hedeflenmemiş metabolomiks" çalışmaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Eğer yaklaşım hedeflenmiş metabolomik ise, numunenin temizlenmesi gereklidir. Bu amaçla sıvı-sıvı veya sıvı-katı ekstraksiyon yöntemleri uygulanabilir. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda ise numune hazırlığı genellikle daha az detaylıdır. Numunede farklı kimyasal, yapısal ve işlevsel özelliklere sahip bileşiklerin çeşitli derişimlerde bulunması, geniş bir kimyasal bileşen yelpazesi oluşturur. Bu kadar çok sayıda bileşenin eksiksiz olarak ölçülmesi mümkün olmadığından, farklı analitik tekniklerin bir arada kullanılması gerekmektedir.

#### 2.4.2.1. İdrar

Toplama kolaylığı nedeniyle metabolik çalışmalarda en çok kullanılan biyoakışkan idrardır. Suda çözünen metabolitlerin ve vücut biyokimyasına yabancı olan ksenobiyotiklerin boşaltım yolu olduğu için üriner metabolom tüm vücut için parametreler içerebilmektedir (Want ve ark., 2010). Tipik olarak toplanan üç tip idrar örneği vardır bunlar sabah idarı, spot idrar ve 24 saatilik idrardır (Fernández-Peralbo ve De Castro, 2012). Sirkadyen ritmin etkisinin azaldığından dolayı 24 saatlik idrar numuneleri daha çok tercih edilmektedir. İdrar numunelerinin oda sıcaklığında kısa süreli saklanması bile glikolitik metabolitlerin parçalanmasına ve metabolizma belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Sykes, 2007). Uzun süreli saklama gerektiğinde, numunelerin −20 °C'de 6 ay boyunca saklanmasının üriner metabolom üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ancak, 6 aydan daha uzun süreli saklamalar için −80 °C'de muhafaza edilmesi önerilmektedir (Gika ve ark., 2007; Gika ve ark., 2008; Pasikanti ve

ark., 2008; Sykes, 2007). Dokuz donma çözünme döngüsüne kadar üriner metabolomda değişiklik gösterilmediği tespit edilmiştir (Gika ve ark., 2008). Ancak bu döngünün mümkün olduğunca kısa tutulması daha doğrudur. Örnek hazırlama, metabolomik çalışmaların kalitesi ve güvenilirliği üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. En yaygın numune hazırlama yönteminde, santrifüj işleminden sonra saf idrar enjeksiyonu yapılır veya santrifüjleme sonrası idrarın seyreltilerek kullanılması önerilmektedir (Chen ve ark., 2016; Emwas ve ark., 2015; Fernández-Peralbo ve De Castro, 2012).

#### 2.4.2.2. Serum ve Plazma

İdrar sonrasında en çok tercih edilen biyolojik sıvılar serum ve plazmadır. Dokularla etkileşim halinde olduğundan dolayı metabolizmanın anlık görüntüsünün sağlanmasında önemli bir numune çeşididir. Serum için kan tüplerine alınan kan belirli bir süre pıhtılaştırılır, pıhtılaşma işlemindeki metabolitleri içeren numune ise plazma olarak adlandırılmaktadır. Bazı çalışmalar, serum ve plazma arasındaki kalitatif ve kantitatif farklılıkları araştırmıştır, ancak her iki biyolojik sıvı için de net bir seçim sunmayan sadece küçük farklılıklar tanımlanmıştır (Dettmer ve ark., 2010; Wedge ve ark., 2011; Yu ve ark., 2011). Kan toplanmasında eğitimli personel gerektirmesi yöntemin olumsuz yanları içerisindedir. En sık kullanılan numune hazırlama yöntemi sıvı-sıvı ekstraksiyonudur, bunun içinde genellikle metanol, asetonitril, izopropil alkol ve aseton gibi çözücüler kullanılmaktadır (Jiye ve ark., 2005; Patterson ve ark., 2015).

#### 2.4.2.3. Beyin Omurilik Sıvısı

Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) omurga ve beyin ventriküllerini dolduran, merkezi sinir sisteminde sıvı regülasyonu ve besin taşınmasında rol oynayan bir sıvıdır (Wishart ve ark., 2008). Bu numunelerin kullanıldığı çalışmalar genellikle alzheimer hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörolojik bozuklukların biyobelirteçlerinin aranmasında kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2012). Eğitimli personel gerektiren bu numune

toplandıktan sonra santrifüjlenerek uzun süreli saklama için -20 °C'de dondurulur, kısa süreli saklama için, BOS metabolomunun 4 °C'de 2 güne kadar stabil olduğu, ancak 5 °C'yi aşan sıcaklıklarda kararsız olduğu bildirilmiştir (Maillet ve ark., 1998; Wishart ve ark., 2008).

#### 2.4.2.4. Tükürük

Tükürük, toplanması kolay ve uzman personel gerektirmeyen bir numune olduğu için metabolomik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Tükürük numuneleri genellikle toplanır ve analiz yapılana kadar dondurulur. −20 °C'de 3 haftaya kadar saklanmasının tükürük metaboloması üzerinde herhangi bir zararlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (Takeda ve ark., 2009). Numune hazırlığı öncesinde, tükürük numuneleri hücresel ve gıda artıklarını uzaklaştırmak için santrifüjlenir (Alvarez-Sanchez ve ark., 2012).

#### 2.4.2.5. Primer ve İmmortal Hücreler

Belirli hücrelerin organizmadan cerrahi veya enzimatik olarak çıkarılması sonucunda kültür edilmesiyle primer hücreler elde edilmektedir. Bütün hücreleri içeren metabolik çalışmalar spesifik hücrelerin tanımlanması için yapılan çalışmalarda doğru sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle hücreler üzerine yapılan çalışmaların yapılması ve yorumlanması daha kolay olabilmektedir. Çünkü bu çalışmalarda çeşitli metabolomik hastalıklar, yaş, cinsyet, yaşam şekli ve alkol-sigara alımı gibi faktörler bulunmamaktadır. Hücre kültürü metabolomikleri ilaç keşfinde ve kanser hücrelerinde kullanılmaktadır (Čuperlović-Culf ve ark., 2010; Halama, 2014). Olumsuz yanları arasında büyüme ortamı formülasyonunun değişkenliği, geçiş sayısının etkisi, metabolik söndürme ve metabolit ekstraksiyonu yer alır. Bunlar zaman alıcıdır ve ekstraksiyondan önce metabolit bozulmasına ve hücreden sızıntıya neden olabilir (León ve ark., 2013).

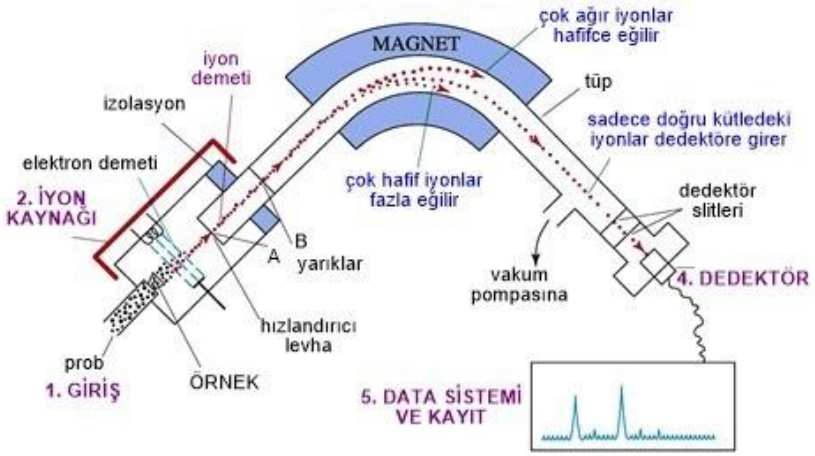
#### 2.4.2.6. Dokular

Metabolomik çalışmalarda kas, kardiyak doku, karaciğer, akciğer, plasenta, arterler ve deri gibi çeşitli dokular kullanılmaktadır. Dokuların kullanılmasıyla daha lokalize sonuçların elde edildiği çalışmalar yapılabilmektedir. İnsan dokuları metabolomik olarak aktif oldukları için toplandıktan sonra kanın uzaklaştırılması için önce fosfat tamponunda veya salin çözeltisinde yıkanır ardından sıvı azot içerisinde hızla dondurulur (Allwood ve ark., 2013). Kan metabolomunun doku metabolomunu değiştirebileceği için, mümkün olduğunca fazla kanın çıkarılması amacıyla dokularda yıkama işlemi yapılır. Dokularla çalışırken dikkat edilmesi gereken konulardan biri, biyoakışkanlara göre dokuların homojen olmamasıdır. Dokuları homojenize etmek için paslanmaz çelik veya bilyalı öğütme yöntemleri kullanılır; ardından monofazik veya bifazik ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilir. Monofazik ekstraksiyonlarda genellikle su ve metanolün çeşitli oranlarda karışımları tercih edilmektedir (Gehmlich ve ark., 2015). Bifazik ekstraksiyonlar için su-metanol karışımına polar olmayan bir çözücü sistemi eklenmektedir, bunun için genellikle kloroform veya diklometan kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2013). En yaygın kullanılan ekstraksiyon modeli Folk ekstraksiyonudur, 1950'lerde geliştirilen bu metotta çözücü olarak su-kloroform-metanol karışımı kullanılmaktadır (Floch, 1957).

### 2.4.3. Kütle Spektroskopisi Temelli Metabolomiks

Külte spektrometrisi çalışmalar için metabolomikte en çok kullanılan analitik tekniklerden biridir. İyon bastırma nedeniyle numunenin doğrudan enjeksiyonunda metabolitlerden kayıp yaşanabilmektedir. Bu nedenle kütle spektroskopisine bağlı gaz veya sıvı kromatografisi kullanılarak ayrım gerçekleştirilir. Bu sistemler genellikle numune girişi, iyon kaynağı, kütle analizatörü ve dedektörden oluşmaktadır (Şekil 2.3). Numune giriş kısmı numunenin cihaza girmesini sağlar, iyon kaynağı iyonizasyon tekniği

ile gaz fazı iyonları üretir, kütle analizörü iyonları kütle şarj oranlarına (*m/z*) göre ayırır ve dedektör iyonların bolluklarıyla orantılı bir elektrik akımı üretir (De Hoffmann ve ark., 1997). Kütle analizatöreleri tek veya kombine halde kullanılabilmektedir, kütle spektrometresinde birinci analizatörden çıkan iyonlar izole edilerek ikinci analizatöre gönderilerek analiz edilmektedir.




**Şekil 2.3.** Kütle analizatörünün şematik diyagramı

Hedeflenen metabolomik çalışmalarda tanımlanmış metabolitlerin kantitatif analizi yapılmaktadır. Bu çalışmalarda metabolitin tespit edilme limitinin yüksek olması, tarama süresi ve tarama hızı önemlidir. Bu yüzden dedektör olarak dört kutuplu kütle analizörü ve orbitrap dedektörleri tercih edilmektedir. Hedefsiz metabolomik çalışmalarda ise numunede bulunan metabolitlerin tamamının veya çoğunluğunun tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu çalışmalarda dedektörün kütle aralığının geniş olması için uçuş zamanlı kütle dedektörü ve orbitrap dedektörler kullanılmaktadır.

Kütle spektrofotometresine bağlanabilen ayırma tekniklerinde genellikle en çok sıvı kromatografisi kullanılmaktadır. Çeşitli sabit fazların bulunmasından dolayı çok kullanışlı olan bu yöntemde genellikle $C_8$ ve $C_{18}$ kolonlar tercih edilmektedir (Denoroy ve ark., 2013). Diğer bir ayırma tekniği ise gaz kromatografisidir, bu yöntem uçucu veya türevlendirmeyle uçucu hale getirilen termal olarak kararlı analitlerin ayrılmasında

kullanılır. Doğal olarak uçucu olan kimyasallar içerisinde ketonlar, alkoller, esterler ve heterosiklik bileşikler bulunmaktadır.

### 2.5. Kromatografi

Kromatografi, 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirilen bir teknik olarak bilim dünyasında yerini aldı (Ettre, 2003). Tswett, bu yöntemi bitki pigmentlerinin, özellikle klorofilin, ayrımını gerçekleştirmek için kullandı. İlk başta bitki pigmentlerinin ayrılması için kullanılan bu teknik, zamanla biyokimyasal moleküllerin tanımlanması ve ölçülmesinde vazgeçilmez bir araç haline geldi. Kromatografi terimi Yunanca kökenlidir; "khrōma" renk anlamına gelirken, "graphē" yazı anlamına gelir. Başlangıçta renkli bileşiklerin ayrılması için kullanılan bu yöntem, ismini de buradan alır.

Kromatografinin temel amacı, belirli bir numunenin bileşenlerini ayırmak ve bu bileşenlerin miktarını ölçmektir. Bu yöntem, maddelerin sabit bir faz üzerinde hareketli bir faz yardımıyla farklı hızlarla hareket etmesi ya da sürüklenmesi prensibine dayanır. Numuneyi kolon boyunca sürükleyen karışımlara 'hareketli faz' denir ve bu hareket, genellikle kolon adı verilen sabit faz ile numunenin etkileşiminden kaynaklanır. Farklı bileşenler, sabit fazla farklı derecelerde etkileşime girer ve bu etkileşim farkı, bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlar.

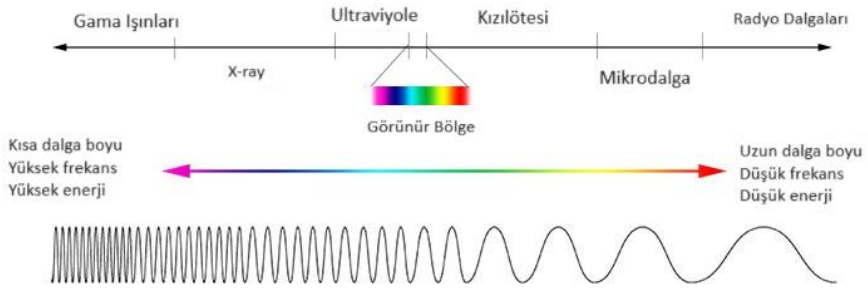
1903 yılında geliştirilen bu yöntemin ilerlemesi, birkaç yıl süren çeşitli teknolojik gelişmeleri gerektirdi. Bunlardan ilki ince tabaka kromatografisi (İTK) geliştirilmesidir. İlk İTK uygulamalarının 1939 yılında olduğu tahmin edilmektedir (Schreiber, 1979). İTK da kullanılan bağlayıcıların çeşitlenmesinin ardından İTK kromatagrafisinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Ardından GC ve HPLC cihazlarının geliştirilmesiyle kromatografinin kullanımı yaygınlaşmıştır.

Kromatografinin sınıflandırılmasında çeşitli gruplandırmalar olsa da en yaygın olanı ayrılma mekanizmasına göre gruplandırılmasıdır (Hamilton ve Sewell, 1982).

- **Adsorbsiyon Kromatografisi:** Bu yöntemde maddelerin ayrılması, sabit faz ile madde arasındaki farklı derecelerde adsorban yüzeylerine tutunma özelliklerinden kaynaklanır
- **Dağılım Kromatografisi:** Maddenin birbirine karışmayan iki sıvı faz arasındaki dağılım farkından dolayı ayrım gerçekleşmektedir.
- **İyon Değişim Kromatografisi:** İyonların sabit faz üzerindeki karşıt yüklü iyonlarla etkileşime girerek ayrılmasına dayanır.
- **Moleküler Eleme Kromatgorafisi:** Bu yöntemde moleküllerin ayrılmasında molekül büyüklükleri rol oynar, küçük moleküller gözeneklere girerken büyük moleküller kolonda daha hızlı ilerler.
- **Afinite Kromatografisi:** Maddenin sabit fazdaki spesifik bağlanma bölgelerine bağlanmasıyla gerçekleşmektedir.

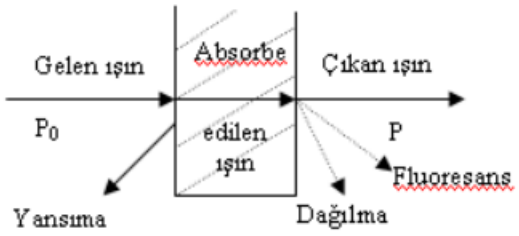
### 2.6. Spektroskopi

Spektroskopi 17. yy'da Isaac Newton'un prizma kullanarak güneş ışığını spektral bileşenlerine ayırması ile başlamaktadır. Bu olay beyaz ışığın farklı renklerden oluştuğunu göstermiştir. Ardından 19. yüzyılda, Joseph Fraunhofer, güneş spektrumunda koyu çizgiler keşfetmiş ve bu çizgilerin belirli elementler tarafından soğurulan ışık dalga boylarını temsil ettiğini göstermiştir (Gurtovenko ve Kostyk, 1989). Spektroskopi, ışığın madde ile etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı, elektromanyetik spektrumun çeşitli bölümlerindeki ışık dalgalarını kullanarak farklı teknikler geliştirir. Bu teknikler arasında görünür, ultraviyole (UV), kızılötesi (IR), mikrodalga ve radyo dalgaları gibi farklı dalga boylarındaki ışığın kullanımı yer almaktadır (Şekil 2.4).




**Şekil 2.4.** Elektromanyetik spektrum diyagramı

Işın veya elektromanyetik dalga uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerjidir. Işının iki bileşeni vardır, bunlar manyetik alan ve elektriksel alandır. Bu iki alan yayılma yönüne ve birbirine dik olarak konumlanmışlardır. Spektroskopide temel prensip; atom, molekül veya iyon, elektromanyetik ışıma ile etkileşime girerek, dönme, titreşim veya enerji seviyesi değişikliğini ölçerek bu madde hakkındaki özelliklerin belirlenmesidir. Tipik bir spektroskopi cihazında devamlı ışın demeti gönderen ışın kaynağı, ışını belirli dalga boylarında sınırlayan monokromatör, numune kabı, dedektör ve sinyal işlemcisi bulunur. Temel bir spektroskopi cihazında ışın numune kabına gönderildikten sonra ışın için dört ihtimal bulunmaktadır. Bunlar; ışının geçmesi, ışının absorbe edilmesi, ışını yansıması ya da ışının dağılmasıdır (Şekil 2.5).




**Şekil 2.5.** Elektromanyetik ışının madde ile etkileşimleri

En çok kullanılan yöntemlerden birisi UV-görünür bölge spektroskopisidir. Bu yöntem hem gıda analizlerinde hem de araştırma laboratuvarlarında geniş bir kullanım

alanı bulmaktadır. UV dalga boyu 100-380 nm aralığını kapsarken görünür bölge 800 nm'ye kadar olduğu ifade edilmektedir (Asahi ve ark., 2001). Yapılan çalışmalarda, daha yüksek doğruluk ve güvenilirlik sağlamak amacıyla analizlerin 220-780 nm dalga boyu aralığında yapılması önerilmektedir. Bu yöntemin avantajları arasında hızlı olması, numuneye ölçüm sırasında zarar vermemesi, çevre dostu olması ve kullanım kolaylığı bulunmaktadır. Bu yöntemde, bir ışın demeti bir ortamdan geçerken bazı dalga boylarındaki ışığın şiddetindeki azalmaya dayanarak işlem yapılmaktadır. Bu olaya absorbsiyon denir. Maddenin verdiği absorbsiyona karşı derişim ölçülerek maddelerin nicel analizlerinde kullanılmaktadır.

Elektronik geçiş enerjisi farkları UV-görünür ışığın enerjisine eşit olan kovalent doymamış bileşikler belirli dalga boylarında emilim yaparlar. Bu bileşikler kromoforlar olarak bilinir ve renklerinden sorumludurlar. UV-görünür elektromanyetik radyasyonu emmeyen ancak kromofor gruplarının emilimini etkileyen kovalent olarak doymuş gruplara oksokromlar denir (Patience, 2017). UV-vis radyasyonu kromoforlara çarptığında, temel durumdaki elektronlar uyarılmış bir duruma atlar, buna elektron uyarımı denir, oksokromlar ise elektron bağışçısıdır ve kendileri renk değiştirmezken kromoforların rengini etkileme kapasitesine sahiptirler. Kromoforlar karakteristik absorbans bantlarına sahiptir. Başka bir bileşik ekleyerek veya sıcaklığı yükselterek ortamın fiziksel koşullarını değiştirmek, enerji seviyelerini, dolayısıyla dalga boyunu ve absorbans yoğunluğunu değiştirebilir (Lewis, 2002). Analittin bulunduğu çözücü ortamı absorbans yoğunluğunu ve dalga boyu kaymalarını etkileyebilir.

Spektroflorometri, temelinde madde elektromanyetik enerji tarafından uyarıldıktan sonra uyarılmış singletten temel haldeki singlete geçişi sırasında yayılan floresans ışınlarının ölçülmesine dayanan bir spektroskopi dalıdır. Emilen ışığın dalga boyu ile yayılan ışığın dalga boyu arasında bir fark vardır. Bu fark, Stokes kayması olarak

bilinir. Bu süreç, genellikle birkaç nanosaniye ile birkaç mikrosaniye arasında gerçekleşir. Yani floresans, uyarıcı ışık kaynağı kapatıldıktan hemen sonra sona erer. Bu nedenle floresan ışık, yalnızca uyarıcı ışık mevcut olduğunda gözlemlenir.

Spektroflorometri yönteminde spektrofotometriden farklı olarak numune dedektöre dik bir açıda bulunmaktadır. Spektroflorometrede çeşitli dalga boylarındaki ışık absorblanırken ama bu dalga boylarının hepsinde floresans gerçekleştirmez. Bu nedenle spektroflorometri yöntemi UV-Vis spektrofotometrelerden bin kat daha hassas ölçümler gerçekleştirebilmektedir. Spektroflorometre cihazlarında ng veya daha düşük seviyedeki floresan bileşiklerin tespiti ve tayini yapılabildiği için spektroflorometri oldukça hassas bir analitik yöntemdir.

### 2.7. Validasyon

Analitik bir yöntemin validasyonu yani uygunluğunun değerlendirilmesi için gerekli olan parametrelerin deneysel olarak doğrulanmış kanıtları elde etmeyi amaçlayan prosedürdür. Farmasötiklerin geliştirilmesinde ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan tüm analitik tekniklerin doğrulanması gerekmektedir. Farmakopelerde yer alan yöntemlerin kullanılması durumunda bu yöntemin validasyonunun yapılmasına gerek yoktur. Yeni yöntem geliştirilmesinde, literatürde bulunan yöntemde değişiklikler yapılmasında, var olan yöntemin yeni laboratuvarlarda uygulanması durumunda validasyona gerek duyulmaktadır. Ayrıca laboratuvarlarda sistemlerin doğru olarak çalıştığını kontrol etmek için periyodik olarak yapılmalıdır.

Validasyon ilk olarak 1968 yılındaki onuncu basımında Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği devlet farmakopesinde “Biyolojik Test Sonuçlarının İstatistiksel Analizi” başlığında incelenmiştir. Bu bölümde analitik tekniklerin doğrulanmasıyla ilgili sorunlar yer almıştır. Daha sonra bu famakopenin 1988 yılında yer alan on birinci basımında “Kimyasal Deneysel Verilerin İstatistiksel İşlenmesi” başlığında yer almıştır

(Epshtein, 2004). 1987 yılında FDA tarafından validasyonun temel prensipleri hakkında kılavuz hazırlanmıştır (U.S. FDA 1987).

1993 yılında Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı [International Conference on Harmonization (ICH)] tarafından analitik prosedürlerin validasyonuna ilişkin genelleştirilmiş tavsiyeler geliştirilerek 1994 yılında yayımlanmıştır (ICH, 1994). Yayınlanan bu belgeler 1995 yılında daha detaylı olarak tekrar ele alınmıştır (IFPMA, 1995). 1996 yılında güncellenen ICH kalvuzları daha sonra 2005, 2022 ve 2023 yılında iki defa güncellenmiştir (ICH, 2023). Daha sonraki yıllarda çeşitli kurumlar tarafından yöntem validasyonuna ilişkin çeşitli kılavuzlar yayımlanmıştır (Caporal-Gautier, 1992; Food ve November, 1994; Green, 1996; Wegscheider, 1996). Yöntem geliştirilmesinde kullanılan validasyon parametreleri arasında

- Enjeksiyon tekrarlanabilirliği
- Özgüllük (Specificity)
- Seçicilik (Selectivity)
- Çalışma aralığı (Range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precsion)
- Sağlamlık (Robustness)
- Gözlenebilme sınırı (Limit of Quantification)
- Miktar tayin sınırı (Limit of Dedection) bulunmaktadır.

### 2.8. Literatür Özetleri

Pregabalin üzerine yapılan çalışmalar türevlendirme yapılarak ve türevlendirmesiz olarak ikiye ayrılabilmektedir.

### 2.8.1. Pregabalinin Türevlendirilmediği Yöntemler

#### 2.8.1.1. HPLC ile Geliştirilen Yöntemler

Gujral ve ark. tarafından farmasötik formülasyonların ve insan idrarında pregabalinin tespiti için ters fazlı HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz $C_{18}$ kolon kullanılırken mobil faz olarak metanol/asetonitril/0.02 M dipotasyum hidrojen ortofosfat içeren pH'sı 7 olan deiyonize su (3/1/16, h/h/h) kullanılmıştır. Ölçümlerin 210 nm'de yapıldığı çalışmada Rt zamanı 4.6 dakika ve analiz süresi toplam 10 dakika olarak bildirilmiştir. Çalışmanı 0.75-6.00 µg/mL aralığında doğrusal olduğu bildirilmiş, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.669 ve 0.221 00 µg/mL olarak kaydedilmiştir. Bağıl standart sapma (BSS) gün içi ve günler arası sırasıyla %99.990 - %100.056 ve %99.98 - %99.99 olarak bulunmuştur. Çalışmanın geri kazanım değerlerinin %99.9 ila %100.1 arasında olduğu bildirilmiştir (Gujral ve ark., 2009).

2015 yılında yapılan çalışmada Farmasötik ve Toplu Formülasyonda HPLC-UV ile yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde fosfat tampon çözeltisi (pH 6.9) ve asetonitril mobil fazı (96/4, h/h) ile $C_{18}$ kolon kullanılmıştır. 210 nm'de yapılan ölçümler sonucunda 0.60 ile 0.89 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu bulmuşlardır. Analiz süresi 9 dakika olarak bildirilmiş olup akış hızı 1 mL/dk olarak bildirilmiştir. $R^2$ değeri 0.998, geri kazanım değeri %98-102 iken Rt değeri yaklaşık dört dakika olarak bildirilmiştir (Akther ve ark., 2015).

Elliott ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Postmortem kanlarda pregabalin analizi için $C_{18}$ kolon ile mobil faz olarak %70 asetonitril %30 su içeren mobil faz A ve deiyonize su olan mobil faz B kullanmışlardır. Her iki mobil faz içerisinde de 1mM amonyum format ve %1 formik asit eklemişlerdir. Mobil faz oranları %14 mobil faz A %86 oranında mobil faz B'den oluşmaktadır. Analiz süresi 1.1 dakika olan çalışmada gözlenebilme limiti 0.05 µg/mL

olarak kaydedilmiştir. Yapılan çalışmanın doğrusal olduğu aralık 1.1-46.7 µg/mL olarak bildirilmiştir (Elliott ve ark., 2017).

Atta ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada insan idrarında ve farmasötik preparatlarda $C_{18}$ kolon kullanarak 92.5/7.5 (h/h) oranlarında pH'sı 6 olan potasyum dihidrojenfosfat ile metanolden oluşan karışım kullanılmıştır. Ölçümler 230 nm'de yapılarak, doğrusal olduğu aralık 200-700 µg/mL olarak bildirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2 µg/mL ve 7 µg/mL olarak kaydedilmiştir. $R^2$ değeri her iki yöntem içinde 0.999 olarak bulunmuştur. Kapsüllerde geri kazanım %99.43 ile %101.33 olarak bulunurken idrarda geri kazanım %98.13 ile %101.30 arasında bulunmuştur. Pregabalinin Rt değeri 7.93 iken toplam analiz süresi 20 dakika olarak bildirilmiştir (Atta ve ark., 2016).

Kasawar ve Farooqui tarafından yapılan çalışmada, pH 6.9 fasfat tamponu ve asetonitrilden (95/5, h/h) oluşan mobil faz ve $C_8$ kolonu kullanılarak 200 nm'de pregabalinin tespit edilmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada fotodiyot dizisi dedektörü kullanılarak 0.5-1.5 mg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Çalışmanın $R^2$ değeri 0.999'dan büyük ve geri kazanım değerleri 100.39 ile 100.72 aralığında bulunmuştur (Kasawar ve Farooqui, 2010).

Kannapan ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada pregabalin ve metilkobalamin içeren kapsüllerin içerisindeki etkin madde miktarlarının teşhisi için ters faz HPLC-UV yöntemi geliştirilmiştir. 40°C sıcaklığındaki $C_{18}$ sabit faz kolonunun kullanıldığı çalışmada mobil faz olarak amonyum dihidrojen-o-fosfat tamponu (pH:6), asetonitril ve metanol (75/15/10, h/h/h) karışımı kullanılmıştır. 210 nm'de yapılan ölçümlerde, çalışma sonuçları 3200-4800 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 0.9938, LOD değerinin ise 47.9 µg/mL olduğu bildirilmiştir (Kannapan ve ark., 2010).

#### 2.8.1.2. Spektroskopi Temelli Geliştirilen Yöntemler

2017 yılında Gujral ve ark. tarafından yapılan çalışmada türevlendirme olmaksızın farmasötik formülasyonlarda ve insan idrar örneklerinde pregabalinin belirlenmesi için UV spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemle 210 nm'de max absorbans noktası seçilerek ölçümler yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin 0.5-50 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu bildirmişlerdir (Gujral ve ark., 2009).

### 2.8.2. Pregabalinin Türevlendirildiği Yöntemler

#### 2.8.2.1. HPLC ile Geliştirilen Yöntemler

Souri ve ark tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada pregabalin türevlendirilmesi için 1-floro-2,4-dinitrobenzen kullanmışlardır. Türevlendirme sonrası 360 nm'de ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Pregabalinin tespit edilmesi için dökme pregabalin formunda ve farmasötik formlarda yöntem geliştirilmişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak $C_{18}$ kolon kullanılırken, asetonitril ve 50 mM sodyum dihidrojen fosfat karışımı (pH 2.5) (60/40, h/h) mobil faz olarak kullanılmıştır. Çalışmanın doğrusal olduğu aralık olarak 1-100 µg/mL aralığı bildirilmiştir. Yöntemin $R^2$ değeri 0.999'dan büyüktür ve gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %0.84-1.98 olarak bildirilmiştir (Souri ve ark., 2013).

UV dedektör kullanılarak yapılan başka bir çalışmada serum ve plazmadaki pregabalin miktar tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Pikril sülfonik asit ile türevlendirilen çalışmanın yapıldığı dalga boyu 340 nm'dir. $C_8$ sabit fazının kullanıldığı çalışmada mobil faz asetonitril ve asetat tamponu (pH 4.6) (50/50, h/h) olarak bildirilmiştir. LOD değerinin 0.2 µg/mL olduğu çalışmanın doğrusal olduğu aralık 0.5-8 µg/mL olarak bildirilmiştir. Çalışmanın korelasyon katsayı 0.999'dan yüksek olarak bulunmuştur (Berry ve Millington, 2005).

Yığın ve kapsül formlarındaki pregabalinin tespiti için geliştirilen başka bir yöntemde türevlendirici ajan olarak *p* –dimetilaminobenzaldehit kullanılmıştır. Ölçümlerin 395.8 nm'de gerçekleştirildiği bu çalışmada korelasyon katsayısı 0.996'dır. Mobil faz olarak 0.022 M potasyum dihidrojen fosfat (pH 6), metanol ve asetonitrilden (92/5/3, h/h/h) oluşan karışım seçilen çalışmanın doğrusal olduğu aralık 5-60 µg/mL'dir (Patil ve ark., 2016).

Saf formda pregabalin tespiti için HPLC-UV ile yöntem geliştirilen başka bir çalışmada 1-floro-2,4-dinitrobenzen kullanılarak türevlendirme yapılmıştır. Sabit faz olarak $C_{18}$ kolon ile mobil faz olarak fosfat tamponu ve asetonitril kullanılmıştır. Çalışma 8-48 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Bileşiğin 8 saat stabil olduğu çalışmada korelasyon katsayısı 0.9998, geri kazanımı %100.03 ±1.10, gün içi kesinliği %1.87'den küçük olarak bildirilmiştir. Çalışmanın LOD 0.8 ng/mL olarak bildirilmiştir (Wu ve ark., 2010).

Gülsüm Ç. ve ark. tarafından yapılan çalışmada 9- fluorenilmetil kloroformat ile türevlendirerek kapsüllerdeki pregabalin analizi için HPLC-FLD cihazında ölçümler yapılmıştır. Mobil fazın 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 3.9)- asetonitril (70:30, h/h) olduğu tamponlu ortamda $C_{18}$ kolonu ile analiz etmişlerdir. Ölçümler için eksitasyon dalga boyu 260 nm emisyon dalga boyu 315 nm'dir. Çalışmanın doğrusallığı 0.5-6.0 µg/mL aralığındadır, gözlenebilme ve miktar tayin sınırı sırasıyla 0.039 µg/mL ve 0.117 µg/mL'dir (Toker ve Çicek, 2019).

Pregabalinin bir farmasötik dozaj formunda değerlendirilmesi için 0.2 trietilamin içeren su ve metanol (10/90, h/h) ortamında floresamin ile türevlendirme yapılmıştır. Bu yöntemde sabit faz $C_{18}$ kolon olarak seçilmiş ve emisyon ve eksitasyon dalga boyları sırasıyla 395 nm ve 476 nm olarak verilmiştir. Çalışmanın korelasyon katsayısı 0.9995'den büyük, Rt 2.4 dakika ve LOD değeri 0.020 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çalışmanın gün içi ve günler arası kesinliği 4.3'ten küçük ve çalışmanın doğrusal olduğu aralık 1.25–250 µg/mL'dir (Martinc ve ark., 2010).

Pregabalin analizi için insan plazmasında 4-kloro-7-nitrobenzofurazan ile türevlendirilerek yapılan başka bir çalışmada çalışmanın doğrusal olduğu aralık 0.50–20.0 µg/mL bulunmuştur. $R^2$ değeri 0,998 olan çalışmada gün içi ve günler arası kesinlik %9.4'ten küçüktür. Çalışmanın doğruluk LOQ değeri 0.5 µg/mL'dir. Sabit faz olarak $C_{18}$ kolon ile metanol ve 0.05 M fosfat tamponu (pH 4.9) (43/57, h/h) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan floresans dedektörün eksitasyon ve emisyon değerleri sırasıyla 470 nm ve 530 nm olarak seçilmiştir (Martinc ve ark., 2014).

Vermeij ve ark. tarafından insan serumunda *o*-ftaldialdehit ve 2-merkaptoetanol kullanılarak pregabalin için floresans saptama gerçekleştirilmiştir. Çalışmada eksitasyon için 330 nm kullanılırken emisyon için 450 nm seçilmiştir. Çalışmada kullanılan mobil faz 20 nM fosfat tamponu/etanol/asetonitril (74.5/8/17.5, h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Doğrusallık 1–40 µg/mL aralığında bildirilirken, LOQ değeri 0.53 µg/mL olarak bildirilmiştir (Vermeij ve Edelbroek, 2004).

Literatürde bulunan çalışmaların özeti Tablo 2.3' de gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** HPLC-UV ve HPLC-FLD ile yapılan pregabalinin türevlendirildiği analitik yöntemler

| Analizin Yapıldığı Ortam | Türevlendirici Ajan | Çalışma Aralığı (µg/mL) | Mobil Faz | Cihaz | Ölçüm Değerleri | Referans |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Saf pragabalin ve Farmasötik preparat | 1-Floro-2,4-dinitrobenzen | 1-100 | Asetonitril ve sodyum dihidrojen fosfat karışımı 50 mM (pH:2.5) (60/40, h/h) | HPLC-UV | 360 | (Souri ve ark., 2013) |
| Serum ve Plazma | Pikril sülfonik asit | 0.5-8 | Asetonitril ve asetat tamponu (pH:4.6) (50/50, h/h) | HPLC-UV | 340 | (Berry ve Millington, 2005) |
| Yığın ve Kapsül | *p* –dimetilaminobenzaldehit | 5-60 | 0.022 M potasyum dihidrojen fosfat (pH:6), metanol ve asetonitrilden (92/5/3, h/h/h) | HPLC-UV | 396 | (Patil ve ark.,. 2016) |
| Saf form | 1-floro-2,4-dinitrobenzen | 8-48 | Fosfat tamponu ve asetonitril | HPLC-UV | * | (Wu ve ark., 2010) |
| Kapsül | 9- fluorenilmetil kloroformat | 0.5-6.0 | 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH:3.9)- asetonitril (70:30, h/h) | HPLC-FL | 260-315 | (Toker ve Çicek, 2019) |
| Farmasötik dozaj | Floresamin | 1.25–250 | 0.2 trietilamin içeren su ve metanol (10/90, h/h) | HPLC-FL | 395-476 | (Martinc ve ark., 2010) |
| İnsan plazması | 4-kloro-7-nitrobenzofurazan | 0.50–20.0 | Metanol ve 0.05 M fosfat tamponu (pH:4.9)(43/57, h/h) | HPLC-FL | 470-530 | (Martinc ve ark., 2014) |
| İnsan serumu | *o* -ftaldialdehit | 1–40 | 20 nM fosfat tamponu-etanol-asetonitril (74.5/8/17.5, h/h/h) | HPLC-FL | 330-450 | (Vermeij ve Edelbroek, 2004) |
| İnsan serumu | 2-merkaptoetanol | 1–40 | 20 nM fosfat tamponu-etanol-asetonitril (74.5/8/17.5, h/h/h) | HPLC-FL | 330-450 | (Vermeij ve Edelbroek, 2004) |
| Farmasötik preparat | *o* -ftaldialdehit | 30-50 | 0.010 M asetat tamponu ve metanol (85/15, h/h) | HPLC-FL | 345-450 | (Douša ve ark., 2010) |

* Yazarlar tarafından bildirilmemiştir.

#### 2.8.2.2. Spektroskopi Temelli Geliştirilen Yöntemler

Navneet ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada saf ilaç ve farmasötik formülasyonlardaki pregabalinin teşhisi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde türevlendirici ajan olarak benzoil klorür kullanılmıştır. Oluşan bileşiği 223 nm'de ölçmüşlerdir. Çalışma 2.5-12.5 µg/mL aralığında doğrusal iken $R^2$ değeri 0.9997 olarak bildirilmiştir. Çalışmanın LOD değeri 0.31 µg/mL, LOQ değeri 0.87 ve doğruluğu %99.71±1.23 (%BSS) olarak bildirilmiştir (Navneet ve ark., 2010).

Pregabalin tespiti için geliştirilen başka bir çalışmada toplu ilaçlarda ve farmasötik preparatta 1,2-naftakinon-4-sülfonik asit sodyum ve 2,4-dinitrofenilhidrazinin ile türevlendirmeye dayalı metot geliştirilmiştir. Yöntemler sırasıyla 5-45 µg/mL ve 50-450 µg/mL aralığında doğrusaldır. Ölçümleri yapıldığı dalga boyları sırasıyla 485 nm ve 461 nm'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların korelasyon katsayıları sırasıyla 0.993 ve 0.998 iken LOD değerleri 0.29 µg/mL ve 1.91 µg/mL'dir. 1,2-Naftakinon-4-sülfonik asit sodyum ile geliştirilen yöntemde geri kazanımı %95-106.6 aralığında; 2,4-dinitrofenilhidrazinin ile geliştirilen yöntemin geri kazanımı %99-101.3 aralığında bildirilmiştir (Sowjanya ve ark., 2011).

Hammad ve ark. tarafından yapılan çalışmada farmasötik preparatta bulunan pregabalin dimetilformamid varlığında askorbik asit ile reaksiyona sokularak 530 nm'de ölçülen mor renkli kompleks ve ikinci yöntem olarak nötr pH'ta salisilaldehit ile 410 nm'de ölçümlerin yapıldığı yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntem için 5–50 µg/mL ve ikinci yöntem için 5–60 µg/mL çalışma aralığı olduğu bildirilmiştir. Çalışmaların ortalama geri kazanım değerleri birinci ve ikinci yöntem için sırasıyla %102.86 ± 0.67 ve %100.41±1.31'dir. Çalışmaların LOD değerleri 0.5 ve 3 µg/mL iken geri kazanım değerleri %103.23 ve %101.84 bulunmuştur (Hammad ve Abdallah, 2012).

Pregabalinin farmasötik preparattaki miktarının belirlenmesi için geliştirilen bir yöntemde p–dimetilaminobenzaldehit ile türevlendirme gerçekleştirilmiştir. Pregabalin 0.5 M $H_2SO_4$ varlığında türevlendirilerek 420 nm'de ölçüm yapılmıştır. Çalışma 40-120 µg/mL aralığında doğrusaldır. Geri kazanım yüzdesi %96.04 ile %102.9 değerleri aralığında bulunurken $R^2$ değeri 0.999 olarak bildirilmiştir (Najam ve ark., 2013).

Bali ve ark. 2011 yılında saf formunda ve kapsüllerde pregabalin tespiti için pH 7.4 fosfat tamponunda ninhidrin ile reaksiyona sokularak 402 nm'de ölçüm yapmışlardır. Korelasyon katsayısı 0.992 bulunurken doğrusal olduğu aralık 50-1000 µg/mL olarak bildirilmiştir. LOQ ve LOD değeri sırasıyla 20 µg/mL ve 6 µg/mL iken geri kazanım değerlerini 100.43 ± 1.24 aralığında bulmuşlardır (Bali ve Gaur, 2011).

Yığın, farmasötik formulasyonlarda ve insan idrarında pregabalin analizi için KI ve $KIO_3$ içeren bir yöntemde 0.5–3.5 µg/mL aralığında doğrusal çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada absorbans 353 nm'de ölçülmüştür. Korelasyon katsayısı 0.9999 olan çalışmanın LOD değeri 0.246 µg/mL LOQ değeri 0.08154 µg/mL olarak bulmuşlardır. İnsan idrarında geri kazanım değerleri %98.21 ile %99.87 aralığındadır. Çalışmanın gün içi kesinlik için geri kazanım değerlerinin sırasıyla %100.10 ve %0.799'dan düşük, günler arası kesinlik için geri kazanım ve BSS değerleri %100.07 ve %1.001'den düşük olarak bulmuşlardır (Gujral ve ark., 2009).

Zergui ve ark. tarafından yapılan çalışmada 2023 yılında pregabalin tespiti için ninhidrin ile türevlendirme yaparak yöntem geliştirmişlerdir. Çeşitli dozaj formlarında ve insan idrarında 100–500 µg/mL aralığında doğrusal olan yöntemler geliştirmişlerdir. Çalışmanın $R^2$ değeri 0.9995 olarak bildirilirken saptama gözlenebilme sınırı 50 µg/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir (Zergui ve ark., 2023).

2009 yılında yapılan çalışmada geliştirilen üç yöntem kapsüllerde pregabalin miktar tayini için uygulanmıştır. Birinci türevlendirici ajan olarak 2,3-dikloro-5,6-

disiyano-1,4-benzokinon, ikinci türevlendirici ajan olarak 7,7,8,8-tetrasiyanokinodimetan ve üçüncü türevlendirici ajan olarak ninhidrin kullanılmıştır. Bu ölçümler sırasıyla 494, 841 ve 573 nm'de gerçekleştirilmiştir. Yöntemlerin doğrusallığı sırasıyla 2.0–30.0 g/mL, 1.5–10 g/mL ve 40.0–180.0 µg/mL olarak bildirilmiştir. Çalışmaların korelasyon katsayıları sırasıyla 0.9995, 0.9995, 0.9996 olarak bildirilmiştir. Gün içi %BSS değerleri 0.83, 0.54 ve 0.96 iken LOD değerleri sırasıyla 0.343, 0.016 ve 1.235 ug/mL olarak bildirilmiştir. Kapsüllerin geri kazanım değerleri sırasıyla %100.88, %100.28 ve %101.24 olarak bulunmuştur (Armağan, 2009).

2010 yılında yapılan bir çalışmada, toplu ve farmasötik formdaki pregabalin, 7-kloro-4-nitrobenzofurazan ile türevlendirilerek yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntemin eksitasyon ve emisyon dalga boyu sırasıyla 460 nm ve 558 nm olarak bildirilmiştir. Korelasyon katsayısı 0.9995 ve çalışma aralığı 40–400 ng/mL olarak bildirilmiştir. Çalışmanın LOD değeri 0.165 ng/mL iken ortalama geri kazanım yüzdesi %99.96' dır (Önal ve ark., 2009).

Pregabalinin kapsüllerdeki miktarının tespit edilmesi için geliştirilen yöntemde floresamin ile türevlendirilme gerçekleştirildikten sonra 390 nm'de eksitasyondan sonra 487 nm'de emisyon ile analizler yapılmıştır. Ortam pH'sı 10 olarak seçilen bu çalışma 0.01-0.3 µg/mL aralığında doğrusal olarak bildirilmiştir. LOD değerinin 0.002 µg/mL olduğu çalışmada korelasyon katsayısı 0.9999 olarak bildirilmiştir (Walash ve ark., 2011).

Shaalan, kapsüllerde ve insan idrarında pregabalin tespiti için üç farklı türevlendirme yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemlerde türevlendirici ajan olarak 2,4-dinitrofluorobenzen, 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon ve floresamin kullanmıştır. Yöntemlerin doğrusal olduğu aralıkları sırasıyla 0.02-0.28 ng/mL, 2-7 ng/mL ve 1-7 ng/mL olarak bildirmiştir. 2,4-dinitrofluorobenzen için geliştirdiği spektrofloresans

yöntemi için eksitasyon değerini 385 nm ve emisyon değerini 485 nm olarak seçmiştir. 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon ve floresamin geliştirilen spektrofotometrik yöntem için ölçüm değeri olarak sırasıyla 369 ve 352 nm değerlerini seçmiştir. Çalışmaların korelasyon katsayılarını sırasıyla 0.9996'dan büyük olarak bulmuştur. Geri kazanım değerlerini ise sırasıyla 99.7±1.122, 99.55±1.971 ve 98.30±0.727 olarak bulmuştur (Shaalan, 2010).

Sowjanya ve ark. tarafından yapılan çalışmada pregabalinin kantitatif tayini için iki yöntem geliştirilmiştir. Birinci yöntem 400 nm'de 2,6-diklorokinon klorimid ile türevlendirilerek ölçülmesine ikinci yöntem ise 3-metil-2-benztiyazolinon hidrazon türevlendirlerek 668 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Çalışma aralıkları her iki çalışmada da 50-350 µg/mL aralığında doğrusal olarak bulunmuştur. Yöntemlerin geri kazanımları sırasıyla %100.4 ve %99.7 olarak bildirilmiştir (Sowjanya ve ark., 2011).

Farmasötik preparatta pregabalinin tespiti için geliştirilen başka bir yöntemde metanollü ortamda bromokrezol yeşili ile türevlendirme yapılmıştır. Türevlendirme sonrası 618 nm'de ölçümlerin yapıldığı çalışmanın doğrusallık aralığı 6-22 µg/mL olarak bildirilmiştir. Yöntemin kesinliği (%BSS) gün için 0.93 günler arası 0.41 olarak kaydedilmiştir (Kutty ve ark., 2023).

2015 yılında Rizk ve ark. yaptıkları bir çalışmada pregabalin türevlendirici ajan olarak etilendiamin seçmişlerdir. 385 nm'de ölçümlerin yapıldığı çalışmada doğrusallık 2-10 µg/mL, korelasyon katsayısı 0.9998, LOD değeri 0.24 ve ortalama geri kazanım yüzdesi %100.1 olarak bildirilmiştir (Rizk ve ark., 2015).

Kapsüllerin içerdiği pregabalin miktarının tespit edilmesi için geliştirilen başka bir yöntemde türevlendirici ajan olarak 2,4-dinitrofenol ve 2,4,6-trinitrofenol seçilmiştir. Her iki çalışmanın da doğrusal olduğu aralığı 0.02-200 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Reaksiyon sonucunda oluşan sarı renkli kopmlekslerin ölçümleri sırasıyla 418 ve 425

nm’de gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemin korelasyon katsayısı 0.999’dan büyük olarak bulunmuştur. Yöntemlerin iki farklı farmasötik preparatta uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım değerlerinin ortalaması %99.99±0.77 ve %101.47±1.13 olarak bildirilmiştir (Sher ve ark., 2015).

Literatürde bulunan çalışmaların özeti Tablo 2.4’te gösterilmiştir.

**Tablo 2.4.** Spektroskopi temelli pregabalinin türevlendirildiği analitik yöntemler

| Ortam | Türevlendirici Ajan | Çalışma Aralığı(µg/mL) | LOD (µg/mL) | Cihaz | Ölçüm Değerleri(nm) | Referans |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Saf ilaç ve Farmasötik formülasyon | Benzoil klorür | 2.5-12.5 | 0.31 | Spektrofotometrik | 223 | (Navneet ve ark., 2010) |
| Toplu ilaçlarda ve Farmasötik preparat | 1,2-naftakinon-4-sülfonik asit sodyum | 5-45 | 0.29 | Spektrofotometrik | 485 | (Sowjanya ve ark., 2011) |
| Toplu ilaçlarda ve Farmasötik preparat | 1,2-naftakinon-4-sülfonik asit sodyum | 50-450 | 1.91 | Spektrofotometrik | 461 | (Sowjanya ve ark., 2011) |
| Farmasötik preparat | Askorbik asit | 5.0–50 | 0.5 | Spektrofotometrik | 530 | (Hammad ve Abdallah, 2012) |
| Farmasötik preparat | Salisilaldehit | 5–60 | 3 | | 410 | (Hammad ve Abdallah, 2012) |
| Farmasötik preparat | p –dimetilaminobenzaldehit | 40-120 | - | Spektrofotometrik | 420 | (Najam ve ark., 2013) |
| Saf formunda ve Kapsül | Ninhidrin | 50-1000 | 20 | Spektrofotometrik | 402 | (Bali ve Gaur, 2011) |
| Farmasötik formulasyonlar ve İnsan idrarı | KI ve KIO3 | 0.5–3.5 | 0.246 | Spektrofotometrik | 353 | (Gujral ve ark., 2009) |
| Dozaj formlarında ve İnsan idrarı | Ninhidrin | 100–500 | 50 | Spektrofotometrik | - | (Zergui ve ark., 2023) |
| Kapsül | 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon | 2.0–30.0 * | 0.343 * | Spektrofotometrik | 494 | (Armağan, 2009) |
| Kapsül | 7,7,8,8-tetrasiyanokinodimetan | 1.5–10 * | 0.016 * | Spektrofotometrik | 841 | (Armağan, 2009) |
| Kapsül | Ninhidrin | 40.0–180.0 | 1.235 | Spektrofotometrik | 573 | (Armağan, 2009) |
| Toplu ve Farmasötik form | 7-kloro-4-nitrobenzofurazan | 40–400 | 0.165 | Spektrofotometrik | 460-558 | (Önal ve ark., 2009) |
| Kapsül | Floresamin | 0.01-0.3 | 0.002 | Spektroflorometrik | 390-487 | (Walash ve ark., 2011) |
| Kapsüllerde ve İnsan idrarı | 2,4-dinitrofluorobenzen | 0.02 - 0.28 ** | 0.0032 | Spektroflorometrik | 385-485 | (Shaalan, 2010) |

**Tablo 2.4. (Devamı)**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kapsüllerde ve İnsan idrarı | Floresamin | 1-7 ** | 0.6 | Spektrofotometrik | 352 | (Shaalan, 2010) |
| Kapsül | 2,6-diklorokinon klorimid | 50-350 | 2.5 | Spektrofotometrik | 400 | (Sowjanya ve ark., 2011) |
| Kapsül | 3-metil-2-benztiyazolinon hidrazon | 50-350 | 2.4 | Spektrofotometrik | 668 | (Sowjanya ve ark., 2011) |
| Farmasötik preparat | Bromokrezol yeşili | 6-22 | 2.3 | Spektrofotometrik | 618 | (Kutty ve ark., 2023) |
| Farmasötik preparat | Etilendiamin | 2-10 | 0.24 | Spektrofotometrik | 385 | (Rizk ve ark., 2015) |
| Kapsül | 2,4-dinitrofenol | 0.02–200 | 0.0059 | Spektrofotometrik | 418 | (Sher ve ark., 2015) |
| Kapsül | 2,4,6-trinitrofenol | 0.02–200 | 0.0041 | Spektrofotometrik | 425 | (Sher ve ark., 2015) |

* g/mL ** ng/m

# 3. MATERYAL VE METOD

## 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Pregabalin etken maddesi (>%99 saflıkta) Atabay İlaç Firması tarafından hediye edilmiştir ve piyasada satışı bulunan pregabalin içeren tabletler (tavşanların beslenmesi için Alyse 300 mg-Geliştirilen yöntemler için Regapen ve Pagamax) Erzurum Selçuk Ecza deposundan temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların hepsi HPLC Grade saflıkta olup kullanılan saf su MILLIPORE Direct-Q3 saf su cihazından alınmıştır.

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar ve çözücüler Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Kullanılan kimyasallar ve çözücüler

| Kimyasalın Adı | Menşei | Kimyasalın Adı | Menşei |
|---|---|---|---|
| Potasyum karbonat | Merck | Etanol | Sigma-Aldrich |
| 2-naftilaldehit | Sigma-Aldrich | Hegzan | Sigma-Aldrich |
| Ağır su | Fluka | Klorform | Sigma-Aldrich |
| Asetonitril | Sigma-Aldrich | Metanol | Sigma-Aldrich |
| İzopropanol | Merck | Formik asit | Riedel-de Haen |

## 3.2. Kullanılan Cihazlar ve Programlar

Spektroskopik analizlerde spektral ve absorbans ölçümleri 200-1000 nm aralığında tarama yapıldıktan sonra 200-350 nm aralığında Thermo MultiScan Go cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler için 10 mm genişliğinde 96 kuyulu kuvars cam plaka kullanıldı. Spektroflorometrede eksitasyon ve emisyon değerlerinin belirlenmesi için PerkinElmer LS-45 cihazı kulllanıldı. Bu ölçümlerde eksitasyon ve emisyon noktalarının belirlenmesi için 200-900 nm aralığında ölçüm yapıldı. Ölçümler sırasında numune çözeltileri için 10 mm ışık yolu olan 0.70 mL' lik kuvars küvetler kullanıldı.

Kromatografik ayrımları Agilent Technologies 1200 serisi HPLC sisteminde gerçekletirildi. Kromatografik aparat, solvent gaz giderme modülü (G1322A), dörtlü gradyan pompası (G1312A), otomatik numune alıcı (G1313A), termostatlı kolon bölmesi

(G1316A) kısımlarından oluşmaktaydı. Kullanılan dedektörler sistemle uyumlu 1200 serisi UV dedektör (G1314B) ve 1100 serisi FL dedektördür (G1321A). Kromatografik ayırma, ters fazlı bir ACE $C_{18}$ kolonu (250 x 4.6 mm, 5 um) ile gerçekleştirildi. Ürünün türevlendirme sürecini ve niteliksel tespitini tanımlamak için H-NMR cihazı kullanıldı. Metabolitlerin analizinde Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF kütle spektrometresi ve Agilent 1290 Infinity Sıvı Kromatografi Sistemi (HPLC-Agilent Technologies, Palo Alto, CA) kullanıldı. Çalışma türü olarak hedefsiz metabolomik yaklaşım kullanıldı. Agilent Jet Stream Elektrosprey İyonizasyon Sisteminin (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) pozitif iyon modu kullanıldı. Kromatografik elüsyonu gerçekleştirmek için ters faz $C_{18}$ kolonu (Kinetex C18, 100 Å, 50 × 2.1 mm, 1.7 μm) seçildi.

IR analizleri için Shimadzu IRSpirit-T cihazı kullanıldı. Analizlerde kullanılan spektral aralığı 400-4000 $cm^{-1}$ olarak seçilip, bu ölçümler yirmi ölçüm sonucunun ortalaması ile oluşturuldu. Numune hazırlama işlemi gerektirmeyen bu ölçümlerde analitler cihazın kuyucuğuna konularak Quick Attenuated Total Reflectance başlığı ile ölçümleri yapıldı.

Örneklerin karıştırılması için ultrasonik su banyosu (ELMA D-78224LC30) ile ependorf tüplerin karıştırıcısı (Eppendorf Thermomixer C), ultrasonik banyo (Elma D-78224), mikrosantrifüj cihazı (Beckman Coulter Microfuge 20R), metabolomiks çalışmalarındaki numunelerin uçurulması için konsentratör (Eppendorf Concentratorplus) ve tartım için analitik terazi (Kern ABT 100-5 M) kullanıldı. Deneyler sırasında kullanılan mikropipetler, degazer, vortex, mavi ve sarı pipet uçları, ependorf tüpler, enjektörler, damar yolu açıcıları ve nylon membran filtre Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Enstrümantal Laboratuvarından temin edildi.

NMR spektrumlarının alındığı Bruker, UltraShield 300 MHz, (Amerika BirleĢik Devletleri) cihazı, Heidolp Laborata 4001 ve Vacuubrand MZ 2C NT cihazları Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Laboratuvarından temin edildi.

Deneylerin tasarımı Design-Expert Statistical Software (versiyon 13, MN, ABD) yardımıyla gerçekleştirildi. Tez sırasında yapılan işlemlerde ve istatiksel hesaplamalarda Excel 2016, R Studio, ProteoWizard, Masshunter 8.00, XCMS, MATLAB, KEGG, HMDb ve MetaboAnalyst 6.0 yazılımları ve veri tabanları kullanıldı.

### 3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Spektrofotometri yönteminde hazırlanan stok çözelti için, 1 mg madde dikkatlice tartılmış ve 10 mL'lik bir hacimsel şişeye aktarıldı. Az miktarda su-asetonitril karışımı eklenmiş ve karışım çözünmesi için 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutuldu. Çözelti daha sonra son hacme kadar getirildi ve pregabalin-naftil imin stok çözeltisinin derişimi 100 µg/mL olarak ayarlandı. Bu stok çözeltiden 2, 5, 10, 20, 25, 30, 45 ve 50 µg/mL derişiminde standart çalışma çözeltileri ve 3, 5.15 ve 28 µg/mL derişiminde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemi için kullanılan stok çözeltinin hazırlanmasında 1 mg madde dikkatlice tartılarak 5 mL’lik balon jojede mobil faz ile bir miktar çözüldü ve on dakika vortekslendikten sonra mobil faz ile tamamlandı. Son hacmine getirilen pregabalin-naftil imin stok çözeltisinin derişimi 200 µg/mL olarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden ependorf tüplere alınarak HPLC-FLD yöntemi için 0.025, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL derişimlerinde, HPLC-UV yöntemi için 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20, 25 µg/mL derişimlerinde ve kalite kontrol çözeltileri için 0.25, 0.75, 7.5, 13, 22.5 µg/mL derişimlerinde çözeltiler hazırlandı.

### 3.4. Plazma Örneği Toplanması

Tavşanlara otuz gün boyunca aynı saatte pregabalin verildi. Kan örnekleri tavşanların kulağında bulunan Auricular Vena'dan mor kapaklı kan tüplerine alındı. Daha sonra 6000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüj edilerek plazmaları 2 mL'lik ependorf tüplere alındı. Alınan plazmalar analize kadar -80 °C'de saklandı.

### 3.5. Metabolomik Çalışma İçin Plazma Örneklerinin Hazırlanması

Tavşanlardan alınan 200 µL plazma örneği buz üzerinde çözündürüldükten sonra hafifçe girdap (vortex mixser) karıştırıcıda homojenize edildi. Homojenize edilen örnek üzerine 600 µL metanol ilave edilerek 1 dakika kuvvetlice çalkalandı. Örnekler daha sonra 15 dakika +4 °C derecede buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan örnekler 15 dakika boyunca +4 °C derecede 12000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısımdaki temiz faz alınarak ependorflara aktarıldı ve kuruyana kadar bekletildi. Kuruyan örnekler 100 µL mobil faz (%0.1 formik asit içeren deiyonize su/%0.1 formik asit içeren asetonitril, 1/1; h/h) ile çözülerek analiz edildi. Veri kalitesini iyileştirmek ve yazılımın otonom entegrasyon başarısını kontrol etmek için IS olarak karbamazepin seçildi. Her numuneden 10 µL alınarak kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Analizlerden önce ve her altı analizde bir veri temizliği ve parti içi etkileri düzeltmek için QC örnekleri enjekte edildi. QC'lerin %50'sinde tespit edilemeyen "feature" değerleri filtrelendi ve yanlış tepe olarak tanımlandı.

### 3.6. Metabolit Profilleme ve İstatistiksel Analiz

Cihazlardan elde edilen ham veriler MSConvert yazılımı yardımıyla .mzxml formatına dönüştürüldü. Çok miktarda verinin bulunduğu bu veri setinden ilgili sonuçları çıkarmak ve düzenlemek için çeşitli algoritmalar gerekmektedir (Worley ve Powers, 2013). Elde edilen sonuçlar pik düzeltilmesi için XCMS yazılım programına aktarıldı, ardından analizler için unique retention time ve *m/z* değerlerine göre gruplandırılmış

excel sayfası oluşturuldu. Kriterleri karşılayan özellikler ( $p \leq 0.05$ ve *m/z* puanlarından katlama analizi $> 1.5$ ) biyobelirteç metabolit adayı olarak kabul edildi. Seçilen önemli *m/z* puanlarının tanımlanması Human Metabolome Database (HMDb) ve METLIN veritabanı kullanılarak değerlendirildi. Metabolik yol analizi Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-KEGG) yol veritabanı ve MetaboAnalyst 6.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Kümeleme analizini gerçekleştirmek için ham verilerin ön işleme tabi tutulması gerekir. Pik sıralaması, dedeksiyonu, alıkonma zamanı normalizasyonu XCMS çevrimiçi yazılımı tarafından gerçekleştirildi. Elde edilen işlenmiş veriler kemometrik analizler için MATLAB'a aktarıldı. Kalite kontrol örnekleri kullanılarak her bir örneğin kütle spektrum normalizasyonu (QC-SVR) gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak sunuldu ve $p \leq 0.05$ (Welch's Test) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.7. Deney Tasarımı

#### 3.7.1. Türevlendirme Prosedürün Faktörleri ve Deney Tasarımı

Deneysel tasarım, deneysel çalıştırma sayısını azaltmak ve aynı zamanda makul çalıştırmalarla gerçek optimum noktalara ulaşmak için faktörlerin etkileşimini dikkate almak üzere geliştirilmiştir. Türevlendirme faktörlerinin belirlenmesi için tüm deneyler iki kopya halinde yapıldı ve tüm değerlerin ortalaması alındı. Faktörlerin belirlenmesi ve sonuçların analiz edilmesi için Desing-expert 13 yazılımı kullanıldı. Yanıt yüzeyi metodolojisi (CCD), daha az sayıda deney gerektiren sentetik bir yaklaşımla değişkenlerin eşzamanlı optimizasyonu ve etkileşimlerinin tahmin edilmesi için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Her faktör üç seviyeye ayarlandı (Tablo 3.2). Bu üç değişkenin oranlarının bulunması için on yedi adet çalışmayı temel alan bir CCD kullanıldı. Tasarımdan elde edilen veriler, bir model oluşturmak için kullanıldı.

**Tablo 3.2.** Türevlendirme koşullarının belirlenmesi için seçilen faktörler

| Faktörler | Seviyeler | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Birim** | **Düşük** | **Orta** | **Yüksek** |
| X1: $K_2CO_3$ Derişimi | Mmol | 0 | 1 | 2 |
| X2: Sıcaklık | ° C | 20 | 30 | 40 |
| X3: Etanol Miktarı | mL | 5 | 12.5 | 20 |

Üç bağımsız faktöre sahip bir Box-Behnken deney tasarımı, 17 standart çalıştırma kullanılarak gerçekleştirildi. Optimize edilmiş 17 deneme çalışmasının tümü için seçilen bağımsız faktörler Tablo 3.3'te verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Türevlendirme reaksiyonu için 17 bağımsız çalışma parametresi

| | Bağımsız Faktörler | | |
|---|---|---|---|
| **No** | **X1** | **X2** | **X3** |
| **1** | 2 | 30 | 20 |
| **2** | 1 | 20 | 5 |
| **3** | 0 | 20 | 12.5 |
| **4** | 0 | 30 | 20 |
| **5** | 1 | 40 | 5 |
| **6** | 1 | 30 | 12.5 |
| **7** | 2 | 30 | 5 |
| **8** | 0 | 30 | 5 |
| **9** | 1 | 30 | 12.5 |
| **10** | 0 | 40 | 12.5 |
| **11** | 1 | 20 | 20 |
| **12** | 1 | 30 | 12.5 |
| **13** | 2 | 40 | 12.5 |
| **14** | 1 | 40 | 20 |
| **15** | 2 | 20 | 12.5 |
| **16** | 1 | 30 | 12.5 |
| **17** | 1 | 30 | 12.5 |

### 3.7.2. HPLC Mobil Faz Deney Tasarımı

Kromatografik koşulların belirlenmesi için merkezi bileşik tasarımı (CCD) kullanılarak optimize edildi. Tüm deneyler üç kopya halinde yapıldı ve tüm değerlerin ortalaması alındı. Sonuçların belirlenen faktörlere göre analiz edilmesi için Design-

Expert 13 yazılımı kullanıldı. Her değişken sayısal faktör 3 seviyeye ayarlandı (Tablo 3.4). Bu üç değişkenin oranlarını bulmak için 17 çalışmaya dayanan merkezi bileşik tasarım kullanıldı. Tasarımdan elde edilen veriler, tahmin edilen bir model oluşturmak için kullanıldı.

**Tablo 3.4.** Kromatografik koşulların belirlenmesi için seçilen faktörler

| Faktörler | Seviyeler | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Birim** | **Düşük** | **Orta** | **Yüksek** |
| Y1: Metanol Oranı | % | 60 | 67 | 75.5 |
| Y2: Dalga Boyu | nm | 260 | 275 | 290 |
| Y3: Sıcaklık | ° C | 20 | 30 | 40 |

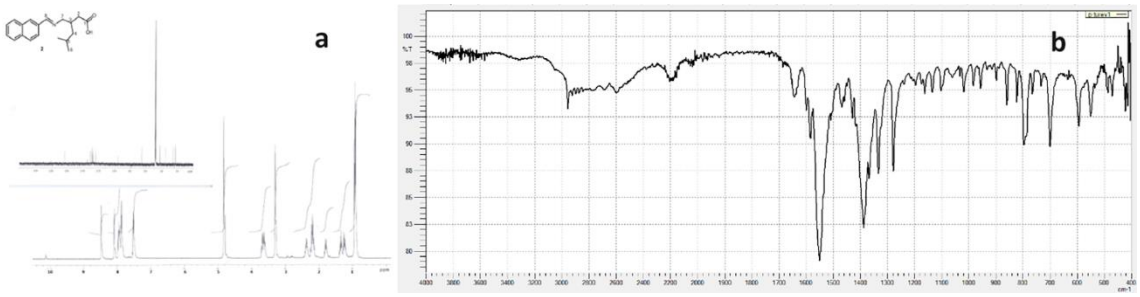
Üç bağımsız faktöre sahip bir Box-Behnken deney tasarımı, 17 standart çalıştırma kullanılarak gerçekleştirildi. Optimize edilmiş 17 deneme çalışmasının tümü için seçilen bağımsız değişkenler Tablo 3.5'te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Mobil faz seçimi için 17 bağımsız çalışma parametresi

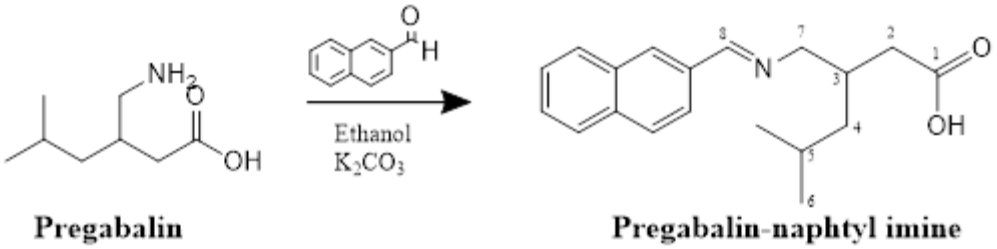
| | Bağımsız Değişkenler | | |
|---|---|---|---|
| **No** | **Y1** | **Y2** | **Y3** |
| **1** | 60 | 290 | 30 |
| **2** | 67.5 | 290 | 40 |
| **3** | 60 | 260 | 30 |
| **4** | 67.5 | 275 | 30 |
| **5** | 67.5 | 260 | 20 |
| **6** | 67.5 | 275 | 30 |
| **7** | 60 | 275 | 40 |
| **8** | 67.5 | 275 | 30 |
| **9** | 75 | 290 | 30 |
| **10** | 75 | 275 | 20 |
| **11** | 67.5 | 275 | 30 |
| **12** | 75 | 260 | 30 |
| **13** | 60 | 275 | 20 |
| **14** | 67.5 | 260 | 40 |
| **15** | 67.5 | 275 | 30 |
| **16** | 67.5 | 290 | 20 |
| **17** | 75 | 275 | 40 |

### 3.8.Türevlendirme Prosedürü

İlk olarak, 0.16 g katı pregabalin (1.0 mmol) 20 mL etanol içerisinde çözüldü ve bu çözelti üzerine 0.14 g $K_2CO_3$ (1.0 mmol) eklendi ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 5 dakika karıştırıldı. Bu karışıma 0.31 g 2-naftaldehit (2.0 mmol) 10 dakika boyunca yavaşça ilave edildi ve ardından reaksiyon karışımı aynı sıcaklıkta 2 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon takibi İTK ile yapıldı. Reaksiyon sonunda karışım 20 mL buzlu suya damla damla ilave edildi. Bu ekleme sırasında kristal çökelmesi gözlenmedi. Buzlu sudaki reaksiyon karışımı 30+30 mL kloroform ile iki kez ekstrakte edildi ve ardından organik faz evaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 15 mL kloroform içinde çözüldü ve ürünü kristalleştirmek için 3 mL hekzan eklendi. Krem renkli kristaller filtrasyon ile ayrıldı. Pregabalin-naftilimin yapısı $^{1}H$ ve $^{13}C$ NMR ile aydınlatıldı (Şekil 3.1a). Pregabalin-naftaliminin IUPAC isimlendirmesi 5-metil-3((((naftalin-2-ilmetilen)amino)metil)hekzanoik asittir. Ek olarak, IR ve UV-Gör. Pregabalin-naftalimin kristallerinin spektrumları alındı ve saflığın %90.4 olduğu belirlendi (Şekil 3.1b). Reaksiyon şeması Şekil 3.2'de gösterilmiştir.




**Şekil 3.1. a)** 400 MHz $^{1}H$-NMR spektrumu ve $D_2O$ çözücüsünde pregabalin-naftil iminin 100 MHz $^{13}C$-NMR spektrumu; **b)** Pregabalin-naftil iminin IR spektrumu

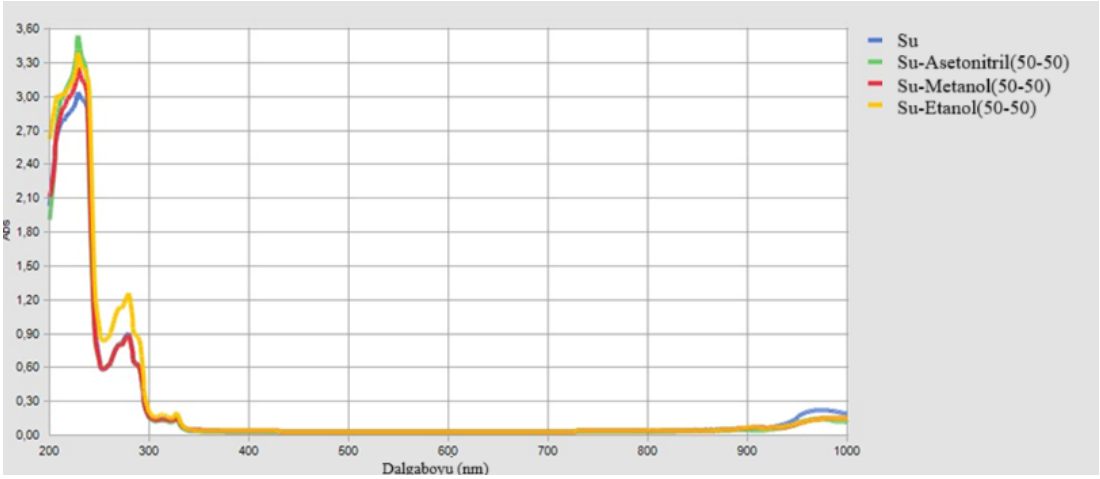



**Şekil 3.2.** Pregabalin ve 2-naftil aldehit arasında gerçekleşen reaksiyonun şeması

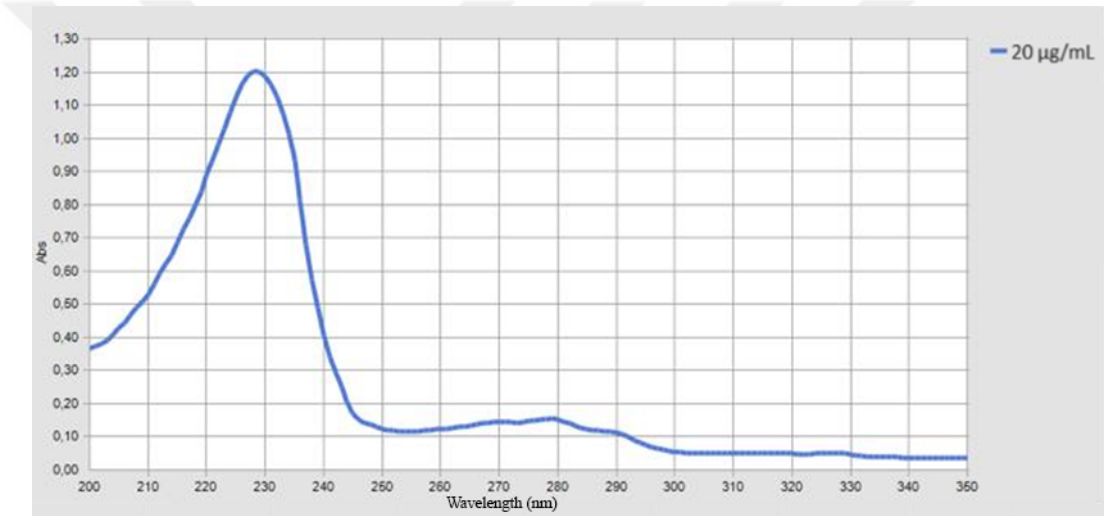
Sentezi yapılan pregabaline ait reaksiyonun kontrol edilmesinde ve reaksiyon sonunda oluĢabilecek safsızlıkların takibi ince tabaka kromotografisi (İTK) ile yapılmıştır. İTK çalışmalarında, adsorban olarak 0.2 mm kalınlığındaki hazır silikajel F-254 (Merck) plakları (20×20 cm) kullanılmıştır. Daha önceden belirlenen zaman aralıklarında alınan numune bir miktar kılcal boru yardımıyla tüpe alınmış ve metanol ile seyreltilmiştir. Ardından bu çözelti adsorban olarak seçilen silikajel 60 F254 kaplı, önceden uygun çözücü karışımları ile doyurulmuş alüminyum plaklara kılcal boru yardımıyla tatbik edilmiş ve hareketli fazlar içerisinde sürüklenmesi sağlanmıştır. Kromatografi tanklarına yaklaşık 5 ml çözücü sisteminden [Kloroform:Metanol (95:5)] konularak çözücü buharıyla doyması sağlanmıştır. Sürükleme işlemi bittikten sonra plaklar açık havada kurutulduktan sonra dalga boyu 254 nm olan UV lambası altında lekeler belirlenmiştir.

### 3.9. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi

Pregabalin-naftil imin türevinin spektrofotometrik analizi için en iyi spektrumu elde etmek amacıyla ilk olarak çözücü seçildi. Pregabalin-naftil imin'in 200-350 nm aralığındaki spektrumları çeşitli çözücü/çözücü karışımları kullanılarak elde edildi (Şekil 3.3). En yüksek absorbans 50/50 (h/h) oranında asetonitril-su karışımında alındı (Şekil 3.4).



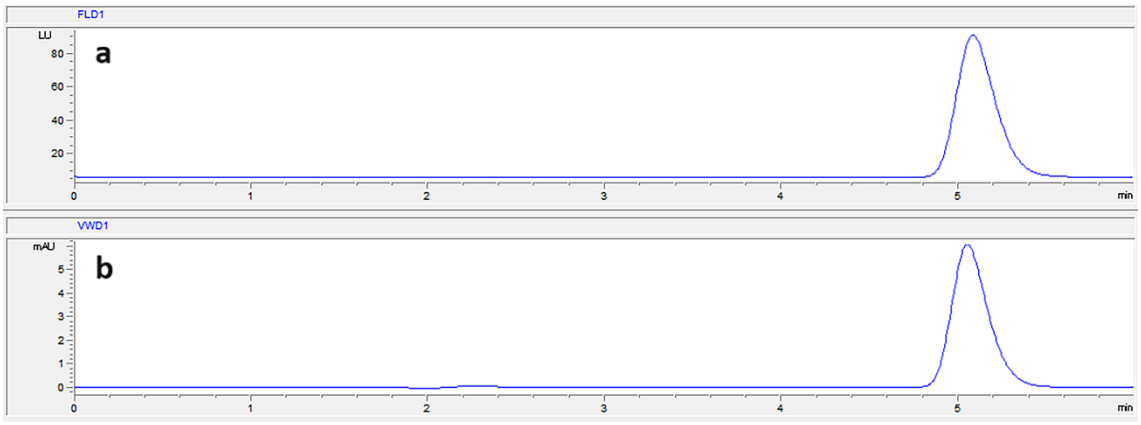

**Şekil 3.3.** Pregabalin-naftaliminin farklı çözücü karışımları içindeki UV-Görünür bölge spektrumu




**Şekil 3.4.** Asetonitril-su (50:50,h/h) ortamında Pregabalin-naftil imin türevinin spektrumu

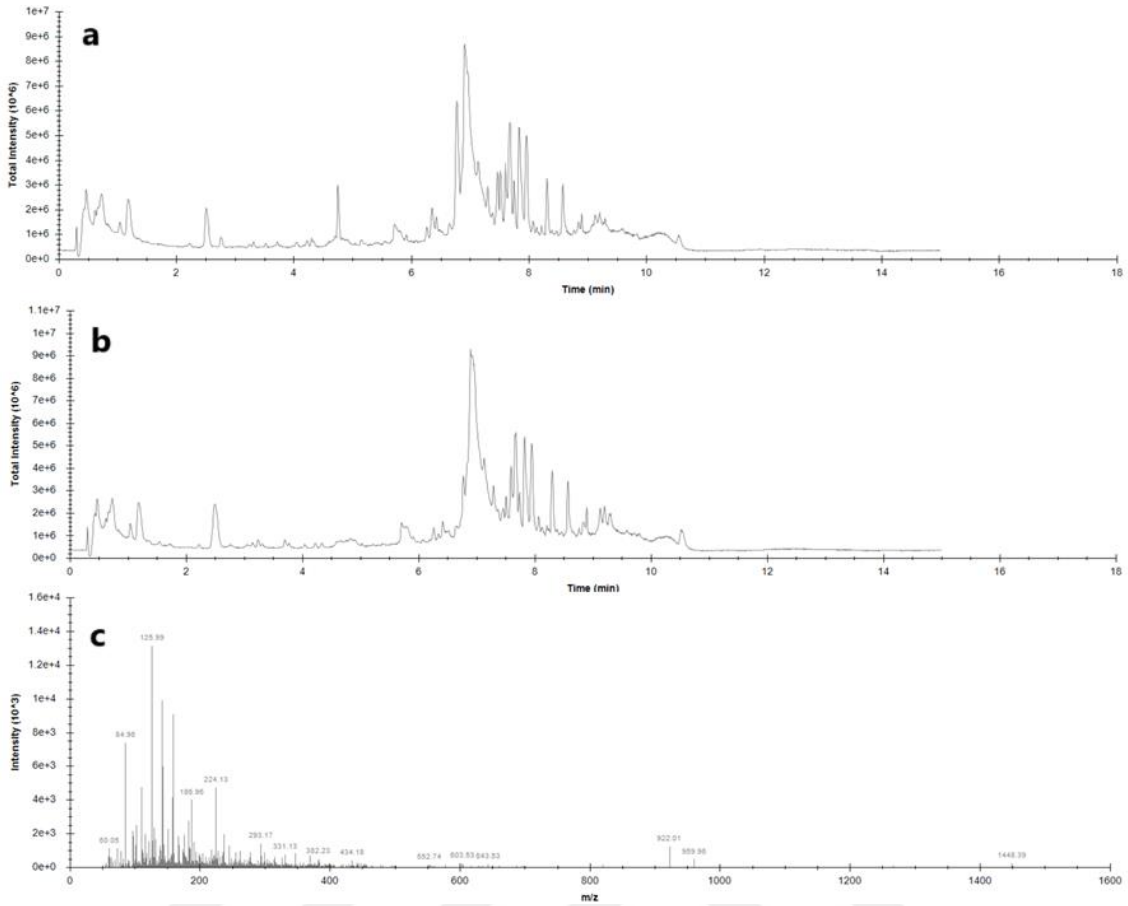
### 3.10. Kromatografik Koşullar

HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemlerinde mobil faz 0.47 µm naylon membran filtreden süzüldü ve ultrasonik olarak gazı giderildi. Numunelerin tayini için asetonitril ve metanol (64/36, h/h) içeren bir mobil faz seçildi. Enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlandı ve yöntem için akış hızı 1 mL/dk olarak belirlendi. Analizin tam çalışma süresi altı dakika olarak seçildi. Ultraviyole dedektör dalga boyu 275 nm olarak ayarlandı. Floresan tespiti 353 nm emisyon dalga boyu ve 221 nm uyarma dalga boyu kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 3.5'de 10 µg/mL standart pregabalin numunesi için elde edilen kromatogram gösterilmektedir.




**Şekil 3.5.** Pregabalin-naftil imin türevinin; a) UV spektrumu spektrumu; b) Floresans spektrumu

Metabolomiks çalışmlarında kullanılan Q-TOF kütle spektrometresi pozitif iyon modunda kullanıldı. Cihazda kullanılan mobil faz sistemi, aşağı yazdığı gibi bir gradyan elüsyonu kullanılarak %0.1'lik formik asit çözeltisi (A) ve asetonitrilden (B) oluşmaktadır. Toplam 12 dakikalık çalışma süresinde gradyan elüsyon için 0.4 mL/dk mobil faz akış hızı şu şekilde kullanılmıştır: 0-0.5 dakika, %2 B; 0.5-4 dakika, %20 B; 4-8 dakika, %50 B; 4-6 dakika, %95 B; 8-9 dakika, %95 B; 9-9.25 dakika, %2 B ve 9.25-12 dakika, kolonun dengelenmesi için %2 B. Toplam çalışma süresi ve akış hızı sırasıyla 15 dakika ve 0.4 mL/dk olarak ayarlandı. Kolon sıcaklığı cihaz tarafından kontrol edildi ve 55°C'ye ayarlandı. Tüm analizler Elektron Sprey İyonizasyon pozitif tarama modunda gerçekleştirildi. Kütle özellikleri 50 ile 1500 *m* / *z* arasında tarandı. Intensite eşiği 200 olarak belirlendi. Kurutma gazı sıcaklığı, 350°C; kurutma gazı akışı, 11 L/dk; nebulizatör, 40 psi; kılıf gazı sıcaklığı, 350°C; kılıf gazı akışı, 11 L/dk, olarak seçildi. Şekil 3.6'da aynı tavşandan alınan ilk son plazma kromatogramları ve kütle spektrumu görülmektedir.




**Şekil 3.6. a)** Pregabalin kullanımından önce tavşan plazmasının kromatogramı; **b)** Pregabalin kullanımı sonrası tavşan plazmasının kromatogramı; **c)** Tavşan plazmasının kütle kromatogramı

### 3.11. Deney Tavşanları

Bu çalışmadaki deneysel prosedürler, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından onaylanmıştır. (Belge sayı No. E-75296309-050.01.04-2200103658).

Tüm tavşanlar çelik (60x40x40 cm) kafeslerde barındırıldı. Tavşanlar standart çiftlik koşullarında yetiştirildi. Tavşanların sıcaklık ve aydınlatma koşulları 24±1°C ve 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde korundu. Tüm tavşanların yem ve suya sınırsız ulaşımı bulunmaktaydı. Yapılan tüm uygulamalar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Kılavuzu'na uygundur.

New Zealand cinsi deney tavşanlarına (3-5 kg ortalama ağırlık 3.7 kg) kilograa göre eşit oranda pregabalin verilen deneysel bir çalışma gerçekleştirildi. Tavşanlar 8

aylıktı ve deneylere başlamadan önce 5 gün boyunca iklime alıştırıldılar. Pregabalin tavşanlara oral olarak 60 mg/kg olarak verildi. Kan örnekleri ilaç verilmeden önce ve 30 gün ilaç verildikten sonra alındı. Tavşanların bilgileri Tablo 3.6'da verildi. Alınan plazma örnekleri analize kadar -80 °C'de saklandı.

**Tablo 3.6.** Tavşan ilaç dozaj tablosu

| Tavşan No | Cinsiyet | Ağırlık (kg) | Verilen ilaç miktarı (mg) |
|---|---|---|---|
| 13 | E | 4 | 240 |
| 33 | E | 3.5 | 210 |
| 39 | E | 3.9 | 234 |
| 41 | E | 3 | 180 |
| 42 | E | 3.3 | 198 |
| 45 | E | 3.5 | 210 |
| 46 | E | 3 | 180 |
| 57 | E | 3.2 | 192 |
| 28 | E | 5 | 300 |
| 41 | E | 4 | 240 |
| 43 | E | 3.1 | 186 |
| 46 | E | 4.5 | 270 |
| 47 | E | 4.8 | 288 |
| 54 | E | 3.5 | 210 |
| 68 | E | 3 | 180 |
| 69 | E | 3.8 | 228 |

### 3.12. Validasyon Parametreleri

Pregabalin-naftil iminin bulk ve farmasötik formülasyonlarda analizi için geliştirilen spektrofotometre yöntemi ICH'ye göre (Guideline, 2005) doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme limiti, miktar tayin sınırı ve stabilite parametreleri çalışılarak valide edildi.

#### 3.12.1. Doğrusallık

Analitin farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiler en düşükten en yükseğe eşit aralıkta dağıtıldıktan sonra ölçümler gerçekleştirilir. Her bir

derişime karşılık gelen sinyaller kaydedilerek kalibrasyon grafiği çizilir ve determinasyon katsayısı değerlendirilir. Determinasyon katsayısının 0.99'dan büyük olduğu değerlerde yöntemin doğrusallık aralığı belirlenir.

### 3.12.2. Doğruluk

Doğruluk geliştirilen yöntemin tahmin ettiği değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunun belirlenmesinde kullanılır. Mutlak hata veya bağıl hata ile verilir.

### 3.12.3. Kesinlik

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrar edilen ölçümlerinin birbirine ne kadar yakın olduğunu, yani yöntemle yapılan tekrar ölçümlerdeki tutarlılığı ifade eder. Kesinlik, aynı numune üzerinde yapılan çoklu ölçümlerde elde edilen sonuçlar arasındaki yayılımın derecesiyle belirlenir. Yani ölçümlerin birbirine ne kadar tutarlı bir şekilde yakın olduğunu gösterir. Kesinlik, genellikle standart sapma, bağıl standart sapma veya varyans gibi istatistiksel ölçümlerle değerlendirilir ve sonuçların ne kadar dar bir aralıkta toplandığını gösterir.

### 3.12.4. Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection)

Gözlenebilme sınırı (LOD), bir analitik yöntemle veya cihazla güvenilir bir şekilde tespit edilebilecek en düşük analit miktarını veya derişimini ifade eder. Bu sınır, analitin varlığının belirlenebileceği ancak miktarının henüz güvenilir şekilde ölçülemediği en düşük seviyedir. Tespit limitini belirlerken, genellikle sinyalin, gürültünün üç katı büyüklüğünde olduğu seviye dikkate alınır.

### 3.12.5. Miktar Tayin Sınırı (Limit of Quantification)

Bir analitik yöntemle belirli bir analitin güvenilir bir şekilde ölçülebileceği en düşük derişimini ifade eder. Miktar tayin sınırı **(**LOQ), analitin varlığını yalnızca tespit etmekle kalmaz, aynı zamanda bu varlığın miktarını doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde belirleme kapasitesini de gösterir. LOQ, genellikle sinyal-gürültü oranının 10:1 olduğu

seviyede tanımlanır. Yani, ölçülen sinyalin, arka plandaki gürültüden en az on kat daha yüksek olması gerekir.

### 3.12.6. Stabilite

Analitik yöntemin veya numunenin zamanla, depolama koşullarında ve analiz süreçleri sırasında nasıl korunduğunu ve geçerliliğini sürdürdüğünü belirten bir parametredir. Stabilite, analitlerin veya çözeltilerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, belirli koşullar altında değişim göstermeden ne kadar süre boyunca geçerli kalabileceğini ifade eder. Stabilite, analitik sonuçların güvenilirliğini sağlamak için kritik bir parametredir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. UV-Vis Spektrofotometri Bulguları

### 4.1.1. Merkezi Bileşik Tasarımı Sonuçları

Üç değişkenin rolünü değerlendirmek için merkezi bir kompozit tasarım uygulanmıştır. Yapılan ön deneyler sonucunda, deney tasarımında Tablo 4.1'deki değer aralıkları kullanılmış ve elde edilen yüzde verim hesaplanmıştır.

**Tablo 4.1.** Üç parametreli merkezi kompozit tasarımı ve verim sonuçları

| No | X1 | X2 | X3 | Verim (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 30 | 20 | 77 |
| 2 | 1 | 20 | 5 | 84 |
| 3 | 0 | 20 | 12.5 | 69 |
| 4 | 0 | 30 | 20 | 66 |
| 5 | 1 | 40 | 5 | 66 |
| 6 | 1 | 30 | 12.5 | 91 |
| 7 | 2 | 30 | 5 | 74 |
| 8 | 0 | 30 | 5 | 64 |
| 9 | 1 | 30 | 12.5 | 92 |
| 10 | 0 | 40 | 12.5 | 53 |
| 11 | 1 | 20 | 20 | 87 |
| 12 | 1 | 30 | 12.5 | 92 |
| 13 | 2 | 40 | 12.5 | 61 |
| 14 | 1 | 40 | 20 | 68 |
| 15 | 2 | 20 | 12.5 | 78 |
| 16 | 1 | 30 | 12.5 | 91 |
| 17 | 1 | 30 | 12.5 | 92 |

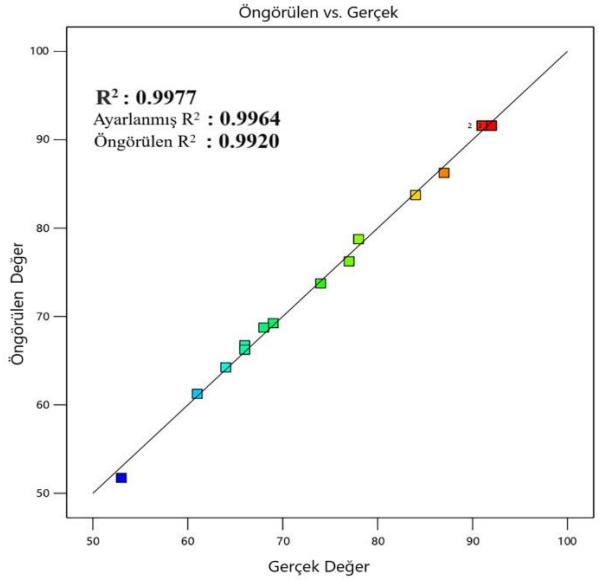
Deneysel veriler ikinci dereceden bir polinom denklemine oturtuldu ve regresyon katsayıları elde edildi. Geliştirilen regresyon modelinin önemini ve yeterliliğini doğrulamak için varyans analizi (ANOVA) yapıldı (Tablo 4.2). Çok değişkenli regresyon analizi kullanılarak, aşağıdaki denklemle verilen ortalama yanıt için uygun model elde edildi:

$$\mathbf{Y=}\ +91.60++4.75A-8.75B+1.25C-0.2500AB+0.2500AC-0.2500BC-16.17\ A^2-10.17\ B^2-5.18\ C^2$$

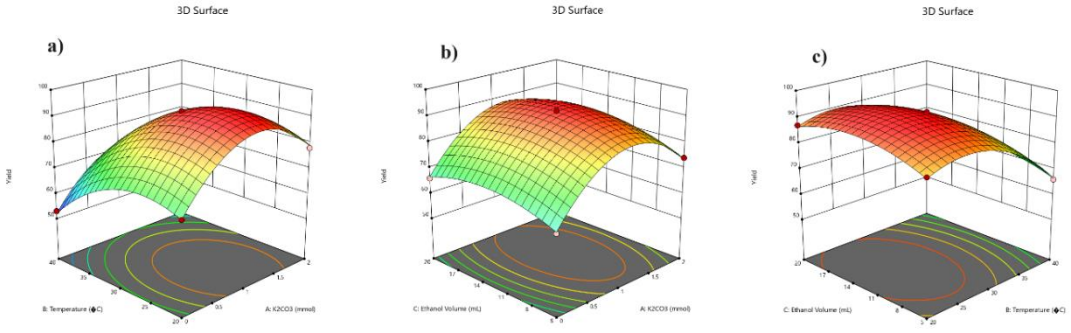
**Tablo 4.2.** Yanıt yüzeyi tasarımının ANOVA analizi sonuçları

| Source | Sum of squares | df | Mean square | f değeri | p değeri | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Model** | 2607.86 | 9 | 289.76 | 390.06 | < 0.0001 | significant |
| **A-$K_2CO_3$ concentration** | 180.50 | 1 | 180.50 | 242.98 | < 0.0001 | |
| **B-Temperature** | 612.50 | 1 | 612.50 | 824.52 | < 0.0001 | |
| **C-Ethanol Volume** | 12.50 | 1 | 12.50 | 16.83 | 0.0046 | |
| **AB** | 0.2500 | 1 | 0.2500 | 0.3365 | 0.5800 | |
| **AC** | 0.2500 | 1 | 0.2500 | 0.3365 | 0.5800 | |
| **BC** | 0.2500 | 1 | 0.2500 | 0.3365 | 0.5800 | |
| **$A^2$** | 1101.60 | 1 | 1101.60 | 1482.93 | < 0.0001 | |
| **$B^2$** | 435.92 | 1 | 435.92 | 586.81 | < 0.0001 | |
| **$C^2$** | 112.76 | 1 | 112.76 | 151.79 | < 0.0001 | |
| **Residual** | 5.20 | 7 | 0.7429 | | | |
| **Lack of Fit** | 4.00 | 3 | 1.33 | 4.44 | 0.0918 | not significant |
| **Pure Error** | 1.20 | 4 | 0.3000 | | | |
| **Cor Total** | 2613.06 | 16 | | | | |

Deneysel tasarım sonucunda elde edlen verilerin ANOVA analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre model anlamlıdır ve uyum eksikliği istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, bu durum modelimizin yüksek verimlilik, uygulanabilirlik ve uygunluk olarak kabul edilir olduğunun göstergesidir. $R^2$ değeri çok yüksektir ayrıca gerçek ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon olduğunu gösterir. Tahmin edilen $R^2$ değerinin 0.9920 olması modelin iyi düzeyde tatmin edildiğini doğrulamaktadır (Şekil 4.1). CCD'nin 3 boyutlu model grafikleri alındı (Şekil 4.2). Yapılan CCD sonuçlarına göre verimin en yüksek olduğu deney şartları X1: 1 mmol, X2: 26 °C ve X3: 10 mL olarak bulundu. Yapılan deney tasarımı sonucunda 2-naftaldehit türevlendirme prosedürünü oluşturuldu.




**Şekil 4.1.** Türevlendirme reaksiyonu sonuçların regresyon analizi grafiği




**Şekil 4.2.** Merkezi kompozit tasarım için üç boyutlu yanıt yüzeyleri: **a)** $K_2CO_3$ derişimi (mmol)-Sıcaklık (° C); **b)** $K_2CO_3$ derişimi (mmol)-Etanol hacmi (mL); **c)** Sıcaklık(° C)-Etanol hacmi (mL)

UV-Spektroskopi ve birinci türevinin çalışma parametreleri Tablo 4.3'te verildi.

**Tablo 4.3.** UV-Gör. Bölge Spektrofotometre ve birinci türevinin yöntem şartları

| **Parametreler** | **UV-Gör. Bölge Spektrofotometri** | **Birinci Türev Spektrofotometri** |
|---|---|---|
| **Etken Madde** | Pregabalin | Pregabalin |
| **Start Lamba (nm)** | 200 | 200 |
| **Stop Lamba (nm)** | 350 | 350 |
| **Data modu** | Absorbans | Absorbans |
| **Bant Genişliği (nm)** | 1.0 | 1.0 |
| **Tarama Hızı** | Hızlı | Hızlı |
| **Mikroplaka Sıcaklığı (°C)** | 30 | 30 |
| **Dalga boyu (nm)** | 228 | 236.5 |

### 4.1.2. Validasyon Parametreleri

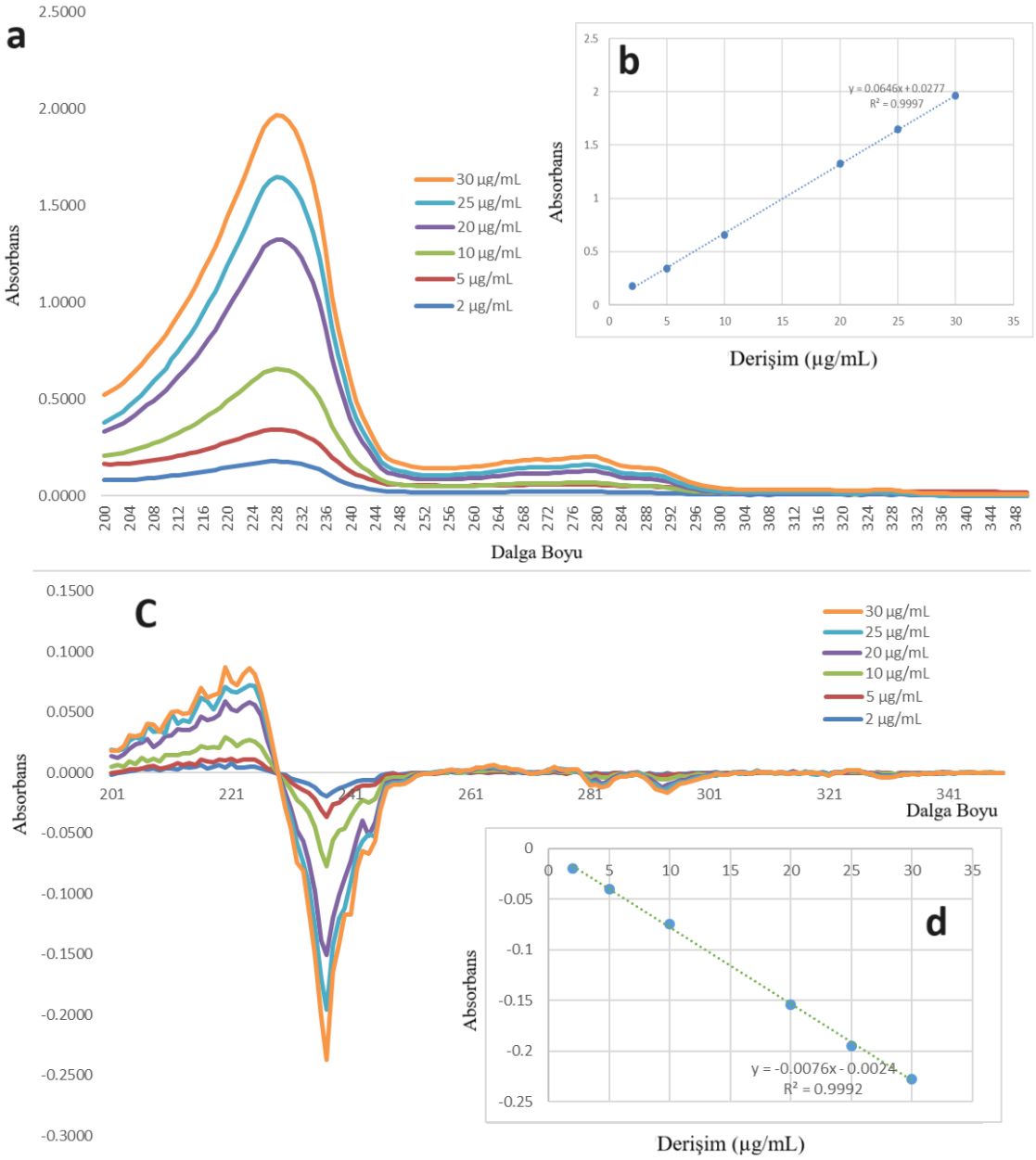
#### 4.1.2.1. Doğrusallık

Pregabalin-naftil imin kompleksi için 2, 5, 10, 20, 25, and 30 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrumları alındı, 228 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Pregabalin-naftil imin derişimine karşı absorbans değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetildi. Ardından birinci türevleri alınarak 236.5 nm dalga boyunda absorbansları alınarak derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri üretildi (Şekil 4.3). Kalibrasyon eğrisinin istatistiksel değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Analitik yöntemlerin parametreleri

| Yöntem | Derişim (µg/mL) | $\lambda_{max}$ (nm) | Denklem | $S_a$ | $S_b$ | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| UV-Gör. Bölge Spektrofotometri | 2.0-30.0 | 228 | A = 0.0646x + 0.0277 | 0.0001 | 0.0647 | 0.9998 |
| Birinci Türev Spektroforometri | 2.0-50.0 | 236.5 | A = -0.0081x + 0.0029 | 0.0001 | 0.0005 | 0.9990 |

A: absorbans, Sa: kesişimin standart sapması, Sb: eğimin standart sapması




**Şekil 4.3. a)** UV-Spektrofotometri için standart çözeltilerin spektrumu; **b)** Spektrofotometri için kalibrasyon eğrisi; **c)** Birinci türev spektroskopisi için standart çözeltilerin spektrumu; **d)** Birinci türev spektroskopisi için kalibrasyon eğrisi

#### 4.1.2.2. Gözlenebilme ve Miktar tayin sınırı (LOD ve LOQ)

Her iki yönteminde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.5 µg/mL ve 2.0 µg/mL olarak tespit edildi.

#### 4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Önerilen yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün içi ve günler arası üç farklı kalite kontrol çözeltileri ile çalışıldı. Doğruluk yüzde bağıl hata ile kesinlik yüzde bağıl standart sapma ile Tablo 4.5'de verildi.

**Tablo 4.5.** Yöntemin doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

| | | Gün içi | | | Günler arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Yöntem** | **Derişim (µg/mL)** | **Bulunan ±SS** | **Doğruluk (%BH)** | **Kesinlik (%BSS)** | **Bulunan ±SS** | **Doğruluk (%BH)** | **Kesinlik (%BSS)** |
| UV-Gör. Bölge | 3.5 | 3.47 ± 0.06 | -0.55 | 0.17 | 3.47 ± 0.02 | -0.90 | 0.05 |
| | 15 | 15.31 ± 0.21 | 1.22 | 1.37 | 15.41 ± 0.17 | 1.47 | 1.09 |
| | 28 | 28.07 ± 0.06 | 0.32 | 0.18 | 28.14 ± 0.06 | 0.30 | 0.19 |
| Birinci Türev | 3.5 | 3.53 ± 0.03 | 0.93 | 0.80 | 3.52 ± 0.05 | 0.52 | 1.34 |
| | 20 | 20.26 ± 0.19 | 1.32 | 0.93 | 20.26 ± 0.09 | 1.31 | 0.45 |
| | 45 | 45.58 ± 0.14 | 1.30 | 0.30 | 45.47 ± 0.19 | 1.05 | 0.42 |

SS: altı tekrarlı tayinin standart sapması; %BH: Bağıl hata: (bulunan/eklenen)/eklenen×100; %BSS: bağıl standart sapma

#### 4.1.2.4. Stabilite

Stok çözelti iki kısma ayrıldı. Birinci kısım şeffaf (ışığı geçiren) ve ikinci kısmı da amber renkli (ışığı geçirmeyen) balon jojeler içerisine konuldu. Çözeltiler laboratuvar ortamında (27.0 ± 4.0 °C) ışık gören ortamda ve buzdolabında (+4.0± 2.0 °C) 30 gün boyunca bekletildi. Bekletme sonucunda yapılan analiz sonuçları λmax civarındaki dalga boyu aralığı için gerçekleştirilen varyans analizi (ANOVA, p = 0.05) yapıldı ve çözeltilerin hem laboratuvar ortamında hem de Buzdolabında 14 gün boyunca stabil kaldığı tespit edildi.

### 4.1.3. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Farmasötik formülasyonlardaki aktif maddelerin geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yöntemin yüzde analitik geri kazanım değerleri, eklenen standart çalışma çözeltilerinin derişiminin (5.5, 17 ve 30 µg/mL) toplam derişim

değerlerinden (2+3.5, 2+15, 2+28) çıkarılması ve tablet çözeltisinin derişimine (2 µg/mL) oranının 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** Farmasötik formülasyondaki pregabalinin analitik geri kazanım değerleri (n=3)

| Yöntem | Tablet (µg/mL) | Eklenen (µg/mL) | Geri kazanım | BSS% |
|---|---|---|---|---|
| UV-Görünür Bölge Spektrofotometri | 2 | 3.5 | 100.68 ± 0.78 | 0.77 |
| | 2 | 15 | 99.08 ± 0.93 | 0.92 |
| | 2 | 28 | 99.15 ± 0.56 | 0.57 |
| Birinci türev Spektrofotometri | 2 | 3.5 | 101.56 ± 0.17 | 0.17 |
| | 2 | 15 | 99.73 ± 0.24 | 0.23 |
| | 2 | 28 | 99.57 ± 0.22 | 0.22 |

## 4.2. HPLC-UV ve HPLC-FLD Bulguları

### 4.2.1. Yöntem Optimizasyonu Sonuçları

Kromatografik olarak en uygun değerlerin bulunması için üç değişkenli CCD yapıldı. Yapılan ön deneyler sonucunda, deney tasarımında Tablo 4.1.'deki değer aralıkları kullanılmış ve elde edilen pregabalin pik alanı İS pik alanına bölünerek yanıt hesaplanmıştır. Deney, elde edilen koşullar altında üç kez gerçekleştirilmiş olup bu üç yanıtın ortalaması alındı. Üç değişkenli deney tasarımından elde edilen sonuçlar toblo 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Üç parametreli merkezi kompozit tasarımı ve pik alanı sonuçları

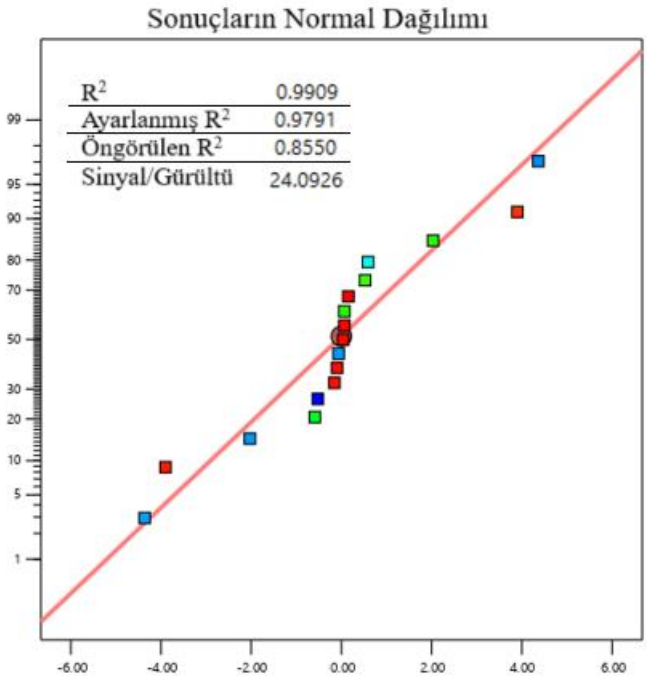
| No | X1 | X2 | X3 | Pik Alanı/İS alanı |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 60 | 260 | 30 | 764.7 |
| 2 | 75 | 260 | 30 | 681.3 |
| 3 | 60 | 290 | 30 | 1021.7 |
| 4 | 75 | 290 | 30 | 777.4 |
| 5 | 60 | 275 | 20 | 1275.2 |
| 6 | 75 | 275 | 20 | 842.4 |
| 7 | 60 | 275 | 40 | 964.2 |
| 8 | 75 | 275 | 40 | 1261.9 |
| 9 | 67.5 | 260 | 20 | 774.7 |
| 10 | 67.5 | 290 | 20 | 1008.9 |
| 11 | 67.5 | 260 | 40 | 772.9 |
| 12 | 67.5 | 290 | 40 | 1010 |
| 13 | 67.5 | 275 | 30 | 1281.3 |
| 14 | 67.5 | 275 | 30 | 1287.6 |
| 15 | 67.5 | 275 | 30 | 1283.3 |
| 16 | 67.5 | 275 | 30 | 1288.4 |
| 17 | 67.5 | 275 | 30 | 1291.4 |

Deneysel veriler ikinci dereceden bir polinom denklemine oturtuldu ve regresyon katsayıları elde edildi. Geliştirilen regresyon modelinin önemini ve yeterliliğini doğrulamak için varyans analizi (ANOVA) yapıldı (Tablo 4.8).

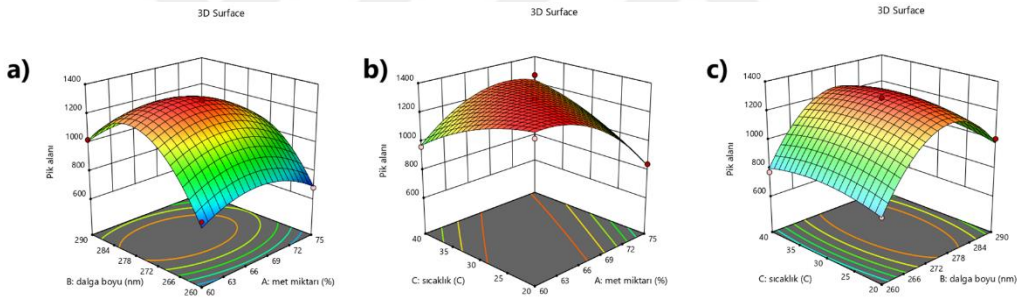
**Tablo 4.8.** HPLC için geliştirilen merkezi kompozit tasarım ANOVA analizi sonuçları

| Source | Sum of squares | df | Mean square | f değeri | p değeri | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Model** | 8.619E+05 | 9 | 95764.30 | 84.43 | < 0.0001 | significant |
| **X1- Metanol miktarı** | 26772.98 | 1 | 26772.98 | 23.60 | 0.0018 | |
| **X2- Dalga boyu** | 84954.42 | 1 | 84954.42 | 74.90 | < 0.0001 | |
| **X3- Sıcaklık** | 1452.60 | 1 | 1452.60 | 1.28 | 0.2951 | |
| **AB** | 6472.20 | 1 | 6472.20 | 5.71 | 0.0483 | |
| **AC** | 1.334E+05 | 1 | 1.334E+05 | 117.62 | < 0.0001 | |
| **BC** | 2.10 | 1 | 2.10 | 0.0019 | 0.9669 | |
| **$A^2$** | 83013.35 | 1 | 83013.35 | 73.19 | < 0.0001 | |
| **$B^2$** | 4.717E+05 | 1 | 4.717E+05 | 415.88 | < 0.0001 | |
| **$C^2$** | 15189.49 | 1 | 15189.49 | 13.39 | 0.0081 | |
| **Residual** | 7939.89 | 7 | 1134.27 | | | |
| **Lack of Fit** | 7873.83 | 3 | 2624.61 | 158.92 | 0.0001 | not significant |
| **Pure Error** | 66.06 | 4 | 16.52 | | | |
| **Cor Total** | 8.698E+05 | 16 | | | | |

Deneylerden elde edilen modelimizin F değeri 84.43'tür. Düzeltilmiş $R^2$ değeri ile öngörülen $R^2$ değerleri uyumluydu ve bu da modelimizin tutarlı olduğunu göstermektedir. Ek olarak, sinyal-gürültü oranı (Adeq Precision) 24.093 olarak bulundu. Elde edilen veriler tahmin edilen değerlerden önemli ölçüde sapmamıştır, bu da modelin doğru tahmin için gerekli parametreleri karşıladığını göstermektedir (Şekil 4.4). Şekil 4.5'te modelden alınan yanıtların üç boyutlu yüzey grafikleri gösterilmektedir.




**Şekil 4.4.** Mobil faz sonuçların regresyon analizi grafiği



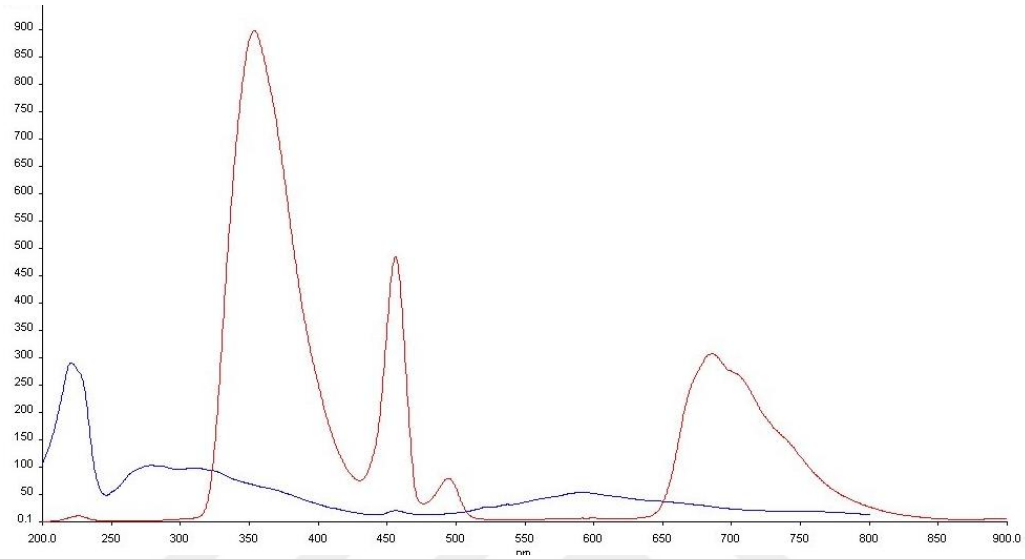

**Şekil 4.5.** Merkezi kompozit tasarım için tepki yüzeyleri: **a)** Metanol miktarı (%)-Dalga Boyu (nm); **b)** Metanol miktarı (%)-Sıcaklık (C°); **c)** Dalga Boyu (nm)-Sıcaklık (C°)

Çok değişkenli regresyon analizi kullanılarak, aşağıdaki denklemle verilen ortalama yanıt için uygun modelin denklemi elde edilmiştir:

$$Y= 1296.40 -57.85*A +103.05*B +13.48*C -40.23*AB +182.63*AC +0.7250*BC - 140.41*A^2 -334.71*B^2 -60.06*C^2$$

Yapılan merkezi bileşik tasarımı sonuçlarına göre pik alanının maksimum olduğu oranlardan biri 275 nm, metanol oranı %64 ve sıcaklık 30 C° derece olarak deney prosedürü belirlendi. Belirlenen parametreler kullanılarak yapılan analiz sonucunda hedeflenen değere %99.4 oranında yakın olan 1287 pik alanını ortaya çıkarmıştır.

HPLC-FLD yönteminde gerekli olan eksitasyon ve emisyon piklerinin belirlenmesi için floresans ölçümler yapıldı (Şekil 4.6). Yapılan bu ölçümlerin ardından HPLC cihazında belirlenen dalga boylarına yakın değerlerde yeni ölçümler yapılarak en yüksek pik alanının olduğu eksitasyon ve emisyon dalga boyları belirlendi.




**Şekil 4.6.** Pregabalin-naftil imin türevinin floresans spektrumu

HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemlerinin parametreleri Tablo 4.9' da gösterildi.

**Tablo 4.9.** HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntem şartları

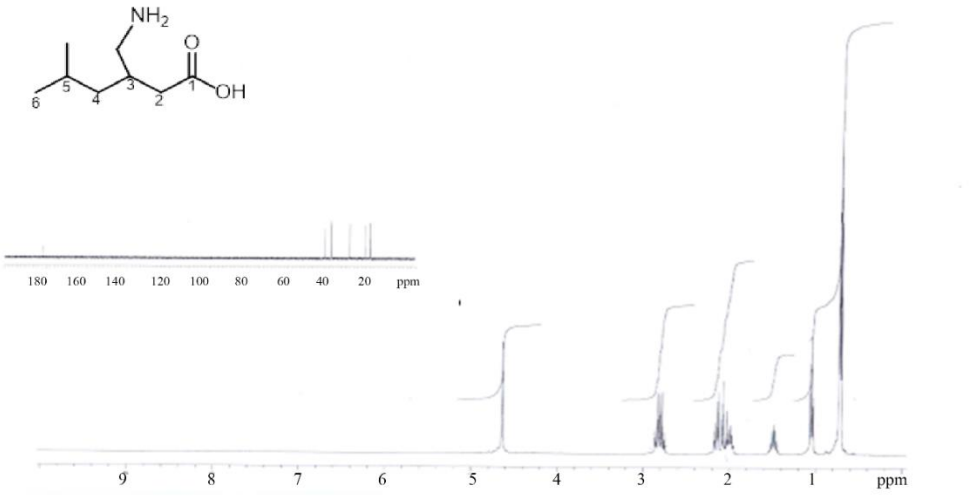
| **Yöntem şartları** | **Yöntemler** | | |
|---|---|---|---|
| | **HPLC-UV** | **HPLC-FLD** | |
| **Kolon** | C18 (250x4.6mm,5µm) | C18 (250x4.6mm,5µm) | |
| **Akış Hızı (mL/dk)** | 1.0 | 1.0 | |
| **Kolon Sıcaklığı (oC)** | 30 | 30 | |
| **Dalga Boyu (nm)** | 275 | 221 (Eksitasyon) | 353 (Emisyon) |
| **Hareketli Faz** | Metanol-Asetonitril (64:36, h/h) | Metanol-Asetonitril (64:36, h/h) | |
| **Enjeksiyon Hacmi (µL)** | 10 | 10 | |

### 4.2.2. NMR Yorumlamaları

*3-(aminometil)-5-metilheksanoik asit (Pregabalin):* Pregabalin'in NMR spektrumu, Pregabalin'in $D_2O$ çözücüsünde çözülmesi ile elde edilmiştir. AB sistemi

rezonans oluşumu 3 numaralı karbona bağlanan -$CH_2NH_2$ grubunun -$CH_2$ protonlarında 2.80 ppm'de gerçekleşmiştir. AB sisteminin A kısmında 2.84 ppm'de dubletin dubleti olarak bir rezonans tespit edilirken, AB sisteminin B kısmında 2.77 ppm'de dubletin dubleti olarak başka bir rezonans gözlenmiştir. Pregabalin'deki 2 numaralı karbonların protonları 2.10 ppm'de AB sistemi olarak aşağıdaki koşullarda bir rezonans yapısı oluşturmuştur: AB sisteminin A kısmı 2.14 ppm'de dubletin dubleti olarak, AB sisteminin B kısmı 2.05 ppm'de dubletin dubleti olarak (devamı yok). AB sisteminin 3 numaralı karbonundaki protonlardan biri 1.98 ppm'de multiplet rezonans yapısı oluşturmuş ve 5 numaralı karbonundaki proton 1.48'de multiplet rezonans sergilemiştir. Ayrıca, 4 numaralı karbonda 1.05 ppm'de triplet rezonans gözlenmiş ve metil gruplarının protonları 0.76 ppm'de dublet rezonans göstermiştir.

Asit grubunun karbonu, 2 numaralı karbon ve 3 numaraya bağlanan -$CH_2NH_2$ karbonu sırasıyla 181.4, 40.9 ve 43.8 ppm'de rezonans göstermiştir. Diğer karbonların rezonans yapısı Pregabalin için sırasıyla 31.9, 24.5, 22.2, 21.7 ppm olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).

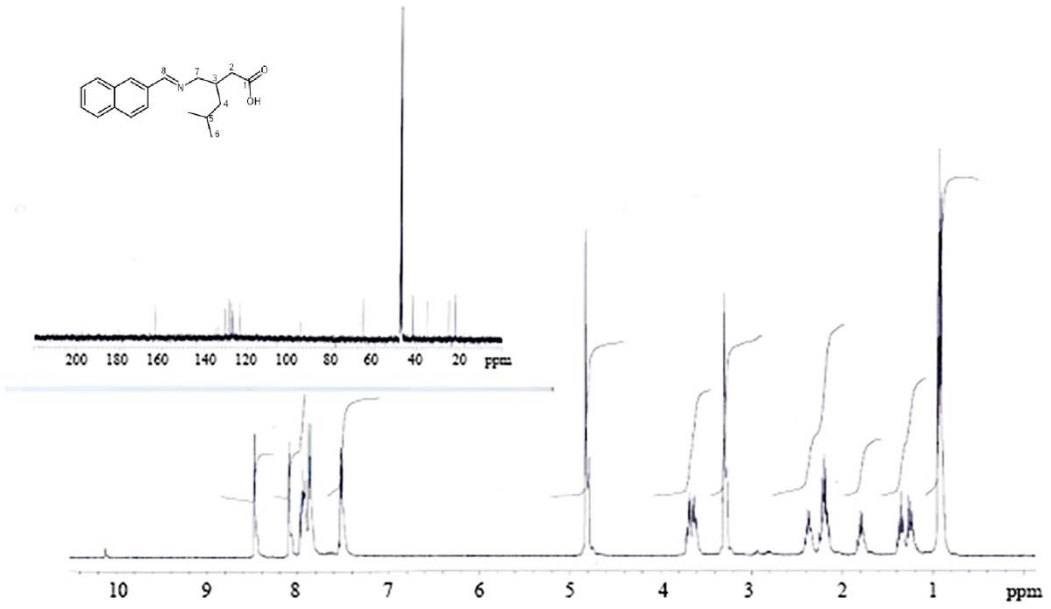



**Şekil 4.7.** Pregabalin'in $D_2O$ çözücüsünde 400 MHz $^1$H-NMR spektrumu ve 100 MHz $^{13}$C-NMR spektrumu

*5-metil-3-(((naftalen-2-ilmetilen)amino)metil)heksanoik asit:* Pregabalin-naftil iminin NMR spektrumu, bu bileşiğin $D_2O$ çözücüsünde çözülmesiyle elde edilmiştir. Aromatik halkanın protonları multiplet olarak 8.1-7.49 ppm'de rezonans gösterirken, imin karbonu (8 numara) singlet olarak 8.47 ppm'de rezonans sergilemiştir. AB sisteminin A ve B kısımlarında sırasıyla 3.69 ve 3.62 ppm'de dublet olarak bir rezonans yapısı gözlenmiştir. Multiplet rezonanslar 2, 3 ve 4 numaralı karbonların protonlarında sırasıyla 2.20, 2.37 ve 1.31 ppm'de rapor edilmiştir. Buna ek olarak, metil grubunun protonları 0.9 ppm'de yapı ile tamamen uyumlu olan bir dublet rezonans yapısı sergilemiştir.

Bileşiğin C-NMR spektrumunda asit grubunun karbonu 180.8 ppm'de rezonans yapısı oluştururken, aromatik halkanın ve imin grubunun karbonları 163.1, 134.9, 133.9, 133.4, 130.2, 128.5, 128.2, 127.6, 127.1, 126.4, 123.5 ppm'de rezonans yapısı göstermiştir. Rezonans yapısı 7 numaralı karbonun komşuluğunda 65.3 ppm'de gözlenmiştir. Son olarak, diğer karbonların rezonans yapısı 42.4, 41.7, 35.4, 25.3, 22.2, 22.1 ppm olarak listelenmiştir.

Standart pregabalin ve türevlendirilmiş numunenin NMR spektrumu $-CH_2NH_2$ grubunun NMR sinyalinin 2.80 ppm'den 3.56 ppm'e kaydığını göstermiştir. Ayrıca, bu grubun C-NMR sinyalleri de 43.8 ppm'den 65.3 ppm'e kaymıştır. Böyle bir sonuç $NH_2$ grubunun başarılı bir şekilde imin grubuna dönüştürüldüğünü kanıtlamıştır. Ayrıca, ikinci moleküldeki 8 numaralı karbon 8.47 ppm'de rezonans yapısı gösterirken, bu karbonun NMR sinyali 163.1 ppm'de gözlenmiştir. Her iki molekülün $^{1}$H-NMR ve $^{13}$C-NMR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmektedir.




**Şekil 4.8.** Pregabalin-naftil iminin $D_2O$ çözücüsü içinde 400 MHz $^{1}$H-NMR spektrumu ve 100 MHz $^{13}$C-NMR spektrumu

### 4.2.3. Validasyon Parametreleri

#### 4.2.3.1 Doğrusallık

HPLC-UV yöntemi için Pregabalin-naftil imin standart çözeltileri 0.5 ila 25 µg/mL (0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 17.5, 20 ve 25 µg/mL) arasında değişen derişimlerde hazırlanmıştır. Optimal koşullar altında, bu derişim aralığında yüksek korelasyon katsayısına (0.9998) sahip doğrusal bir grafik elde edilmiştir. HPLC-FLD yöntemi için Pregabalin-naftil imin için 25 ng/mL ve 25 µg/mL oranlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır (0.025, 0.25, 1, 3, 7.5, 15 ve 25 µg/mL). Optimum koşullar altında, bu derişim aralığında iyi bir korelasyon katsayısına (0.9996) sahip doğrusal bir grafik elde edilmiştir.

#### 4.2.3.2. Gözlenebilme ve Miktar Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

LOD ve LOQ en düşük konsantrasyon seyreltilerek belirlenmiş ve sırasıyla 3.3 σ/S ve 10 σ/S olarak hesaplanmıştır; burada S kalibrasyon eğrisinin eğimi ve σ regresyon denkleminin y-kesişiminin standart sapmasıdır (n=3). HPLC-UV yöntemi için LOD ve

LOQ değerleri sırasıyla 0.1 ve 0.5 µg/mL iken, HPLC-FLD yöntemi için sırasıyla 0.010 ve 0.025 µg/mL'dir. Önerilen yöntemlerin analitik performans parametreleri Tablo.4.10'da özetlenmiştir.

**Table 4.10.** HPLC-UV ve HPLC-FLD yöntemlerinin parametreleri

| Yöntem | Çalışma aralığı (µg/mL) | Denklem | Determinasyon katsayısı | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) |
|---|---|---|---|---|---|
| **HPLC-UV** | 0.5-25 | y=107.71x+80.12 | 0.9998 | 0.10 | 0.50 |
| **HPLC-FLD** | 0.025-25 | y = 236.72x - 8.4567 | 0.9996 | 0.010 | 0.025 |

y: pik alanı, x: Pregabalin derişimi

#### 4.2.3.3. Doğruluk ve Kesinlik

Önerilen yöntemlerin doğruluğu ve kesinliği, doğrusal aralıktaki üç derişim seviyesinde (düşük, orta ve yüksek) değerlendirilmiştir. Bu, her bir derişim seviyesinde altı tekrarlı ölçüm kaydedilerek gün içi ve günler arası ölçümler yoluyla yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.11' de özetlenmiştir.

**Table 4.11.** Yöntemlerin doğruluk ve kesinlik sonuçları

| Yöntem | Eklenen (µg/mL) | Gün İçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Bulunan ± SS | Doğruluk[a] | Kesinlik[b] | Bulunan ± SS | Doğruluk[a] | Kesinlik[b] |
| **HPLC-UV** | 0.75 | 0.75 ± 0.01 | 0.24 | 1.55 | 0.73 ± 0.01 | -3.02 | 0.91 |
| | 13 | 13.58 ± 0.07 | 4.46 | 0.49 | 13.36 ± 0.06 | 2.77 | 0.43 |
| | 22.5 | 22.30 ± 0.16 | -0.89 | 0.70 | 22.40 ± 0.08 | -0.46 | 0.34 |
| **HPLC-FLD** | 0.25 | 0.249 ± 0.001 | -0.422 | 0.537 | 0.246 ± 0.002 | -1.726 | 0.910 |
| | 7.5 | 7.376 ± 0.090 | -1.649 | 1.215 | 7.512 ± 0.067 | 0.162 | 0.898 |
| | 22.5 | 22.833 ± 0.233 | 1.482 | 1.019 | 22.837 ± 0.277 | 1.461 | 1.213 |

SS: altı ölçüm sonucunun standart sapması, [a]Doğruluk: (% bağıl hata) (bulunan/eklenen)/eklenenx100, [b] BSS: Bağıl standart sapma

### 4.2.4. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Standart ekleme geri kazanımları, önceden analiz edilmiş ilaç tableti çözeltisi örneklerine bilinen miktarda saf ilaç eklenerek gerçekleştirilmiştir. Her seviye üç kez

tekrarlanmış (n=3) ve ilaç miktarları ilgili tahlil yöntemlerinin uygulanmasıyla belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri, ölçülen miktarın eklenen miktara bölünmesi ve ardından sonucun 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar ve ilgili istatistiksel parametreler Tablo 4.12' de sunulmuştur.

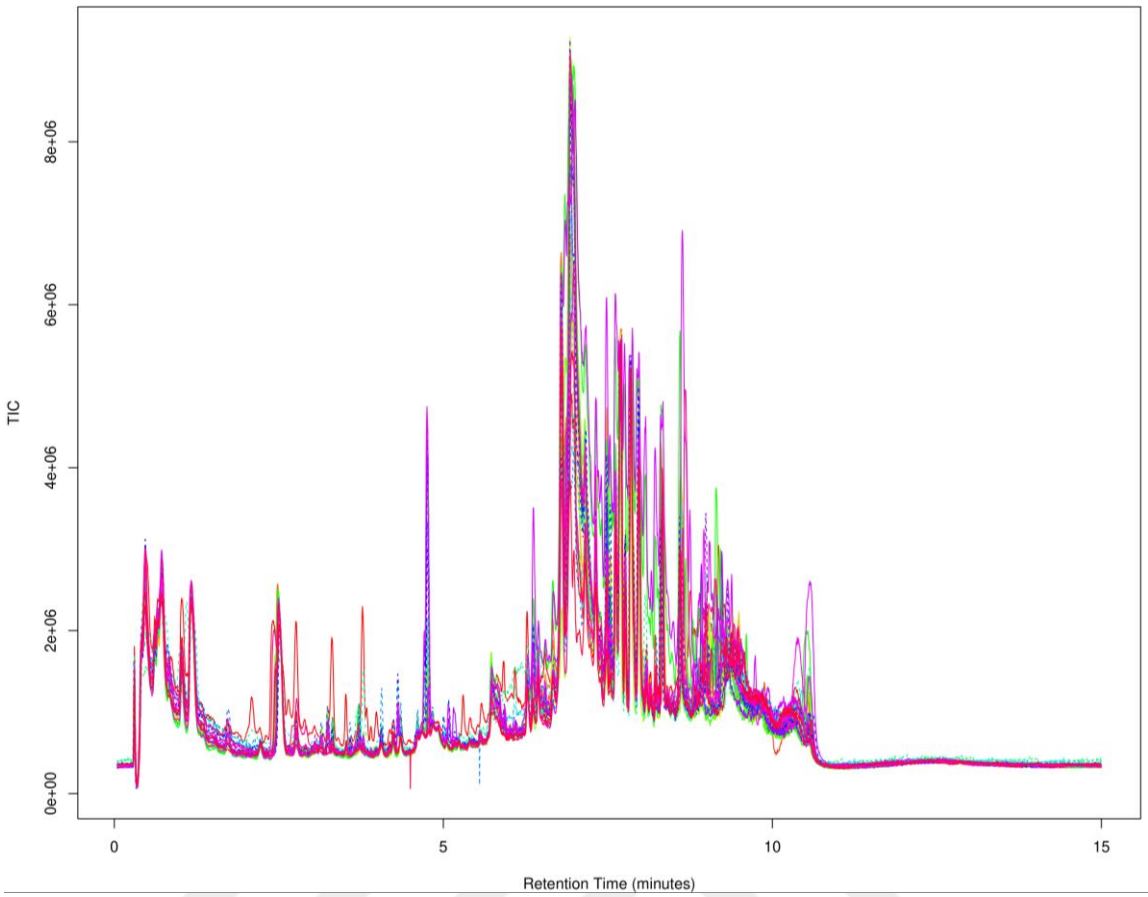
**Table 4.12.** İki tablet formülasyonunda (Regapen 75 mg ve Pagamax 75 mg) pregabalinin geri kazanımı

| Yöntem | İlaç | Eklenen (µg/mL) | Bulunan±SS (µg/mL) | Geri Kazanım (%) |
|---|---|---|---|---|
| HPLC-UV | Regapen 1.5 µg/mL | 1 | 2.46 ± 0.12 | 98.4 |
| | | 11 | 12.67 ± 0.35 | 101.7 |
| | | 16 | 17.62 ± 0.09 | 100.7 |
| | Pagamax 1.5 µg/mL | 1 | 2.54 ± 0.08 | 101.6 |
| | | 11 | 12.56 ± 0.35 | 100.5 |
| | | 16 | 17.66 ± 0.09 | 100.9 |
| HPLC-FLD | Regapen 1.5 µg/mL | 1 | 2.53 ± 0.03 | 101.0 |
| | | 11 | 12.61 ± 0.23 | 100.9 |
| | | 16 | 17.39 ± 0.04 | 99.4 |
| | Pagamax 1.5 µg/mL | 1 | 2.48 ± 0.07 | 99.1 |
| | | 11 | 12.42 ± 0.21 | 99.4 |
| | | 16 | 17.41 ± 0.18 | 99.5 |

SS: Üç ölçüm sonucunun Standart Sapması

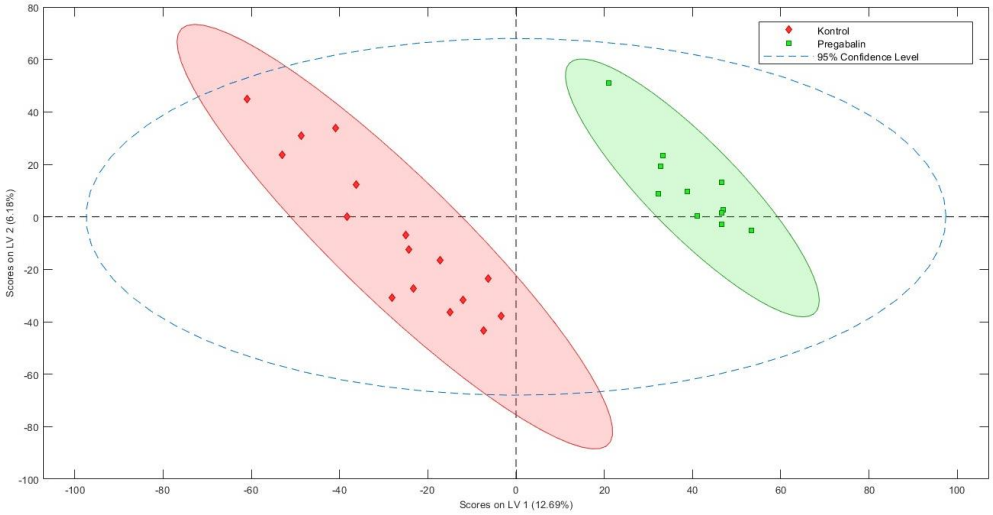
### 4.3. Metabolomiks Çalışmasının Bulguları

Tüm analitler ve QC örnekleri Q-TOF MS/MS ile analiz edildikten sonra toplam iyon kromatogramları alındı (Şekil 4.9). Çok sayıda tepe noktası içeren bu piklerin tespiti için XCMS *Centwave* algoritması kullanıldı. Tüm örnekler XCMS R paketine aktarılmış ve pik tespiti devam ettirildi. Pik hizalama için söz konusu paketin *Obiwarp* algoritması kullanılmıştır. Her bir kromatogramdaki "feature" değerlerinin alıkonma süreleri bu yaklaşımla optimize edildi.



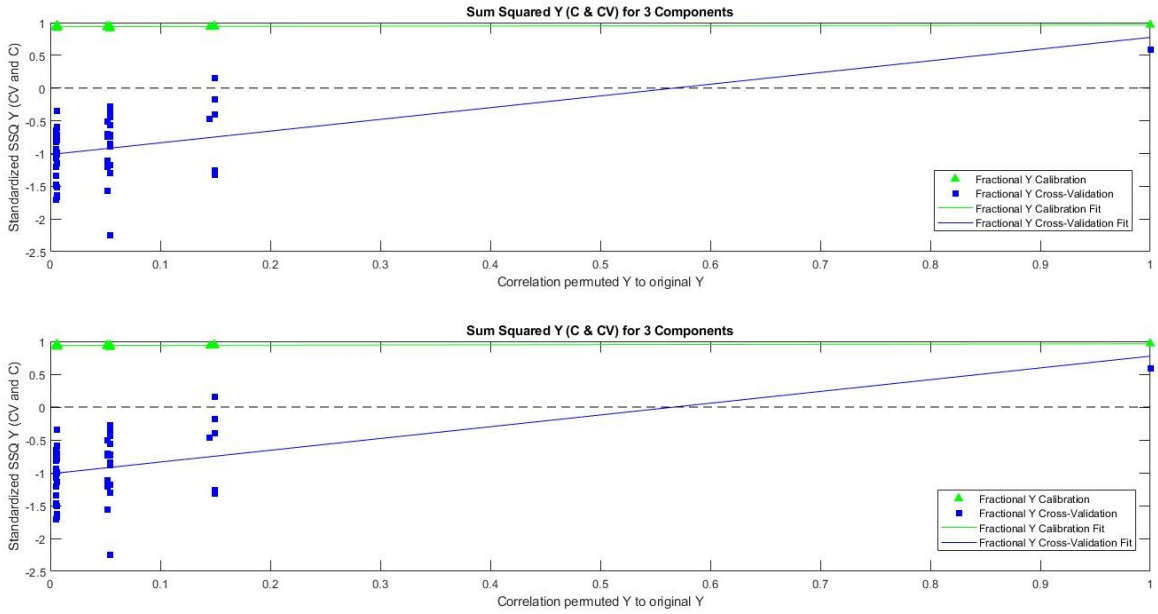

**Şekil 4.9.** Bütün numunelerin toplam iyon kromatgoramları

Analiz için *"özellik"* (feature) olarak adlandırılan alıkonma süresi ve *m/z* değerini elde etmek için pik gruplama adımı gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından alıkonma süresi ve m/z değerlerini içeren bir veri tablosu oluşturuldu. Bu veri tablosu kemometrik analiz için MATLAB' a alınarak QC'lerle düşük tekrarlanabilir pikler kaldırıldı. Kalite Kontrol - Destek Vektör Regresyonu (QC-SVR) düzeltmesi de sürdürüldü. Her grup için Kısmi En Küçük Kareler diskriminant Analizi (PLS-DA) uygulandı. Elde edilen PLS-DA latent değişken skor grafikleri pregabalin öncesinde ve sonrasında alınan plazmadaki metabolitlerin ayrımının farklı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.10). İki grubun PLS-DA scor grafiği %95 güven aralığında bulunmaktadır. Kırmızı noktalar pregabalin alınmadan önce tavşan plazma metabolom dağılımını yeşil noktalar pregabalin sonrası plazma metabolom profilini göstermektedir.

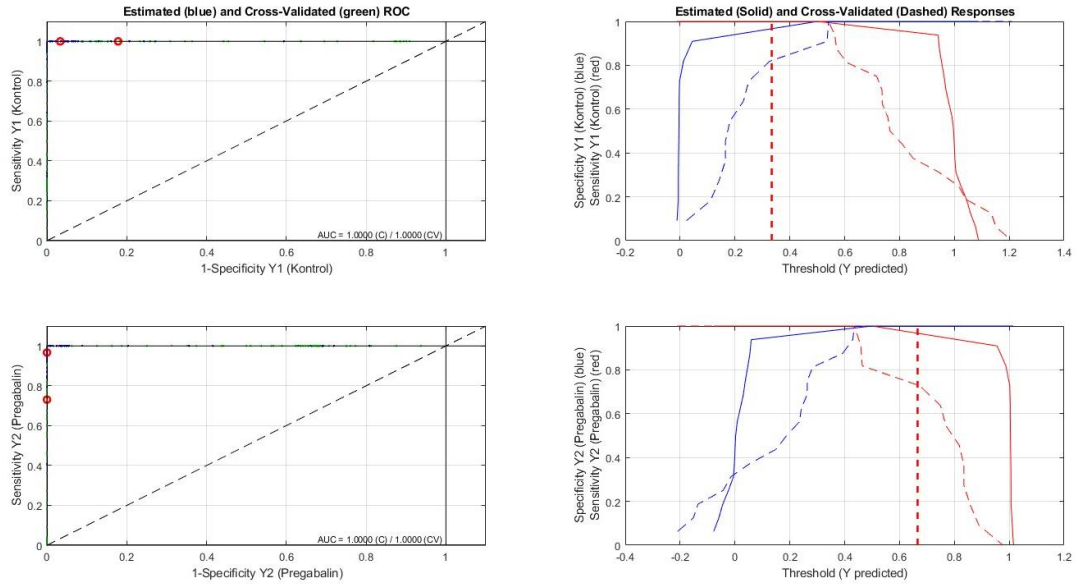



**Şekil 4.10.** PLS-DA modeline göre gizli değişkenlerin scor plot tablosu

Geliştirilen modelin doğrulanması 50 iterasyon yinelemeli permütasyon testi *ile* sağlandı. Permütasyon testinde izlenen, grafiğin sağ tarafına işaret eden tüm yinelemeler, grafiğin solunda işaretlenen ölçülen yinelemeden daha yüksektir (Şekil 4.11). Tüm istatistikler modelin anlamlı olduğunu gösterdi ($p \leq 0.05$). PLS-DA modeli için Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrisi, modelin seçiciliğini ve duyarlılığını değerlendirmek için çizildi. ROC çizilerek modelin seçicilik ve duyarlılık değerlendirme analizi yapıldı (Şekil 4.12). ROC eğrileri için hesaplanan AUC değerleri kalibrasyon ve çapraz validasyon veri seti için 1.00 ve 0.9989 olarak bulunmuştur. ROC eğrileri, modelin uyumsuz olmadığını ve şans korelasyonunun mümkün olmadığını göstermektedir. Veriler, modelin her grubu yüksek özgüllük ve duyarlılıkla ardışık olarak sınıflandırabileceğini açıklamaktadır.



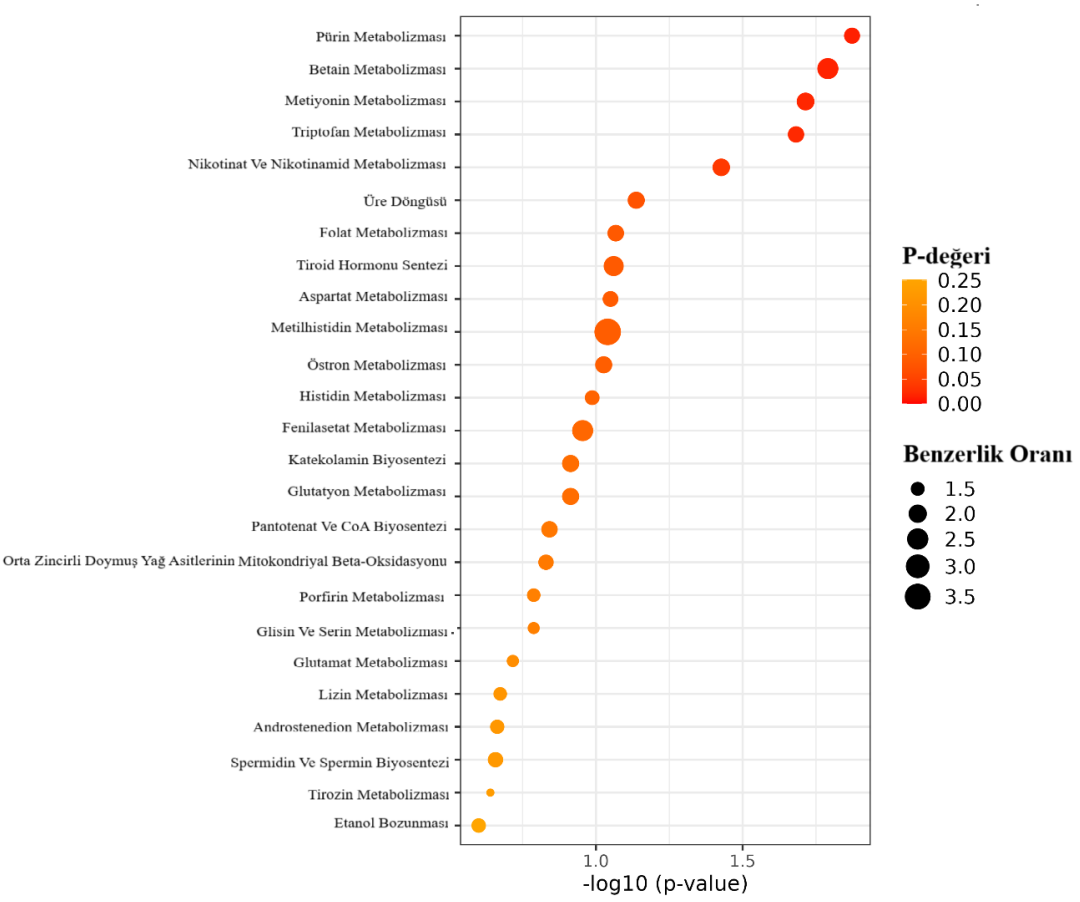

**Şekil 4.11.** PLS-DA modeli için permütasyon testi



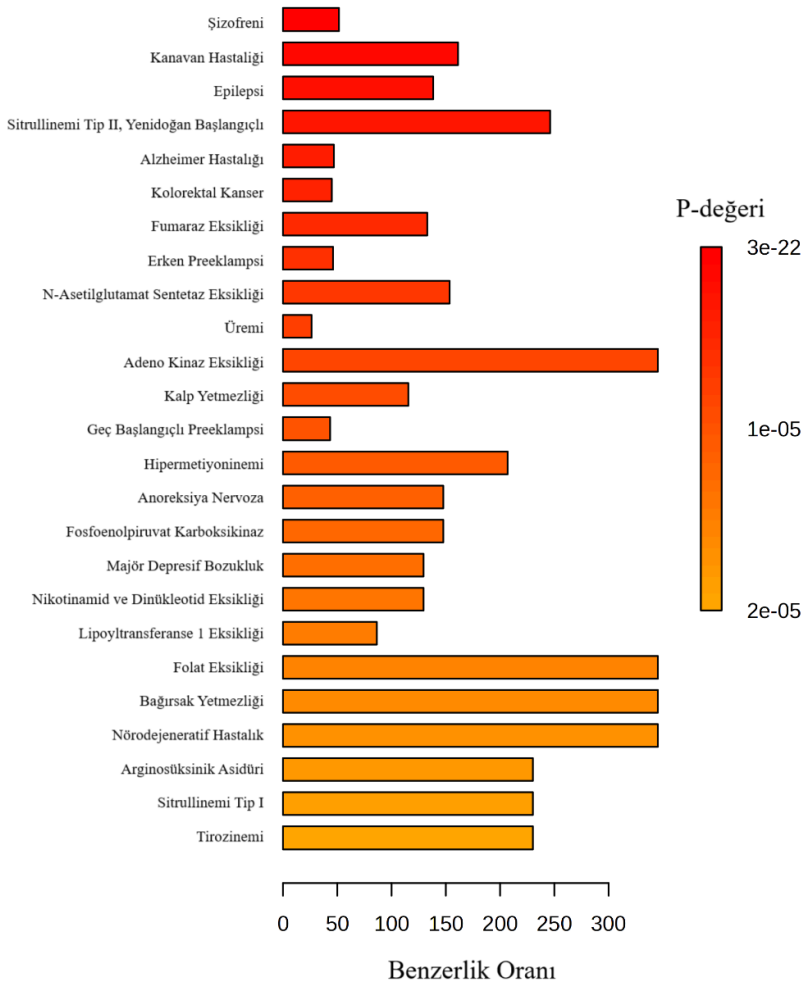

**Şekil 4.12.** Veri seti ve çapraz doğrulama örnekleri için ROC eğrileri

Pozitif iyon modundaki toplam 10666 “feature” KEGG yolak analizine alındı. PLS-DA modeli ile belirlenen bu 10666 değerden 207 tanesi istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. Bunların 95 tanesinin aşağı yönlü 112 tanesi yukarı yönlü olarak değiştiği bulundu. Anotasyonu gerçekleştirilen metabolitlerin gruplar arasında 1.5 kat değişikliğe (yukarı veya aşağı) ve/veya p değerine ($\leq 0.05$) sahiptir. Pregabalin öncesi ve sonrası

tavşan plazmalarındaki önemli ölçüde ayrılan anotasyonu yapılan metabolitlerden ilk 20 tanesi Tablo 4.13' de verilmiştir. Elde edilen "Enriched metabolites"lerin metabolik yollar üzerindeki temel işlevsel etkileri MetaboAnalyst tarafından belirlendi. Bu verilerden yola çıkarılarak yapılan yolak analizinde etkilenen tespit edilmiş yolaklar Şekil 4.13' de gösterilmiştir. Bu "Enriched metabolites"lerden yola çıkılarak yapılan metabolom değişikliğine göre bağlantılı olan hastalıkların listesi Şekil 4.14' de verilmiştir. Ayrıca bu "Enriched metabolites"lere ilişkin bir hastalık haritası da çizildi. Ayrıca, açıklanan her metabolitin yukarı/aşağı regülasyonunu açıklığa kavuşturmak için bir volkan grafiği de çizilerek Şekil 4.15'te gösterilmektedir.



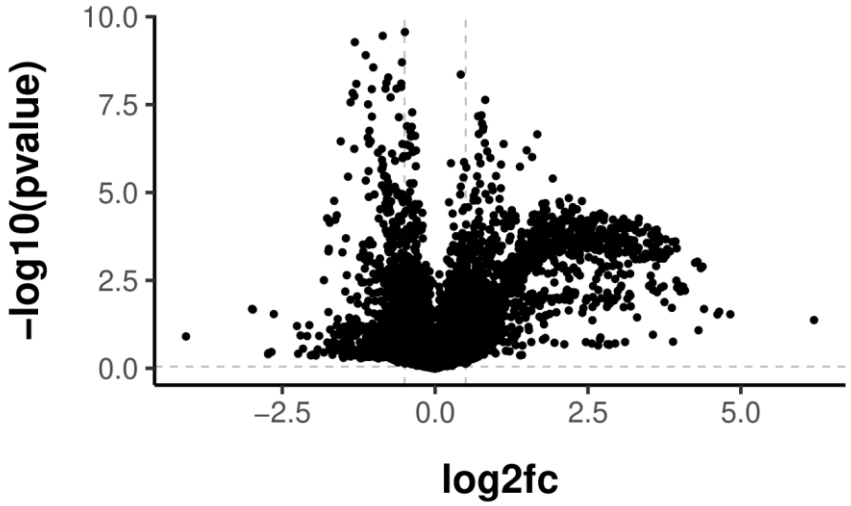

**Şekil 4.13.** Metabolitlerin yolak analizi




**Şekil 4.14.** Yolak analizlerine göre hastalık benzerlik tablosu

**Table 4.13.** En büyük p değerine sahip ilk yirmi metabolit

| No | Metabolit adı | Molekül ağırlığı | RT (dakika) | Regülasyonu (Aşağı/ Yukarı) | Kat artışı | p-değeri |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | N6-Succino-2-amino-2'-deoxyadenylate | 465.0927 | 0.62275 | Aşağı | 1.804262294 | 1.64E-06 |
| 2 | Prostaglandin F2a | 283.2242 | 8.1943 | Aşağı | 1.279110619 | 5.43E-06 |
| 3 | Taurochenodesoxycholic acid | 251.1554 | 5.189217 | Yukarı | 1.337823693 | 6.8E-06 |
| 4 | 12-Keto-leukotriene B4 | 335.2221 | 5.404033 | Aşağı | 1.634843256 | 7.69E-06 |
| 5 | 2-(S-Glutathionyl)acetyl glutathione | 587.1819 | 1.031317 | Aşağı | 3.141391258 | 1.73E-05 |
| 6 | Pyridoxamine | 152.0703 | 1.348333 | Aşağı | 1.203319957 | 2.14E-05 |
| 7 | 9,10-Epoxyoctadecenoic acid | 296.2336 | 6.737983 | Yukarı | 2.385793206 | 3.18E-05 |
| 8 | Inosinic acid | 321.0591 | 1.036367 | Aşağı | 3.049560576 | 4.46E-05 |
| 9 | Nicotinamide ribotide | 336.0705 | 0.85895 | Aşağı | 3.402364063 | 5.42E-05 |
| 10 | Deoxyadenosine monophosphate | 350.0859 | 1.7512 | Aşağı | 1.895362566 | 5.47E-05 |
| 11 | Glucose 1-phosphate | 217.0469 | 6.078667 | Aşağı | 1.232237976 | 6.2E-05 |
| 12 | Stearoyl-CoA | 1017.359 | 4.762775 | Yukarı | 4.400655117 | 6.39E-05 |
| 13 | (S)-Hydroxydecanoyl-CoA | 854.3002 | 4.313467 | Yukarı | 3.400809268 | 6.63E-05 |
| 14 | Oxidized glutathione | 545.1764 | 4.716717 | Yukarı | 5.511116983 | 6.76E-05 |
| 15 | Hydroxymethylbilane | 819.2649 | 4.71795 | Yukarı | 5.766897313 | 6.84E-05 |
| 16 | Coprocholic acid | 453.3432 | 5.117517 | Yukarı | 1.420052959 | 8.11E-05 |
| 17 | Coproporphyrin III | 571.3193 | 4.718192 | Yukarı | 5.456099 | 9.16E-05 |
| 18 | Deoxyadenosine | 320.0965 | 0.857317 | Aşağı | 1.750548 | 0.000119 |
| 19 | Trypanothione | 808.2781 | 4.7176 | Yukarı | 9.708176 | 0.00012 |
| 20 | Phylloquinone | 535.3194 | 6.76985 | Aşağı | 1.475436 | 0.000137 |




**Şekil 4.15.** Log2fold ve on tabanında log pvalue ye göre çizilen volkano grafiği

# 5. TARTIŞMA

Pregabalin, nöropatik ağrı ve epilepsi gibi nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların tedavisinde, az yan etki ve çabuk etki etmsi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer ilaçların yetersiz kaldığı durumlarda da tercih edilmektedir. Bu nedenle, pregabalinin tespiti için yeni ve etkili analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Pregabalin emici kromosferlerden yoksundur; bu nedenle HPLC kolonundaki yükü bozacak ve kolonun ömrünü kısaltacaktır. Ayrıca oldukça polar olduğu için uçucu değildir. Bu nedenle, spektrofotometrik yöntem basit, doğru ve çok uygun maliyetlidir. Karmaşık olmayan bir spektrofotometrenin kullanılması, prosedürü çoğu laboratuvara uygulanabilir kılmaktadır. Bu çalışmada, UV spektroskopisi ve birinci türev spektroskopisi kullanılarak türevlendirilmiş pregabalin tayini için iki yeni analitik yöntem geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Bu yöntemler pregabalinin absorbans değerlerini 15 kat artırarak önemli ölçüde geliştirmiştir. Her iki yöntem de pregabalin tayini için yüksek hassasiyet göstererek düşük derişimlerde bile doğru ve hassas ölçümlere olanak sağlamıştır.

Pregabalin kromofor grupları içermez ve bu nedenle böyle bir bileşiğin tespiti yalnızca herhangi bir organik mobil fazın üst üste gelerek hassasiyeti düşürebileceği 200 ila 230 nm arasında mümkündür. Buna ek olarak, pregalinin molar absorptivitesi çok düşüktür, bu da seyreltik örneklerde pregabalin analizini imkansız kılan çok yüksek bir miktar tayin sınırı değerine neden olur. Bu nedenle, bu bileşiği HPLC-UV yöntemi ile analiz etmek çok zordur. Bu yöntemle, tampon çözelti kullanmadan dökme ve farmasötik formülasyonda pregabalin tayini için hassas, yeni, doğru ve kesin bir yöntem belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürdeki analizler genellikle 200-230 nm dalga boyunda yapılmaktadır, bu da organik mobil fazdan kaynaklanan parazitlenmelere neden olmaktadır. Bu çalışmada, pregabalin 275 nm'de tespit edilerek organik bileşiklerden

kaynaklanan girişimler önlenmiş ve analiz güvenilirliği artırılmıştır. Çalışmada önerilen yöntemin duyarlılığı HPLC-UV için yaklaşık 50 kat, HPLC-FLD için 800 kat arttırdığı ve düşük dalga boyundan (210 nm) kaynaklanan girişimleri önlediği gözlemlenmiştir. Literatürdeki HPLC-UV yöntemleri, pregabalinin düşük molar absorptivitesi nedeniyle genellikle yüksek LOQ değerleriyle sınırlı kalmakta ve düşük derişimlerde analiz yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen yöntem, UV dedektörle 1.0 µg/mL ve floresans dedektörle 25 ng/mL kadar düşük derişim tespit edebilme kapasitesiyle, literatürdeki diğer yöntemlerden çok daha hassas bir çözüm sunuyor. Bu çalışmamızda literatürde yer alan diğer yöntemlere göre HPLC-FLD yönteminde daha düşük derişimlere inilmiştir. Özellikle düşük derişimlerde pregabalin analizinin mümkün kılınması, kalite kontrol çalışmaları ve rutin analizlerde büyük avantaj sağlar. HPLC-UV yönteminde ise literatürde yer alan bir çalışmayla aynı derişime inilmiştir. Berry, D ve ark. (Berry ve Millington, 2005) tarafından yapılan çalışmada ve bizim çalışmamızda 0.5 µg/ml derişimi inilmiştir ancak bizim çalışmamızın çalışma aralığı daha geniştir ve tampon kullanımı gerektirmemektedir. Ayrıca literatürde bulunan bu çalışmada pH 4.6 tamponu kullanılmıştır. Tampon çözeltileri paslanmaz çelik bileşenlerde korozyona yol açabilecek ve cihazda tuz birikimine yol açarak hatların tıkanmasına, kolon performansının bozulmasına ve sistemdeki basınç düşüşlerine neden olabilmektedir, bizim çalışmamızda ise tampon kullanımına gerek kalmayan asetonitril ve metanol mobil fazıyla ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma literatürdeki diğer yöntemlere kıyasla daha hassas, daha az girişime maruz kalan, tampon gerektirmeyen ve daha düşük derişimlerde analiz yapılmasına olanak tanıyan bir çözüm sunmaktadır.

Pregabalin, etki mekanizmalarından biri olarak kalsiyum kanallarının $\alpha_2\delta$ alt birimine bağlanarak uyarıcı nörotransmitterlerin salınımını inhibe etmektedir. Bu doğrultuda serotonin ve tyramin düzeylerinde bir artış gözlemlenirken, dopamin,

epinefrin ve kolin düzeylerinde bir düşüş meydana gelmiştir. Artan serotonin ve tyramin seviyeleri, ruh halinin iyileşmesine ve anksiyetenin azalmasına katkıda bulunarak, pregabalinin depresyon ve anksiyete üzerindeki etkinliğini açıklamaktadır. Azalan epinefrin, enerji seviyelerinde düşüşe yol açarak gün içindeki yorgunluk hissi ve hareketsizlik gibi belirtilerle kendini gösterebilir. Kolin düzeyinin azalması, kolin ve asetilkolin metabolizmasında değişiklikler yaratarak bellek ve öğrenme gibi bilişsel işlevlerde olumsuz etkilere yol açabilir (Hasselmo, 2006). Bu durum, pregabalinin en sık gözlemlenen yan etkileri arasında yer alan baş dönmesi ve somnolans ve bağımlılığın bilişsel bozukluklarının açıklanmasında dikakte değer bir değişikliktir.

Bağımlılığın temel mekanizmalarından biri olan mezokortikolimbik dopamin yolu, dopamin salınımını artırarak ödüllendirici bir etki yaratır. Çalışmamızda, tirozin miktarındaki azalmaya paralel olarak dopamin düzeylerinde de bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu süreçte glutamat yolaklarının aktivasyonu tirozinin azalmasına neden olmuş olabilir. Dopamin seviyelerindeki azalma, bağımlılığın nörobiyolojik temeliyle ilişkilidir. Ayrıca, bağımlılıkta kritik rol oynayan katekolaminlerin düzenlenmesi ile ilişkili olarak, tiramin seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Tiramin, "sahte nörotransmitter" olarak hareket edebilir ve dopamin gibi depolanmış katekolaminleri presinaptik veziküllerdeki yerinden edebilir (Finberg ve Gillman, 2011). Bu, norepinefrin ve dopaminin artan salınımına yol açabilir, beynin ödül yollarını etkileyebilir ve potansiyel olarak bağımlılık davranışlarına sebep olabilir (Best ve ark., 2009). Bu durum, norepinefrin ve dopamin salınımında artışa yol açarak beynin ödül yollarını etkileyebilir ve bağımlılık davranışlarını güçlendirebilir. Glutamat, beyindeki en yaygın uyarıcı nörotransmitter olup, artan glutamat seviyeleri öğrenme ve hafıza süreçlerini etkileyebilir ve bağımlılık ile ilişkilendirilebilir. Çeşitli çalışmalar bağımlılığın glutamat metabolizmasını değiştirdiğini ortaya koymuştur(Gass ve Olive,

2008; Moghaddam ve Homayoun, 2008). Çalışmamızda glutamat sentezinde rol oynayan glutamin düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Aynı zamanda yine çalışmamızda bulunan sonuçlarda artan glutatyon ve azalan gama-glutamilsistein seviyeleri, beynin oksidatif stres yanıtında rol oynayan metabolitlerdir. Bu durum, özellikle alkol ve uyarıcı bağımlılığı gibi ilaca bağlı nörotoksisite vakalarında yaygın olarak görülmektedir (Tomasi ve ark., 2019). Do-Wan Lee ve Martin Bendszus'un çalışmaları bağımlılıkta beyindeki glutatyon ve N-asetilaspartat düzeylerinin arttığını göstermiştir ve bizim çalışmamızda da aynı bulgular elde edilmiştir (Bendszus ve ark., 2001; Lee ve ark., 2012). Çalışmamızda ayrıca azalan glukoz-1-fosfat düzeylerinin, önceki araştırmalarda beyin glikoz metabolizmasındaki değişikliklerin bağımlılıkla ilişkilendirildiğini desteklediği gözlemlenmiştir. Nikotinamid ribozid düzeylerinde bir azalma tespit edilmiş olup, özellikle alkol bağımlılığında hücresel enerji metabolizmasının bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, S-adenozilmetiyonin (SAMe) seviyelerindeki düşüş de gözlemlenmiştir. SAMe, bağımlılıkta gen ekspresyonunu etkileyen metilasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. SAMe'nin düşük düzeyleri, dopamin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin sentezinde aksamalara neden olabilir, bu da bağımlılık davranışlarını ve ruh hali düzenlemesini olumsuz etkileyebilir.

İlaç kullanımı beyinde serotonin reseptörlerini aşırı uyararak serotonin seviyelerinde geçici bir artışa neden olabilir. Ancak zamanla bu seviyelerin düşmesi, bağımlılık gelişimine sebep olabilir. Bizim çalışmamızda bir aylık pregabalin kullanımının ardından serotonin düzeylerinde bir artış gözlenmiştir ancak uzun vadede bu seviyelerin düşmesi olası bir bağımlılık mekanizmasına parçalarından biridir.

Purin metabolizması, sinir sistemi üzerinde önemli rol oynayan adenosin ve diğer purin nükleotidlerinin sentezini ve yıkımını içerir. Çalışmamızda, en çok etkilenen yolaklardan biri purin metabolizmasının bozulmasıdır. Bu bozulma, adenosin kinaz

eksikliğine yol açar. Adenosin kinaz, adenosinin fosforilasyonu aracılığıyla bu molekülün adenosin trifosfat (ATP) ve diğer enerji taşıyan moleküllere dönüşümünde kritik bir rol oynar. Adenosin kinaz eksikliği, nöbetler ve uyku bozuklukları gibi nörolojik anomalilere neden olabilir (Beamer ve ark., 2021). Adenin ve guanin gibi purinlerin beynin enerji metabolizmasında ve nörotransmisyonunda önemli rolleri bulunmaktadır. Enerji metabolizmasındaki değişikliklerin nörolojik işlevlerde önemli olduğu göz önüne alındığında, purin metabolizmasının bozulması nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (Micheli ve ark., 2011). Ayrıca, purin metabolizmasının parçalanma ürünleri sonunda ürik asite dönüştürülür; yüksek ürik asit seviyeleri nöropatik ağrı ile ilişkilendirilmiştir (Beamer ve ark., 2021). Çalışmamızda, purin metabolizmasında ve sentezinde rol oynayan N6-Succino-2-amino-2'-deoxyadenylate, Deoksiadenozin, Fosforibosilformilglisinamidin, Guanosine 3'-diphosphate 5'-triphosphate, 10-Formiltetrahidrofolat ve ATP ile guanozin trifosfat gibi enerji taşıyan nükleotidlerin öncülü olan inosinik asit metabolitlerinde değişiklikler gözlemlenmiştir. Purin metabolizmasının bozulması, pregabalin tedavisinin etkinliğinde rol oynayabilir; bu nedenle, nörolojik hastalıkların daha iyi tedavisi için bu süreçlerin derinlemesine araştırılması gerekmektedir.

Betain, metilasyon süreci ve homosistein metabolizmasında önemli bir rol oynayan doğal bir bileşiktir. Betain metabolizmasındaki gözlemlenen değişiklikler betainin nöroprotektif özellikleri kaynaklı olabilir (Rosas-Rodríguez ve Valenzuela-Soto, 2021). Daha önce yapılan çalışmalarda, betain desteğinin ratlarda nörodejeneratif problemlere karşı faydalı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (Chai ve ark., 2013). Özellikle metilasyon döngüsünde kritik bir ara molekül olan S-Adenozilhomosistein, metiyonin metabolizmasında yer alır ve metiyoninin bir yan ürünü olarak homosistein oluşumunda önemli bir adımdır. S-Adenozilhomosistein, normalde düşük seviyelerde bulunur; ancak

yüksek seviyeleri kardiyovasküler ve sinir hücrelerinde oksidatif stres ve hasara yol açarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilebilir (Smith ve Refsum, 2016; Toth, 2014). Yaptığımız çalışmada S-Adenosylhomocysteine seviyesinin azaldığı bulunmuştur, bu da pregabalinin beklenen etkisiyle uyumludur. Betaine metabolizmasındaki bozulma, pregabalinin yan etkilerinden biri olan kilo alımıyla ilişkilendirilebilir. Pregabalin kullanımının ardından kilo alımı, karaciğer yağlanmasına ve dolayısıyla betain metabolizmasının bozulmasına neden olabilir. Ayrıca, folat metabolizmasındaki değişiklikler ve hastalık tablomuzda görülen folat eksikliği bulguları arasında tutarlılık bulunmaktadır. Ayrıca etkilen yolaklardan biri olan metiyonin metabolizması, metiyonin amino asidinin vücutta nasıl işlendiğini ve dönüştüğünü açıklayan bir süreçtir. Metiyonin metabolizmasının ara ürünlerinden biri yine homosisteindir. Metiyonin, hücrelerdeki enerji dengesini etkileyebilir. Yeterli metiyonin alımı, hücresel enerji üretimini destekleyerek genel metabolizmayı düzenler (Martínez ve ark., 2017). Betain ve metiyonin yolaklarında meydana gelen değişiklikler değişen homosistein seviyelerinin nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilebileceği ve azalan homosistein seviyelerinin tedaviye yönelik potansiyel bir etkiyi gösterebileceği düşünülmektedir.

Triptofan metabolizması, besinlerden alınan triptofan esansiyel amino asitinin vücutta kulllanıldığı metabolizmadır. Triptofan metabolizma yolu ile diğer metabolitlere dönüşebilir, bu ürünler bağışıklık yanıtları ve nörolojik işlevler üzerin etkilidir. Bu değişimlerden biri olarak Triptofan, beyin ve vücutta bir nörotransmitter olan serotonine dönüşür (Fernstrom, 1983). Serotonin, ruh hali, uyku, kaygı gibi süreçleri düzenler ve seratonin ekskliği depresyon ve anksiyete durumlarına sebep olur (Cowen ve Browning, 2015). Pregabalin ağrı yönetimi sağlarken seratonin seviyelerinde artış sağlaması beklenir. Çalışmamızda bulunan seratonin seviyesindeki artış beklentilerle tutarlıdır.

Serotonin eksikliği depresyona ve anksiyeteye yol açabilirken, pregabalin bu anksiyete ve depresyon belirtilerini hafifletmeye yardımcı olur. Pregabalin ağrıyı hafifletirken aynı zamanda anksiyete ve ruh hali üzerine de olumlu etkiler göstermektedir. Pregabalin'in nörotransmitter salınımını düzenleyici etkisi, dolaylı olarak serotonin gibi nörotransmitterlerin dengesi üzerinde etkili olabilir. Serotonin ise triptofan metabolizmasıyla doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla triptofan metabolizmasındaki bu değişiklikler pregabalinin depsesyon ve anksiyete tedavisinde kullanımını açıklamaktadır. Serotonin aynı zamanda melatoninin öncüsüdür ve uyku düzeninin sağlanmasında önemli rol oynar. Melatonin, uykuya dalmayı kolaylaştıran bir hormondur ve vücuda uyku sinyalleri verir. Bizim çalışmamızda bulunan sonuçlarda melatonin miktarının azaldığı bulunmuştur. Pregabalinin kullanımında en sık görülen yan etkilerden biri olan uyku hali melatonin miktarındaki artış kaynaklı değildir. Bunun sebebinin belirlenmesi için daha fazla çalışamaya ihtiyaç duyulmaktadır.

NAD+ (nikotinamid adenin dinükleotid), hücresel enerji üretiminde kritik bir rol oynar ve düşük NAD+ seviyeleri hücresel enerji eksikliğine yol açarak yorgunluk ve somnolans hissine neden olabilir (Verdin, 2015). Çalışmamızda Nikotinamid ribotid metabolitinin aşağı yönlü regüle olduğu gözlemlenmiştir. Ayrca nikotinat ve nikotinamid metabolizmasında da değişiklikler saptanmıştır. Nikotinamid ribotid vücutta hızlıca NAD+'a dönüştürülen bir öncül olup, NAD+ seviyelerindeki azalma, sinir sistemi bozukluklarına yol açar (Verdin, 2015). NADPH ise hücresel antioksidan savunmada önemli bir rol oynar; oksidatif stresi azaltarak hücreleri, özellikle sinir hücrelerini, korur (Pollak ve ark., 2007). Oksidatif stresin artması sinir hücrelerinde hasara ve nörodejeneratif hastalıklara yol açabilir. Hem NAD+ hem de NADPH, sinir hücrelerinin enerji üretimini destekler ve oksidatif strese karşı koruma sağlar, bu da sinir hücrelerinin hasar görmesini ve dejeneratif hastalıkların gelişimini önleyebilir. Çalışmamızda bulunan

azalmış nikotinamid ribotid seviyeleri, sinir hücrelerinin korunmasında ve pregabalin tedavisinin etkisinde rol oynuyor olabilir. NAD+ üretimi, nörotransmitterlerin düzenlenmesi için gerekli olan enerji üretim süreçlerini destekler. Beyindeki serotonin, dopamin ve GABA gibi nörotransmitterlerin üretimi ve salınımı için NAD+ metabolizmasının hayati önem taşıdığı bilinmektedir. Sinir hücrelerinin enerji üretimini ve oksidatif strese karşı savunmasını destekleyen NAD+ metabolizması, pregabalin'in sinir hücrelerini aşırı uyarılmaya karşı koruyucu etkisiyle birleşerek sinir sağlığı üzerinde sinerjik faydalar sağlayabilir. Nikotinamid, hücresel onarım süreçlerinde de kritik bir rol oynar; bu süreçlerin sağlıklı sinir hücrelerini desteklemesi, ağrı ve anksiyete tedavisinde önemlidir. 2020 yılında fareler üzerinde yapılan çalışmalar, oral yoldan uygulanan nikotinamid ribozidin oksitosin, sosyallik ve anksiyete bozukluklarını düzelttiğini göstermiştir (Gerasimenko ve ark., 2020). Nikotinamid ribozid ve nikotinamid ribotid gibi NAD+ öncülleri, NAD+ seviyelerini artırarak enerji metabolizmasını destekleyebilir. Nikotinamid ribozid, NAD+ sentezinde önemli bir ara ürün olup, vitamin B3 türevlerinden biridir ve enerji metabolizmasında rol oynar. Mitokondriyal işlev bozuklukları ise enerji üretiminde azalmaya yol açarak yorgunluk ve somnolans gibi semptomlara neden olabilir. Ayrıca yine çalışmamızda bulunan metabolik değişimlerden orta zincirli doymuş yağ asitlerindeki değişim ile mitokondriyal beta-oksidasyon yolundaki bozulmalar, orta zincirli doymuş yağ asitlerinin mitokondride enerji üretimi için yeterli düzeyde parçalanamadığını göstermekte olup mitokondrinin düzgün çalışmaması, hücresel enerji metabolizmasının yavaşlamasına ve beyin fonksiyonlarının olumsuz etkilenmesine sebep olabilir. Çalışmamızda enerji metabolizmasıyla ilişkili olan Glucose 1-phosphate metabolitinde de azalma bulunmuştur. Glukoz 1-fosfat metaboliti glikojen sentezi, glikoliz ve glukoneogenez gibi biyokimyasal süreçlerde önemli bir ara

ürün olup, enerji dengesinin sağlanmasında kilit rol oynar. Bu durum, hücresel enerji metabolizmasının pregabalin tedavisiyle nasıl etkilendiğini anlamada önemlidir.

Metabolik yolak değişimlerine baktığımızda spermidin ve spermin metabolizmasında değişim meydana gelmiştir. Spermidin ve spermin, poliaminler sınıfına ait organik bileşikler olup, hücresel işlevlerde önemli roller üstlenirler. Spermidin, RNA ve DNA'nın işlevini desteklerken, spermin hücre içi pH düzenlemesi ve oksidatif strese karşı koruma gibi işlevler görür. Ayrıca, spermidin nörotransmitter düzenlemesinde de rol oynar ve spermidin artışı hücresel ve sinirsel işlevlerde iyileşme göstergesi olarak kabul edilir. Spermidinin nöropatik ağrıların hafifletilmesinde olumlu etkiler gösterdiği de literatürde belirtilmiştir (Yousefi-Manesh ve ark., 2023). Pregabalin'in stres tepkileri ve oksidatif strese karşı koruyucu etkileri, spermidin seviyesindeki değişikliklerle ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda, plazma spermin ve spermidin seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Spermidin seviyesindeki bu artış, hücresel enerji metabolizmasında, yaşlanma karşıtı etkilerde ve nöroproteksiyon süreçlerinde iyileşmelere işaret edebilir.

Ürea döngüsünün bozulması, vücutta amonyak birikimine yol açarak bulantı, baş dönmesi ve zihin bulanıklığı gibi semptomlara neden olur (Brusilow ve Maestri, 1996). Bu belirtiler, pregabalinin olası yan etkileri ile uyuşmaktadır. Çalışmamızda artış yaptığı bulunanan hidroksimetilbilan'nin metabolizmayla bilurubine dönüştüğü ve bu yan etkiler ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durum aynı zamanda üremi hastalığı ile benzerlik taşıyan metabolik bulgularımızı açıklar. Ayrıca Hidroksimetilbilan, hemoglobin metabolizmasında önemli bir ara ürün olup, çalışmamızda anlamlı bir artış göstermiştir. Hydroxymethylbilane seviyelerindeki artışlar laboratuvar testlerinde hemoglobin metabolizmasıyla ilgili hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Uchida ve

ark. 2018). Bu artış, pregabalin kullanımına bağlı hemoglobin seviyelerindeki düşüşle tutarlı olup, metabolik bozuklukların bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Taurochenodesoxycholic asit ve Koprokolik asit, memelilerde sindirim ve yağların emiliminde görev alan safra asitleridir (Chiang, 2013). Taurochenodesoxycholic asit, nükleer reseptörler aracılığıyla enerji ve lipid metabolizmasını düzenlerken, Koprokolik asit ince bağırsakta yağ sindirimini ve yağda çözünen vitaminlerin emilimini kolaylaştırır. Çalışmamızda her iki safra asidinin de artış gösterdiği saptanmıştır. Bu artış, yağ emiliminin artmasına ve pregabalin kullanımının bilinen yan etkilerinden biri olan kilo alımı ile uyumludur.

Bu bulgular, pregabalin'in nöroprotektif etkilerini ve sinir hücrelerinin korunmasını destekleyen çeşitli biyokimyasal yollarla ilişkisini göstermektedir. Sonuç olarak, GABA sisteminin dolaylı yolla artırılması, purin ve betain metabolizmasındaki bozulmalar ve enerji metabolizmasındaki değişiklikler, pregabalinin anksiyete ve ağrı yönetimindeki rolünü desteklemektedir. Ayrıca, Spermin ve spermidin gibi biyomoleküllerin seviyelerindeki değişiklikler, tedavinin nöroprotektif ve nörorejeneratif etkilerini işaret ederken, safra asitleri ve hidroksimetilbilane gibi metabolitlerin değişimi, pregabalinin yan etkileriyle ilişkili olabilir. Bu bulgular, pregabalin tedavisinin hem olumlu hem de olumsuz etkilerini daha iyi anlamak ve optimize etmek için daha kapsamlı araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geliştirilen UV-Spektroskopi ve birinci türev spektroskopisi yöntemlerinde kalibrasyon eğrileri geniş bir derişim aralığında iyi bir doğrusallık sergilemiştir. Türevlendirme aşaması pH ayarlamasına gerek kalmadan, oda sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir ve yöntemler hem basit hem de hızlıdır. Ayrıca, karmaşık olmayan bir spektrofotometre cihazının kullanılması, prosedürü çoğu laboratuvara uygulanabilir hale getirmektedir. Bu yeni yöntemler pregabalinin doğru, kesin ve hassas tayini için etkili araçlar sağlayarak klinik ve farmasötik uygulamalarda önemli avantajlar sunmaktadır.

Çalışma kapsamında geliştirilen yöntem ICH kılavuzuna göre başarılı bir şekilde valide edilmiş ve validasyon parametrelerine göre doğru, hassas, doğrusal ve duyarlı bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik numunelere de uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri, bu yöntemin kalite kontrol çalışmalarında ve dökme numunelerde ve farmasötik formülasyonlarda rutin pregabalin analizlerinde güvenle kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışmamız pregabalinin çeşitli metabolik ve biyokimyasal yolaklar üzerindeki etkilerinin kapsamlı bir analizini sunmaktadır. Metabolik analizlere dayanan çalışmanız, pregabalin'in nöroprotektif etkileri ve sinir hücrelerinin korunmasını destekleyen çeşitli biyokimyasal yollar üzerindeki etkilerini ayrıntılı bir şekilde ele alıyor. Nörolojik fonksiyon ve ağrı modülasyonunu etkileyebilecek inosin ve ATP gibi anahtar metabolitlerde değişiklikler de dahil olmak üzere pürin metabolizmasında önemli değişiklikler gözlemledik. Spermidin ve spermin seviyelerinde gözlenen artış, pregabalinin terapötik etkileriyle uyumlu olarak hücresel enerji metabolizmasında ve nöroproteksiyonda potansiyel iyileşmelere işaret etmektedir. Pregabalin'in, kalsiyum

kanallarının $\alpha_2\delta$ alt birimine bağlanarak nörotransmitter salınımını inhibe ettiği ve bu doğrultuda serotonin ve tyramin düzeylerini artırırken, dopamin, epinefrin ve kolin düzeylerini düşürdüğü gözlemlenmiş. Bu değişikliklerin ruh hali, enerji seviyeleri, bilişsel fonksiyonlar ve bağımlılıkla ilişkili süreçler üzerindeki etkileri dikkat çekmektedir. Serotonin ve tiramin düzeylerindeki artış, pregabalin'in depresyon ve anksiyete üzerindeki olumlu etkilerini açıklarken, dopamin ve epinefrin düzeylerindeki düşüşler enerji seviyeleriyle ilişkili yorgunluk hissiyle bağdaştırılmıştır. Çalışmamızda tirozin azalmasıyla birlikte dopamin düzeylerinde azalma ve glutamat yolaklarının aktivasyonuna bağlı olarak bağımlılıkla ilişkili nörobiyolojik süreçler üzerinde önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Çalışmanızda özellikle dikkat çeken diğer bulgular arasında glutamin düzeylerindeki azalma, oksidatif stresle ilişkili artan glutatyon seviyeleri ve mitokondriyal işlev bozukluğuna işaret eden nikotinamid ribotid azalması yer alıyor. Bu bulgular, pregabalin tedavisinin enerji metabolizması, oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olabileceğini öne sürüyor. Ayrıca purin ve betain metabolizmalarındaki bozulmalar, nörolojik işlevler ve kilo alımı gibi yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Hidroksimetilbilanda gözlenen değişikliklerle birlikte tauroksenodesoksikolik ve koprokolik asitlerdeki artış, pregabalinin lipid metabolizması üzerindeki etkisini ve kilo alımı gibi potansiyel yan etkilerini yansıtmaktadır. Bulgularımız, pregabalinin nörotransmitter sistemleri ve oksidatif stres üzerindeki etkisi de dahil olmak üzere bilinen etkileriyle uyumlu olmakla birlikte, metabolik etkileşimlerinin karmaşıklığının da altını çizmektedir. Gelecekteki araştırmalar, pregabalin tedavisinin daha geniş etkilerini daha iyi anlamak ve nöropatik ağrı ve ilgili bozuklukların yönetiminde klinik kullanımını optimize etmek için bu yolları daha fazla araştırmalıdır.

# KAYNAKLAR


Akther, H., Morshed, M. M., Islam, M. M., Hassan, M. J., Barua, B. P., & Emran, T. B. (2015). Development of a Method and its Validation for Estimation of Pregabaline in Pharmaceutical and Bulk Formulation. *Biomed. Sci. Today*, *2*(10).

Allwood, J., Winder, C., Dunn, W., & Goodacre, R. (2013). Considerations in sample preparation, collection, and extraction approaches applied in microbial, plant, and mammalian metabolic profiling. *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques*, 79-118.

Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & De Castro, M. L. (2012). Study of sample preparation for metabolomic profiling of human saliva by liquid chromatography–time of flight/mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, *1248*, 178-181.

Armağan, Ö. (2009). Development and validation of selective spectrophotometric methods for the determination of pregabalin in pharmaceutical preparation. *Chinese Journal of Chemistry*, *27*(4), 781-786.

Asahi, R. Y. O. J. I., Morikawa, T. A. K. E. S. H. I., Ohwaki, T., Aoki, K., & Taga, Y. (2001). Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *science*, *293*(5528), 269-271.

Atta, A. M., Salama, I., Gomaa, M. S., & Mostafa, S. (2016). A New HPLC Method for Simultaneous Determination of Atenolol and Pregabalin in Dosage Forms and in Human Urine. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, *6*(1).

Attal, N. (2019). Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Revue neurologique*, *175*(1-2), 46-50.

Bali, A., & Gaur, P. (2011). A novel method for spectrophotometric determination of pregabalin in pure form and in capsules. *Chemistry Central Journal*, *5*, 1-7.

Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S. L., Letts, V. A., Brodbeck, J., ... & Rees, M. (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience*, *21*(16), 6095-6104.

Bauer, C. S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., ... & Dolphin, A. C. (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit α2δ-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the α2δ ligand pregabalin. *Journal of Neuroscience*, *29*(13), 4076-4088.

Bauer, C. S., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Lujan, R., Dickenson, A. H., & Dolphin, A. C. (2010). The anti-allodynic α2δ ligand pregabalin inhibits the trafficking of the calcium channel α2δ-1 subunit to presynaptic terminals in vivo. *Biochemical Society Transactions*, *38*(2), 525-528.

Beamer, E., Kuchukulla, M., Boison, D., & Engel, T. (2021). ATP and adenosine—Two players in the control of seizures and epilepsy development. *Progress in neurobiology*, *204*, 102105.

Ben-Menachem, E. (2004). Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia*, *45*, 13-18.

Ben-Menachem, E., Persson, L. I., & Hedner, T. (1992). Selected CSF biochemistry and gabapentin concentrations in the CSF and plasma in patients with partial seizures after a single oral dose of gabapentin. *Epilepsy research*, *11*(1), 45-49.

Ben-Menachem, E. (2004). Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia*, *45*, 13-18.

Bendszus, M., Weijers, H. G., Wiesbeck, G., Warmuth-Metz, M., Bartsch, A. J., Engels, S., ... & Solymosi, L. (2001). Sequential MR imaging and proton MR spectroscopy in patients who underwent recent detoxification for chronic

alcoholism: correlation with clinical and neuropsychological data. *American Journal of Neuroradiology*, *22*(10), 1926-1932.

Berry, D., & Millington, C. (2005). Analysis of pregabalin at therapeutic concentrations in human plasma/serum by reversed-phase HPLC. *Therapeutic Drug Monitoring*, *27*(4), 451-456.

Best, J. A., Nijhout, H. F., & Reed, M. C. (2009). Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, *6*, 1-20.

Bialer, M., Johannessen, S. I., Kupferberg, H. J., Levy, R. H., Perucca, E., & Tomson, T. (2007). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eigth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy research*, *73*(1), 1-52.

Bockbrader, H. N., Radulovic, L. L., & Strand, J. C. (2000). Regional differences in the colonic absorption of pregabalin [abstract no. CI-1008]. *Pharm Sci*, *2*, 2080.

Bockbrader, H. N., Radulovic, L. L., Posvar, E. L., Strand, J. C., Alvey, C. W., Busch, J. A., ... & Wesche, D. L. (2010). Clinical pharmacokinetics of pregabalin in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *50*(8), 941-950.

Bockbrader, H. N., Wesche, D., Miller, R., Chapel, S., Janiczek, N., & Burger, P. (2010). A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. *Clinical Pharmacokinetics*, *49*, 661-669.

Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., & Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, *136*(3), 380-387.

Brusilow, S. W., & Maestri, N. E. (1996). Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy. *Advances in Pediatrics*, *43*(1), 127-170.

Bryans, J. S., & Wustrow, D. J. (1999). 3-Substituted GABA analogs with central nervous system activity: A review. *Medicinal Research Reviews*, *19*(2), 149-177.

Corrigan, B.W. (2001). Metabolic disposition of pregabalin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, *69*, 18.

Calandre, E. P., Rico-Villademoros, F., & Slim, M. (2016). Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *16*(11), 1263-1277.

Cantí, C., Davies, A., & Dolphin, A. C. (2003). Calcium channel α2δ subunits: structure, functions and target site for drugs. *Current Neuropharmacology*, *1*(3), 209-217.

Caporal-Gautier, J. (1992). Guide de validation analytique, Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma pratiques*, *23*, 205.

Castro, C., Briggs, W., Paschos, G. K., FitzGerald, G. A., & Griffin, J. L. (2015). A metabolomic study of adipose tissue in mice with a disruption of the circadian system. *Molecular BioSystems*, *11*(7), 1897-1906.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 521-555.

Chai, G. S., Jiang, X., Ni, Z. F., Ma, Z. W., Xie, A. J., Cheng, X. S., ... & Liu, G. P. (2013). Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *Journal of Neurochemistry*, *124*(3), 388-396.

Chen, S., Hoene, M., Li, J., Li, Y., Zhao, X., Häring, H. U., ... & Lehmann, R. (2013). Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1298*, 9-16.

Chen, Y., Xu, J., Zhang, R., & Abliz, Z. (2016). Methods used to increase the comprehensive coverage of urinary and plasma metabolomes by MS. *Bioanalysis*, *8*(9), 981-997.

Chiang, J. Y. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology*, *3*(3), 1191.

Chincholkar, M. (2020). Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice. *British journal of pain*, *14*(2), 104-114.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., ... & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 1-19.

Cowen, P. J., & Browning, M. (2015). What has serotonin to do with depression?. *World Psychiatry*, *14*(2), 158.

Crawford, P., Ghadiali, E., Lane, R., Blumhardt, L., & Chadwick, D. (1987). Gabapentin as an antiepileptic drug in man. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *50*(6), 682-686.

Čuperlović-Culf, M., Barnett, D. A., Culf, A. S., & Chute, I. (2010). Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today*, *15*(15-16), 610-621.

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1-105.

Davis, K. E., Straff, D. J., Weinstein, E. A., Bannerman, P. G., Correale, D. M., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1998). Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *Journal of Neuroscience*, *18*(7), 2475-2485.

De Hoffmann, E., Charette, J., & Stroobant, V. (1997). Mass spectrometry: Principles and applications.

Denoroy, L., Zimmer, L., Renaud, B., & Parrot, S. (2013). Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: a review. *Journal of Chromatography B, 927*, 37-53.

Dettmer, K., Almstetter, M. F., Appel, I. J., Nürnberger, N., Schlamberger, G., Gronwald, W., ... & Oefner, P. J. (2010). Comparison of serum versus plasma collection in gas chromatography–Mass spectrometry-based metabolomics. *Electrophoresis*, *31*(14), 2365-2373.

Di Nicola, M., Martinotti, G., Tedeschi, D., Frustaci, A., Mazza, M., Sarchiapone, M., ... & Janiri, L. (2010). Pregabalin in outpatient detoxification of subjects with mild-to-moderate alcohol withdrawal syndrome. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, *25*(3), 268-275.

DiBonaventura, M. D., Sadosky, A., Concialdi, K., Hopps, M., Kudel, I., Parsons, B., ... & Farrar, J. T. (2017). The prevalence of probable neuropathic pain in the US: results from a multimodal general-population health survey. *Journal of Pain Research*, 2525-2538.

Dooley, D. J., Donovan, C. M., & Pugsley, T. A. (2000). Stimulus-dependent modulation of [3H] norepinephrine release from rat neocortical slices by gabapentin and pregabalin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *295*(3), 1086-1093.

Dooley, D. J., Mieske, C. A., & Borosky, S. A. (2000). Inhibition of K+-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neuroscience Letters*, *280*(2), 107-110.

Douša, M., Gibala, P., & Lemr, K. (2010). Liquid chromatographic separation of pregabalin and its possible impurities with fluorescence detection after

postcolumn derivatization with o-phtaldialdehyde. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *53*(3), 717-722.

Einarsdottir, S., & Björnsson, E. (2008). Pregabalin as a probable cause of acute liver injury. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *20*(10), 1049.

Eisenberg, E., River, Y., Shifrin, A., & Krivoy, N. (2007). Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. *Drugs*, *67*, 1265-1289.

Elliott, S. P., Burke, T., & Smith, C. (2017). Determining the toxicological significance of pregabalin in fatalities. *Journal of Forensic Sciences*, *62*(1), 169-173.

Emwas, A. H., Luchinat, C., Turano, P., Tenori, L., Roy, R., Salek, R. M., ... & Wishart, D. S. (2015). Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics*, *11*, 872-894.

Epshtein, N. A. (2004). Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *38*(4).

Ettre, L. S. (2003). MS Tswett and the invention of chromatography: on the occasion of the centenary of the invention of chromatography, this month's" Milestones in Chromatography" column chronicles the life and activities of its inventor, his struggle for acceptance, and, finally, the triumph of his technique.(Milestone in Chromatography). *LC-GC North America*, *21*(5), 458-465.

Fava, M., Mulroy, R., Alpert, J., Nierenberg, A. A., & Rosenbaum, J. F. (1997). Emergence of adverse events following discontinuation of treatment with extended-release venlafaxine. *American Journal of Psychiatry*, *154*(12), 1760-1762.

Fayaz, A., Croft, P., Langford, R. M., Donaldson, L. J., & Jones, G. T. (2016). Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. *BMJ Open*, *6*(6), e010364.

Fernández-Peralbo, M. A., & De Castro, M. L. (2012). Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *41*, 75-85.

Fernstrom, J. D. (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiological Reviews*, *63*(2), 484-546.

Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, *2*(3), 155-168.

Finberg, J., & Gillman, P. (2011). Pharmacology of MAO-B inhibitors and the cheese reaction. *International Review of Neurobiology*, 169-190.

Fink, K., Dooley, D. J., Meder, W. P., Suman-Chauhan, N., Duffy, S., Clusmann, H., & Göthert, M. (2002). Inhibition of neuronal Ca2+ influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology*, *42*(2), 229-236.

Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., ... & Wallace, M. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *14*(2), 162-173.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497-509.

Food and Drug Administration. (1994). Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods. *Cited November*.

Gaskin, D. J., & Richard, P. (2012). The economic costs of pain in the United States. *The Journal of Pain*, *13*(8), 715-724.

Gass, J. T., & Olive, M. F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical Pharmacology*, *75*(1), 218-265.

Gee, N. S., Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Offord, J., Thurlow, R., & Woodruff, G. N. (1996). The Novel Anticonvulsant Drug, Gabapentin (Neurontin), Binds to the α2δ Subunit of a Calcium Channel (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5768-5776.

Gehmlich, K., Dodd, M. S., Allwood, J. W., Kelly, M., Bellahcene, M., Lad, H. V., ... & Dunn, W. B. (2015). Changes in the cardiac metabolome caused by perhexiline treatment in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Molecular BioSystems*, *11*(2), 564-573.

Gerasimenko, M., Cherepanov, S. M., Furuhara, K., Lopatina, O., Salmina, A. B., Shabalova, A. A., ... & Higashida, H. (2020). Nicotinamide riboside supplementation corrects deficits in oxytocin, sociability and anxiety of CD157 mutants in a mouse model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, *10*(1), 10035.

Gika, H. G., Theodoridis, G. A., & Wilson, I. D. (2008). Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *Journal of Chromatography A*, *1189*(1-2), 314-322.

Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Wingate, J. E., & Wilson, I. D. (2007). Within-day reproducibility of an HPLC− MS-based method for metabonomic analysis: application to human urine. *Journal of Proteome Research*, *6*(8), 3291-3303.

Gomes, T., Juurlink, D. N., Antoniou, T., Mamdani, M. M., Paterson, J. M., & van den Brink, W. (2017). Gabapentin, opioids, and the risk of opioid-related death: a population-based nested case–control study. *PLoS medicine*, *14*(10), e1002396.

Gong, H., Du, X., Wu, L., Wei, J., Tan, Q., Zhao, R., ... & Zhao, L. (2021). Discontinuation Syndrome of Extended-Release Venlafaxine during the COVID-19 Epidemic. *Psychiatria Danubina*, *33*(1), 121-122.

Gong, H. C., Hang, J., Kohler, W., Li, L., & Su, T. Z. (2001). Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel α2δ subunit subtypes. *The Journal of Membrane Biology*, *184*, 35-43.

González-Bueno, J., Calvo-Cidoncha, E., Desongles-Corrales, T., Rubio, M. S., de Vega, E. C., & Bautista-Paloma, F. J. (2015). DI-024 off-label use of gabapentin and pregabalin in a tertiary hospital.

Green, J. M. (1996). Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, *68*(9), 305A-309A.

Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, *1*(20), 05.

Gujral, R. S., Haque, S. M., & Kumar, S. (2009). A novel method for the determination of pregabalin in bulk pharmaceutical formulations and human urine samples. *Afr J Pharm Pharmacol*, *3*(6), 327-334.

Gujral, R. S., Haque, S. M., & Shanker, P. (2009). Development and validation of pregabalin in bulk, pharmaceutical formulations and in human urine samples by UV spectrophotometry. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, *5*(2), 175.

Gujral, R. S., Haque, S. M., & Kumar, S. (2009). A novel method for the determination of pregabalin in bulk pharmaceutical formulations and human urine samples. *Afr J Pharm Pharmacol*, *3*(6), 327-334..

Gurtovenko, E. A., & Kostyk, R. I. (1989). Fraunhofer spectrum and a system of solar oscillator strengths. *Kiev Izdatel Naukova Dumka*.

Halama, A. (2014). Metabolomics in cell culture—A strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *564*, 100-109.

Hamilton, R. J., & Sewell, P. A. (1982). Chromatographic theory. In *Introduction to high performance liquid chromatography* (pp. 13-41). Dordrecht: Springer Netherlands.

Hammad, S. F., & Abdallah, O. M. (2012). Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of pregabalin in pharmaceutical formulation using ascorbic acid and salicylaldehyde. *Journal of American Science*, *8*(12), 118-124.

Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(6), 710-715.

Hennemann-Krause, L., & Sredni, S. (2016). Systemic drug therapy for neuropathic pain. *Revista Dor*, *17*, 91-94.

Hoppa, M. B., Lana, B., Margas, W., Dolphin, A. C., & Ryan, T. A. (2012). α2δ expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature*, *486*(7401), 122-125.

Hoppe, C., Rademacher, M., Hoffmann, J. M., Schmidt, D., & Elger, C. E. (2008). Bodyweight gain under pregabalin therapy in epilepsy: mitigation by counseling patients?. *Seizure*, *17*(4), 327-332.

Huang, C. W., Huang, C. C., & Wu, S. N. (2006). The Opening Effect of Pregabalin on ATP-Sensitive Potassium Channels in Differentiated Hippocampal Neuron–derived H19-7 Cells. *Epilepsia*, *47*(4), 720-726..

Huckle, R. (2004). Pregabalin (Pfizer). *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, *5*(1), 82-89.

ICH. (2023). *Quality guidelines*. Retrieved from https://ich.org/page/quality-guidelines

ICH, H. T. G. (1994, October). Text on Validation of Analytical Procedures. In *International Conference on Harmonization, Geneva* (pp. 1-5).

IFPMA, G. (1995). ICH, Text on Validation of Analytical Procedures, ICH–Q2A. In *International Conference on Harmonisation* (pp. 2-3).

Ivanov, S. V., Ward, J. M., Tessarollo, L., McAreavey, D., Sachdev, V., Fananapazir, L., ... & Lerman, M. I. (2004). Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the Cacna2d2 gene. *The American Journal of Pathology*, *165*(3), 1007-1018.

Jiye, A., Trygg, J., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., ... & Moritz, T. (2005). Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem*, *77*(24), 8086-8094.

Jones, D. L., & Sorkin, L. S. (1998). Systemic gabapentin and S (+)-3-isobutyl-γ-aminobutyric acid block secondary hyperalgesia. *Brain Research*, *810*(1-2), 93-99.

Kannapan, N., Nayak, S. P., Venkatachalam, T., & Prabhakaran, V. (2010). Analytical RP-HPLC method for development and validation of pregabalin and methylcobalamine in combined capsule formulation.

Kasawar, G. B., & Farooqui, M. N. (2010). Development and validation of HPLC method for the determination of pregabalin in capsules. *Indian Journal of Pharmaceutical sciences, 72*(4), 517.

Krizman-Genda, E., González, M. I., Zelenaia, O., & Robinson, M. B. (2005). Evidence that Akt mediates platelet-derived growth factor-dependent increases in activity and surface expression of the neuronal glutamate transporter, EAAC1. *Neuropharmacology, 49*(6), 872-882.

Kugler, P., & Schmitt, A. (1999). Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia*, *27*(2), 129-142.

Kutty, S. V., Haribabu, Y., & MB, A. (2023). Method Development and Validation of Simultaneous Estimation of Pregabalin and Etoricoxib in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form by UV-Visible Spectroscopy. *Indian Drugs*, *60*(7).

Kweon, T. D., Kim, J. Y., Kwon, I. W., Choi, J. B., & Lee, Y. W. (2011). Participation of KATP Channels in the Antinociceptive Effect of Pregabalin in Rat Formalin Test. *The Korean Journal of Pain*, *24*(3), 131-136.

Lanneau, C., Green, A., Hirst, W. D., Wise, A., Brown, J. T., Donnier, E., ... & Pangalos, M. N. (2001). Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology, 41*(8), 965-975.

Lee, D. W., Kim, S. Y., Lee, T., Nam, Y. K., Ju, A., Woo, D. C., ... & Choe, B. Y. (2012). Ex vivo detection for chronic ethanol consumption-induced neurochemical changes in rats. *Brain Research, 1429*, 134-144.

León, Z., García-Cañaveras, J. C., Donato, M. T., & Lahoz, A. (2013). Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis, 34*(19), 2762-2775.

Lewis, M. (2002). *Advanced Chemistry Through Diagrams*. Oxford University Press.

Li, C. Y., Song, Y. H., Higuera, E. S., & Luo, Z. D. (2004). Spinal dorsal horn calcium channel α2δ-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *Journal of Neuroscience*, *24*(39), 8494-8499.

Li, C. Y., Zhang, X. L., Matthews, E. A., Li, K. W., Kurwa, A., Boroujerdi, A., ... & Luo, Z. D. (2006). Calcium channel α2δ1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain*, *125*(1-2), 20-34.

Link, H., Fuhrer, T., Gerosa, L., Zamboni, N., & Sauer, U. (2015). Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. *Nature Methods*, *12*(11), 1091-1097.

Lockwood, P. A., Pauer, L., Scavone, J. M., Allard, M., Mendes da Costa, L., Alebic-Kolbah, T., ... & Chew, M. L. (2016). The pharmacokinetics of pregabalin in breast milk, plasma, and urine of healthy postpartum women. *Journal of Human Lactation*, *32*(3), NP1-NP8.

Lotarski, S., Hain, H., Peterson, J., Galvin, S., Strenkowski, B., Donevan, S., & Offord, J. (2014). Anticonvulsant activity of pregabalin in the maximal electroshock-induced seizure assay in α2δ1 (R217A) and α2δ2 (R279A) mouse mutants. *Epilepsy Research*, *108*(5), 833-842.

Lotarski, S. M., Donevan, S., El-Kattan, A., Osgood, S., Poe, J., Taylor, C. P., & Offord, J. (2011). Anxiolytic-like activity of pregabalin in the Vogel conflict test in α2δ-1 (R217A) and α2δ-2 (R279A) mouse mutants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *338*(2), 615-621.

Maillet, S., Vion-Dury, J., Confort-Gouny, S., Nicoli, F., Lutz, N. W., Viout, P., & Cozzone, P. J. (1998). Experimental protocol for clinical analysis of cerebrospinal fluid by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *Brain Research Protocols*, *3*(2), 123-134.

Mapplebeck, J. C., Beggs, S., & Salter, M. W. (2017). Molecules in pain and sex: a developing story. *Molecular Brain, 10*, 1-8.

Marais, E., Klugbauer, N., & Hofmann, F. (2001). Calcium channel α2δ subunits—structure and gabapentin binding. *Molecular Pharmacology, 59*(5), 1243-1248.

Martinc, B., Grabnar, I., Mrhar, A., & Vovk, T. (2010). Rapid high-performance liquid chromatography method for determination of pregabalin in a pharmaceutical dosage form following derivatization with fluorescamine. *Journal of AOAC International, 93*(4), 1069-1076.

Martinc, B., Roškar, R., Grabnar, I., & Vovk, T. (2014). Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B, 962*, 82-88.

Martinez, J. A., Kasamatsu, M., Rosales-Hernandez, A., Hanson, L. R., Frey, W. H., & Toth, C. C. (2012). Retracted: Comparison of central versus peripheral delivery of pregabalin in neuropathic pain states. *Molecular Pain, 8*, 1744-8069.

Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., ... & Yin, Y. (2017). The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, *49*, 2091-2098.

McClelland, D., Evans, R. M., Barkworth, L., Martin, D. J., & Scott, R. H. (2004). A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. *BMC Pharmacology*, *4*, 1-26.

Micheli, V., Camici, M., G Tozzi, M., L Ipata, P., Sestini, S., Bertelli, M., & Pompucci, G. (2011). Neurological disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *11*(8), 923-947.

Mj, F. (2006). Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*, 17537-17542.

Moghaddam, B., & Homayoun, H. (2008). Divergent plasticity of prefrontal cortex networks. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 42-55.

Morris III, G. L. (1995). Efficacy and tolerability of gabapentin in clinical practice. *Clinical Therapeutics*, *17*(5), 891-900.

Emre, M. (2018). Voltaj kapılı kalsiyum kanalları ve moleküller özellikleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *27*(1), 1-17.

Najam, R., Shah, G. M., & Andrabi, S. M. A. (2013). Kinetic spectrophotometric determination of an important pharmaceutical compound, pregabalin. *Journal of Analytical Science and Technology*, *4*, 1-9.

Nakamura, Y., Iga, K., Shibata, T., Shudo, M., & Kataoka, K. (1993). Glial plasmalemmal vesicles: a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia*, *9*(1), 48-56.

Navneet, K., Karan, M., Rishabh, N., Kunal, N., Arti, T., Road, F., & Kalan, G. (2010). A sensitive spectrophotometric method for the determination of pregabalin in pure drug and pharmaceutical formulations through benzoylation. *IRJP*, *1*(1), 175-180.

Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, *29*(11), 1181-1189.

Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, *16*(9), 373-378.

Önal, A., & Sagirli, O. (2009). Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical preparation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *72*(1), 68-71.

Panel, E. (2003). Abuse liability assessment of CNS drugs: conclusions, recommendations, and research priorities. *Drug and Alcohol Dependence*, *70*(3 Suppl), S107-S114.

Park, J., Yu, Y. P., Zhou, C. Y., Li, K. W., Wang, D., Chang, E., ... & Luo, Z. D. (2016). Central mechanisms mediating thrombospondin-4-induced pain states. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(25), 13335-13348.

Pasikanti, K. K., Ho, P. C., & Chan, E. C. (2008). Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, *22*(19), 2984-2992.

Patience, G. S. (2017). *Experimental methods and instrumentation for chemical engineers*. Elsevier.

Patil, D. D., Patil, M. S., & Wani, Y. B. (2016). Spectrophotometric method for pregabalin determination: An experimental design approach for method development. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, *21*, 31-37.

Perucca, E. (2006). Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *61*(3), 246-255.

Pollak, N., Dölle, C., & Ziegler, M. (2007). The power to reduce: pyridine nucleotides–small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, *402*(2), 205-218.

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., ... & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, *161*(9), 1976-1982.

Rizk, M., Elshahed, M. S., Attiab, A. K., & Farag, A. S. (2015). Spectrophotometric Determination of Pregabalin Using N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine, as Uv Labeling Reagent. *IJPBS*, *5*(2), 152-162.

Rosas-Rodríguez, J. A., & Valenzuela-Soto, E. M. (2021). The glycine betaine role in neurodegenerative, cardiovascular, hepatic, and renal diseases: Insights into disease and dysfunction networks. *Life Sciences*, *285*, 119943.

Rowbotham, M. C. (2015). Tricyclic antidepressants and opioids—better together?. *Pain*, *156*(8), 1373-1374.

Ryu, J. H., Lee, P. B., Kim, J. H., Do, S. H., & Kim, C. S. (2012). Effects of pregabalin on the activity of glutamate transporter type 3. *British Journal of Anaesthesia*, *109*(2), 234-239..

Satzinger, G. (1994). Antiepileptics from gamma-aminobutyric acid. *Arzneimittel-Forschung*, *44*(3), 261-266.

Schifano, F. (2014). Misuse and abuse of pregabalin and gabapentin: cause for concern?. *CNS Drugs*, *28*(6), 491-496.

Schjerning, O., Rosenzweig, M., Pottegård, A., Damkier, P., & Nielsen, J. (2016). Abuse potential of pregabalin: a systematic review. *CNS Drugs*, *30*, 9-25.

Schreiber, M. (1979). Years of Chromatography-an Historical Dialogue, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford New York.

Schwan, S., Sundström, A., Stjernberg, E., Hallberg, E., & Hallberg, P. (2010). A signal for an abuse liability for pregabalin—results from the Swedish spontaneous adverse drug reaction reporting system. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *66*, 947-953.

Serpell, M. G., & Neuropathic Pain Study Group. (2002). Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*, *99*(3), 557-566.

Shaalan, R. A. A. (2010). Spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of pregabalin in capsules and urine samples. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, *6*(3), 260.

Sher, N., Fatima, N., Perveen, S., Siddiqui, F. A., & Wafa Sial, A. (2015). Pregabalin and tranexamic acid evaluation by two simple and sensitive spectrophotometric methods. *International Journal of Analytical Chemistry*, *2015*(1), 241412.

Shigeri, Y., Seal, R. P., & Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews*, *45*(3), 250-265.

Shinu, P., Morsy, M. A., Nair, A. B., Mouslem, A. K. A., Venugopala, K. N., Goyal, M., ... & Deb, P. K. (2022). Novel therapies for the treatment of neuropathic pain: potential and pitfalls. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(11), 3002.

Shupler, M. S., Kramer, J. K., Cragg, J. J., Jutzeler, C. R., & Whitehurst, D. G. (2019). Pan-Canadian estimates of chronic pain prevalence from 2000 to 2014: a repeated cross-sectional survey analysis. *The Journal of Pain*, *20*(5), 557-565.

Smith, A. D., & Refsum, H. (2016). Homocysteine, B vitamins, and cognitive impairment. *Annual Review of Nutrition*, *36*(1), 211-239.

Smith, B. H., Higgins, C., Baldacchino, A., Kidd, B., & Bannister, J. (2012). Substance misuse of gabapentin. *British Journal of General Practice*, *62*(601), 406-407.

Soares, A. C., Leite, R., Tatsuo, M. A., & Duarte, I. D. (2000). Activation of ATP-sensitive K+ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *European Journal of Pharmacology*, *400*(1), 67-71.

Souri, E., Eskandari, M., Tehrani, M. B., Adib, N., & Ahmadkhaniha, R. (2013). HPLC determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical dosage forms after derivatization with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene. *Asian Journal of Chemistry*, *25*(13), 7332-7336.

Sowjanya, K., Thejaswini, J. C., Gurupadayya, B. M., & Indu Priya, M. (2011). Spectrophotometric determination of Pregabalin using 1, 2-Napthaquinone-4-sulfonic acid Sodium and 2, 4 dinitrophenyl hydrazine in pharmaceutical dosage form. *Der Pharmacia Lettre*, *3*(2), 47-56.

Sowjanya, K., Thejaswini, J. C., Gurupadayya, B. M., & Indupriya, M. (2011). Spectrophotometric determination of pregabalin using Gibb's and MBTH reagent in pharmaceutical dosage form. *Der Pharma Chemica*, *3*(1), 112-122.

Spina, E., & Perugi, G. (2004). Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic Disorders*, *6*(2), 57-75.

Su, T. Z., Feng, M. R., & Weber, M. L. (2005). Mediation of highly concentrative uptake of pregabalin by L-type amino acid transport in Chinese hamster ovary and Caco-2 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *313*(3), 1406-1415..

Sc, S. (2009). Martindale: the complete drug reference.

Saude, E. J., & Sykes, B. D. (2007). Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics*, *3*(1), 19-27.

Takahashi, Y., Nishimura, T., Higuchi, K., Noguchi, S., Tega, Y., Kurosawa, T., ... & Tomi, M. (2018). Transport of pregabalin via L-type amino acid transporter 1 (SLC7A5) in human brain capillary endothelial cell line. *Pharmaceutical Research*, *35*(12), 246.

Takeda, I., Stretch, C., Barnaby, P., Bhatnager, K., Rankin, K., Fu, H., ... & Slupsky, C. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, *22*(6), 577-584.

Tassone, D. M., Boyce, E., Guyer, J., & Nuzum, D. (2007). Pregabalin: a novel γ-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. *Clinical Therapeutics*, *29*(1), 26-48.

Taylor, C. P. (2004). The biology and pharmacology of calcium channel a2-d proteins. *CNS Drug Rev*, *10*, 159-164.

Taylor, C. P., Vartanian, M. G., Andruszkiewicz, R., & Silverman, R. B. (1992). 3-alkyl GABA and 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents. *Epilepsy Research*, *11*(2), 103-110.

Taylor, C. P., Vartanian, M. G., Po-Wai, Y., Bigge, C., Suman-Chauhan, N., & Hill, D. R. (1993). Potent and stereospecific anticonvulsant activity of 3-isobutyl GABA relates to in vitro binding at a novel site labeled by tritiated gabapentin. *Epilepsy Research*, *14*(1), 11-15.

Thorpe, A. J., & Taylor, C. P. (2007). Calcium channel α2–δ ligands: gabapentin and pregabalin.

Toker, P. D. S., & Çiçek, G. (2019). Pregabalinin Farmasötik Preparatlarda Analizi İçin Yeni Bir HPLC Yöntemi.

Tomasi, D. G., Wiers, C. E., Shokri-Kojori, E., Zehra, A., Ramirez, V., Freeman, C., ... & Volkow, N. D. (2019). Association between reduced brain glucose metabolism and cortical thickness in alcoholics: evidence of neurotoxicity. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *22*(9), 548-559.

Toth, C. (2014). Pregabalin: latest safety evidence and clinical implications for the management of neuropathic pain. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, *5*(1), 38-56.

Tran-Van-Minh, A., & Dolphin, A. C. (2010). The α2δ ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit α2δ-2. *Journal of Neuroscience*, *30*(38), 12856-12867.

Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., ... & Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, *156*(6), 1003-1007.

Uchida, T., Funamizu, T., Chen, M., Tanaka, Y., & Ishimori, K. (2018). Heme binding to porphobilinogen deaminase from Vibrio cholerae decelerates the formation of 1-hydroxymethylbilane. *ACS Chemical Biology*, *13*(3), 750-760.

Urquhart, L. (2018). Market watch: Top drugs and companies by sales in 2017. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(4), 232-233.

U.S. Food and Drug Administration. (1987). General Principles of Validation. Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research

Van Hecke, O. A. S. K. R., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., & Torrance, N. (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *PAIN®*, *155*(4), 654-662.

Verdin, E. (2015). NAD+ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, *350*(6265), 1208-1213.

Vermeij, T. A. C., & Edelbroek, P. M. (2004). Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phtaldialdehyde and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, *810*(2), 297-303.

Walash, M. I., Belal, F., El-Enany, N., & El-Maghrabey, M. H. (2011). Simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of pregabalin in capsules through derivatization with fluorescamine. *Luminescence*, *26*(5), 342-348.

Want, E. J., Wilson, I. D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R. S., Shockcor, J., ... & Nicholson, J. K. (2010). Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC–MS. *Nature Protocols*, *5*(6), 1005-1018.

Wedge, D. C., Allwood, J. W., Dunn, W., Vaughan, A. A., Simpson, K., Brown, M., ... & Goodacre, R. (2011). Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Analytical Chemistry*, *83*(17), 6689-6697.

Wegscheider, W. (1996). Validation of analytical methods. In *Accreditation and quality assurance in analytical chemistry* (pp. 135-158). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wesche, D., & Bockbrader, H. (2005). A pharmacokinetic comparison of pregabalin and gabapentin. *The Journal of Pain*, *6*(3), S29.

Williams, C. D., Al-Jammali, Z., & Herink, M. C. (2023). Gabapentinoids for pain: a review of published comparative effectiveness trials and data submitted to the FDA for approval. *Drugs*, *83*(1), 37-53.

Williams, R. J., & Kirby, H. (1948). Paper chromatography using capillary ascent. *Science*, *107*(2784), 481-483.

Wishart, D. S., Lewis, M. J., Morrissey, J. A., Flegel, M. D., Jeroncic, K., Xiong, Y., ... & Li, L. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B*, *871*(2), 164-173.

Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, *1*(1), 92-107.

Wu, T., Jing, Q. F., Ye, B., & Shen, Y. J. (2010). Determination of Pregabalin by HPLC with precolumn derivatization using 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, *2*, 350-353.

Yada, H., Murata, M., Shimoda, K., Yuasa, S., Kawaguchi, H., Ieda, M., ... & Fukuda, K. (2007). Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type Ca2+ channels in the heart. *Circulation Research*, *101*(1), 69-77.

Yousefi-Manesh, H., Shirooie, S., Noori, T., Sheibani, M., Tavangar, S. M., Hemmati, S., ... & Dehpour, A. R. (2023). Spermidine reduced neuropathic pain in chronic constriction injury-induced peripheral neuropathy in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *37*(4), 779-785.

Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., Belcredi, P., Möller, G., Prehn, C., ... & Wang-Sattler, R. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PloS one*, *6*(7), e21230.

Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological reviews*, *67*(4), 821-870.

Zareba, G. (2008). New treatment options in the management of fibromyalgia: role of pregabalin. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *4*(6), 1193-1201.

Zelaya, C. E., Dahlhamer, J. M., Lucas, J. W., & Connor, E. M. (2020). Chronic pain and high-impact chronic pain among US adults, 2019.

Zergui, A., Chefirat, B., Bendjamaa, A., Benabdelouahab, S., & Rezk-kallah, H. (2023). Qualitative determination of pregabalin in urine by spectrophotometric method. *Toxicologie Analytique et Clinique*, *35*(3), 206-216.

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, *75*(4), 1079-1088.

## EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
Graduate School of Health Sciences

**ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU** [1]

| | |
|---|---|
| Öğrencinin Adı ve Soyadı | Burak BAYRAK |
| Öğrencinin Numarası | [redacted] |
| Ana Bilim Dalı | **Analitik Kimya** |
| Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü | Doktora |

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

| **Bölümler** | **Benzerlik Oranı** | **Maksimum Benzerlik Oranları** |
|---|---|---|
| **I.** Giriş | %0 | % 15 |
| **II.** Genel Bilgiler | %5 | % 35 |
| **III.** Materyal ve Metod | %9 | % 35 |
| **IV.** Bulgular | %4 | % 15 |
| **V.** Tartışma | %0 | % 20 |

***Not:*** *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

## EK-2. Etik Kurul Onay Formu

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : E-75296309-050.01.04-2200103658 04.04.2022
Konu : HADYEK Kararı.

ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 29.03.2022 tarihli ve E-93722986-000-2200100271 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 29.03.2022 tarihli ve 2022/4 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 66 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

**TOPLANTI TARİHİ :** 29.03.2022

**TOPLANTI SAYISI :** 2022/4

**KARAR N0 66:** Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülecek olan **"Nöropatik Ağrıda Kullanılan Pregabalin Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerinin Geliştirilip Valide Edilmesi ve Tavşanlarda Kullanımı Esnasındaki Metabolom Profilinin Belirlenmesi"** isimli araştırma çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 29.03.2022 tarihli ve E-93722986-000-2200100271 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.