PİRASETAM ETKEN MADDESİNİN FARKLI ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLİP VALİDE EDİLMESİ VE BAŞ DÖNMESİ ŞİKAYETİ OLAN HASTALARIN PİRASETAM KULLANIMI ESNASINDA METABOLOM PROFİLLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Büşra YÜKSEL

Eczacılık Analitik KimyaAna Bilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi-2025

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

PİRASETAM ETKEN MADDESİNİN FARKLI ORTAMLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLİP VALİDE EDİLMESİ VE BAŞ DÖNMESİ ŞİKAYETİ OLAN HASTALARIN PİRASETAM KULLANIMI ESNASINDA METABOLOM PROFİLLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Büşra YÜKSEL

Eczacılık Analitik KimyaAna Bilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

ERZURUM
2025

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**

TEŞEKKÜR ..... **V**

ÖZET ..... **VI**

ABSTRACT ..... **VII**

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

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XIII**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Pirasetam 3

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 3

2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri 4

2.1.3. Farmakolojik Özellikleri 4

2.1.4.Vasküler Etki Mekanizması 5

2.1.5. Nöronal Etki Mekanizması 5

2.1.5.1. Nörotransmitterler 7

2.1.6. Klinik Kullanımı 8

2.1.6.1.Vertigo 8

2.1.6.2. Kortikal Miyoklonus 9

2.1.6.3. Bilişsel Bozukluklar 9

2.1.6.4. Disleksi 9

2.1.6.5. Orak Hücreli Anemi 10

2.1.7. Pirasetamın Reçetesiz Kullanımı 10

2.1.8. Pirasetam'ın Yan Etkileri 11

2.2. Metabolomiks 11

2.2.1. Hedeflenmiş ve Hedeflenmemiş Metabolomiks 14
2.2.2. Metabolom Analizinde Kütle Spektrofotometresi 15
2.3. Spektroskopi 16
2.3.1. Ultraviyole- Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi 17
2.4. Kromatografi 18
2.4.1. Sıvı Kromatografisi 20
2.4.1.1. HPLC 20
2.4.1.2. Normal Faz Kromatografisi 20
2.4.1.3. Ters Faz Kromatografisi 21
2.4.2. LC-MS 21
2.4.3. LC-MS/MS 23
2.4.4. LC-Q-TOF/MS 23
2.5. Validasyon 23
2.5.1. Validasyon Parametreleri 24
2.6. Literatür Özetleri 26
2.6.1. Spektroskopik Yöntemler 26
2.6.2. Kromatografik Yöntemler 27
2.6.2.1. Plazmadan Geliştirilen yöntemler 27
2.6.2.2. Standarttan Geliştirilen yöntemler 29
3. MATERYAL VE METOT 33
3.1. Kullanılan Kimyasallar 33
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Programlar 33
3.3. Deneysel Prosedür 35
3.3.1. Plazma Örneklerinin Toplanması 35
3.3.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi 36

3.3.2.1. Yöntem Şartları 36
3.3.2.2. Standart, Kalite Kontrol ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması 36
3.3.2.3. Yöntem Validasyonu 37
3.3.3. LC-MS/MS Yöntemi 37
3.3.3.1. Yöntem Şartları 37
3.3.3.2. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi 38
3.3.3.3. Pirasetam Standart Çalışma Çözeltileri ve Plazma Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması 38
3.3.3.4. Yöntem Validasyonu 39
3.3.4. Metabolomiks 39
3.3.4.1. LC-Q-TOF/MS Yöntem Şartları 39
3.3.4.2. Metabolomiks İçin Örnek Hazırlama 40
3.3.4.3. Veri Toplama, Ön İşleme, Özellik Tespiti ve İstatiksel Analiz 41
4. BULGULAR 43
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri Yöntem Bulguları 43
4.1.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık 43
4.1.2. Doğruluk ve Kesinlik 44
4.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ) 46
4.1.4. Analitik Geri Kazanım 46
4.2. LC-MS/MS Bulguları 48
4.2.1. Kütle Spektroskopi Bulguları 48
4.2.2. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık 48
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik 51
4.2.4. Gözlenebilme (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ) 52

4.2.5. Plazmadan Geri Kazanım (GK) 53
4.2.6. Gerçek Numunelere Uygulanması 54
4.3. Metabolomiks Bulguları 55
4.3.1. Metabolomik Analiz ve Metabolitleri Tanımlama 55
4.3.2. Metabolomik Yol Analizi 63
4.3.2.1. Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması 65
4.3.2.2. Arjinin Biyosentez 67
4.3.2.3. Glutatyon Metabolizması 69
4.3.2.4. Nitrojen Metabolizması 71
4.3.3. Biyobelirteç Keşfi 72
5. TARTIŞMA 74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 86
KAYNAKLAR 88
EKLER 111
EK-1. Etik Bildirim İntihal Beyan Formu 111
EK-2. Etik Kurul Onay Formu 112

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, akademik hayatım boyunca sadece hoca değil yeri geldiğinde anne şefkatiyle yaklaşan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na, süreç boyunca yardımlarını, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Fatma Demirkaya MİLOĞLU'na, hastaların temin edilmesi ve kan örneklerinin toplanmasında emeği geçen ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mevlana GÜL'e ve ekibine, destekleri için değerli hocam Sayın Prof. Dr. Alptuğ ATİLA'ya ve bölümdeki diğer tüm hocalarıma, değerli tez jürilerim Sayın Prof. Dr. Işıl AYDIN'a, Sayın Prof. Dr. Fırat AYDIN'a ve Sayın Doç. Dr. Rüstem Anıl UĞAN'a, çalışma arkadaşım Dr. Arş.Gör. Burak BAYRAK'a, bu süreçte desteklerini, motivasyon konuşmalarını, yardımlarını eksik etmeyen, heyecanımı, telaşımı, stresimi ve mutluluğumu paylaşan başta kayınvalidem olmak üzere eşimin değerli ailesine, beni bu günlere getiren, maddi manevi her türlü imkanı sağlayan, uzakta olsalar da desteklerini her zaman omuzlarımda hissettiğim, evladı olmaktan gurur duyduğum canım babam ve anneme, kardeşlerime, bu süreçte ondan çaldığım vakitler adına canım kızıma ve son olarak her pes edişimde beni yüreklendiren, benimle birlikte strese giren, benimle birlikte mutlu olan yol arkadaşım, hayattaki en büyük şansım eşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca projeme olan desteklerinden ötürü A.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve bu süreçte yardımları için A.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Büşra YÜKSEL

ÖZET

Pirasetam Etken Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilip Valide Edilmesi Ve Baş Dönmesi Şikayeti Olan Hastaların Pirasetam Kullanımı Esnasında Metabolom Profillerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı pirasetam miktar tayini için farmasötik preaparatlarda UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerini geliştirip valide etmek, baş dönmesi şikayeti ile hastaneye başvuran hastalara tedavi amaçlı Nootropil tablet verilen hastaların plazma örneklerinde LC-MS/MS yöntemiyle Pirasetam miktar tayin yöntemi geliştirip valide etmek ve LC-Q-TOF/MS yöntemiyle plazma metabolomik profillerini belirlemektir.

Materyal ve Metot: UV-Gör. Bölge spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotmetri yöntemleri geliştirildi ve absorbans ölçümleri sırasıyla 201 nm ve 204 nm dalga boylarında yapıldı. Plazma çalışmalarında, pirasetamın ekstraksiyonu için asetonitril kullanıldı. LC-MS/MS yöntem şartları optimize edildi. Pirasetam çözeltileri %0.03 TFA'lı metanolle hazırlandı. Yöntemde, mobil faz olarak asetonitril-su-formik asit (88:12:0,1, h/h/h) karışımı kullanıldı ve izokratik elüsyon uygulandı. İnsan plazmasında metabolom analizi için LC-Q-TOF/MS cihazı kullanıldı. Metabolom profillemede Mass Hunter B.02.00, XCMS, HMDB, KEGG ve METLIN yazılımları kullanıldı.

Bulgular: Geliştirilip valide edilen LC-MS/MS, UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri uygun doğruluk, kesinlik ve yüksek geri kazanım değerleri gösterdi. Plazmadan geri kazanım %86.785 ile %91.715 aralığında değişmekte idi. Metabolomiks çalışmasında ise kontrol grubu ile Grup 1 (ilaç verildikten 30 dk sonra alınan plazma) arasında 724 farklı m/z değeri, kontrol grubu ile Grup 2 (ilaç verildikten 60 dk sonra alınan plazma) arasında 2119 farklı m/z değeri belirlendi. 6/28'lik bir eşleşme ve 7.3192E-9'luk P değeriyle alanin-aspartat ve glutamat metabolizması etkilenen önemli yolaklardan biri oldu. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucu 0.926 AUC değerine sahip pikolinik asit en kuvvetli biyobelirteç adayı olarak belirlendi.

Sonuç: Yapılan hedeflenmemiş metabolomiks çalışma ile pirasetamın etki mekanizmasına dair yapılan çalışmalar desteklenmiş oldu ve ayrıca yeni bir yaklaşım getirildi. İleride elde edilen yüksek katlanma değerine sahip metabolitler ve belirlenen biyobelirteçler ile sonuçları güçlendirmek amacıyla ile hedeflenmiş metabolomik çalışma geliştirilebilir. Ayrıca geliştirilen UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin kalite kontrol amaçlı kullanılabileceği ve ayrıca geliştirilen LC-MS/MS yöntemiyle plazma örneklerinde pirasetam ilacının yüksek doğruluk ve kesinlikte belirlenebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: biyobelirteç, metabolomiks, pirasetam, spektrofotometre, validasyon

ABSTRACT

Development And Validation Of Analytical Methods For Quantitation Of Piracetam In Dıfferent Environment And Determination Of Changes In The Metabolom Profiles During The Use Of Piracetam Of Patients With Diagnosis Complaints

Aim: The aim of this study was to develop and validate UV-Visible Spectrophotometry and 1. First-Order Derivative Spectrophotometry methods for the determination of piracetam levels in pharmaceutical preparations, to develop and validate a method for the determination of piracetam levels in plasma samples from patients treated with Nootropil tablets for dizziness using LC-MS/MS, and to determine plasma metabolomic profiles using LC-Q-TOF/MS.

Material and method: UV-Visible region spectrophotometry and first-order derivative spectrophotometry methods were developed, and absorbance measurements were performed at 201 nm and 204 nm wavelengths, respectively. In plasma studies, acetonitrile was used for the extraction of piracetam. LC-MS/MS method conditions were optimized. Piracetam solutions were prepared with methanol containing 0.03% TFA. In the method, a mixture of acetonitrile-water-formic acid (88:12:0.1, v/v/v) was used as the mobile phase, and isocratic elution was applied. An LC-Q-TOF/MS device was used for metabolome analysis in human plasma. Mass Hunter B.02.00, XCMS, HMDB, KEGG, and METLIN software were used for metabolome profiling.

Results: The developed and validated LC-MS/MS, UV-Visible Spectrophotometry, and First Derivative Spectrophotometry methods showed appropriate accuracy, precision, and high recovery values. The recovery from plasma ranged from 86.785% to 91.715%. In the metabolomics study, 724 different m/z values were identified between the control group and Group 1 (plasma collected 30 minutes after drug administration), and 2,119 different m/z values were identified between the control group and Group 2 (plasma collected 60 minutes after drug administration). With a 6/28 match and a P-value of 7.3192E-9, alanine-aspartate and glutamate metabolism emerged as one of the significantly affected pathways. Additionally, the ROC analysis identified picolinic acid, with an AUC value of 0.926, as the strongest candidate biomarker.

Conclusion: The non-targeted metabolomics study conducted supported the studies on the mechanism of action of piracetam and also introduced a new approach. In the future, targeted metabolomics studies can be developed to strengthen the results with metabolites with high fold-up values and identified biomarkers. Additionally, it is believed that the developed UV-Visible Region Spectrophotometry and First-Order Derivative Spectrophotometry methods can be used for quality control purposes, and that the developed LC-MS/MS method can accurately and precisely determine the presence of piracetam in plasma samples.

KeyWords: biomarker, metabolomics, piracetam, spectrophotometer, validation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AUC : Area Under the Curve
BİB : Bilişsel İşlev Bozukluğu
BH : Bağıl hata
BOS : Beyin Omurilik Sıvısı
BSS : Bağıl Standart Sapma
EM : Elektromanyetik Spektrum
ESI : Elektro Sprey İyonizasyon
FAB : Hızlı Atom Bombardımanı
FD : Alan Desorpsiyon
FI : Alev İyonizasyon
HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
KM : Kortikal Miyoklonus
LC : Sıvı Kromatografisi
LC-MS : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LOD : Gözlenebilme Sınırı
LOQ : Miktar Tayin Sınırı
MALD : Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
mg : Miligram
mL : Mililitre
NAA : N-Asetil Aspartik Asit
NMDA : N-Metil D-Aspartat
NO : Nitrik oksit
NP-HPLC : Normal Faz- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi
OGY : Oksijen Glikoz Yoksunluğu
OH : Orak hücreli anemi
PA : Pikolinik asit
PLS-DA : Partial Least Squares Discriminant Analysis
RP-HPLC : Ters Faz- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi
SIM : İkincil İyon Kütle Spektrometresi
SS : Standart Sapma
TFA : Trifloro Asetik Asit

TI: **:** Termosprey İyonizasyon

µg : **:** Mikrogram

µL: **:** Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Pirasetam'ın molekül yapısı 3

Şekil 2.2. Metabolomiksin grafiksel özeti 14

Şekil 2.3. Tipik bir spektroskopi cihazının kısımları 16

Şekil 2.4. Elektromanyetik spektrum 17

Şekil 4.1. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile 10 µg/mL pirasetam çözeltisinin alınan spektrumları ve maksimum absorbans değerlerini gösteren dalga boyları 44

Şekil 4.2. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarda pirasetam standart çalışma çözeltilerinin spektrumları 45

Şekil 4.3. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon eğrileri 45

Şekil 4.4. [a]Kromatogram (zamana karşı iyon yoğunluğu), [b]Kromatogram (zamana karşı göreceli bolluk), [c]Kütle spektrumu (kütle/yük oranınan karşı iyon yoğunluğu) 48

Şekil 4.5. LC-MS/MS yönteminin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi ve regrasyon denklemi 50

Şekil 4.6. LC-MS/MS yöntemiyle plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi ve regrasyon denklemi 50

Şekil 4.7. 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında pirasetamın standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı 51

Şekil 4.8. 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında pirasetamın plazma çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı 51

Şekil 4.9. 120 ng/mL pirasetam standart çalışma çözeltisinin kromatogramı 53

Şekil 4.10. 120 ng/mL pirasetam plazma çalışma çözeltisinin kromatogramı 54

Şekil 4.11. Boş hasta plazması (a), ilaç verildikten 30 dk sonra alınan plazma örneği (b), ilaç verildikten 60 dk sonra alınan plazma örneği (c) LC-MS/MS kromatogramları 55

Şekil 4.12. Grup 1 metabolitlerin toplam iyon kromatogramı 57

Şekil 4.13. Grup 2 metabolitlerin toplam iyon kromatogramı 57

Şekil 4.14. Grup 2 ile kontrol grubu karşılaştırıldığındaki metabolitlerin bulut grafiği 61

Şekil 4.15. PLS-DA modeline göre değişkenlerin scor plot tablosu (Grup 1 ile kontrol grubu) 62

Şekil 4.16. PLS-DA modeline göre değişkenlerin scor plot tablosu (Grup 2 ile kontrol grubu) 62

Şekil 4.17. Pirasetam ile değişen metabolik yolaklar 64

Şekil 4.18. Alanin, Aspartat ve Glutamat metabolizması yolu (C01042: N-Acetyl L-Aspartat, C00049: L-Aspartat, C00025: L-Glutamat, C00064: L-Glutamin, C00402:D- aspartat, C00122: Fumarat) 66

Şekil 4.19. Alanin, Aspartat ve Glutamat yolağının KEGG haritası 67

Şekil 4.20. Arjinin biyosentez yolu (C00025: L-Glutamat, C00049: L-Aspartat, C00064: L-Glutamin, C00062: L-Arjinin, C00122: Fumarat) 68

Şekil 4.21. Arjinin biyosentez yolağı KEGG haritası 68

Şekil 4.22. Glutatyon metabolizması yolu (C00025: L-Glutamat, C01879: Piroglutamik asit) 69

Şekil 4.23. Glutatyon metabolizması KEGG haritası 70

Şekil 4.24. Nitrojen metabolizması yolu (C00025: L-glutamat ve C00064:L-Glutamin) 71

Şekil 4.25. Nitrojen metabolizması KEGG haritası 72

Şekil 4.26. Biyobelirteç olabilecek metabolitlerin ROC eğrileri ve kutu grafikleri..... 73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. Pirasetamın fizikokimyasal özellikleri 4

Tablo 2.2. Pirasetamın farmakokinetik parametreleri 4

Tablo 2.3. Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomiks arasındaki farklar 15

Tablo 2.4. Kromatografinin sınıflandırılması 19

Tablo 2.5. Analizöre göre kütle spektrometreleri 22

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal ve çözücüler 33

Tablo 3.2. Kullanılan cihazların modelleri ve kullanım amaçları 34

Tablo 3.3. LC-MS/MS yöntem şartları 38

Tablo 4.1. Pirasetamın UV-Gör. bölge spektrofotometri ve 1. derece türev spektrofotometri yöntemlerinin kalibrasyon eğrilerinin istatiksel analiz verileri 44

Tablo 4.2. UV-Gör. bölge spektrofotometri ve 1. derece türev spektrofotometri yöntemleri için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri 46

Tablo 4.3. Geri kazanım değerleri 47

Tablo 4.4. Standart ve plazma çözeltilerinin istatiksel analiz sonuçları 49

Tablo 4.5. Standart ve plazma çalışma çözeltilerinin gün içi ile günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri 52

Tablo 4.6. Pirasetamın plazmadan geri kazanım (GK) değerleri (60, 120 ve 600 ng/mL) 53

Tablo 4.7. Hasta numunelerinin 30. ve 60.dk dakikalardaki plazma konsantrasyon değerleri 54

Tablo 4.8. Önemli metabolitler (Grup 1) 58

Tablo 4.9. Önemli metabolitler (Grup 2) 59

Tablo 4.10. Pirasetam ile değişen metabolik yolaklar listesi 64

1. GİRİŞ

Nootropikler bilişsel bozuklukların yönetimi, zihinsel uyanıklığın iyileştirilmesi ve klinik hastalarda enerji seviyelerinin artırılması için günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca sağlıklı bireyler tarafından performansı iyileştirmek ve belirli bilişsel-zorlayıcı görevlerde rekabet avantajı elde etmek için de tercih edilmektedir (Atiri ve Popoola, 2023). Nootropikler sınıfına dahil olan pirasetam da sağlıklı insanlar tarafından artan stres dönemlerinde zihinsel performansı iyileştirmek ve hafıza ile ilişkili nöronal bozukluklar için bilişsel bir güçlendirici olarak günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır (Mani, 2022; Voronina, 2023). Ancak günümüzde hala etki mekanizması dahi tam olarak kanıtlanmamış ilaç olan pirasetamın zekâ ve hafızayı artırmak amacıyla rastgele kullanılmasının doğuracağı sonuçlar kocaman bir soru işaretidir.

Bu çalışmada pirasetam etken maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda (tablet) miktar tayini için UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi, insan plazmasında pirasetam etken maddesinin miktar tayini için LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi ve validasyonun yapılması, bu geliştirilen ve valide edilen yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için ile Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Acil Servise baş dönmesi şikayeti ile gelen hastalara Nootropil tablet verildikten sonra alınan kan örneklerinde pirasetam miktar tayinlerinin yapılması ve ayrıca bu hastaların plazmalarında LC-Q-TOF/MS yöntemiyle metabolomiks analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır

Yapılan literatür taramasında pirasetamın insan plazmasında metabolomik etkileri üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. İnsan plazmasında pirasetamın metabolom

profilini belirleyerek pirasetamın etki mekanizmalarına dair soru işaretlerinin ortadan giderilmesini sağlanması ve bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin bu alandaki bilgi eksikliğini gidereceği düşünülmektedir.

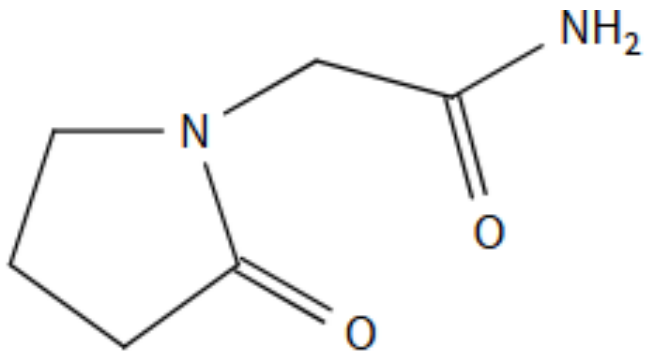
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pirasetam

Pirasetam yunanca zihin anlamına gelen noos ve ileri anlamına gelen tropein kelimelerinden türetilmiştir (Giurgea, 1973). Pirasetam, nootropikler adı verilen ve oksirasetam, pramirasetam, etirasetam, nefirasetam, anirasetam, rolzirasetam gibi rasetam ailesinin üyelerinden biri olup bu ilaç grubunun ilk üyelerinden biridir (Wojszel, 2021). 1972'den beri klinik kullanımda olan pirasetam Belçika'daki UCB laboratuarlarında Corneliu E. Giurgea tarafından 1964 yılında sentezlenmiştir (Winnicka ve ark., 2005).

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

5-karbon oxopirolidon halka yapısına sahip olan pirasetam, 2-oxo-1-pirolidin-asetamid olarak bilinen rasetam grubuna dâhil sentetik bir bileşiktir. Gamma-amino butyrik asit (GABA)'in siklik bir türevidir (Kumar ve ark., 2022). Su, metanol ve etanolde kolaylıkla çözünürken asetonda neredeyse çözünmez. Beyaz kristal toz görünümünde olan pirasetam hafif acıdır ve kokusuzdur (Genton ve Van Vleymen, 2000). Pirasetamın fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.1'de verildi.



Şekil 2.1. Pirasetam'ın molekül yapısı

Tablo 2.1. Pirasetamın fizikokimyasal özellikleri

Pirasetamın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	Değeri/Özelliği
Kaba formülü	$C_6H_{10}N_2O_2$
Molekül kütlesi (g/mol)	142.158
Kaynama noktası (°C)	337.3±44.0 (760 mmHg'de)
Erime noktası (°C)	151.5-152.5
Fiziksel görünümü	Beyaz renkte kristaller
Çözünürlük (suda) (mg/mL)	50.0
Yoğunluk (g/cm^3)	1.4±0.1

2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Pirasetamın farmakokinetik parametreleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir (Hitzenberger ve ark., 1998).

Tablo 2.2. Pirasetamın farmakokinetik parametreleri

Farmakokinetik parametre	Değeri
Tmax (dakika)	30-50
$t_{½}$ (saat)	4.5
Biyoyararlanım (%)	>99
Renal klerens (mL/min)	66
Total vücut klerens (mL/min)	99
İdame dozu (g)	3.6-12
Doz aralığı (saat)	6-12
Plazma proteinlerine bağlanma (%)	0

2.1.3. Farmakolojik Özellikleri

Alışılmadık bir farmakolojik etkinliğe sahip olan pirasetam sağlıklı canlılarda ya da çeşitli nedenlerden dolayı bilişsel zayıflık yaşayan canlılarda öğrenmeyi kolaylaştırır ve hafızayı iyileştirir. Tüm bunları yaparken de yüksek dozlara rağmen herhangi bir sedatif etkiye neden olmaz ve otonomik aktiviteden yoksundur (Vernon ve Sorkin, 1991). Yani pirasetam ve türevi ilaçlar herhangi ciddi bir yan etkiye sahip olmaksızın serebral

fonksiyonların modülatörü olarak rol oynar ve nöronal düzeyde etkilerine ilaveten bir de vasküler düzeyde etkileri vardır (Waegemans ve ark., 2002).

2.1.4.Vasküler Etki Mekanizması

Nalbandian ve ark. (1983) hem normal hem de orak hücreli eritrositler üzerinde yaptığı çalışmada pirasetam eklenen donörlerde pirasetamın eritrositlerin endotele yapışmasını azalttığını tespit etmişlerdir. Bir çalışmada pirasetamın tromboksan sentetaz veya anti-tromboksan A2 aktivitesinin inhibe ederek etki gösterdiği sonucuna varılmış, ek olarak güçlü vazodilatör ve anti-trombotik aktiviteye sahip prostasiklin sentezini uyardığı belirlenmiştir (Moriau ve ark., 1993; Vane ve Corin, 2003). Sato ve Heiss, (1985) ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise pirasetamın kan akımı yetersizliğinden dolayı işlevi bozulan beyin dokusuna pozitif yönde etki ettiği sonucuna varmışlardır. İç kulaktaki kan akışına dair yapılan başka bir çalışmada ise pirasetamın kulaktaki doku perfüzyonu için önemli rol oynayan koklear mikro dolaşımı hızlandırdığı sonucuna varılmıştır (Maass ve Soetanto, 1988).

2.1.5. Nöronal Etki Mekanizması

Çok sayıda biyokimyasal ve davranışsal bulgu sunulmasına rağmen pirasetam ve benzeri nootropiklerin etki mekanizması hala kocaman bir soru işareti olmakla birlikte net bir şekilde açıklığa kavuşmadığı belirtilmektedir (Ebrahimi ve ark., 2022). Pirasetam veya analoglarının yüksek afiniteli asetilkolin alımı, muskarinik reseptör yoğunluğu, glutamat, serotonin ve biyojen aminler dahil olmak üzere bilişsellikte rol oynayan çeşitli iletici mekanizmalara etki ettiğini kanıtlayan raporlar olmasına rağmen, etki mekanizmalarına ilişkin birleştirici bir hipotez hala eksiktir ve bu ajanların bilişsel güçlendirici özelliklerini gösterme mekanizmalarının hala tartışmaya açık bir konu olduğu vurgulanmaktadır (Gualtieri ve ark., 2002). Loscarteles ve ark. (1998), civcivler üzerinde yaptıkları bir çalışmada pirasetamın civcivlerin plazma kortikosteron

seviyelerini artırtığını, hafıza kolaylaştırıcı etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir ve bu çalışmalarından yola çıkarak nootropiklerin bilişsel etkilerinde glukokortikoid reseptörünün aktivasyonunu ve hafızayı güçlendirici etkilerin steroide duyarlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yapılan deneysel başka bir çalışmada pirasetamın hafıza ve odaklanma üzerine etkili olabilmesi, bilişsel faydalarını ortaya çıkarabilmesi için uzun süreli yüksek dozda uygulamanın gerekli olduğu belirlenmiştir ve ayrıca pirasetamın kolinerjik nörotransmisyonu artırabileceği çalışmada vurgulanmıştır (Croisile ve ark., 1993). Bering ve Müller, (1985) tarafından yapılan bir çalışmada pirasetamın L-glutamat reseptöründe önemli ölçüde aktif olduğunu belirlemişlerdir. Müller ve ark. (1997) tarafından ratlar ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise yaşlı ratların beyin zarlarında zar akışkanlığını artırdığı genç ratlarda ise beyin zar akışkanlığını değiştirmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, yaşlı ratlarda aktif kaçınma öğrenimini önemli ölçüde iyileştirdiği belirlenmiştir. Pilch ve Müller, (1988) ratlarda pirasetamın yaklaşık 2 hafta kronik kullanılması sonucunda dişi ratların frontal korteksindeki m-kolinerjik reseptör yoğunluğunu yaklaşık %30-40 oranında artırdığı, ancak genç (4 haftalık) ratların frontal korteksindeki m-kolinerjik reseptör yoğunluğu üzerinde hiç bir etkinin olmadığını belirlemişlerdir. Pirasetamın m-kolinerjik reseptör yoğunluğu üzerindeki etkisinin, pirasetam ile kolinerjik öncül tedavinin kombinasyonlarının yaşlı deney hayvanları ve hastalarda hafıza ve diğer bilişsel işlevler üzerinde olumlu etki yapacağı belirtilmektedir. Ayrıca, pirasetam ve analoglarının kolinerjik mekanizmaların aktivasyonunu gösteren doğrudan veya dolaylı kanıtlar yapılan bir derlemede de belirtilmektedir (Pepeu ve Spignoli, 1989). Pirasetamın bilişsel işlevi üzerine yapılan bir çalışmada, pirasetam'ın oksijen glikoz yoksunluğu (OGY) ile uyarılan SH-SY5Y hücrelerinin büyümesini arttırdığı, mitokondriyal fonksiyonunu geliştirdiği ve pirasetamın OGY ile uyarılan SH-SY5Y hücrelerinin oksidatif stresini inhibe ettiği tepit edilmiştir (Liu ve ark., 2024).

Karimi shayan ve ark. (2024) pentilentetrazol nöbet rat modelinde pirasetamın nöroprotektif, antikonvülsan ve antianksiyete etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışma sonucunda pirasetam'ın nöroprotektif etkilerini, kolinerjik, noradrenerjik, glutamaterjik ve serotoninerjik yollar gibi nörotransmitter sistemleri düzenleme yeteneği ile açıklanacağını belirtmişlerdi. Buna ek olarak kontrol grubuna kıyasla Pirasetam verilen gruplarda antioksidan özellik görüldüğünü tespit etmişlerdir. Scheuer ve ark. (1999) yaşlı sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada beyincik hariç tüm beyin bölgelerinde pirasetamın membran akışkanlığını artırdığını ayrıca, pirasetam tedavisinin hipokampusta bilişsel süreçlerde önemli rol oynayan N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptör yoğunluğu, frontal korteks ve striatumdaki muskarinik kolinerjik reseptör yoğunlukları üzerine olumlu etkilerini belirlemişlerdir ve bilişsel etkilerini de buna bağlamışlardır. Yine bunu destekleyen başka bir çalışmayı Firstova ve arkadaşları (2023) yapmıştır ve pirasetamın hipokampuda NDMA reseptör yoğunluğunu artırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise pirasetamın hem α-amino-3-hidroksi-5-metiloksazol-4-propiyonat tipi glutamat reseptörlerini aktive etmesi hem de membran akışkanlığını artırması ile nöronal etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır (De Deyn ve ark., 1997).

2.1.5.1. Nörotransmitterler

Nöronal iletişim nöronlardan salınan, hedef hücredeki özel reseptörlere bağlanarak aktivitesini değiştiren nörotransmiterlerin salınımına bağlıdır (Herlenius ve Lagercrantz, 2004). Yani merkezi sinir sisteminin görevini eksiksiz şekilde tamamlayabilmesi için nörotransmitterler kilit rol oynar. Nörotransmitterler küçük moleküllü nörotransmitterler ve nöropeptitler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Küçük moleküllü nörotransmitterler ise kendi içinde amino asit yapıda olanlar (glisin, glutamat, GABA), biyolojik aminler (dopamin, serotonin, epinefrin, histamin ve norepinefrin),

purinerjik nörotransmitterler (adenozin trifosfat) ve asetil kolin olarak farklı gruplara ayrılır. Bunlardan glutamik asit ve aspartik asit uyarıcı nörotransmitter, GABA ve glisin ise inhibitör nörotransmitter olarak görev yapmaktadır (Valenzuela, Publiga ve Zucca, 2011; Webster, 2001; Weis ve ark., 2019).

2.1.6. Klinik Kullanımı

Pirasetamdan nootropik özelliğinin ötesinde birçok farklı özelliklerinden de yararlanılmaktadır (Winblad, 2005). Pirasetam yaşlanma ve demansın neden olduğu bilişsel bozukluklara ek olarak klinikte vertigo (Fernandes ve Samuel, 1985), disleksi (Di Ianni ve ark., 1985), kortikal miyoklonus (Brown ve ark., 1993) ve orak hücreli anemide (Mikati ve ark., 1983) reçete edilir.

2.1.6.1.Vertigo

Hareket yanılsaması veya uzayda yönelim hissi değişikliği olarak tanımlanan vertigo; vestibüler sistemdeki dengesizlikten kaynaklanan baş dönmesinin bir alt tipidir. Subjektif bir semptomdur ve değerlendirilmesi zordur. Altta yatan nedene bağlı olarak tedavi şekli değişir ancak vertigonun nedenini saptamak oldukça zordur (Oosterveld, 1999). Vertigonun altta yatan periferik ve santral nedenlerini ayırt etmede hastanın öyküsü oldukça önemlidir. Spesifik, semptomatik ve rehabilite edici olmak üzere vertigo tedavisi temelde 3 kategoriye ayrılabilir. Spesifik tedaviler vertigoyu ortadan kaldırabilir çünkü tedavi direkt olarak altta yatan nedene yöneliktir. Semptomatik tedavi ise nedeni ne olduğu fark etmeksizin; vertigodan kaynaklanan mide bulantısı ve kusma gibi semptomları kontrol altına almada uygulanır (Baloh, 1998). Hem merkezi hem de periferik kökenli vertigoda etki gösteren pirasetam serebral nörotransmisyon yoluyla etki gösterir ve kulaktan beyin sapına kadarki sinir aksiyon potansiyellerini ve vestibüler çekirdekteki nöronların uyarılabilirliğini azaltır (Chaudhry, 2021). Böylece pirasetam atakları, ataklar arasındaki sıklığı azaltırken arka plan semptomlarını iyileştirerek hastada

hem ani rahatlama sağlar hem de dengenin restorasyonunu ve adaptasyonu sağlar. Vertigo tedavisi için pirasetamın oral yoldan günde 2.4-4.8 g aralığında alınması önerilmektedir (Benchev ve Zhelyazkova, 2003; Rosenhall ve ark., 1996; Winblad, 2005).

2.1.6.2. Kortikal Miyoklonus

Patolojik olarak beyinde serebellar sistemle bağlantılı olan kortikal miyoklonus (KM) bir epilepsi türüdür ve vücudun çeşitli yerlerindeki kasların kasılması ile karakterizedir (Tijssen ve ark., 2000). Çeşitli nörolojik ortamlarda etkili olan pirasetamın kortikal miyoklonustaki etkinliği ilk olarak 1978 yılında kardiyak arrest sonrası anoksik miyoklonus geçiren bir hastada fark edilmiştir (Shorvon, 2015). Centon ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada kortikol miyoklonusta pirasetamın ilk sıralarda tercih edilmesi gereken bir ilaç olması gereğini vurgulamışlardır. Bu çalışmadan sonra yapılan çalışmalarda bu görüşü destekler niteliktedir. Kortikal miyoklonus (KM) tedavisi için oral yoldan günde 7.2-24 g aralığında alınması önerilmektedir (Winblad, 2005).

2.1.6.3. Bilişsel Bozukluklar

Bilişsel işlev bozukluğu (BİB); alzheimer hastalığı, yaşlılık, parkinson, kafa travması ve felç gibi rahatsızlıklardan kaynaklanan ve nörodejeneratif hastalıklarla kendini gösteren başlıca semptomlardan biridir (Gualtieri ve ark., 2002). Bilişsel işlevi iyileştiren ilaçlar genelde retiküler ve limbik sistem üzerindeki etkileri nedeniyle uyarıcı ve yatıştırıcı yan etkiler gösterebilirken pirasetam herhangi bir yan etki göstermeyen atoksik bir bileşik olmasından ötürü tercih edilmektedir ve BİB tedavisi için oral yoldan günde 2.4-4.8 g aralığında alınması önerilmektedir (Giurgea, 1973; Winblad, 2005).

2.1.6.4. Disleksi

Nörolojik bir öğrenme bozukluğu ile karakterize olan disleksi fonolojik sistemdeki kusurdan kaynaklı okuma, yazma ve öğrenmede güçlüğe sebep olan bir

hastalıktır (Shaywitz ve Shaywitz, 2005). Disleksi hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada piracetam ile tedavi edilen çocukların okuma yeteneğinde ve okuduğunu anlamada önemli gelişmeler gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır (Wilsher ve ark., 1987). Disleksi tedavisi için oral yoldan günde 3.2 g pirasetam alınması önerilmektedir (Winblad, 2005).

2.1.6.5. Orak Hücreli Anemi

Orak hücreli anemi (OHA), hemoglobinin mutasyona uğraması sonucunda anormal hemoglobin üretimine bağlı kalıtsal, hemolitik bir hastalıktır (Mostafa ve ark., 2012). Oluşan bu mutant hemoglobin dokulara oksijen iletildikten sonra kırmızı kan hücrelerinin bozulmasına (uzun, yassı, orak bir şekil alması) ve böylece dolaşımın tıkanmasına neden olur. Bunun sonucunda şiddetli ağrıyla karakterize orak hücre krizi meydana gelir (Tisdale ve ark., 2020). In vitro yapılan bir çalışmada pirasetamın eritrositlerin oraklaşmasını inhibe ettiği, kırmızı kan hücrelerini daha esnek hale getirdiği ayrıca trombostlerin bir araya toplanmasına engel olduğu belirlenmiştir (Al Hajeri ve Fedorowicz, 2016). OHA tedavisi için oral yoldan günlük kg başına 160 mg pirasetam alınması önerilmektedir (Winblad, 2005).

2.1.7. Pirasetamın Reçetesiz Kullanımı

Popüler medyada bahsedilen nootropiklerin bilişsel işlev üzerindeki etkileri sağlıklı bireylerin bu maddelerin reçete dışı kullanımına yol açmaktadır (Patel ve ark., 2024). Pirasetamın sağlıklı bireylerin, özellikle de sınava hazırlanan öğrencilerin zekâyı artırmak ve hafızayı geliştirmek için sıklıkla kullandığı çalışmalarda belirtilmektedir. Yan etkilerinin hafif olması sebebiyle pirasetam sıklıkla tercih edilir ve sağlıklı bireyler tarafından aile ve arkadaşlar gibi reçeteli veya reçetesiz kaynaklardan elde edilebilmektedir (Solmaz ve Erbaş, 2023). Polonya'daki tıp öğrencileri arasında yapılan bir anket çalışmasında öğrencilerin reçeteli ya da reçetesiz olarak %7.8'inin hafıza ve

odaklanmayı artırmak için pirasetam kullandığı tespit edilmiştir (Merwid-Ląd ve ark., 2023). Ayrıca, Amerika'da yapılan bir çalışmada ise bilişsel gücü artırmak için pirasetamın bilişsel güçlendirme takviyelerine onay alınmadan ilave edildiğini, satışlarının milyon doları aştığını ancak riskleri ve güvenliği konusunda yeterli çalışmaların hala eksik olduğu vurgulanmaktadır (Cohen ve ark., 2020). Yapılan araştırmalardan anlaşılacağı üzere pirasetam sadece klinikte değil gençler arasında sınav dönemlerde rekabeti artırmak ve üstünlük sağlamak amacıyla reçete dışı da kullanılmaktadır.

2.1.8. Pirasetam'ın Yan Etkileri

Pirasetamın en yaygın görülen yan etkilerinden biri uykusuzluktur (Rao ve ark., 2013). Diğer yan etkileri arasında mide bulantısı, ishal ve hafif baş dönmesi vardır. Ancak bunlar da zaman zaman bildirilmekle birlikte tedavinin kesilmesine engel olmadığı vurgulanmaktadır (Vernon ve Sorkin, 1991).

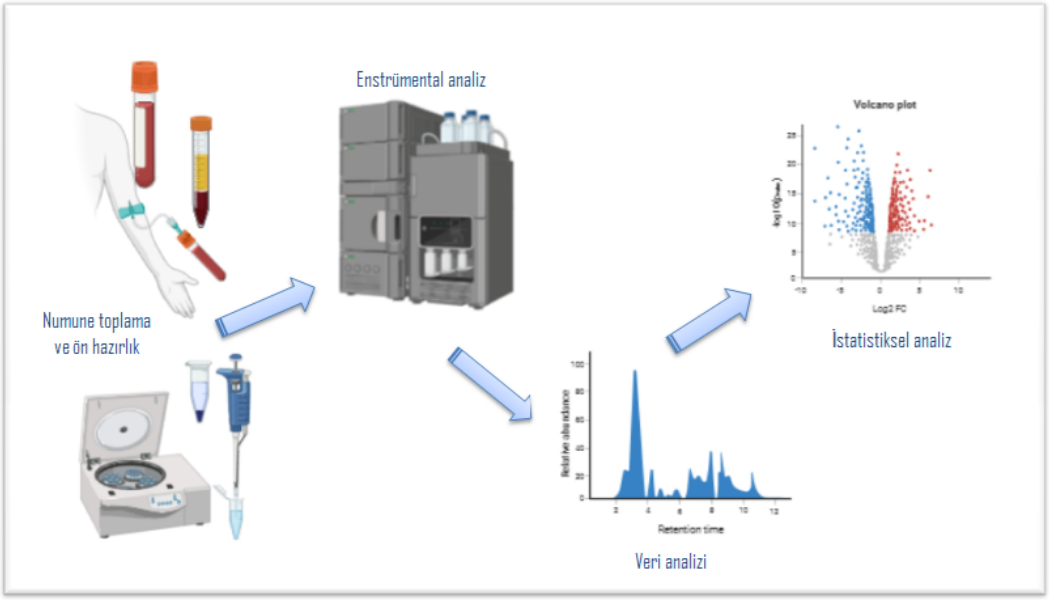
2.2. Metabolomiks

Karbonhidratlar, aminoasitler, lipitler, peptitler, nükleik asitler, organik asitler, vitaminler biyolojik sistemlerdeki yapı taşlarıdır. Metabolizma da bu hücresel yapı taşlarının üretimini-tüketimini katalize eden süreçler bütünüdür (Vermeersch ve Styczynski, 2013). Metabolik süreç boyunca ortaya çıkan biyokimyasal ara ürünler ise metabolit olarak adlandırılır ve hücresel biyokimyanın spesifik parmak izlerini taşırlar. Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir ve biyolojik hücre içinde birçok farklı yolun birbirine bağlanmasında kritik öneme sahiptir. Metabolomik de tüm bu endojen küçük metabolitlerin toplamını temsil eder. Metabolom analizi ise bu küresel metabolitlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi işlemidir (Chen ve ark., 2022; Villas-Bôas ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2012a). Metabolomiks; hastalık keşfi (Vinayavekhin ve ark., 2010), kanserin erken tanısı (Beger, 2013), ilaçların yan etki

profilinin belirlenmesi (Malkawi ve ark., 2018), gıda kalitesi analizleri (Li ve ark., 2021), bitki metabolomiği (Hegeman, 2010) gibi bir çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. ^{1}H Nükleer manyetik rezonans (NMR) (Cao ve ark., 2012), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS)(Fancy ve Rumpel, 2008), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) (Bajad ve Shulaev, 2011), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)(Consonni ve ark., 2016) gibi çeşitli analitik yöntemler biyolojik sistemlerde doku veya biyosıvılardaki metabolitleri tespit etmek amacıyla metabolom çalışmalarda kullanılmaktadır. Her bir yöntemin birbirine üstünlük sağladığı noktaları, avantajları ve dezavantajları mevcuttur (Fang ve Gonzalez, 2014). MS tabanlı yaklaşımların yüksek hassasiyet sunmasından dolayı bu yöntem daha fazla tercih edilmektedir (Alarcon-Barrera ve ark., 2022). Metabolitlerin ölçümü için çeşitli biyosıvılar kullanılmaktadır. Bu biyosıvılar içerisinde en çok tercih edilen idrardır çünkü idrar ile analizde numune ön işlemleri nispeten daha kolaydır, protein içeriği daha düşüktür, moleküller arası etkileşim daha azdır ve en önemlisi toplanması diğer biyosıvılara göre çok daha kolaydır (Zhang ve ark., 2012b). Diğer sıklıkla tecih edilen biyoakışkan ise kandır. Kan canlının tüm metabolizmasının anlık bir görüntüsünü ve zengin bir biyolojik bilgi sağlar, numune toplama kolaylığı olarak idrar ve tükürükten sonra gelmektedir (Vignoli ve ark., 2022). Flebotomiden sonra kandan iki farklı biyoakışkan ayrılır. Bunlar serum ve plazmadır. Serum tam kan pıhtılaştırıldıktan sonra elde edilen biyolojik sıvıyken plazma pıhtılaşmanın önlendiği kandan elde edilen biyosıvıdır yani plazma pratik olarak düşünüldüğünde vücutta dolaşan kan ile aynı sıvı fraksiyonuna sahiptir (Kiseleva ve ark., 2021). Plazma seruma kıyasla daha sık tercih edilir çünkü serum bozulmaya daha yatkındır ayrıca pıhtılaşma süresi, sıcaklık gerektiren ön işlemleri nedeniyle standardizasyonu daha zor olmakla birlikte sıcaklıktaki bu değişiklikler metabolitleri etkileyebilir. Bu dezavantajlarının yanı sıra kan ve serum

metabolomikste aynı analitik fırsatlara sahiptir (Wedge ve ark., 2011). Diğer biyosıvı ise çoğunluğu su olmakla birlikte mukus, çeşitli enzimler, peptitler, hormonlar, antikorlar, bakteri hücreleri, sitokinler, immünoglobulinnler ve metabolitlerden oluşan tükürüktür ve toplanması en zahmetsiz biyolojik sıvıdır. Ancak bu avantajına rağmen analizlerde çok fazla tercih edilmez (Dame ve ark., 2015). Bunun nedeni tükürük içeriğinin hem canlılar arasında hem de canlının kendi içinde zamansal olarak değişken ve karmaşık olmasıdır (Gardner, Carpenter ve So, 2020). Kan bileşimi paraselüer ve transselüer yolla tükürüğe geçebildiğinden tükürük de serum kadar vücudun fizyolojik durumunu yansıtır (Zhang, ve ark., 2012). Tüm bu avantajları göz önüne alındığında tükürük ile yapılan metabolomiks çalışmaları ağız hastalıkları ya da biyolojik sistemde meydana gelen diğer hastalıkların teşhisinde hızla gelişen bir disiplindir (Hyvärinen ve ark., 2021). Son yıllarda –omik çalışmaları doku üzerinden de yapılmaya başlanmıştır. Dokunun diğer biyosıvılara avantajı çoğu hastalıkların lokalize bölgesi olan organa özgü olmasıdır. Dezavantajı ise diğer biyosıvılara göre numunelerin toplanması zahmetlidir. Ancak son 20 yılda gelişen enstrümental yöntemler ile minimal doku alınarak önemli metabolitlerin tanımlanması sağlanmıştır. Özellikle kanserin erken tanısında doku metabolomiksinden günümüzde sıklıkla yararlanılmaktadır (Budczies ve Denkert, 2016; Huang ve ark, 2013; Saoi ve Britz-McKibbin, 2021). Metabolomikste kullanılan diğer biyosıvı ise beyni dış kuvvetlerden koruyan beyin omurilik sıvısıdır (BOS). BOS analizleri çeşitli nörodejeneratif hastalıkların teşhisinde çok önem arz eder (Stoop ve ark., 2010). Çünkü BOS bileşimi direkt olarak beyindeki metabolit üretimine bağlı olduğundan alzheimer, parkinson, multipl skleroz gibi nörodejenaratif hastalıklar için potansiyel bilgi kaynağıdır (Mandal ve ark., 2012; Noga ve ark., 2012; Wishart ve ark., 2008;) . Ancak BOS ‘un en büyük dezavantajı lomber-punksiyon denilen toplama yöntemidir. BOS numuneleri toplanmasından kısa bir süre içinde santrifüj edilerek -80°C’de muhafaza edilmelidir.

Çünkü gecikmiş depolamanın meabolitlerde ve aminoasitlerde değişime neden olduğu bildirilmiştir (Yan ve ark., 2021). Metabolomik çalışmalar için kullanılan diğer biyosıvı ise semendir. Sperm için bir taşıma sıvısı olan semen ayrıca birçok organik ve inorganik bileşik içermektedir (Xu ve ark., 2023). Semen analizi daha çok kusurlu sperm üretimini saptama, kısırlık gibi durumlarda ve ayrıca erkeklerin potansiyel doğurganlık biyobelirteçlerinin tespitinde de sıklıkla tercih edilmektedir (Li ve ark., 2020; Velho ve ark., 2018).



Şekil 2.2. Metabolomiksin grafiksel özeti

2.2.1. Hedeflenmiş ve Hedeflenmemiş Metabolomiks

Metabolomik analizler kendi içinde hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomiks olarak ikiye ayrılır. Hedefe yönelik metabolomiks daha çok klinik analizlerde tercih edilir ve sınırlı sayıda önceden bilinen metabolitleri ölçmeyi amaçlar. Hedeflenmemiş metabolomik ise bilinen ya da bilinmeyen saptanabilen tüm metabolitlere odaklanır ve hedeflenmiş yaklaşıma üstünlüğü önceden var olan bilgileri toplamadan veri analizi yapılmasıdır ve küresel bir kapsama alanı sağlamasıdır (Schrimpe-Rutledge ve ark.,

2016). Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş yaklaşımlar arasındaki farklar Tablo 2.3'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomiks arasındaki farklar

Hedeflenmemiş Metabolomiks	**Hedeflenmiş Metabolomiks**
Küresel analiz	Alt küme analizi
Önceden bilgi toplamaya gerek yok.	Önceden bilgi toplanmalı.
Nitel tanımlama	Metabolitler zaten tanımlı.
Göreceli niceleme	Mutlak niceleme
Saptanabilen tüm metabolitleri ölçer.	Sınırlı sayıda metabolit ölçer.
MS/MS veri tabanı kütüphaneler ile ilişkili	MS/MS veri tabanı referans standartlar ile ilişkili
Keşif amaçlı	Hipotez güdümlü

2.2.2. Metabolom Analizinde Kütle Spektrofotometresi

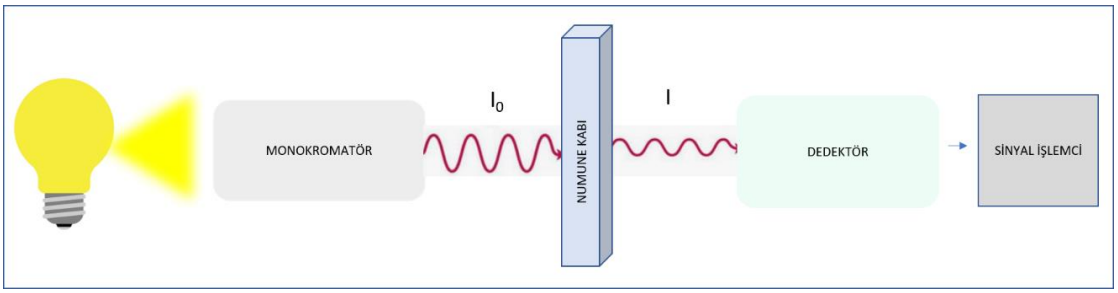
Metabolitler iyonlaşma ve parçalanma özellikleri sayesinde MS ile tanımlanabilir. Kütle spektrumlarının karmaşıklığını azaltmak amacıyla MS bir ayırma tekniği ile birlikte kullanılır ve genellikle gaz kromatografisi (GC) ile sıvı kromatografisi (LC) ile yöntemleri ile tercih edilmektedir. Çünkü bu ayırma teknikleri metabolitlerin zaman boyutunda ayrılmasına olanak sağlar böylece veriler zaman, yoğunluk ve kütle (m/z) değerlerini içerir. Bu da yöntemin çözünürlüğünü, seçiciliğini, hassasiyetini iyileştirir (Monteiro ve ark., 2013). LC-MS tabanlı hedeflenmemiş metabolomikler genelde yeni metabolitleri keşfetmede tercih edilmektedir ve öncesinde tanımlama yapılmadan birden fazla numunede metabolitlerin nispi bolluklarının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Metabolitlerin tanımlanması için çalışma tasarımı, doğru kütle, alıkonma süresi ve parçalanma modeli gibi kriterler dikkate alınır. Yapılan çalışmalara bakıldığına metabolomik çalışmalarda tandem MS analizleri en yüksek metabolit tanımlama güvenilirliği sunar (Chen ve ark., 2023; Godzien ve ark., 2015; Vinaixa ve ark., 2016; Zhou ve ark., 2012).

2.3. Spektroskopi

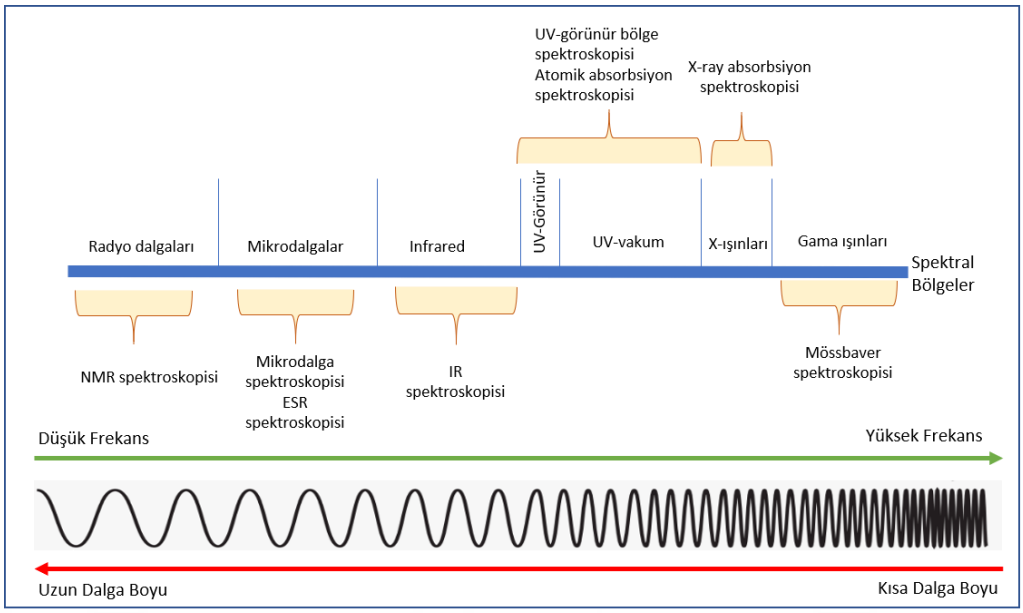
Yüksek enerjili gama ışınlarından düşük enerjili radyo dalgalarına kadar tüm spektroskopik tekniklerin temelini oluşturan elektromanyetik radyasyon (ER) hem maddeyle etkileşimi hem ışının özelliği hem de maddenin yapısal parçacıklarına bağlı olduğundan bir kuantum olgusudur (Andrews, 2010; Hofmann, 2010). Yani ER hem dalga hem de parçacık özelliği gösterir. Elektromanyetik spektrum, spektral bölgeler ve bu bölgelerdeki analitik yöntemler Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimine dayanan bir analitik yöntemdir. Birçok farklı spektroskopik yöntem mevcuttur. Bunlara; Ultraviyole-görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi, floresans-fosforesans spektroskopisi, atomik absorpsiyon spektroskopisi, atomik emisyon ve atomik floresans spektroskopisi, ınfrared spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve kütle spektroskopisi örnek verilebilir. Şekil 2.3'de tipik bir spektrofotometre cihazının şekli verilmiştir.

Yöntem seçiminde;

- Maddenin türü: moleküler spektroskopi-atomik spektroskopi
- Maddenin fiziksel özelliği: Absorbsiyon-floresans-fosforesans-saçılma-emisyon-kemilüminesans
- Elektromanyetik spektrumun bölgesi etkilidir (Penner, 2017).



Şekil 2.3. Tipik bir spektroskopi cihazının kısımları



Şekil 2.4. Elektromanyetik spektrum

2.3.1. Ultraviyole- Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Ultraviyole ve Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisine elektronik spektroskopi de denir çünkü ana enerji değişimleri elektronik düzeyde gerçekleşir. Elektronik spektroskopi yapı tayini, kalitatif analiz ve kantitatif analiz, asit baz denge sabitlerinin bulunması ve titrasyonda sıklıkla tercih edilen yöntemler topluluğudur. Araştırmalar bütün dünyada yapılan kantitatif analizlerin %90'ının absorbsiyon yöntemiyle gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ancak absorbsiyon yöntemi ile tayinin yapılabilmesi için çifte bağ, üçlü bağ, fenol grubu, aromatik grup, ester grubu, amit grubu, azo, nitrozo, nitro grubu gibi fonksiyonel gruplardan en az birini içermesi gerekmektedir. Bir madde 180-400 nm dalga boyu aralığında absorbans gösteriyorsa UV bölgede, 400-800 nm dalga boyu aralığında absorbans gösteriyorsa görünür alan bölgesinde analiz edilir (Gündüz, 1988). UV bölgede daha çok organik bileşikler analiz edilirken UV-Gör. Bölgede inorganik bileşikler analiz edilir (Marczenko ve Balcerzak, 2000). Absorbans ışının numuneden geçerken katettiği mesafeye, analitin konsantrasyonuna ve molar absorptivite katsayısına bağlı olarak değişir. Bu ilişki

Lambert-Beer yasasıyla verilir ve denklemi $A = \varepsilon \times b \times c$ şeklindedir. Denklemdeki A; absorbans, ε; molar absorptivite, b; ışının numune içinde katettiği mesafe ve c; analitin konsantrasyonudur (Passos ve Saraiva, 2019). Absorbasın tayini için maddelerin ışığı en fazla absorpladığı dalga boyu seçilir ve buna λ_{max} denir. Bu dalga boyu baz alınarak çizilen kalibrasyon eğrilerinin kesinliği ve hassasiyeti daha yüksektir.

2.3.2. Türev Spektroskopisi

Türev spektrofotometrisi absorbansın dalga boyuna karşı türevinin alınması ile elde edilen yöntemdir. Aşağıdaki denklemlerde Lambert-Beer kanununda elde edilen farklılıklar gösterilmektedir.

Birinci Türev: $dA/d\lambda = b \times C \times d\,\varepsilon/d\lambda$

İkinci Türev: $d^2 A/d\lambda^2 = b \times C \times d^2\,\varepsilon/d\lambda^2$

.....

n.türev: $d^n A/d\lambda^n = b \times C \times d^n\,\varepsilon/d\lambda^n$

Türev spektroskopisi ile spektrum taban çizgisi kaymaları ve taban çizgisi eğimlerinin olumsuz etkilerinden arındırılmış olur. Böylece spektrum detayları ve matris etkisi iyileştirilmiş, numuneden kaynaklanan bulanıklık giderilmiş olur (Marczenko ve Balcerzak, 2000). Keskin maksimum ve minimum noktaları elde edilir. Örtüşen spektrumların çözünürlüğü artırılması gibi avantajlar sunar (Ansari ve ark., 2004).

2.4. Kromatografi

Kromatografi, sabit bir faz üzerinden hareketli bir faz yardımıyla geçirilen numunedeki maddelerin farklı yürüme hızlarından yararlanılark birden fazla bileşenin ayrılması, saflaştırılması, nitel ya da nicel analizi için kullanılan bir analitik tekniktir (Mallik ve ark., 2008). Teknik, sabit faz üzerinden hareketli fazın akmasıyla, ayrılmanın bu iki faz bileşenlerinin afinitelerine göre gerçekleştiği esasına dayanır. Hareketli faz ya da diğer adıyla mobil faz; sıvı veya gazdır ve analiz edilecek maddeyi sabit faz üzerinde

hareket etmesini sağlamaktadır. Sabit faz veya diğer adıyla durgun faz ise analiz edilecek madde ile etkileşime girerek ayrılmanın gerçekleştiği kromatografinin önemli bir bileşenidir (Premnath ve Zubair, 2024). Madde sabit faz tarafından kuvvetli tutuluyorsa mobil fazın akışı ile yavaş hareket ederken, sabit faz tarafından zayıf tutuluyorsa oldukça hızlı hareket eder. Bu da maddelerin farklı hızlarda hareket etmesini sağlar. Maddenin sabit faz üzerinde tutulma süresini analitin polaritesi, boyutu, yükü ve sabit faza afinitesi belirler. Numune sisteme enjekte edildikten sonra detektöre ulaşana kadar geçen süreye retensiyon zamanı (alıkonma zamanı) denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Her madde sabit kolona tutulamaz tutunmayan maddenin detektöre ulaşması için geçen zamana ise ölü zaman denir ve t_M sembolü ile gösterilir. Tutunmayan maddeler genellikle mobil faz ile aynı hızda hareket ederler.

Kromatografi sabit fazın ve hareketli fazın cinsine ve uygulama biçimlerine göre çeşitli sınıflara ayrılır. Bu ayrım Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Kromatografinin sınıflandırılması

Ayrılma Mekanizmasına Göre	**Uygulama Biçimine göre**	**Hareketli Faz Tipine Göre**
1-Adsorbsiyon Kromatografisi	**1-**Düzlemsel Kromatografisi	**1-**Gaz Kromatografisi
Sıvı-Katı Kromatografisi	Kağıt Kromatografisi	Gaz-Katı Kromatografisi
Gaz-Katı Kromatografisi	İnce Tabaka Kromatografisi	Gaz-Sıvı Kromatografisi
2-Dağılma (Partisyon Kromatografisi)	**2-**Kolon Kromatografisi	**2-**Sıvı Kromatografisi
Sıvı-Sıvı Kromatografisi	Gaz Kromatografisi	Sıvı-Katı Kromatografisi
Gaz-Sıvı Kromatografisi	Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografisi	Sıvı-Sıvı Kromatografisi
3-İyon Değişim Kromatografisi		
4-Jel-Fitrasyon Kromatografisi		

2.4.1. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisinde (LC), mobil faz sıvıdır ve analit bu sıvı içinde çözünür. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerde en çok kullanılan sıvı kromatografisi yöntemidir.

2.4.1.1. HPLC

HPLC'de çözücü karışımının yüksek atmosferik basınç altında (10 Pa-400 Pa aralığında) sabit faz içeren kolonlardan geçmesi sağlanır. Böylece analit yüksek bir akış hızı oluşturmuş olur ve sabit fazdan hızlıca ayrımı gerçekleşir. HPLC'nin 4 türü olabilir. Bunlar; dağılma (partisyon) kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir (Premnath ve Zubair, 2024). Tipik bir HPLC; sıkıca doldurulmuş kolondan mobil fazın ilerlemesini sağlayan ve yaklaşık 6000 psi basınç üretebilecek güçte bir pompa, analitin kolon içine verilmesini sağlayan, valf ve şırınga olmak üzere iki türü bulunan enjektör, analitik ayrımın gerçekleştiği yer olan ve çoğunlukla paslanmaz çelikten üretilen kolon, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptayan dedektör gibi kısımlardan oluşur. Dedektör seçimi maddenin yapısına ve yöntemin gereksinimlerine bağlı olarak değişmekle birlikte HPLC'de sıklıkla tercih edilen dedektörler; UV-VIS dedektör, flüoresans dedektör, elektrokimyasal dedektör, rekraktif indeks dedektör, diyod array dedektörlerdir.

2.4.1.2. Normal Faz Kromatografisi

Normal faz kromatografisinde (NP-HPLC) sabit faz polarken hareketli faz apolardır. Bu nedenle sabit faz polar analiti tutar. Yani çözünen maddelerin polaritesi arttıkça retensiyon zamanları uzar. NP-HPLC'de mobil faz olarak hekzan, kloroform, propil eter gibi çözücüler kullanılırken sabit faz ise genellikle kimyasal olarak modifiye edilmiş silika (siyanopropil, aminopropil ve diol)dır. Böylece apolar çözücülerde çözünen

analitler kolayca ayrılır. NP-HPLC kimyagerlerin ilk kullandığı HPLC türlerinden biriydi ve mobil fazda bulunan az miktardaki suyun bile sabit faza adsorbe olma eğilimi vardı. Bu da analizlerde bir takım zorlıklara yol açmaktaydı (Vidushi ve ark., 2017).

2.4.1.3. Ters Faz Kromatografisi

NP-HPLC'nin bir takım zorluklarından sonra geliştirilmiştir ve çoğunlukla tercih edilen yöntemdir. Ters faz kromatografisinde (RP-HPLC) sabit faz apolar bir hidrokarbon, hareketli faz ise su, metanol, asetonitril gibi polar yapıda bir çözücüdür. RP-HPLC hidrofobik etkileşim ilkesine dayanır ve polaritesi en yüksek olan madde kolondan ilk önce çıkar. Mobil fazın polaritesinin artırılması piklerin kolondan çıkış süresini uzatır (Vidushi ve ark., 2017).

2.4.2. LC-MS

Kütle spektrometresi, analitin buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve bunun sonucunda elde edilen iyonların kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilmesini sağlayan, yüksek hassasiyet sunan güçlü bir analitik cihazdır Sıvı kromatografisi (LC), MS ile birleştirildiğinde, oldukça düşük konsantrasyonları tespit edebilir ve ayrıca MS, LC'den elüe edilen bileşikleri, yük kütle oranına göre elektrik ve manyetik alanlarda ayırır ve belirler (Premnath ve Zubair, 2024). Giderek kullanımı artan LC-MS, özellikle ilaçların keşif ve geliştirilmeleri sırasında, ürün karakterizasyonunda, metabolizma çalışmalarında, safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin tespitinde sıklıkla tercih edilir (Beccaria ve Cabooter, 2020). Piyasadaki tüm MS cihazları iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere 3 ana eleman içerir. MS analizinde hedef analitlerin sıvı ya da katı fazdan gaz fazına dönüştürülmesi ilk adımdır. Birçok iyonizasyon tekniği vardır (Awad ve ark., 2015). Bunlar; alan desorpsiyonu (FD), alan iyonizasyonu (FI), elektro sprey iyonizasyonu (ESI), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI), plazma desorpsiyonu (PD), hızlı atom bombardımanı (FAB),

ikincil iyon kütle spektrometrisi(SIMS) ve termo sprey iyonizasyonu (TI) olmak üzere sınıflandırılır (Medhe, 2018). Her bir tekniğin kendine göre avantajları ve ideal uygulamaları vardır ve iyonizasyon kaynağının seçimi analizi önemli derecede etkileyebilir. Bunlardan ESI ve MALDI özellikle sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS) ile kullanılmaktadır. Yüklü iyonları ayırma şekillerine göre yani analizöre göre kütle spektrometreleri 5'e ayrılır ve Tablo 2.5'de gruplandırılarak özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Analizöre göre kütle spektrometreleri

Spektrometre Çeşidi	**Özelliği**
1-Manyetik Alanlı Spektrometre	
Tek odaklı spektrometre	Yalnızca manyetik alan içerirler
Çift odaklı spektrometre	Manyetik alan ve elektriksel alan içerirler.
2-Kuadropol Kütle Spektrometresi	Dört kutuplu analizör, manyetik alan yerine iyon demeti yoluna paralel olarak yerleştirilmiş dört paralel metal silindirik çubuktan oluşur. Bu kuadropol sisteme hem radyo frekans hem de doğru akım uygulanır. Silindir eksenine dar bir yarıktan giren iyonlar arasında yalnızca belli bir bir m/z değerine sahip olanlar detektöre ulaşır. Voltajları değiştirilerek oluşan kütle spektrumu kaydedilir(Pitt, 2009).
3-Uçuş Zamanlı Spektrometre	Uçuş süresi (TOF) analizörü, iyonları oldukça yüksek bir voltajla hızlandırarak çalışır. İyonların hızı ve uçuş tüpünden dedektöre ulaşmak geçen süre, m/z değerlerine bağlıdır. TOF analizörü, spektrumları son derece hızlı ve yüksek hassasiyetle elde edebilir. Ayrıca yüksek kütle doğruluğuna sahiptir bu da küçük moleküllerin bile formüllerinin belirlenmesine olanak sağlar. Ve matabolomiks çalışmalarında sıklıkla tercih edilir. (Pitt, 2009).
4-İyon-Siklotron Rezonansı Spektrometresi	İyon tuzağı analizörü elektrik alanı ve manyetik alan kullanarak iyonları tuzağa düşürür. Bu şekilde uyarılan ve senkronize edilen iyonlar, tuzak algılama elektrotlarında görüntü yükleri oluşturur ve potansiyellerini değiştirir. Algılama elektrotlarındaki bu değişiklikler bir ICR sinyali olarak kaydedilir(Nikolaev ve ark, 2016)
5-Hibrit Analizörlü Spektrometreler	Farklı kütle analizörlerinin birleşimi ile oluşturulmuştur. Örneğin Q-TOF gibi.

2.4.3. LC-MS/MS

Biyoanalitik yöntemlerde doğruluk, hassasiyet, duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik oldukça önem arz etmektedir. Bundan dolayı yöntemin bize sunduğu bu kavramlar o yöntemi değerli kılar. Sıvı kromatografisi ile birleştirilen çift kütle spektrometresi yüksek derecede özgüllük ve hassasiyet sağladığından dolayı biyolojik matrislerdeki ilaç ve metabolitlerinin tespitinde ve miktar analizinde sıkça tercih edilir (Jemal ve Xia, 2006). LC-MS'de tek kütle spektrometresi bulunurken LC-MS/MS'de iki kütle spektrometresi bulunur ve bu da LC-MS/MS'in daha detaylı daha seçici ve daha hassas analiz yapmasına imkân sağlar. Böylece karmaşık ve düşük bolluktaki bileşiklerin analizinde üstünlük sağlamasına neden olur.

2.4.4. LC-Q-TOF/MS

Q-TOF MS, dört kutuplu MS'nin basitliğini bir TOF kütle analizörünün ultra yüksek verimliliğiyle birleştirir (Ferrer ve Thurman, 2003). Özellikle metabolom çalışmalarında sıklıkla tercih edilir.

2.5. Validasyon

Validasyon; latince güçlü anlamına validus kelimesinden türemiş ve ilk olarak 1978'de Amerikada ortaya atılmıştır (Araujo, 2009). Sistemin, tesisin, analitik yöntemin, prosedürlerin kapasitelerini güvenli ve yeterli bir şekilde yerine getirip getirmediklerinin etkin bir şekilde araştırılması ve objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Böylelikle validasyon kalite güvencesinin temelini oluşturur. Validasyon çalışmalarında USP, US FDA, ICH, US EPA, cGMP ve çeşitli Avrupa yönergelerinden yararlanılır (Chavan ve Desai, 2022; Sharma ve ark., 2018). ICH' a göre validasyon, "Belirli bir sürecin önceden belirlenmiş özelliklerinde ve kalite özelliklerinde sürekli olarak istenen sonucu üreteceğine dair yüksek derecede güvence sağlayan belgelenmiş bir kanıt oluşturmak" olarak tanımlanmaktadır (ICH Q2, 1995).

Validasyon, yeni bir yöntem geliştirildiğinde, önceden geliştirilmiş bir yöntemde değişiklik yapıldığında, yöntem farklı laboratuvarlarda ve farklı analistler tarafından uygulanması gerektiğinde yapılır. Bu belirtilen şartlarda bir değişiklik olduğunda uluslararası kılavuzlara göre yöntem tekrar valide edilmelidir.

2.5.1. Validasyon Parametreleri

Doğruluk: Ölçüm sonucunda elde edilen değerin, gerçek değere veya kabul görmüş referans değere yakınlığını gösteren parametredir (ICH Q2, 1995; Lavanya ve ark., 2013). Doğruluk mutlak hata, bağıl hata ve yüzde geri kazanım değerleri ile verilmektedir. Mutlak hata ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark, bağıl hata ise mutlak hatanın gerçek değere oranıdır. Yüzde Geri Kazanım (%GK) ise gerçek numuneden elde edilen değerin gerçek değere oranının yüz ile çarpılması ile elde edilen değerdir (ICH Q2, 1995; Peris-Vicente, Esteve-Romero ve Carda-Broch, 2015).

$$E = \bar{x} - u \qquad E_r = \frac{\bar{x}-u}{u} \cdot 100$$

Kesinlik: Aynı analitik koşullar altında aynı homojen numunenin çoklu örneklemesinden elde edilen ölçüm sonuç değerlerinin birbirlerine yakınlığı yani aralarındaki uyum derecesine kesinlik olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik, dağılım, standart sapma (s), bağıl standart sapma (BSS), varyans (s^2) ve varyasyon katsayısı gibi istatiksel parametrele ile verilir. Standart sapma; her verinin ortalama ile olan farkının karesi alınarak toplanması ve analiz sayısının bir eksiğine bölünerek karekökü alınması ile elde edilen değerdirve aşağıda formülü verilmiştir. Yüzde bağıl standart sapma (%BSS) standart sapmanın ortalama değere bölünmesi ve 100 ile çarpımından elde edilir. (ICH Q2, 1995; Ravisankar ve ark., 2015)

$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+\cdots x_n}{n}$ (x^{-}= ortalama)

$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i-u)^2}{n}}$ (Sonsuz sayıda analiz varsa bu denklem kullanılır.)

$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ (Eğer az sayıda numune varsa bu denklem kullanılır.)

$\%BSS = \frac{s}{\bar{x}}$

$\%BSS = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$

Doğrusallık: Analiz sonucunda, ölçüm sonuçlarının analitin konsantrasyonu ile doğrudan veya bir tür matematiksel dönüşümden sonra dolaylı olarak orantılı olması olarak tanımlanabilir. Doğrusallık genellikle cihaz yanıtının (pik alanı veya yükseklik) analit konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Bu kalibrasyon eğrisi olarak adlandırılır ve bu doğrusal ilişki arasındaki bağıntı en küçük kareler yöntemi ile belirlenir. Uygun istatiksel yöntem ile eğrinin denklemi belirlenir ve bu denkleme göre regrasyon katsayısı (R^2) hesaplanır (ICH Q2, 1995; Yuwono ve Indrayanto, 2005). Her deney belli bir ölçüm aralığında doğrusaldır, buna çalışma aralığı denir ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği endüşük ve en yüksek konsantrasyon aralığını kapsar.

Özgüllük ve Seçicilik: Özgüllük ve seçicilik terimleri sıklıkla karıştırılır. Yöntemin sadece tek bir analit için yanıt sağlamasına özgüllük denirken, seçicilik o numune ortamında var olan her bir kimysasal varlık için ayrı ayrı yanıt sağladığı anlamına gelir. Yani seçicilik; analiti metabolitlerinden, bozunma ürünlerinden, beraberinde kullanılan diğer ilaçlardan ayırma yeteneğini de ifade eder (ICH Q2, 1995; Yuwono ve Indrayanto, 2005)

Gözlenebilme Sınırı ve Miktar Tayin Sınırı: Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD), analitin miktarının kantitatif olarak ölçülemediği ancak kalitatif olarak tespit edilebildği en küçük konsantrasyonu ifade eder. Miktar tayin sınırı (Limit of Quantitation, LOQ) ise, analitik koşullar altında kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetsiyetle belirlenebilen en düşük konsantrasyonu ifade eder (ICH Q2, 1995;

Yuwono ve Indrayanto, 2005). LOD ve LOQ hesaplama formülü aşağıda gösterilmektedir.

$$LOD = 3{,}3\ s/m \qquad LOQ = 10\ s/m$$

Burada s = kalibrasyon eğrilerinin kesişimlerinin standart sapması, m = doğrusallık grafiğinin eğimidir.

Geri Kazanım: Geri kazanım için belirlenen bir minimum değer yoktur ancak mümkün olduğunca %100'e yakın bir geri kazanım değeri elde edilmek istenir. Yöntemin duyarlılığı uygun olduğu sürece, düşük geri kazanımlı bir analitik yöntem bile belirli bir analit için yeterli görülebilir (ICH Q2, 1995; Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020).

Sağlamlık: Sağlamlık terimi ICH tarafından kullanılmaz, USP'ye göre ise farklı koşullar altında aynı numunelerin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesi olarak tanımlanmaktadır. Ancak ICH kılavuzu Q2 (R1)'de ara hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik başlıkları altında ele alınır (ICH Q2, 1995). Ara hassasiyet: aynı laboratuvarda meydana gelen değişiklikleri kapsar örneğin farklı analist ve farklı günde yapılan analiz sonuçlarının uyumluluğu gibi. Yeniden üretilebilirlik ise laboratuvarlar arası değişiklikleri kapsar. Kısaca sağlamlık yöntemdeki küçük değişiklikliklerden etkilenmemenin bir ölçüsüdür (ICH Q2, 1995; Swartz ve Krull, 2006).

2.6. Literatür Özetleri

2.6.1. Spektroskopik Yöntemler

Sivadas ve ark. (2013) tablet formülasyonlarında pirasetam ve sitikolinin eş zamanlı tayini için spektroskopik yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemlerden birincisi eş zamanlı denklemler yöntemi ikinci ise Q-absorpsiyon oranı yöntemidir. Çözeltiler 0.1 N metanolik HCl'de hazırlanmıştır. Eş zamanlı denklem yöntemi için, pirasetam 256.6 nm'de ölçülmüş ve yöntemin 10-22 µg/mL konsantrasyon aralığında

doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Eş zamanlı denklem yöntemi ile pirasetamın % Geri Kazanım değerini %99.167-%100.112 arasında belirlemişlerdir.

Hadad ve ark. (2011), tabletlerde pirasetamın miktar tayini için tablet 1. derece türev spektroskopi yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemin 5-30 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu tespit etmişlerdir. Yöntemin, LOQ değerini 0.86 µg/mL ve LOD değerini ise 2.72 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

Metwally ve ark. (2005) farmasötik preparatlarda ve standart çözeltilerde pirasetam ile birlikte sinnarizin HCl in tayini için dört yeni yöntem geliştirip valide etmişlerdir. Bu yöntemler, Dansitometrik yöntem, Kolorimetrik yöntem, Türev spektroskopisi ile birlikte Spektrofotometrik yöntem ve Sıvı kromatografisi yöntemidir. Her dört yöntem ile pirasetam ile birlikte sinnarizin HCl'in analiz edilebileceği gösterilmiştir.

Bhowmick ve ark. (2010), farmasötik formülasyonlarda pirasetam etken madde miktar tayini için UV spektrofotometri yöntemi geliştirilip valide edilmiştir. Pirasetam metanol çözülerek çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Birinci türev spektrumu 214 nm dalga boyunda n=5 ve $\Delta\lambda$=2.0 nm değerlerinde alınmıştır. Yöntem parçalanma ürünlerinin varlığında ve 10-80 µg/mL konsantrasyon aralığında iyi bir doğrusallık göstermiştir. %99.35 geri kazanım ile yüksek bir doğruluk elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir.

2.6.2. Kromatografik Yöntemler

2.6.2.1. Plazmadan Geliştirilen yöntemler

Wang ve ark. (2010) rat plazmasında pirasetam miktar tayini için LC/MS-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin çalışma aralığı 0.1-20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmada, asetonitril–%1'lik formik asit çözeltisinde (10: 90 h/h) den oluşan mobil faz ve ekstraksiyon çözeltisi olarak %5'lik trikloroasetik asit kullanmışlardır. Kalibrasyon

eğrisi denklemi y = 0.203855x + 0.299692 ve R^2 değeri ise 0.9977 olarak tespit etmişlerdir. Yöntemin doğruluğu %94.6 ile %103.2 arasında değişmektedir ve LOQ değeri ise 0.1 µg/mL'dir.

Curticapean ve Imre (2007), insan plazmasında pirasetam miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Çalışmada %20'lik perklorik asit ($HClO_4$) ekstraksiyon çözeltisi, asetonitril-su mobil fazı gradient elüsyon, 200 nm dalga boyu kullanılmıştır ve yöntemin çalışma aralığı 1-100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Regrasyon katsayısı 0.99'dan yüksek olduğu belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik varyans katsayısı değerleri sırasıyla %3.2 - 11.6 ve %1.8 – 11.6 ve doğruluk (%sapma) değerleri sırasıyla %8.4 – 14.9 ve %2.3 – 3.9 olarak tespit etmişlerdir.

Mendes ve ark. (2016), insan plazmasında pirasetam miktarını belirlemek için HPLC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, ekstraksiyon çözücüsü olarak asetonitril, mobil faz olarak asetronitril- 10 mm amonyum asetat ve % 0.1 formik asit içeren su (72/28: h/h) kulanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 0.5-50 µg/mL, çalışma süresi ise 3.8 dk ve LOQ değeri ise 0.5 µg/mL olarak berlirlenmiştir.

Barkat ve ark. (2014) insan plazmasında pirasetam miktar tayini ve farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada, plazmadan ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, mobil faz olarak 0.005 M potasyum dihidrojen fosfat tampon çözeltisi ve 205 nm dalga boyu kullanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 0.39 - 50 µg/mL, LOD değeri 0.195 µg/mL, gün içi ve günler arası doğruluk değerleri sırasıyla % 99.23 ve %99.52, kesinlik değerleri ise sırasıyla % 2.10 ve % 1.29 olarak belirlenmiştir.

Sahu ve ark. (2013), rat plazmasında pirasetam etken madde miktarı için UPLC-MS/MS yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak etil asetat, mobil faz olarak asetonitril ve amonyum asetat tamponu (15:85 h/h, 10 mM,

pH 5.0) ve 209 nm dalga boyu kullanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 10 - 200 ng/mL, gün içi ve günler arası doğruluk değerleri sırasıyla %98.16 ve %99.34, kesinlik değerleri ise sırasıyla %1.90 ve %1.08 olarak belirlenmiştir.

Louchahi ve ark. (1995) insan plazması ve idrarda pirasetam miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak heksan-2-propanol kullanmışlardır. Plazma için yöntemin 3-40 mg/L konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve eğrinin R^2 değeri 0.9991 olarak tespit edilmiştir. Varyasyon katsayısı tüm ölçümler için % 5.9'den düşük belirlenmiştir.

Siddiqui ve ark. (2014) ilaç ve biyolojik sıvılarda pirasetam ve levetirasetamın eş zamanlı tayini için RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada, UV dedektör, 205 nm dalga boyu, 0.1 g/L trietilamin ve asetonitrilden (70: 30 h/h) oluşan mobil faz kullanılmıştır. Her iki ilaç için de kalibrasyon eğrisi 20 ng/mL ile 10000 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Pirasetam için eğrinin R^2 değeri 0.999'dur. LOD değeri 2.43 ng/mL olarak belirlenmiştir.

2.6.2.2. Standarttan Geliştirilen yöntemler

Patil ve ark. (2018), pirasetam (PIR) ve vinposetinin (VIN) tabletlerde eş zamanlı tayini için RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada potasyum dihidrojen fosfat tamponu (0.05 M pH:6) : metanolden (50:50/ h:h) oluşan mobil faz, C18 kolon, 1.0 mL/dk akış hızı ve 225 nm dalga boyu kullanılmıştır. PIR ve VIN alıkonma süreleri sırasıyla 3.52 ve 7.41 dk olarak tespit edilmiştir. PIR ve VIN için % geri kazanım değerleri sırasıyla %101.38±0.71 ve %102.04±0.58 ve yöntemin %BSS değeri her iki ilaç için de %2'den küçük olarak tespit edilmiştir.

Mansour ve ark. (2021), birivarasetam, karbamazepin ve pirasetamın eş zamanlı miktar tayini için yeşil ve basit bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada, C18 kolon, % 1'lik trietil amin içeren su ve pH'ı 6.5 olan asetonitril (70:30 h/h) oluşan mobil

faz, 0.6 mL/dk akış hızı, UV dedektör ve 215 nm dalga boyu kullanılmıştır. Pirasetam için yöntemin çalışma aralığı 10-120 µg/mL, korelasyon katsayısı 0.9999, LOD değeri 1.23 ve LOQ değeri ise 3.74 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Arayne ve ark. (2010) pirasetam ve dört safsızlığı olan 2-oksopirrolidin-1-il)asetik asit, pirolidin-2-on, metil (2-oksopirrolidin-1-il)asetat ve etil (2-oksopirrolidin-1-il)asetat'ın ayrılması ve eş zamanlı miktar tayini için RP-HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Mobil faz olarak pH:6'ya ayarlanmış (fosforik asit ile) suda 0.2 g/L trietil amin çözeltisi ve asetonitril (85:15, h/h) karışımı, C18 kolon, UV dedektör, 1.0 mL/dk akış hızı ve ortam sıcaklığı çalışma parametresi olarak kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem ile pirasetam ve dört madde arasında iyi bir ayrımın oladuğu tespit edilmiştir. Pirasetam için çalışma aralığı 50-10.000 ng/mL, R^2 değeri 0.9999 ve LOQ değeri 50 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Mittal ve ark. (2017), pirasetam ve sitikolinin tablet dozaj formlarında ve çözeltilerinde eş zamanlı miktar tayini için bir HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Mobil faz olarak asetonitril ve 10 mM disodyum hidrojen fosfat tamponu (10:90 / h:h), C18 kolon, 205 nm dalga boyu ve 1.0 mL/dk akışhızı çalışma parametreleri kullanılmıştır. Çalışmanın toplam süresi her iki etken maddenin tamamen ayrılması için 16 dakika ve pirasatem etken maddenin alı konma süresi 13.2 dk olarak tespit edilmiştir. Sitikolin ve pirasetam için çalışma aralığı sırasıyla 4-40 µg/mL ve 5-50 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Alenezi ve ark. (2025) sert jelatin kapsül dozaj formlarında pirasetam ve vinkamisinin eş zamanlı tayini için RP-HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ayrıca pirasetam ve vinkamisinin parçalanma ürünlerinin ayrılması için de bu yöntemi kullanmışlardır. Çalışma parametresi olarak, 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu pH 3.5: etanol (60:40, h/h) mobil fazını, 220 nm dalga boyunu, C18 kolonu, 1.0 mL/dk akış hızını kullanmışlardır. Pirasetam ve vinkamisin çalışma aralığı sırasıyla 80-550

µg/mL ve 4.0-28 µg/mL ve 5.0 dk toplam analiz süresi olarak tespit etmişlerdir. Geliştirilen kromatografik yöntemin çevre dostu olması, 76,5'lik son Eko-ölçek puanı, 0,66'lık AGREE puanı, beş yeşil segmentle 42 olan ComplexMoGAPI E faktörü, 82,5'lik BAGI puanı ve son olarak 97,5'lik beyazlık puanı ile gösterilmiştir.

Dwi Lestari ve ark. (2005) film kaplı tabletlerde pirasetamın miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada, mobil faz olarak metanol:su (5:95) karışımı, 215 nm dalga boyu ve C18 kolon kullanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 100-1000 µg/mL ve R^2 değeri 0.9992 olarak belirlenmiştir. Ölçümler farklı günlerde farklı analistler tarafından ve farklı HPLC ekipmanları kullanılarak iki laboratuvarda gerçekleştirilmiş ve tüm analizler için %BSS değeri %2'nin altında bulunmuştur.

Marslarska (2013), film kaplı tabletlerde pirasetamın miktar tayini için basit bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. Çalışma parametresi olarak, C18 kolon, asetonitril-fosfat tamponu (5:95, h/h) olarak mobil faz, 205 nm dalga boyu kullanılmıştır. Yöntemin çalışma aralığı 12.5-100 µg/mL ve R^2 değeri 0.999 olarak belirlenmiştir. Pirasetamın alıkonma süresi 3.73 dk, tabletten ortalama geri kazanım değeri %99.99, gün içi ve günler arası %BSS değerleri %2'den küçük olarak tespit edilmiştir.

Abdelgawad ve ark. (2022), bu çalışmada aynı üretici tarafından üretilen çeşitli dozaj formlarında pirasetam, ketoprofen ve omeprazolün miktar tayini için kalite kontrol amaçlı yenilikçi ve yeşil RP-HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, polar olmayan C18 kolonu, 1.5 mL/dk akış hızını, 220 nm dalga boyunu, metanol ve su'dan oluşan mobil fazı gradient elüsyon modunda kullanmışlardır. Her üç bileşenin kalibrasyon eğrisi değerleri 5-25 µg/mL (pirasetam ve ketoprofen) ve 3-20 µg/mL (omeprazol) olarak belirlenmiştir. Ayrıca R^2 değeri 0.9995 olarak gözlenmiştir.

Acharya ve ark. (2016) Pirasetam ve sitikolinin eş zamanlı tayini için bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Pirasetam için dalga boyu 205 nm olarak belirlenmiştir.

Gradient elüsyonla ayrım gerçekleşmiştir. Kalibrasyon eğrisi 0.48-1030 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. %BSS 0.29 ile 2.49 aralığındadır. Tabletten geri kazanım PİR için 94.3% - 109.1% aralığında bulunmuş ve LOQ değeri 0.41 µg/mL'dir. (Acharya ve ark., 2016)

Vahith ve ark. kapsülden Pirasetam ve sinnarizinin eş zamanlı tayini için RP-HPLC metodu geliştirmişlerdir. Mobil faz bileşimi metanol ve orto fosforik asitten oluşuyordu. Pirasetam için LOD= 1.9926 µg/mL ve LOQ= 6.0384 µg/mL olarak belirlenmiştir. (Vahith ve ark., 2024)

Abdelrahman ve ark. (2020) sitikolin ve pirasetamı, uluslararası uyum konferansı tarafından önerildiği gibi ayrı ayrı farklı stres koşullarına (asidik, oksidatif, fitolitik ve termal) tabi tutmuşlar ve bozunma ürünleri ile birlikte bu etken maddelerin miktar tayini için İnce Tabaka Kromatografisi ve UPLC yöntemlerini geliştirip valide etmişlerdir. Önerilen ince tabaka kromatografisi yönteminde 230 nm dalga boyunda silikajel plakalar üzerinde metanol; kloroform; amonyum klorür tamponu (9: 1: 2, h/h/h) kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Diğer tarafta, UPLC yönteminde mobil faz olarak % 0.1 trietilamin içeren su:etanol (92:8, h/h) karışımı, C18 kolon, UV dedektör, 230 nm dalga boyu ve 1.0 mL/dk akış hızı kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 5 dk'dir. Pirasetam için kalibrasyon eğrisi 2-60 µg/mL aralığında türetilmiş ve R^2 değeri 0.9998 olarak belirlenmiştir. Pirasetamın İnce tabaka kromtaografisi ve UPLC yöntemleri için LOQ değerleri sırasıyla 0.17 µg/band ve 1.82 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Pirasetam etken maddesi (>%99 saflıkta) Northeast Pharmaceutical Group Co. LTD tarafından sağlanmıştırr ve piyasada satışı bulunan Pirasetam içeren tablet (Nootropil ®) eczaneden temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların hepsi HPLC Grade saflıkta olup kullanılan saf su Millipore Direct-Q3 saf su cihazından alınmıştır.

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan etkin madde ve çözücüler analitik saflıkta olup Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal ve çözücüler

Kimyasalın Adı	**Menşei**
Trifloro asetik asit	Carlo Erba Reagents
Metanol	J.T. Baker
Asetonitril	Sigma Aldrich
Formik asit	Sigma Aldrich

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Programlar

Numunelerin ön hazırlığı için kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.2'de verildi. Deney hazırlığında kullanılan otomatik pipet, pipet ucu (sarı-mavi), eppendorf tüp (2 mL-15 mL), enjektör, şırınga filtre ucu, vial, vial kapağı, balon joje, manyetik balık, beher gibi malzemeler Fakültemizdeki Analitik Kimya Enstrümental Analiz Laboratuvarından temin edildi.

Kromatografik analiz için DAYTAM'da bulunan Agilent 6460 Triple Quadropol model LC-MS/MS kullanıldı. Cihazın kütle aralığı 5 – 3.000 m/z, maksimum tarama oranı 12,500 Da/s, kütle çözünürlüğü 0.7 Da (autotune) 0.5 Da (manual tune)'dır. Metabolit analizi için yine DAYTAM'da bulunan Agilent 6530 Accurate-Mass LC-Q-TOF/MS kullanıldı. Cihazın kütle aralığı 20.000 m/z'dir. Agilent

6520 Q-TOF cihazıyla konvansiyonel bir Agilent ESI kaynağı ve Agilent 6530 Q-TOF platformuna entegre edilmiş Agilent Jet Stream teknolojisi kullanıldı. Ayrım Hypersil GOLD™ UPLC BEH C18 kolonunda (100 mm ×2,1 mm, 1,9 µm) gerçekleşti. Hedeflenmemiş metabolomik yaklaşım uygulandı.

Spektrofotometrik ölçümler, Lexmark lazier yazıcıya bağlı 1,0 cm kuvars hücreleri kullanan bir Thermospectronik çift ışınlı UV-Vis Spektrofotometre (Model: Helios Beta NC: 9423 UVB 1002E No: UVB 090121 Made:in England) ile yapıldı. Spektral bant genişliği 2 nm ve dalga boyu tarama hızı 600 nm/min olarak belirlendi.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazların modelleri ve kullanım amaçları

Kullanılan cihaz	Model	Kullanım amacı
Mikrosantrifüj cihazı	Beckman Coulter Microfuge 20R)	Maddelerin ayrımını sağlamak için merkezkaç kuvveti etkisi ile çöktürme amacıyla kullanıldı.
Konsantratör	Eppendorf Concentratorplus	Uçurma yapma amacıyla kullanıldı.
Hassas Terazi	Kern ABT 100-5 M	Kimyasalların hassas şekilde tartımını sağlamak amacıyla kullanıldı.
Ultrasonik su banyosu	ELMA D-78224LC30	Çözündürme amacıyla kullanıldı.
Vorteks cihazı	Eppendorf Thermomixer C	Eppendorf tüp içindeki maddelerin karıştırılması, çalkalanması amacıyla kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı	WISD MSH-20A	Balon jojede hazırlanan numunelerin karıştırılması ve homojenizasyonu amacıyla kullanıldı.
-80° C dondurucu	ESCO Lexicon II	Numunelerin saklanması amacıyla kullanıldı.

İstatiksel analizler için Excel 2016, R Studio, XCMS, MATLAB, KEGG, HMDb ve MetaboAnalyst 6.0 yazılımları ve veri tabanları kullanıldı.

3.3. Deneysel Prosedür

3.3.1. Plazma Örneklerinin Toplanması

İnsan kan numunesi temini için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvuruldu ve gerekli onay alındı (B.30.2.ATA.0.01.00/394 sayılı belge). İnsan etik kurulu belgesi ilgili kısımda ekte sunuldu. Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Acil Polikliniğine baş dönmesi ile şikayeti başvuran hastaların tedavisi amacıyla hastaların bilgileri ve izinleri dâhilinde oral yoldan pirasetam etken maddesi içeren Nootropil (800 mg pirasetam) içeren ilaçtan iki tablet (1600 mg pirasetam) verildi. İlaç verilmeden önce mor kapaklı (EDTA'lı) tüplere 0. dk kanı alındı ve bunu takiben 30. dk ve 60. dk yeniden kanları alındı. Alınan kan numuneleri Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarında santrifüj edildi ve plazmanın ayrılması sağlandı. Plazmalar eppendorf tüplere alındıktan sonra analiz gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi. Toplamda 40 hastadan plazma numunesi toplandı. İlaç verilmeden önce alınan kan numuneleri konrtol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Hasta seçimi: Homojen bir yaş grubu sağlamak amacıyla 20-50 yaş arası bireyler çalışmaya ve toplamda 40 hasta çalışmaya dâhil edildi. Katılımcıların çalışmaya alınmadan önce son en az iki hafta içinde herhangi bir ilaç ya da gıda takviyesi kullanıp kullanmadığı sorgulandı ve eğer kullanmışsa bu bilgi kayıt altına alındı.

Dâhil Edilme Kriterleri: Hasta grubu için: 20-50 yaş arasında olmak

Dışlama Kriterleri: Kronik hastalıkları olan bireyler (diyabet, hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı gibi), son bir ay içinde düzenli olarak reçeteli ilaç veya sistemik etkili takviye ürünleri kullanmış bireyler , ahmile veya emziren kadınlar, sigara içen bireyler

3.3.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

3.3.2.1. Yöntem Şartları

Spektrofotometrik ölçümler, 190-260 nm dalga boyu aralığında Thermospectronik çift ışınlı UV-VIS spektrofotometresinde, 1 cm kuvartz küvetler kullanılarak alındı. Spektral band genişliği 2 nm dalga boyu tarama hızı 600 nm/dk. Pirasetamın için en iyi spektrumu elde edebilmek amacıyla önce farklı çözücüler denenerek çözücü seçimi yapıldı. UV Spektrofotometri de 190-600 nm dalga boyları arasında elde edilen çözeltiler taranarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λmax) belirlendi. En yüksek absorbans değeri %0.03 trifloasetik asit (TFA) içeren metanol'de elde edildi. Ayrıca çözeltilerin 1. Türevleri alınarak analiz işlemleri yapıldı. Yapılan taramalar sonucunda maksimum absorbans veren dalga boyu UV-Gör. Bölge Spektrofotometri yöntemi için 204 nm, 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemi için 201 nm olarak belirlendi. Standart çalışma çözeltileri ve kalite kontrol çözeltileri ile yapılan çalışmalarda bu dalga boyları kullanıldı.

3.3.2.2. Standart, Kalite Kontrol ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

% 0.03 TFA içeren metanolün hazırlanması: 500 mL'lik balon jojeye biraz metanol alındı. Üzerine 160 µL TFA eklendikten sonra metanol ile hacimi 500 mL'ye tamamlandı.

Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması: Pirasetam etken maddesinden dikkatlice 10 mg tartıldı ve 10 mL'lik balon jojede metanol'de (% 0.03 TFA) çözülerek 100 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden uygun miktarlarda alınıp seyreltilerek 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarında pirasetam standart çalışma çözeltileri elde edildi. Ayrıca stok çözeltiden kalibrasyon eğrisi aralığına dahil olan düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda (4, 17 ve 33 µg/mL) kalite kontrol numuneleri de benzer şekilde hazırlandı.

Tablet Çözeltilerin Hazırlanması: 10 adet tablet tek tek tartılarak toplam kütlesi belirlendi. Bir havana alındı ve toz haline gelene kadar iyice öğütüldü. 1 adet tabletin ortalama kütlesi (0.881 g) kadar bu tozdan tartıldı. 100 mL kalibre edilmiş balon jojeye aktarıldı, ilk önce bir miktar % 0.03 TFA'lı metanolde sonik banyo içerisinde bekletilerek tamamen çözülmesi sağlandı ve daha sonra aynı çözücü ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0.45 µm'lik por çapına sahip filtreden süzüldü. Hazırlanan bu stok çözeltiden çalışma için gerekli konsantrasyonlarda tablet çözeltileri hazırlandı. Analitik geri kazanım için; tablet stok çözeltiden 2 µg/mL konsantrasyonda tablet çalışma çözeltisi hazırlandı. 4, 17 ve 33 µg/mL konsantrasyonlardaki kalite kontrol çözeltilerinin her birine bu çözeltiden 2 µg/mL olacak şekilde tablet çözeltisi eklendi ve yöntemler ile analizleri yapıldı.

3.3.2.3. Yöntem Validasyonu

Analitik alanda, belirli amaçlar doğrultusunda oluşturulan kuralların dünya genelinde farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışma; The International Conference on Harmonization (ICH Q2, 1995) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

3.3.3. LC-MS/MS Yöntemi

3.3.3.1. Yöntem Şartları

Çalışmamızda Agilent 6460 Triple Quadropol model LC-MS/MS sistemi kullanıldı. ZORBAKS RR StableBond 4.6 x 75 mm boyutlarında, 3.5 µm partikül büyüklüğüne sahip C-18 kolon kullanıldı ve kolon ortam sıcaklığında tutuldu. Sisteme ait kütle şartları Tablo 3.3'de verildi. Asetonitril-su-formik asit (88:12:0,1, h/h/h) karışımı mobil faz olarak ve izokratik elüsyon kullanıldı. Mobil faz kullanılmadan önce ultrasonik banyoda bekletilerek degazae edildi. Çalışmada akış hızı 0.5 mL/dk ve enjeksiyon hacmi

5 µL idi. LC-MS/MS, pozitif iyon elektrosprey iyonizasyon arayüzünde piracetam için m / z 142.7 → 125.7 deki hedef iyonlar kullanılarak MRM modunda gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. LC-MS/MS yöntem şartları

Parametre	Değer (+)	Değer (-)
Gaz sıcaklığı (°C)	300.0	300.0
Gaz akışı (L/dk)	10.0	10.0
Nebulizatör basıncı (psi)	40.0	40.0
Kılıf gazı ısıtıcısı	325.0	325.0
Kılıf gazı akışı	11.0	11.0
Kılcal (V)	3000.0	3000.0
Şarj gerilimi	0.0	0.0
Enjeksiyon hacmi (µL)	5.0 µL	
İyon kaynağı	AJS ESI	
İyon modu	Pozitif	

3.3.3.2. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

Boş plazma oda sıcaklığına getirilerek çözünmesi sağlandıktan sonra 100 µL plazma 2 mL'lik santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 500 µL asetonitril eklenerek plazma proteinlerinin çökmesi sağlandı. 10 dk vortekslendi ve 8.000 rpm'de 12 dk santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve vakum konsantratörde kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı daha sonra 1 mL mobil fazda çözüldü. Ardından 200 µL'lik kısmı eppendorf tüpe alınarak yeniden 1 mL mobil faz ile seyreltildi böylece 50 kat seyreltilmiş oldu. Hazırlanan bu çözeltiden 5 µL LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

3.3.3.3. Pirasetam Standart Çalışma Çözeltileri ve Plazma Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Pirasetam standart stok çözeltisi %0.03 TFA içeren metanolde 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Hazırlanan standart stok çözeltisinden önceden belirlenen

uygun hacimlerde alınıp %0.03 TFA içeren metanol ile 25, 50, 75, 100, 200, 500 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

Plazma standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması: pirasetam standart stok çözeltisinden plazmada 25, 50, 75, 100, 200, 500 ve 750 ng/mL konsantrasyonlarda pirasetam olacak miktarlar önceden belirlendi ve bu miktarlarda pirasetam standart çözeltisi 50 µL boş insan plazmasına spayk edildi, vortekslendi ve "3.3.3.2. Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi" bölümünde anlatıldığı şekilde ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlar süzüldü ve 5 µL hacimde LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Validasyon için kullanılan kalite kontrol çözeltileri de (KK) yukarıda anlatıldığı şekilde 60, 120 ve 600 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlandı ve analizleri yapıldı.

3.3.3.4. Yöntem Validasyonu

Yöntem doğrusallık, miktar tayin sınırı (LOQ), gözlenebilme sınırı (LOD), geri kazanım, doğruluk ve kesinlik açısından ICH kılavuzlarına göre valide edildi. Doğrusallığı değerlendirmek için standart ve plazma kalibrasyon eğrileri hazırlandı ve 3 ayrı günde iki kez denendi. Doğruluk ve kesinlik ayrıca, 3 gün üç konsantrasyon seviyesinde altı tekrarlı değerlendirildi. Doğruluk % bağıl hata (%BH) ile ve kesinlik % bağıl standart sapma (%BSS) ile ifade edildi.

3.3.4. Metabolomiks

3.3.4.1. LC-Q-TOF/MS Yöntem Şartları

Analizler Atatürk Üniversitesi DAYTAM'dan hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Hazırlanan örnekler LC-QTOF/MS yöntemi ile analiz edildi. Agilent 1290 Infinity Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC; Agilent, Santa Clara, CA, ABD) ile Agilent 6530 Doğru Kütle Dörtlü Kutuplu Uçuş Süresi (Q-TOF) kütle spektrometresi (Agilent, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Bir Hypersil GOLD™ UPLC BEH

C18 kolonu (100 mm ×2.1 mm, 1.9 µm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanıldı. Mobil faz, suda %0.1 formik asit (mobil faz A) ve asetonitrilden (mobil faz B) oluşuyordu. Gradinet elüsyonu 0.00 ila 0.5 dakika arasında %98 çözücü A ve %2 çözücü B ile başladı ve 4,00 dakikaya kadar %80 A ve %20 B'ye geçti. Daha sonra 4.00 ila 7.00 dakika arasında %50 A ve %50 B'ye geçti, ardından 7.00 ila 12.00 dakika arasında %5 A ve %95 B geldi. Gradyan 12.00 ila 15.00 dakika arasında %98 A ve %2 B'ye geri döndü. Enjeksiyon hacmi ve akış hızı sırasıyla 5 µL ve 0.4 mL/dakikaydı. Kütle spektrometresi, pozitif iyonizasyon modunda 100–1500 m/z kütle aralığında tam MS modunda çalıştırıldı. Kurutma gazı akışı 11 L/dk olarak ayarlandı ve gaz sıcaklığı 350◦C idi. Nebulizatör basıncı 45 psig idi ve fragmentatör voltajı 120 V idi. Doğru kütle ölçümleri, jet akımı termal odaklama ESI kaynağı aracılığıyla düşük akışlı (100 mL/dk) kalibrasyon çözeltisi sağlayan otomatik bir kalibrasyon dağıtım sistemiyle sağlandı.

3.3.4.2. Metabolomiks İçin Örnek Hazırlama

-80°de saklanan plazma numuneleri oda sıcaklığında kontrollü olarak çözündürüldü. Çözündükten sonra vortekslendi. Her bir plazmadan 100 µL alınarak 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Her birine 300 µL metanol eklendi yaklaşık 1.0 dk vortekslendi ve 15 dk +4°C'de bekletildi. Sonrasında 16.000 rpm, 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak vakum konsantratörde V-AL modunda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1.0 µM iç standart (karbamazepin) içeren 1.0 mL asetonitril (%0.1 formik asit) ve ultra saflaştırılmış su (%0.1 formik asit) (1:1 ; h:h) karışımı ile yeniden çözüldü. Bunun yanı sıra başlangıçta her örneğin 5.0 µL'si kalite kontrolü (QC) ve QC-Support Vector Regression (SVR) örneklerinin hazırlanması için toplandı ve QC ve QC-SVR örnekleri analitik çalışma sırasında 3 örnekten sonra enjekte edilerek tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesinde kullanıldı. LC-Q-TOF/MS analizi için

96 kuyucuğu bulunan platelere numuneler 0.45 µ'luk şırınga filtre ile süzülerek 300 µL olacak şekilde aktarıldı

3.3.4.3. Veri Toplama, Ön İşleme, Özellik Tespiti ve İstatiksel Analiz

Bu stratejinin ilk aşaması kapsamlı küresel MS verilerinin elde edilmesi ve ardından üç boyutlu bir veri matrisinin çıkarılmasıdır. Bu matris, örnek kodu, tutulma süresi (Rt)–m/z çiftleri ve iyon yoğunluğu değerlerinden oluşuyordu. İlaç verilmeden önce alınan plazma, ilaç verildikten sonra 30. dakikada ve 60. dakikada alınan plazma örnekleri potansiyel ayırıcı sinyalleri belirlemek için LC-Q-TOF/MS ile analiz edildi. İki farklı iyonizasyon modundan elde edilen verileri işlemek için pozitif iyonizasyon verileri ayrı ayrı işlendi. Başlangıçta .d formatında olan ham Q-TOF/MS verileri, mzXML'ye dönüştürüldü ve ardından veriler, daha fazla işleme için XCMS çevrimiçi platformuna yüklendi. XCMS, özellikle sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve diğer kütle spektrometrisi tabanlı metabolomik verileri analiz etmek için yaygın olarak kullanılan biyoenformatik bir yazılım paketidir ve temel amacı biyolojik olarak ilgili olma olasılığı yüksek olan tanımlanacak özelliklere öncelik vererek hedeflenmemiş çalışmaların genel verimini ve verimliliğini artırmaktır. XCMS'de öncelikle tepe tespiti yapıldı yani ham kromatogramlardaki metabolitlere karşılık gelen sinyaller belirlendi. Daha sonra farklı örnekler arasındaki retensiyon zamanlarındaki küçük farklılıklar hizalandı. Sonrasında farklı örneklerde tespit edilen pikler, kütle yük oranları ve düzeltilmiş retansiyon zamanlarına göre gruplandırıldı. Bunlar ön işleme adımlarıydı. Daha sonra özellik tespiti yapıldı. Her bir tepe özellik olarak adlandırıldı ve belirli bir retensiyon zamanı ve m/z değeri ile temsil edildi. $P \leq 0.05$ ve kat değişimi ≥ 1.1 olan özellikler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Seçilen önemli m/z değerleri İnsan Metabolom Veritabanı (HMDB), Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) ve METLIN veritabanı aracılığıyla

değerlendirildi. Metabolik verilerin işlenmesi, istatiksel analizi, görselleştirilmesi (kümeleme gibi), biyolojik olarak yorumlanması ve diğer omiks verileriyle entegrasyonu için MetaboAnalyst 6.0 programı kullanıldı. Ayrıca MetaboAnalyst ROC eğrisi analizine imkan sağlayarak potansiyel biyomarkerlerin belirlenmesini de sağladı.

4. BULGULAR

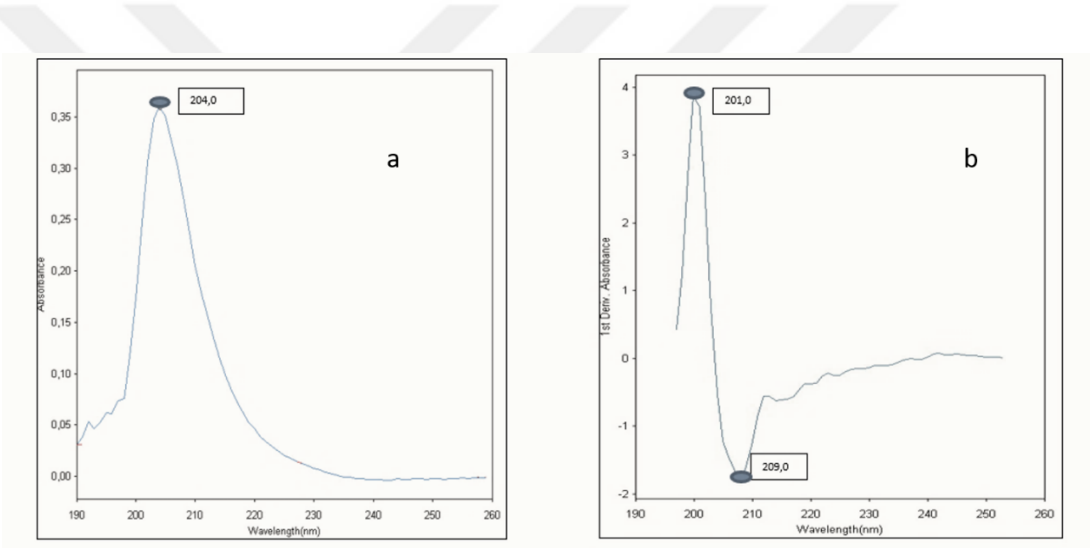
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri Yöntem Bulguları

4.1.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Pirasetamın % 0.03 TFA içeren metanol ortamında UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri çalışması için, açıklanan deneysel koşullar altında sırasıyla, maksimum absorbans gösterdikleri 204 nm ve 201 nm dalga boylarında spektrumları alındı ve absorbans değerleri belirlendi. Konsantrasyona karşı okunan absorban değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri elde edildi. Şekil 4.1'de 10 µg/mL konsantrasyonda pirasetam çözeltisinin her iki yöntemle alınan spektrumları verildi ve maksimum absorbans değerleri spektrum üzerinde gösterildi. 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarda pirasetam standart çalışma çözeltilerinin UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri ile elde edilen Şekil 4.2'de verildi. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı değerleri için en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon analizi yapıldı. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin 2-35 µg/mL konsantrasyon aralığında 9 noktalı kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrileri Şekil 4.3'de verildi. İlacın yanıtı her iki yöntem için de bu çalışma aralığında doğrusal olduğu belirlendi. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri için doğrusal regresyon denklemi A = 0.030x + 0.039 ve korelasyon katsayısı 0.9990 bulundu. 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemi için doğrusal regresyon denklemi A_1 = 0.316x + 0.623 ve korelasyon katsayısı 0.9992 bulundu. Kalibrasyon eğrisi istatiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Pirasetamın UV-Gör. bölge spektrofotometri ve 1. derece türev spektrofotometri yöntemlerinin kalibrasyon eğrilerinin istatiksel analiz verileri

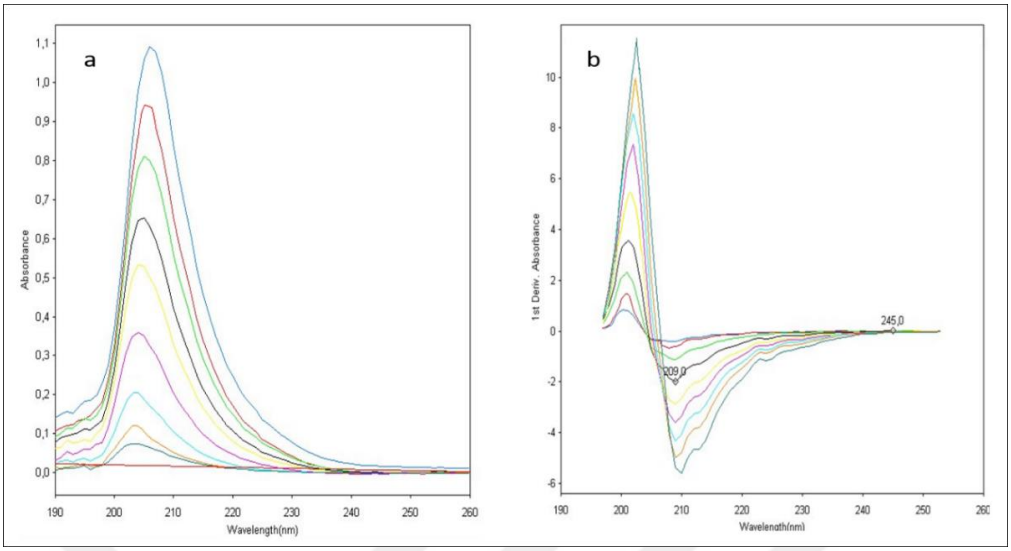
	Dalga boyu(nm)	Çalışma aralığı (µg/mL)	Regrasyon Denklemi	R^2
UV-Gör. Bölge Spektrofotometri	204	2-35	A = 0.030x + 0.039	0.9990
1. Derece Türev Spektrofotometri	201	2-35	A_1 = 0.316x + 0.623	0.9992



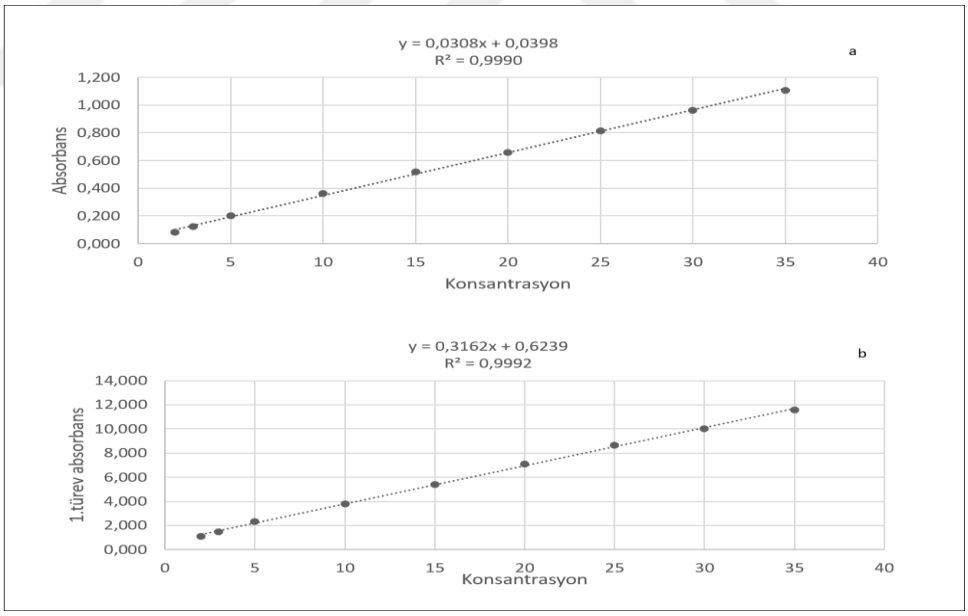
Şekil 4.1. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile 10 µg/mL pirasetam çözeltisinin alınan spektrumları ve maksimum absorbans değerlerini gösteren dalga boyları

4.1.2. Doğruluk ve Kesinlik

Kalite kontrol çözeltileri her iki yöntemle gün içi (aynı gün) ve günler arası (farklı 3 gün) altı kez tekrar ederek analizleri yapıldı. Elde edilen verilerin ortalama değerleri, standart sapmaları, bağıl standart sapma değerleri ve bağıl hata değerleri hesaplandı. Doğruluk % Bağıl Hata (%BH) ile kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (%BSS) ile verildi. İncelenen tüm konsantrasyonlar için gün içi ve günler arası %BSS değerleri %2.06 ve %BH değerleri ise % 3.79'dan küçük bulundu (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarda pirasetam standart çalışma çözeltilerinin spektrumları



Şekil 4.3. UV-Gör. bölge spektrofotometri (a) ve 1. derece türev spektrofotometri (b) yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon eğrileri

Tablo 4.2. UV-Gör. bölge spektrofotometri ve 1. derece türev spektrofotometri yöntemleri için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

	Eklenen (µg/mL)	Gün-içi			Günler arası		
		Bulunan ±SS[a]	Doğruluk %BH[b]	Kesinlik %BSS[c]	Bulunan ±SS[a]	Doğruluk %BH[b]	Kesinlik %BSS[c]
UV-Gör. Bölge Spektrofoto-metri	4	3.98±0.07	-0.28	1.79	3.94±0.08	-1.39	1.93
	17	17.11±0.16	0.65	0.98	17.55±0.34	3.27	1.91
	33	32.95±0.18	-0.14	0.54	33.05±0.42	0.17	1.27
1.Derece Türev spektrofoto-metri	4	3.98±0.02	-0.50	0.55	3.84±0.07	-3.79	2.06
	17	16.79±0.03	-1.20	0.15	16.79±0.05	-1.23	0.30
	33	32.67±0.03	-0.99	0.10	32.60±0.03	-1.19	0.12

([a]SS: Standart sapma; [b]BH: Bağıl hata; [c]BSS%: % Bağıl standart sapma)

4.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

ICH yönergelerinde gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırını (LOQ) belirlemek için 3 farklı yöntem önerilmiştir. Bu çalışmada, bu yöntemlerden kalibrasyon eğrisi üzerinden standart sapma ve eğim kullanılarak LOQ= 10 x (SS/m), LOD=3.3 x (SS/m) formüllerine göre LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Burada m; kalibrasyon eğrisinin eğimini SS ise eğimlerin standart sapmasını temsil etmektedir. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri yöntemi için LOD ve LOQ sırasıyla 0.40 µg/mL ve 1.23 µg/mL, 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemi için sırasıyla 0.04 µg/mL ve 0.12 µg/mL olarak belirlendi.

4.1.4. Analitik Geri Kazanım

Analitik geri kazanım (AGK) deneyleri standart ekleme yöntemiyle yapılmıştır. Bölüm 3.3.2.2' de anlatıldığı gibi Nootropil ® tabletinden hazırlanan 2 µg/mL konsatrasyondaki pirasetam tablet çözeltisi (A_{tablet}) ile 4, 17 ve 33 µg/mL

konsantrasyonlardaki kalite kontrol çözeltilerinin UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri ile spektrumları alındı ve absorbans değerleri ($A_{kalite\ Kontrol}$) belirlendi. Daha sonra üç kalite kontrol çözeltileri (4, 17 ve 33 µg/mL) üzerine 2 µg/mL konsatrasyondaki tablet çözeltisinden eklendi. Ekleme sonrası elde edilen çözeltilerin (2+4, 2+17 ve 2+33 µg/mL) her iki yöntemle spektrumları alındı maksimum absorbans (A_{Toplam}) değerleri tespit edildi. Analitik geri kazanım değerleri aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\%AGK = \frac{A_{Toplam} - A_{Kalite\ Kontrol}}{A_{Tablet}}\ x\ 100$$

% Analitik Geri Kazanım (%AGK) değerleri her iki yöntem için %98.09 - %100.13 aralığında bulundu. Değerler Tablo 4.3'de özetlenmiştir.

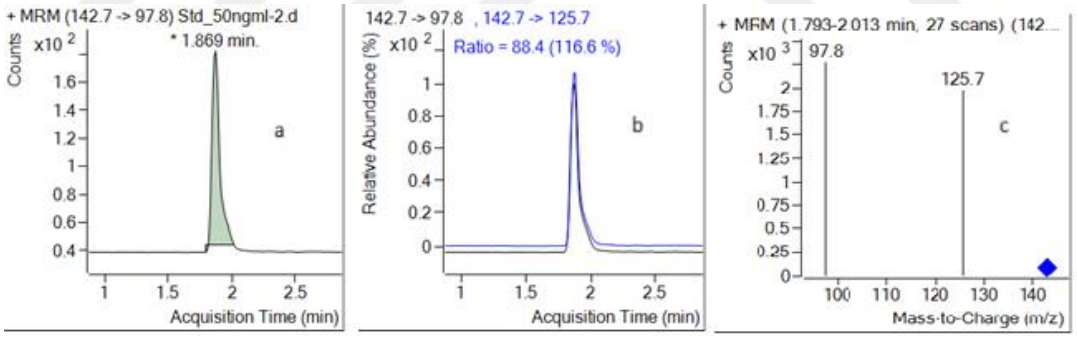
Tablo 4.3. Geri kazanım değerleri

	Ticari Preparat	**Tablet çözeltisi derişimi (µg/mL)**	**Eklenen (µg/mL)**	**Bulunan (µg/mL)**	**Geri kazanım %**	**BSS %**
UV-Gör. Bölge Spektrofoto-metri	Nootropil (800 mg)	2	4	6.04	98.70±3.69	3.73
			17	18.86	98.09±0.66	0.68
			33	34.73	98.96±0.58	0.59
1.Derece Türev spektrofoto-metri	Nootropil (800 mg)	2	4	5.80	99.15±0.96	0.97
			17	18.67	100.13±0.13	0.13
			33	34.25	99.16±0.05	0.05

4.2. LC-MS/MS Bulguları

4.2.1. Kütle Spektroskopi Bulguları

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi iki spesifik MRM geçişi vardır. 142.7 -> 97.8 geçişi 142.7 m/z oranına sahip bir prekürsör iyonun parçalanarak 97.8 m/z'lik bir ürün iyonu oluşturduğunu göstermektedir. 142.7 -> 125.7 geçişi ise aynı prekürsör iyonun parçalanmasıyla 125.7 m/z'lik bir başka iyonun oluştuğunu ifade eder. Pirasetamın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 142 g/mol'dür. Dolayısıyla, 142.7 m/z değeri, pirasetamın protonlanmış molekül iyonu ([M+H]+)dur. MRM analizlerinde, aynı prekürsör iyondan oluşan farklı ürün iyonlarının sinyal yoğunluklarının belirli bir oranda olması beklenir. Bu grafikte, 142.7 -> 97.8 geçişinin sinyali ile 142.7 -> 125.7 geçişinin sinyali arasındaki oran 88.4 olarak bulunmuştur. Bu iyon oranı, pirasetam için karakteristik bir "parmak izi" gibidir. Grafikte bu oran %116.6'lık bir sapma gösteriyor, ancak bu kabul edilebilir bir aralıktadır.



Şekil 4.4. [a]Kromatogram (zamana karşı iyon yoğunluğu), [b]Kromatogram (zamana karşı göreceli bolluk), [c]Kütle spektrumu (kütle/yük oranınan karşı iyon yoğunluğu)

4.2.2. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

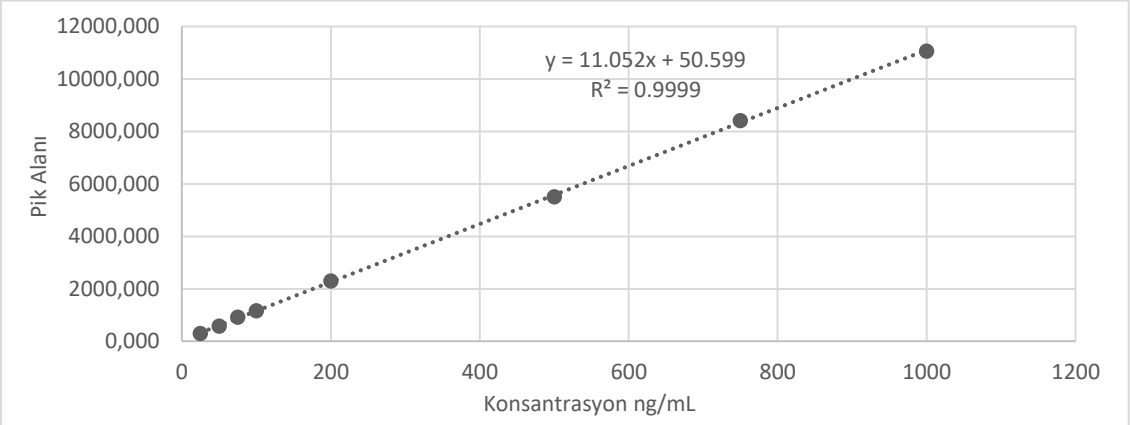
25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında sekiz konsantrasyon (25, 50, 75, 100, 200, 500, 750 ve 1000 ng/mL) seviyesinden bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Doğrusal regresyon analizi test edilen konsantrasyon aralığında pirasetamın hem standart çalışma çözeltileri hem de plazma çalışma çözeltileri için mükemmel doğrusallık elde edildi. Standart çalışma çözeltilerinin ve plazma çalışma çözeltilerini istatiksel analizi sonrası

elde edilen regrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları sırasıyla y= 11.052x + 50.599 (R^2 = 0.9999) ve y= 8.226x + 52.627 (R^2 = 0.9993) olarak elde edildi ve istatiksel değerler Tablo 4.4'de verildi. LC-MS/MS ile çalışmasında plazmadan gelen herhangi bir interfere pike rastlanmadı ve pirasetam için tatmin edici bir ayırma ve pik noktası ile sonuçlanan kromatogram elde edildidi. Pirasetam alı konma süresi 1.869 dk olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrileri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da; elde edilen kromatogramlar Şekil 4.7 ve 4.8'de verildi.

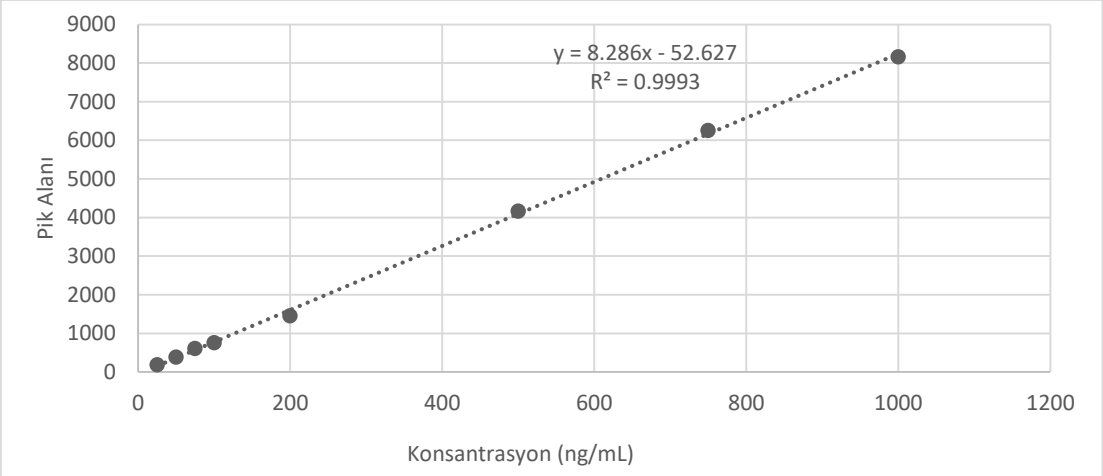
Tablo 4.4. Standart ve plazma çözeltilerinin istatiksel analiz sonuçları

	Çalışma Aralığı (ng/mL)	Regrasyon Denklem	R^2	Sa	Sb
Standart çalışma çözeltileri	25-1000	y= 11.052x + 50.599	0.9999	0.011472	2.54272
Plazma çalışma çözeltileri	25-1000	y= 8.226x + 52.627	0.9993	0.031820	5.07637

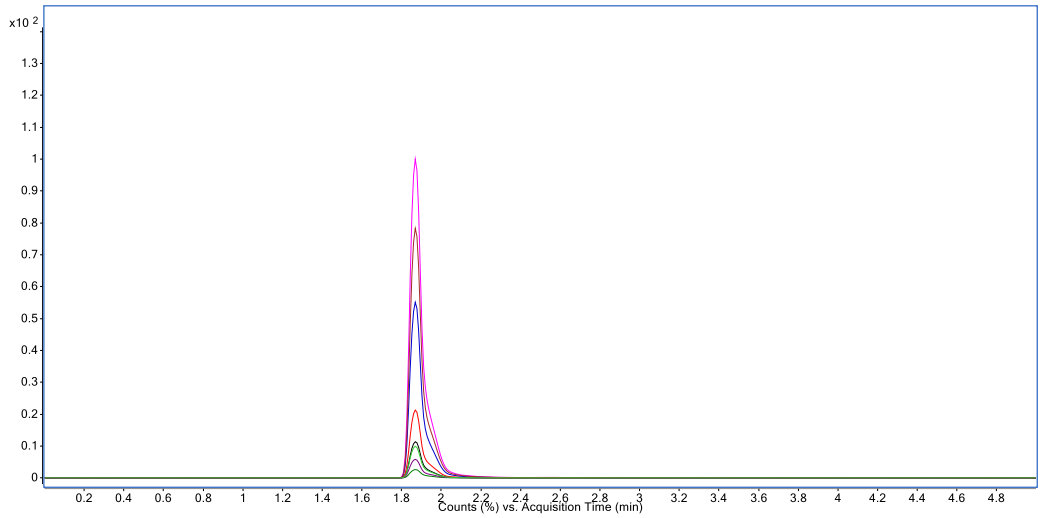
R^2: Korelasyon katsayısı, Sa: Kalibrasyon eğrisi kaymanın standart sapması, Sb: Kalibrasyon eğrisi eğiminin standart sapması



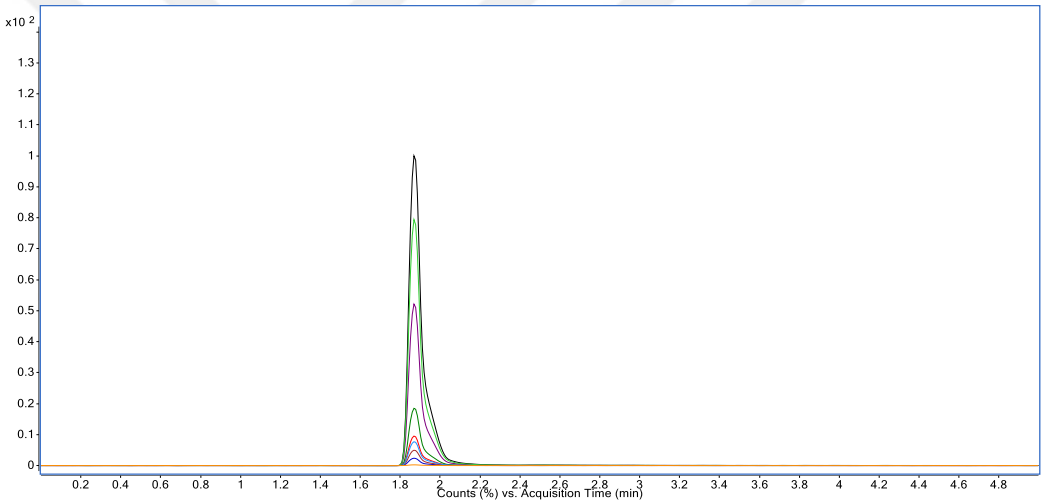
Şekil 4.5. LC-MS/MS yönteminin standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi ve regrasyon denklemi



Şekil 4.6. LC-MS/MS yöntemiyle plazma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi ve regrasyon denklemi



Şekil 4.7. 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında pirasetamın standart çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.8. 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında pirasetamın plazma çalışma çözeltilerinin LC-MS/MS kromatogramı

4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Kalite kontrol çözeltileri her iki yöntemle gün içi (aynı gün) ve günler arası (farklı 3 gün) altı kez tekrar ederek analizleri yapıldı. Elde edilen verilerin ortalama değerleri, standart sapmaları, bağıl standart sapma değerleri ve bağıl hata değerleri hesaplandı. Doğruluk % Bağıl Hata (%BH) ile kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (%BSS) ile verildi. 60, 120 ve 600 ng/mL standart çalışma çözeltileri LC-MS/MS yöntemi ile gün içi ve günler arası analizleri gerçekleştirildi. Plzama çalışmalarında ise üç farklı

konsantrasyonda (60, 120 ve 600 ng/mL) pirasetam standart çalışma çözeltileri boş plazmaya spayk edildi ve önceden geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ekstraktları yapıldı. Elde edilen plazma çözeltileri mevcut yöntem ile analizleri yapıldı. Analizler sonrasında gün içi ve günler arası standart çalışma çözeltilerinin %BH değerlerinin % 0.072, %BSS değerlerinin ise % 1.97'den küçük olduğu, gün içi ve günler arası plazma çalışma çöeltileri için ise % BH değerlerinin % 0.004 ve % BSS değerlerininde % 0.66'dan küçük olduğu tespit edildi (Tablo 4.5). Bu elde edilen verilerin yöntemin plazma çalışmalarında iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.5. Standart ve plazma çalışma çözeltilerinin gün içi ile günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

		Gün içi			**Günler arası**		
	Eklenen (ng/mL)	Bulunan±SS	Doğru-luk % BH	Kesin-lik % BSS	Bulunan±SS	Doğru-luk % BH	Kesin-lik % BSS
Standart çalışma çözeltileri	60	60.43±1.14	0.072	1.89	63.34±1.25	0.557	1.97
	120	123.24±0.85	0.540	0.69	124.15±1.89	0.691	1.52
	600	602.52±0.76	0.420	0.13	603.14±1.06	0.523	0.18
Plazma çalışma çözelltileri	60	57.38±0.82	-0.004	1.43	57.18±1.59	-0.087	0.66
	120	119.13±1.23	-0.145	1.03	118.89±1.89	-0.186	1.59
	600	597.89±2.78	-0.352	0.47	600.69±3.98	0.114	0.66

(SS: Standart sapma; %BH: Bağıl hata; %BSS: Bağıl standart sapma)

4.2.4. Gözlenebilme (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

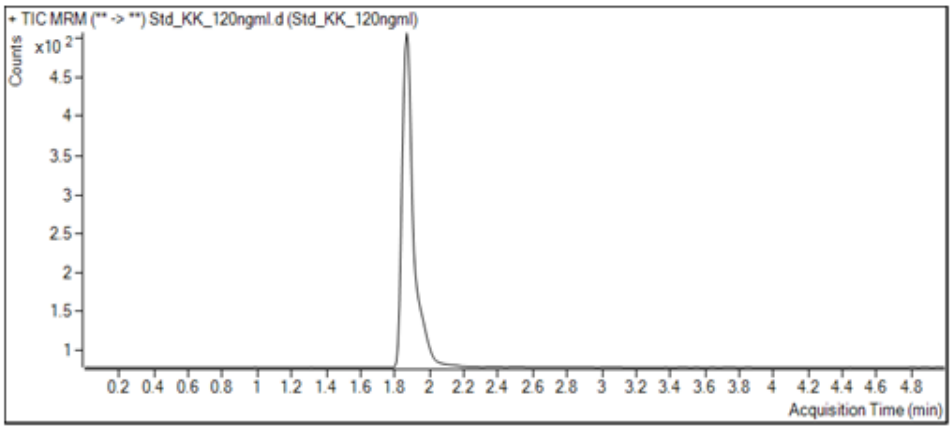
LC-MS/MS yönteminin plazma çalışmasında cihazda alınan kromatogramlardan LOD değeri sinyal/gürültü oranının 3 ile çarpılması ve LOQ değeri ise sinyal/gürültü oranının 10 ile çarpılması ile belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.75 ng/mL ve 2.30 ng/mL olarak tespit edildi.

4.2.5. Plazmadan Geri Kazanım (GK)

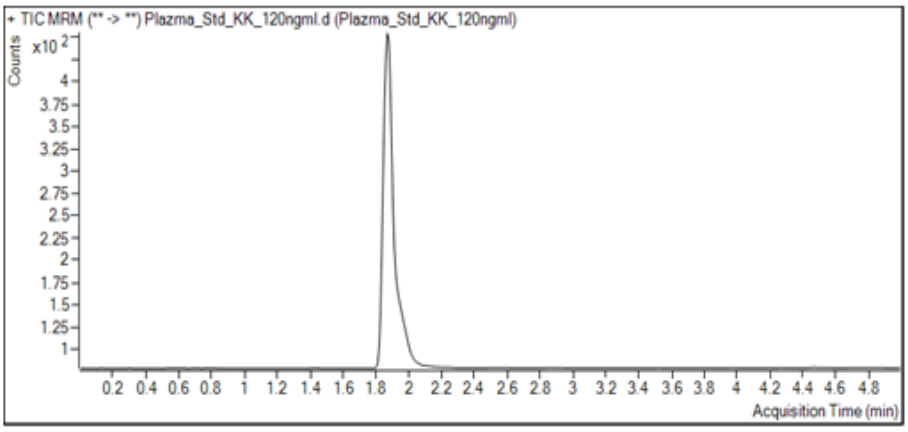
Çalışılan yöntemin plazmadan geri kazanım değeri ortalama olarak % 86.79 ve %91.72 aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek geri kazanım değeri hem gün içi hem günler arası analizde 120 ng/mL konsantrasyonunda gözlendi. 120 ng/mL konsantrasyonda pirasetam standart çalışma çözeltisinin ve plazma çalışma çözeltisinin kromatogramları sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verildi. Geri kazanım değerleri ise Tablo 4.7'de özetlendi.

Tablo 4.6. Pirasetamın plazmadan geri kazanım (GK) değerleri (60, 120 ve 600 ng/mL)

Plazma konsatrasyonu	**60 ng/mL**	**120 ng/mL**	**600 ng/mL**
Gün içi (% GK)	89.99±3.24	91.72±1.38	88.52±0.46
Günler arası (%GK)	89.41±2.13	91.68±1.69	86.79±0.54



Şekil 4.9. 120 ng/mL pirasetam standart çalışma çözeltisinin kromatogramı



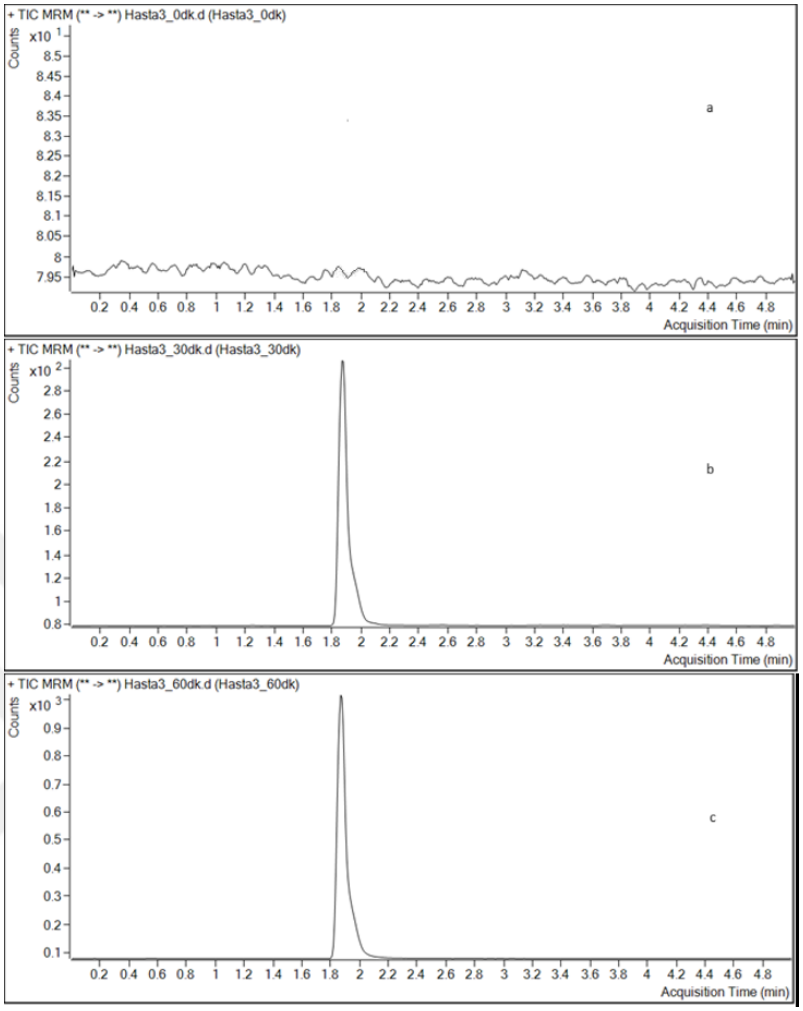
Şekil 4.10. 120 ng/mL pirasetam plazma çalışma çözeltisinin kromatogramı

4.2.6. Gerçek Numunelere Uygulanması

40 hastanın ilaç verildikten 30. dk sonra ve 60. dk sonrası plazmadaki pirasetam konsantrasyonları Tablo 4.7'de verildi. Hastaların 30. dk ve 60. dk plazma konsantrasyonlarının ortalama değerleri sırasıyla 74.81 ng/mL ve 351.69 ng/mL olarak tespit edildi. Boş plazma (ilaçsız) ile hastalara ilaç verildikten sonra alınan 30. dk ve 60. dk plazma örneklerinin LC-MS/MS kromatogramları Şekil 4.11'de verildi.

Tablo 4.7. Hasta numunelerinin 30. ve 60.dk dakikalardaki plazma konsantrasyon değerleri

Hasta no	30.dk plazma konsantrasyonu (ng/mL)	60.dk plazma konsantrasyonu (ng/mL)	Hasta no	30.dk plazma konsantrasyonu (ng/mL)	60.dk plazma konsantrasyonu (ng/mL)
1	56.675	206.200	**21**	60.056	325.900
2	81.898	361.878	**22**	78.400	452.690
3	80.932	317.225	**23**	61.542	300.560
4	45.565	217.652	**24**	89.125	500.620
5	54.869	237.896	**25**	100.350	605.980
6	92.896	415.899	**26**	78.760	425.100
7	83.696	324.989	**27**	75.452	374.562
8	75.696	305.542	**28**	76.254	400.525
9	99.896	405.696	**29**	90.250	450.685
10	64.125	254.650	**30**	62.580	345.621
11	52.154	228.456	**31**	56.425	265.128
12	98.225	402.569	**32**	69.552	364.255
13	85.400	375.250	**33**	70.568	300.650
14	92.420	500.625	**34**	102.568	594.890
15	62.800	269.841	**35**	89.462	375.648
16	95.640	408.350	**36**	64.855	264.500
17	75.250	375.975	**37**	62.564	310.524
18	64.840	255.671	**38**	60.453	298.564
19	57.900	221.552	**39**	70.899	300.253
20	69.782	326.500	**40**	81.469	398.458



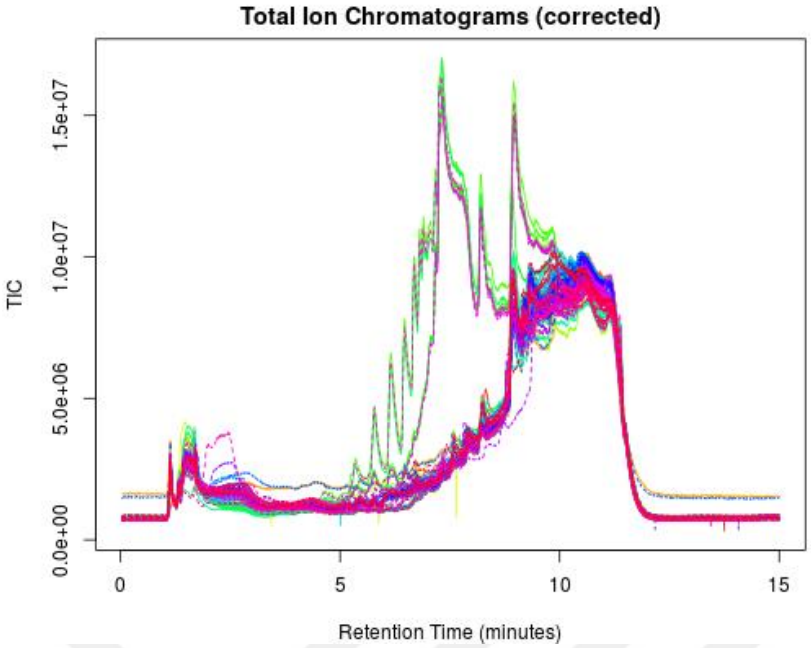
Şekil 4.11. Boş hasta plazması (a), ilaç verildikten 30 dk sonra alınan plazma örneği (b), ilaç verildikten 60 dk sonra alınan plazma örneği (c) LC-MS/MS kromatogramları

4.3. Metabolomiks Bulguları

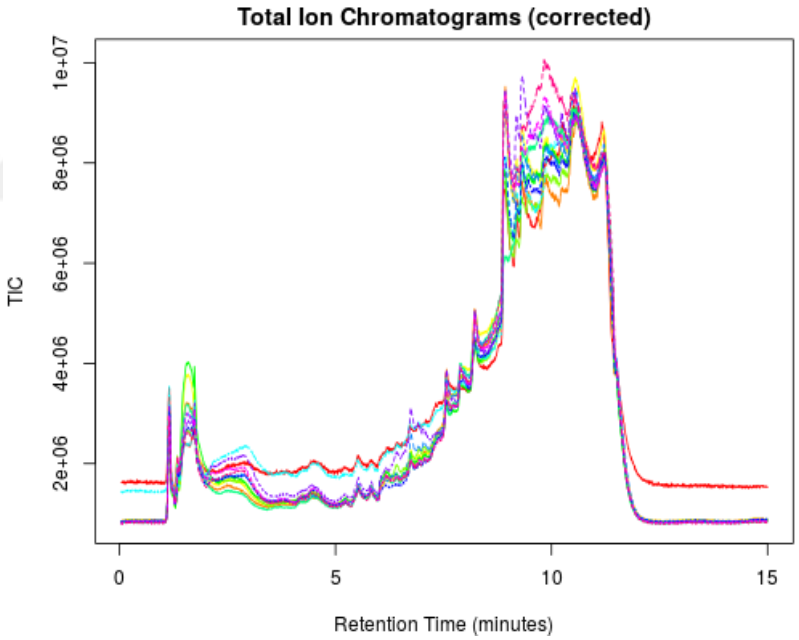
4.3.1. Metabolomik Analiz ve Metabolitleri Tanımlama

Bu çalışmada, Araştırma Hastanesi Acil Kliniğine gelen hastalara ilaç verilmeden önce (Kontrol grubu) ve ilaç verildikten sonra 30. dk ve 60. dk (pirasetam ile tedavi edilen gruplar) toplanan plazma örnekleri üzerindeki metabolik etkisi LC-Q-TOF/MS ile araştırıldı. İlaç verildikten 30 dk sonra alınan kan örnekleri ile yapılan analiz grup 1, 60 dk sonra alınan kan örnekleri ile yapılan analiz ise grup 2 olarak adlandırıldı. Sonuçlar Agilent MassHunter Yazılım Sürümü B.02.00 ile değerlendirildi. Metabolitlerin

tanımlanması m/z oranlarına dayanarak gerçekleştirildi ve pik (tepe) noktaları XCMS yazılımı ile doğrulandı ve düzenlendi. Grup 1 ve Grup 2 için düzeltilmiş toplam iyon kromatogramları sırasıyla Şekil 4.12'de ve Şekil 4.13'te verildi. Grafikte; y ekseni belirli bir anda dedektöre ulaşan tüm iyonların toplam sinyal yoğunluğunu temsil eder. Yüksek değerler, o anda daha fazla sayıda veya daha yoğun sinyalli iyonun dedekte edildiği anlamına gelir. X ekseni, analitlerin kolon boyunca hareket etme süresini (alıkonma süresi) gösterir. Grafikte görünen her bir tepe (pik), numunede bulunan farklı bir metaboliti temsil eder. Pikin yüksekliği, o metabolitin göreceli bolluğunu veya konsantrasyonunu gösterirken, pikin konumu (x eksenindeki alıkonma süresi) o metabolitin kimliği hakkında bilgi verir. Farklı bileşikler, kolonla farklı etkileşimler gösterdikleri için farklı alıkonma sürelerinde dedektöre ulaşırlar. Kütle dedektörü, kontrol ve grup 1 arasında farklılık gösteren 724 farklı m/z değeri belirlerken kontrol ve grup 2 arasında 2119 farklı m/z değeri belirledi. Kat değişimi ≥ 1.1 ve/veya $P \leq 0.05$ olan özellikler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. 30 dk grubu için 724 metabolitten 244 tanesi anlamlı bulunurken 60 dk grubu için 2119 metabolitten 227 tanesi anlamlı bulundu. Aynı m/z değerine sahip özellikler, MS/MS sonuçları karşılaştırılarak daha fazla doğrulandı. Doğru kütle ve yapısal bilgiler, METLIN veritabanındaki literatür değerleriyle eşleştirildi. Tablo 4.8 ve 4.9'da sırasıyla her iki grup için belirlenen metabolitler listelenmektedir. Agaritinal, pikolinik asit, vinil asetil glisin, glutamin, piroglutamik asit, aspartil sistein hem 30 dk grubunda hem de 60 dk grubunda gözlemlenen metabolitlerdir.



Şekil 4.12. Grup 1 metabolitlerin toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.13. Grup 2 metabolitlerin toplam iyon kromatogramı

Tablo 4.8. Önemli metabolitler (Grup 1)

No	Kodu	Metabolit adı	Kat-lanma	P değeri	Regü-lüsyo-nu	Molekül ağırlığı	Rt - med
1	HMDB0040694	Agaritinal	30.4	3.10862e-15	yukarı	307.2573	2.83
2	HMDB0002243	Picolinic acid	24.5	5.20473e-13	yukarı	123.1109	2.26
3	HMDB0028802	Glutaminyllysine	1.2	0.01021	yukarı	118.0873	1.71
4	HMDB0000894	Vinylacetiylglycine	16.7	4.44089e-16	yukarı	126.0560	2.84
5	C00303	Glutamine	18.4	8.88178e-16	yukarı	143.0823	2.23
6	HMDB0000267	Pyroglutamic acid	15.9	2.20002e-12	yukarı	126.0560	2.84
7	HMDB0031411	4-Acetamido-2-butanoic acid	15.0	2.30414e-9	yukarı	143.0828	2.18
8	HMDB0006779	Indole-5,6-quinone	12.4	0.00000e+0	yukarı	165.0646	3.82
9	HMDB0029633	Phenylmethanethiol	8.6	3.83912e-9	yukarı	166.0684	2.20
10	HMDB0034263	Triethyl citrate	2.0	0.00074	aşağı	315.0828	
11	HMDB0003416	D-arginine	1.5	0.01485	yukarı	175.1119	1.52
12	HMDB0249195	Bifemelane	6.5	1.97264e-12	yukarı	308.1630	4.37
13	131751354	2-Undecyl-4(1H)-quinolinone N-oxide	1.4	0.03811	aşağı	332.2471	7.93
14	HMDB0003334	Symmetric Dimethylarginine	1.5	0.00535	yukarı	203.1511	1.59
15	51712	Pramiracetam	1.4	0.03542	yukarı	292.2003	1.42
16	HMDB0028750	Aspartyl-Cysteine	1.6	0.00360	aşağı	219.0450	4.81

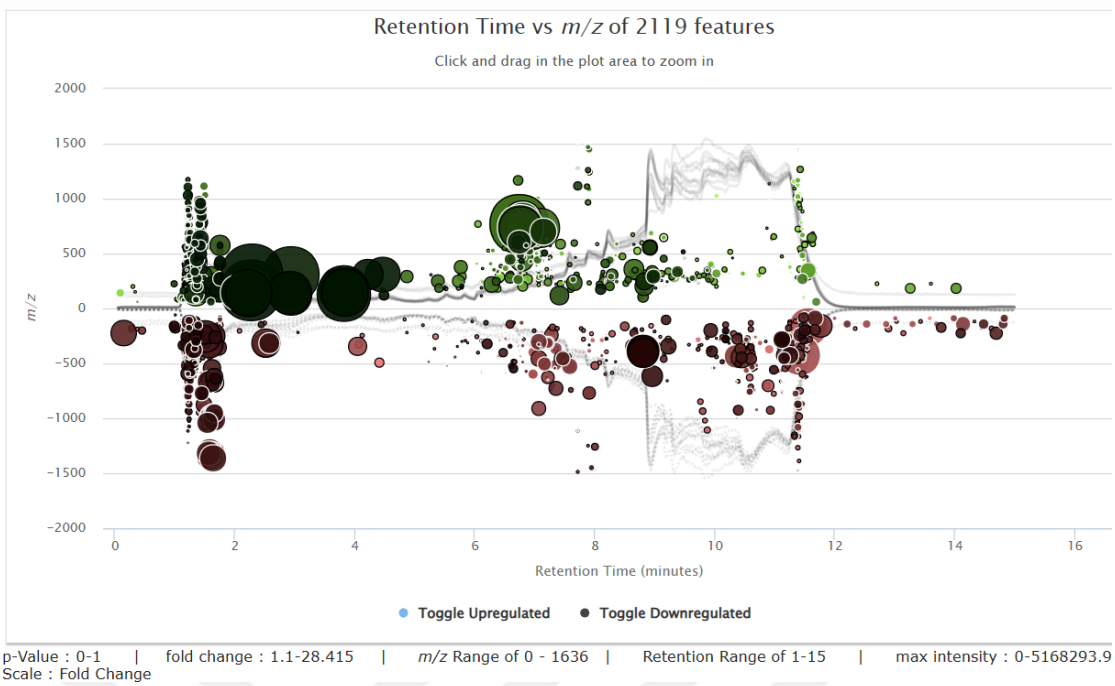
Tablo 4.9. Önemli metabolitler (Grup 2)

No	Kodu	Metabolit adı	Kat - lanma	P değeri	Regü- lüsyo- nu	Molekül ağırlığı	Rt- med
1	HMDB0040694	Agaritinal	25.7	0.00031	yukarı	307.2573	2.3
2	HMDB0002243	Picolinic acid	20.1	1.53744e-12	yukarı	123.1109	2.23
3	C00303	Glutamine	11.7	0.00001	yukarı	143.0823	2.23
4	HMDB0000894	Vinylacetylglycine	16.6	2.23115e-11	yukarı	126.0560	2.84
5	HMDB0028949	L-glutamate	3.1	0.007677	yukarı	292.1993	1.46
6	HMDB0000812	N-Acetyl-L-Aspartic acid	2.8	0.04889	aşağı	239.0651	1.49
7	HMDB0012250	L-Aspartyl-4-phosphate	5.3	0.06457	aşağı	255.0394	1.51
8	HMDB0000267	Pyroglutamic acid	16.6	2.23115e-11	yukarı	126.0560	2.84
9	HMDB0003416	L-arginine	2.4	0.011872	yukarı	197.1026	1.32
10	HMDB0015304	Orphenadrine	6.7	5.46692e-11	yukarı	308.1631	4.36
11	HMDB0028750	Aspartyl-Cysteine	1.5	0.01590	aşağı	219.0845	1.78
12	HMDB0000191	L-Aspartic acid	1.1	0.006060	yukarı	139.9749	1.2
13	HMDB0240274	Picrotoxinine	2.5	4.67733e-6	aşağı	315.0826	2.45
14	HMDB0250763	D-Histidine	1.4	0.04022	yukarı	219.0833	1.7
15	HMDB0006779	Indole-5,6-quinone	13.6	0.00228	yukarı	165.0646	3.82
16	HMDB0240650	Ectoine	13.4	0.00231	yukarı	181.0384	2.25
17	HMDB0245812	L-2 Aminoadipate	16.0	4.44089e-16	yukarı	143.0828	2.84
18	HMDB0000641	L-Glutamin	11.9	5.74517e-6	yukarı	143.0826	3.84

Tablo 4.9. (devamı)

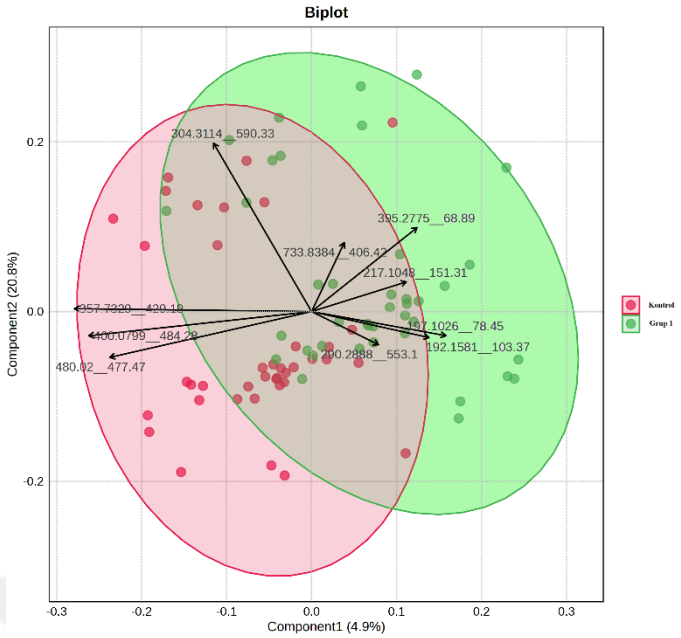
19	HMDB0240273	pyrvinium	4.7	0.01446	aşağı	404.2096	8.81
20	HMDB0012249	D-Aspartate	4.0	0.01933	yukarı	131.0845	1.74
21	HMDB0031257	Fumarate	2.7	0.012363	yukarı	145.0492	1.75
22	C09187	1,3-Diaminopropane	1.4	0.05316	aşağı	367.1529	5.25
23	HMDB0250588	Cumenehydroperoxide	16.0	4.44089e-16	yukarı	143.0828	2.84
24	HMDB0030481	Agrocybin	15.2	0.00000e+0	yukarı	165.0648	3.68
25	HMDB0255137	N-Ethylmaleimide	12.7	0.00000e+0	yukarı	126.0559	2.18
26	C18752	Hydroquinone	1.4	0.00758	aşağı	252.0840	1.32
27	HMDB0013733	1,2,4-Trimethylbenzene	11.4	0.00000e+0	yukarı	143.0827	3.70
28	C07130	1,3-Dimethylxanthine	1.5	0.00731	yukarı	197.1027	1.30
29	K19744	L-argininedehydrogenase	1.6	0.00277	yukarı	175.1201	1.48
30	D05592	Pramiracetamhydrochloride	1.5	0.02090	yukarı	292.2003	1.42
31	HMDB0034263	Triethyl citrate	2.5	4.67733e-6	aşağı	315.0826	2.45
32	HMDB0037723	2-Phenylethyl 2-furancarboxylate	1.8	0.00591	aşağı	255.0402	1.47

Şekil 4.14'de Grup 2 ile kontrol grubu karşılaştırıldığında yukarı regülasyonu (yeşil) ve aşağı regülasyonu (kırmızı) gösteren açıklamalı metabolitlerin bulut grafiği gösterilmektedir. Grafikte P değeri, rengin ne kadar koyu veya açık olduğuyla temsil edilir. Kat değişimi, her özelliğin yarıçapıyla temsil edilir. Retensiyon zamanı, x eksenindeki konumla temsil edilir. Kütle-Yük oranı ise y eksenindeki konumla temsil edilir.

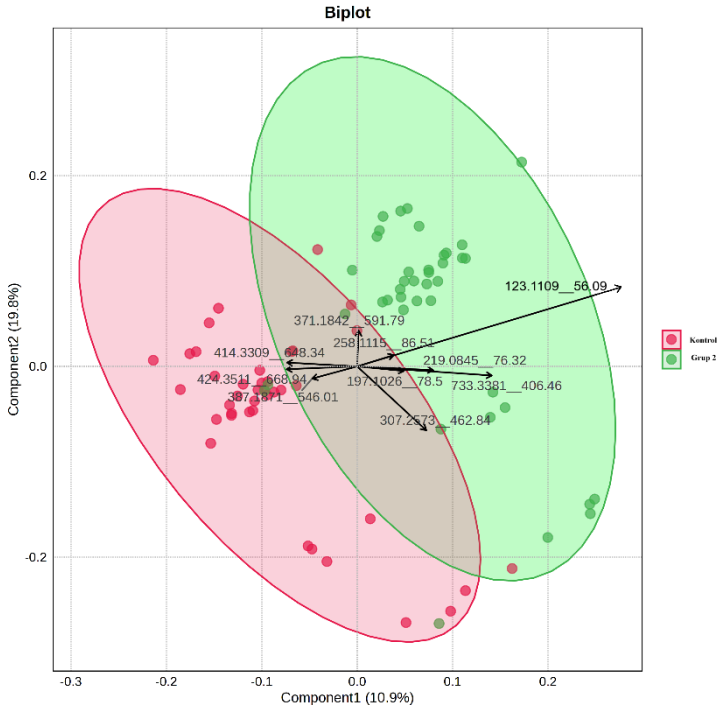


Şekil 4.14. Grup 2 ile kontrol grubu karşılaştırıldığındaki metabolitlerin bulut grafiği

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da metabolitlerin PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) modelinin sonuçlarını görselleştiren bir scor plot tablosudur. Grafikteki oklar orijinal değişkenleri yani biyomarkırları temsil etmektedir. Okların uzunluğu ise değişkenin etkisinin bir göstergesidir. Yani daha uzun ok ilgili bileşenler üzerinde daha büyük etkiye sahip olan değişkeni temsil eder. Okların üzerindeki sayılar ise bu değişkenlerin m/z değerlerini göstermektedir.



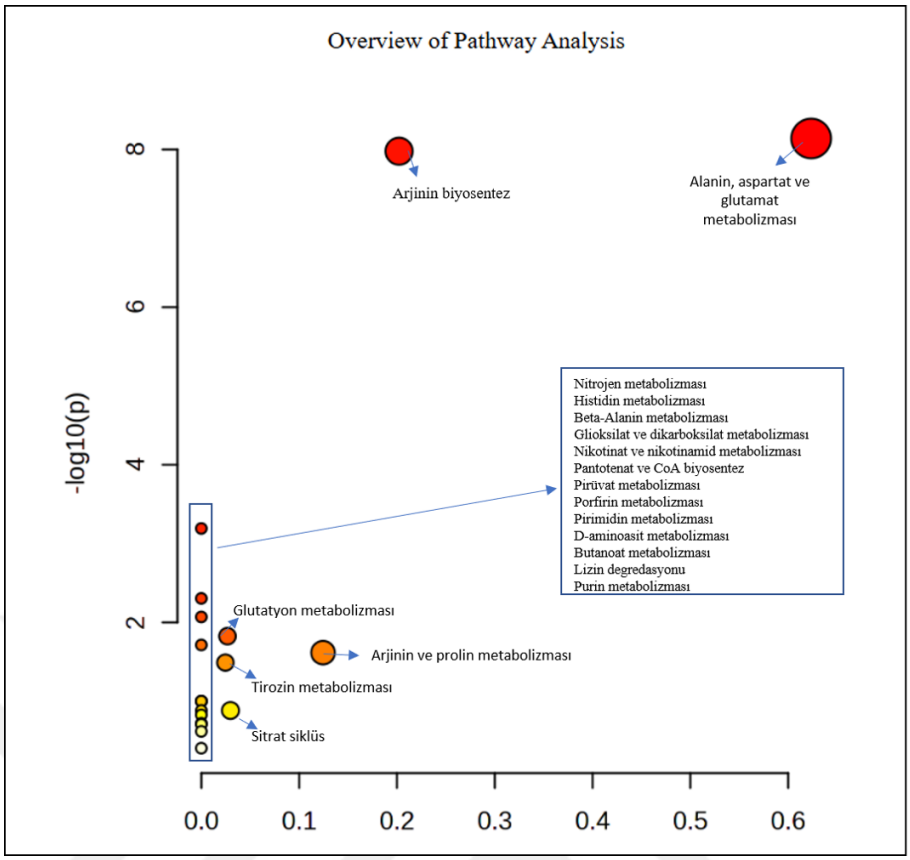
Şekil 4.15. PLS-DA modeline göre değişkenlerin scor plot tablosu (Grup 1 ile kontrol grubu)



Şekil 4.16. PLS-DA modeline göre değişkenlerin scor plot tablosu (Grup 2 ile kontrol grubu)

4.3.2. Metabolomik Yol Analizi

Grup 2 ve kontrol grubu karşılaştırıldığında bazı önemli metabolik yolaklarda değişiklikler tespit edildi. Bu metabolik yolaklar Tablo 4.10'da özetlendi ve Şekil 4.17'de gösterildi. Bu grafik, incelenen durumda hangi metabolik yolakların en çok etkilendiğini ve bu değişikliklerin ne kadar güvenilir (anlamlı) olduğunu görsel olarak özetlemektedir. Grafikteki her bir baloncuk farklı bir metabolik yolu temsil etmekte, bu baloncukların konumu ve boyutu bu yolaklar hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Yatay Eksen (Pathway Impact), ilgili metabolik yolun genel metabolizmadaki etkisini veya önemini gösteriyor. Sağ tarafa doğru olan baloncuklar daha yüksek bir etkiye sahip yolakları temsil eder. Dikey Eksen (-log10(p)) ise istatistiksel anlamlılık düzeyini gösterir. Yüksek -log10(p) değerleri, ilgili metabolik yoldaki değişikliklerin istatistiksel olarak daha anlamlı olduğunu ifade ederken bu yollarda gözlemlenen değişikliklerin rastlantısal olma olasılığı daha düşüktür. Bir baloncuk ne kadar sağda ve yukarıda yer alıyorsa, o metabolik yolun hem etkisi daha büyük hem de gözlemlenen değişiklikler istatistiksel olarak daha anlamlıdır. Baloncukların boyutu ise metabolik yoldaki değişikliklerin büyüklüğünü temsil edebilir. Daha büyük baloncuk daha belirgin değişikliği ifade eder. Grafiğe göre alanin - aspartat - glutamat metabolizması ve arjinin biyosentez metabolizması bu analizde öne çıkan yollar olarak görünmektedir. Çünkü sırasıyla 7.3192E-9'luk ve 1.0616E-8'lik önemli bir P değeriyle 6/28'lik ve 5/14'lük bir eşleşme durumu sergilemişlerdir. Ek olarak; glutatyon metabolizması 0.014879'luk P değeri ve 2/28'lik eşleşme, nitrojen metabolizması 6.4166E-4'lük bir P değeri ve 2/6'lık bir eşleşme durumu gösterdi.



Şekil 4.17. Pirasetam ile değişen metabolik yolaklar

Tablo 4.10. Pirasetam ile değişen metabolik yolaklar listesi

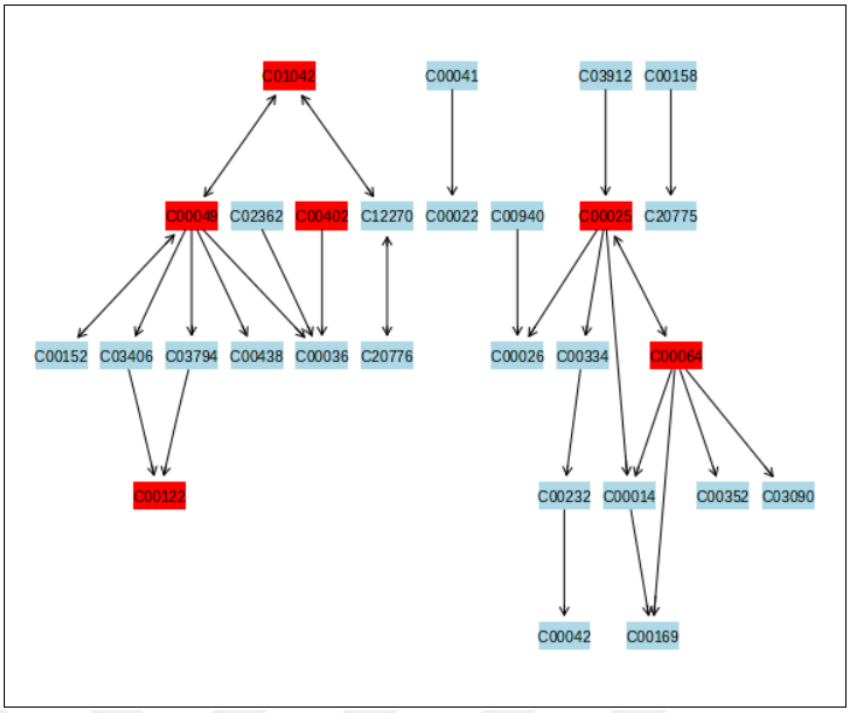
No	Yolak adı	Eşleşme	P değeri	-log(p)
1	Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	6/28	7.3192E-9	8.1355
2	Arjinin biyosentez metabolizması	5/14	1.0616E-8	7.9741
3	Nitrojen metabolizması	2/6	6.4166E-4	3.1927
4	Histidin metabolizması	2/16	0.0049428	2.3060
5	Beta-Alanin metabolizması	2/21	0.008488	2.0712
6	Glutatyon metabolizması	2/28	0.014879	1.8274
7	Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	2/32	0.019231	1.7160
8	Arjinin ve prolin metabolizması	2/36	0.024061	1.6187
9	Tirozin metabolizması	2/42	0.032146	1.4929
10	D-Amino asit metabolizması	1/15	0.099193	1.0035
11	Butanoat metabolizması	1/15	0.099193	1.0035
12	Nikotinat ve nikotinamid metabolizması	1/15	0.099193	1.0035
13	Pantotenat metabolizması	1/20	0.13021	0.88534
14	Sitrat siklüs	1/20	0.13021	0.88534
15	Pirüvat metabolizması	1/23	0.14836	0.82869
16	Lizin degredasyonu	1/30	0.18936	0.72271

Tablo 4.10. (devamı)

17	Porfirin metabolizması	1/31	0.19507	0.70981
18	Pirimidin metabolizması	1/39	0.23944	0.62080
19	Purin metabolizması	1/70	0.39117	0.40763

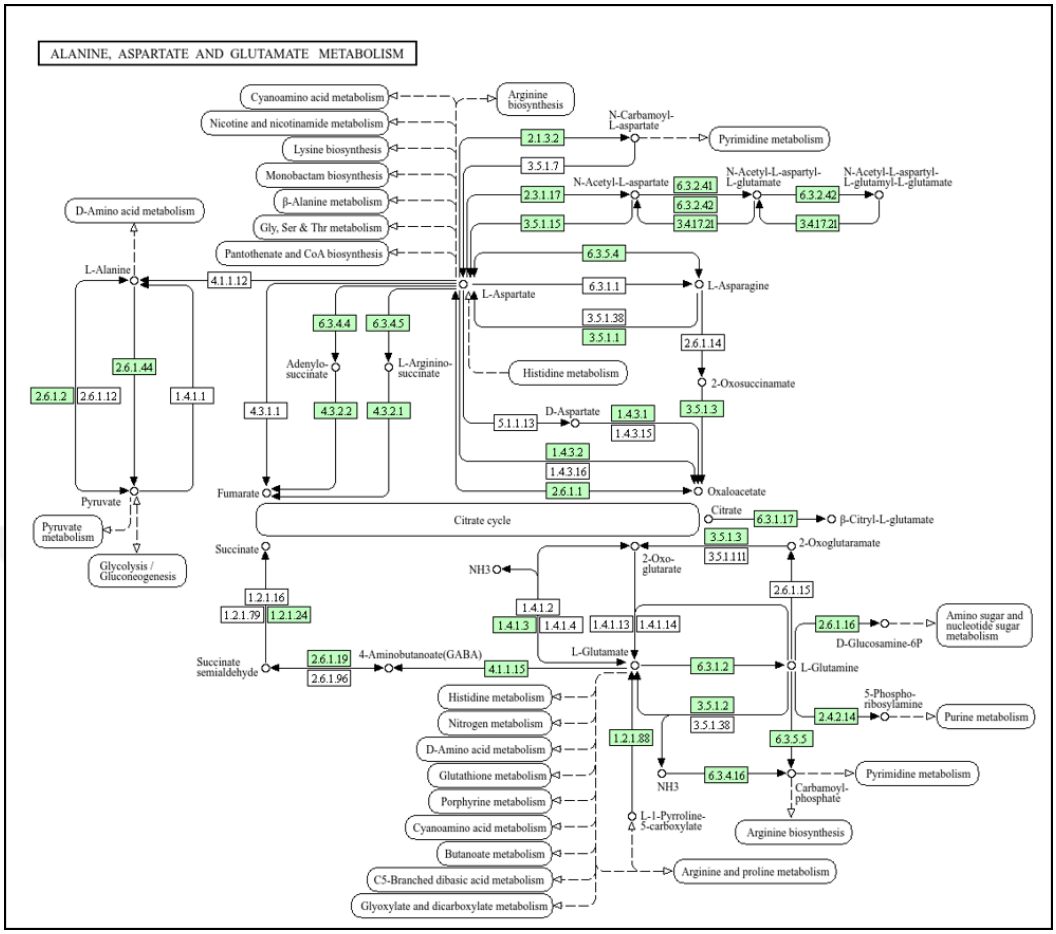
4.3.2.1. Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması

Şekil 4.18'de kutucuklar metabolitleri oklar ise bu metabolitler arasındaki dönüşümleri veya ilişkileri göstermektedir. Grafik bu altı önemli amino asidin birbiriyle ve diğer metabolitlerle olan karmaşık ilişkilerini ve dönüşümlerini görselleştirmektedir. Kırmızı kutular; C01042 (N-asetil-L-aspartat), C00049 (L-aspartat), C00025 (L-glutamat), C00064 (L-glutamin), C00402 (D- aspartat), C00122 (Fumarat) metabolitleridir. L-aspartat ve L-glutamat, bu metabolik yolun merkezi bileşenleridir ve çeşitli diğer moleküllerin sentezi ve yıkımında rol oynarlar. Hem proteinlerin yapı taşı hem de uyarıcı nörotransmitterlerdir ve hafıza gibi bilişsel rollerde kilit rol oynarlar. N-asetil-L-aspartat, aspartatın bir türeviyken, L-glutamin ise glutamatın bir amid türevidir.



Şekil 4.18. Alanin, Aspartat ve Glutamat metabolizması yolu (C01042: N-Acetyl L-Aspartat, C00049: L-Aspartat, C00025: L-Glutamat, C00064: L-Glutamin, C00402:D-aspartat, C00122: Fumarat)

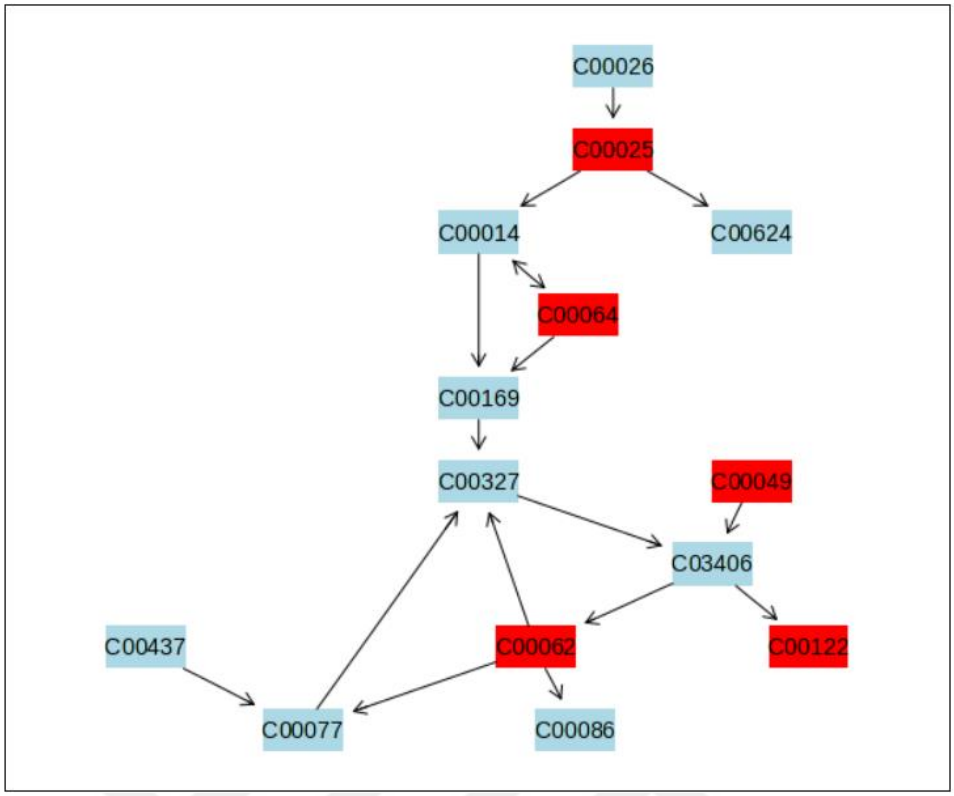
Şekil 4.19'da alanin, aspartat ve glutamat arasındaki dönüşümler ve bu amino asitlerin katıldığı diğer metabolik yollar gösterilmektedir. Bu üç amino asit, hücrelerde birçok önemli metabolik süreçte merkezi roller oynar. Yeşil kutular içerisinde enzimlerin EC numaraları belirtilmiştir. Bu numaralar, ilgili enzimin hangi reaksiyonu katalizlediğini gösterir. Oklar, metabolik akışı ve reaksiyonların yönünü temsil eder. Şemada alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasının diğer önemli metabolik yollar olan sitrik asit döngüsü (krebs döngüsü), glikoliz/glikoneogenez, üre döngüsü, pirimidin metabolizması, pürin metabolizması ve çeşitli diğer amino asit metabolizma yolları ile bağlantısı da gösterilmektedir. Amino asitlerin hücresel enerji üretimi, azot dengesi ve diğer biyomoleküllerin sentezi için bu bağlantılar önem arz etmektedir. Ayrıca şemada bahsedilen metabolik yollarda yer alan önemli ara ürünler de gösterilmektedir. Örneğin, alanin'den pirüvat, aspartat'tan oksaloasetat ve glutamat'tan α-ketoglutarat oluşumu ve bu metabolitlerin sitrik asit döngüsü'ne girişi açıkça görülmektedir.



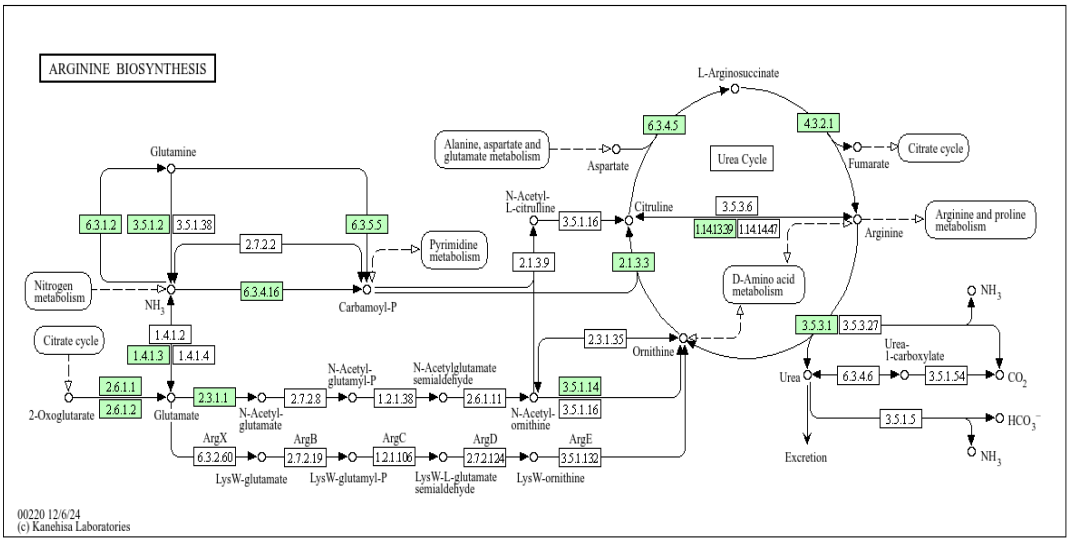
Şekil 4.19. Alanin, Aspartat ve Glutamat yolağının KEGG haritası

4.3.2.2. Arjinin Biyosentez

Şekil 4.20'de kırmızı kutular; C00025 (L-glutamat), C00049 (L-aspartat), C00064 (L-glutamin), C00062 (L-Arjinin), C00122 (Fumarat) metabolitleridir. Şekil L- glutamat, L-glutamin ve L-Aspartatın birleşerek L-Arjinin amino asidini oluşturduğunu göstermektedir. Fumarat ise bu sentez sırasında açığa çıkan önemli bir yan üründür.



Şekil 4.20. Arjinin biyosentez yolu (C00025: L-Glutamat, C00049: L-Aspartat, C00064: L-Glutamin, C00062: L-Arjinin, C00122: Fumarat)



Şekil 4.21. Arjinin biyosentez yolağı KEGG haritası

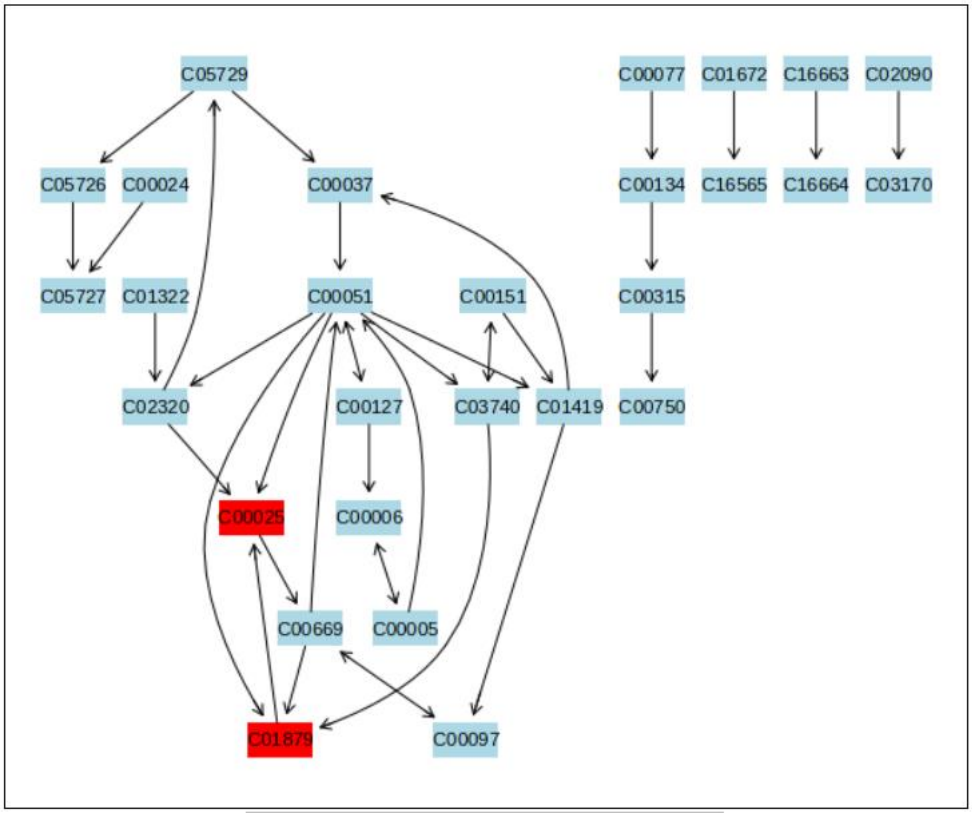
Şekil 4.21'de organizmalarda arginin amino asidinin nasıl sentezlendiğini gösteren metabolik yolak gösterilmektedir. Argininin çok sayıda öncülden, ara ürünler ve enzimler aracılığıyla nasıl sentezlendiğini ve aynı zamanda üre döngüsü gibi diğer temel

metabolik yollarla nasıl etkileşimde olduğunu kapsamlı bir şekilde göstermektedir. Yolağın sol üst kısmında glutamin ve glutamat'ın arginin sentezi için önemli başlangıç molekülleri olduğu görülmektedir.

4.3.2.3. Glutatyon Metabolizması

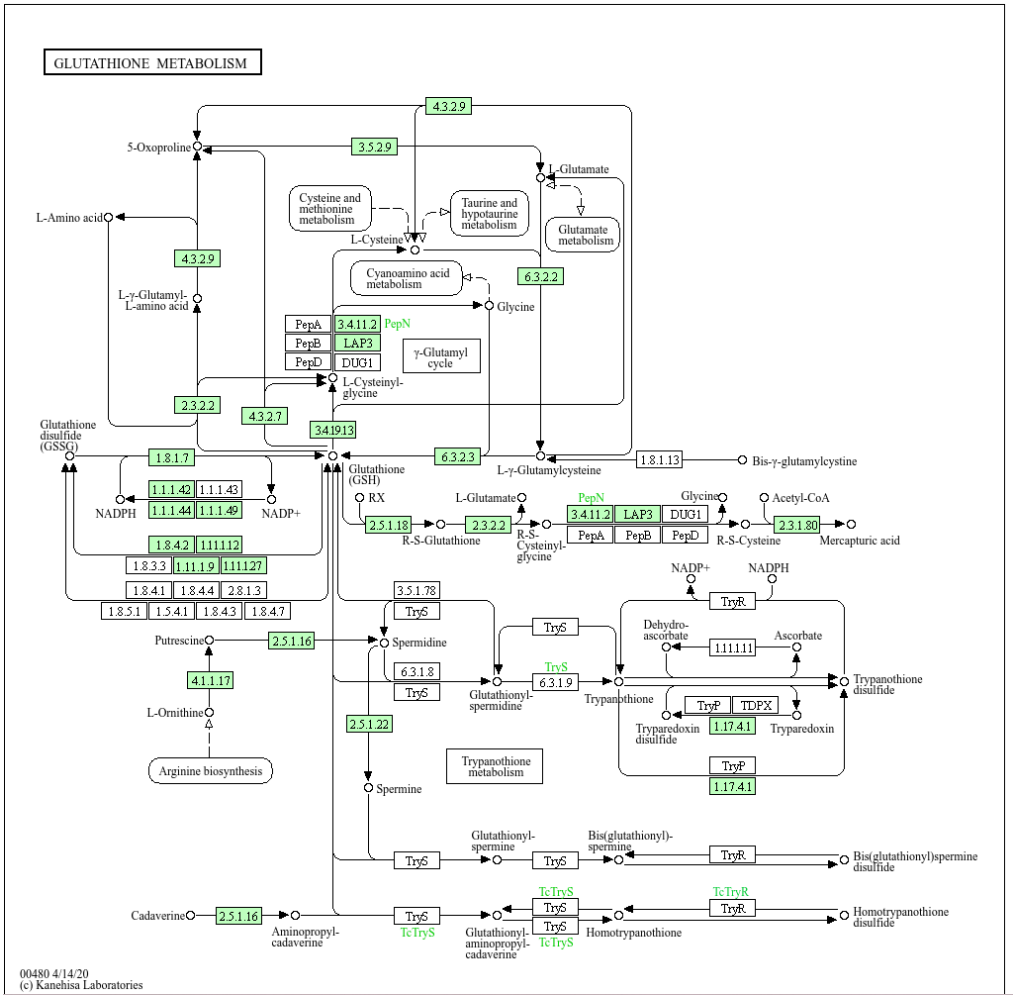
Şekil 4.22'de kırmızı kutular; C00025 (L-glutamat), C01879 (5- oksoprolin), metabolitleridir. Grafikte de görüldüğü üzere L-glutamat'ın 5-oksoprolin'e dönüşümü bilinen bir adımdır. Bu dönüşüm, gamma-glutamil siklotransferaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. 5-oksoprolin daha sonra 5-oksoprolinaz yoluyla tekrar L-glutamat'a dönüştürülerek gamma-glutamil döngüsünü (glutatyon-glutamat döngüsü veya Meister döngüsü olarak da bilinir) tamamlar.

Dolayısıyla, grafik, L-glutamat'ın metabolize edildiği ve özellikle 5-oksoprolin'e dönüştürüldüğü glutatyon metabolizması yolunun bir kesitidir.



Şekil 4.22. Glutatyon metabolizması yolu (C00025: L-Glutamat, C01879: Piroglutamik asit)

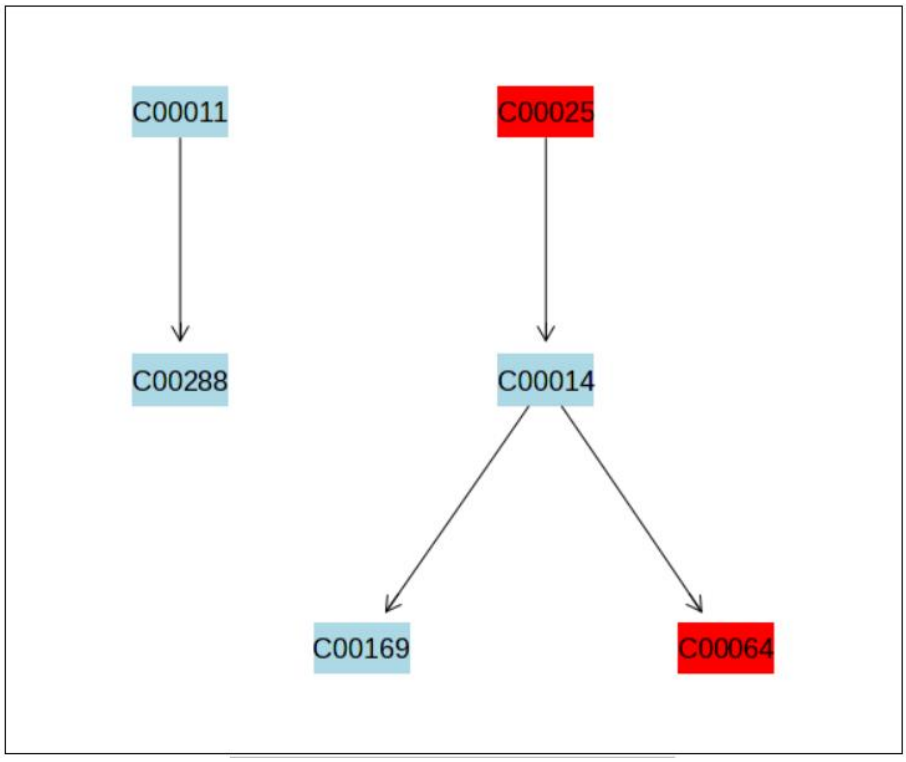
Şekil 4.23, biyolojik sistemler için kritik bir antioksidan olan glutatyonun karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar ağını ve diğer metabolik yollarla etkileşimlerini göstermektedir. Şekil çeşitli öncü maddelerin glutatyonu sentezlemek için nasıl kullanıldığını, nasıl parçalandığını ve hücre içindeki diğer reaksiyonlara nasıl katıldığını göstermektedir. Grafiğe göre L-glutamat, glutatyonun sentezi için olmazsa olmaz bir başlangıç maddesidir ve glutatyon metabolizmasının ilk ve hız sınırlayıcı adımında yer almaktadır. 5-oksoprolin ise glutatyonun yıkımından sonra glutamatın geri dönüştürüldüğü bir ara maddedir. Görüldüğü üzere bu iki molekül, glutatyonun sürekli olarak sentezlenip geri dönüştürülebilmesi ve böylece hücrelerin oksidatif strese karşı savunma kapasitesinin korunabilmesi için önem arz etmektedir.



Şekil 4.23. Glutatyon metabolizması KEGG haritası

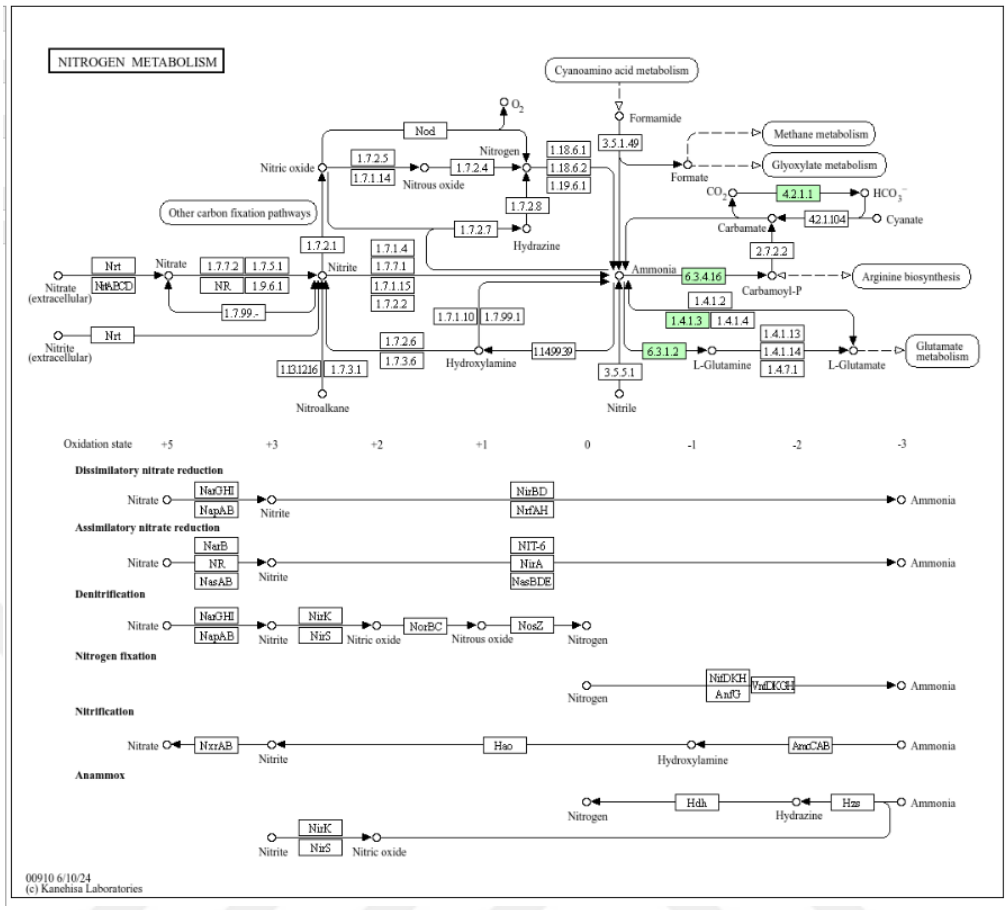
4.3.2.4. Nitrojen Metabolizması

Şekil 4.24'de kırmızı kutular; C00025 (L-glutamat), C00064 (L-Glutamin) metabolitleridir. Grafik, L-glutamat ve L-glutaminin dahil olduğu nitrojen metabolizmasının karmaşık bir bölümünü şematik olarak göstermektedir.



Şekil 4.24. Nitrojen metabolizması yolu (C00025: L-glutamat ve C00064:L-Glutamin)

Şekil 4.25 azotun çevrimsel doğasını ve farklı mikroorganizmaların bu döngüdeki kritik rollerini vurgulamaktadır. Grafiğe göre azot oksit ve nitrik oksit yolları, siyanamin azot metabolizması ve metan metabolizması, arginin biyosentezi azot metabolizması ile ilişkili yollar olarak öne çıkmaktadır.

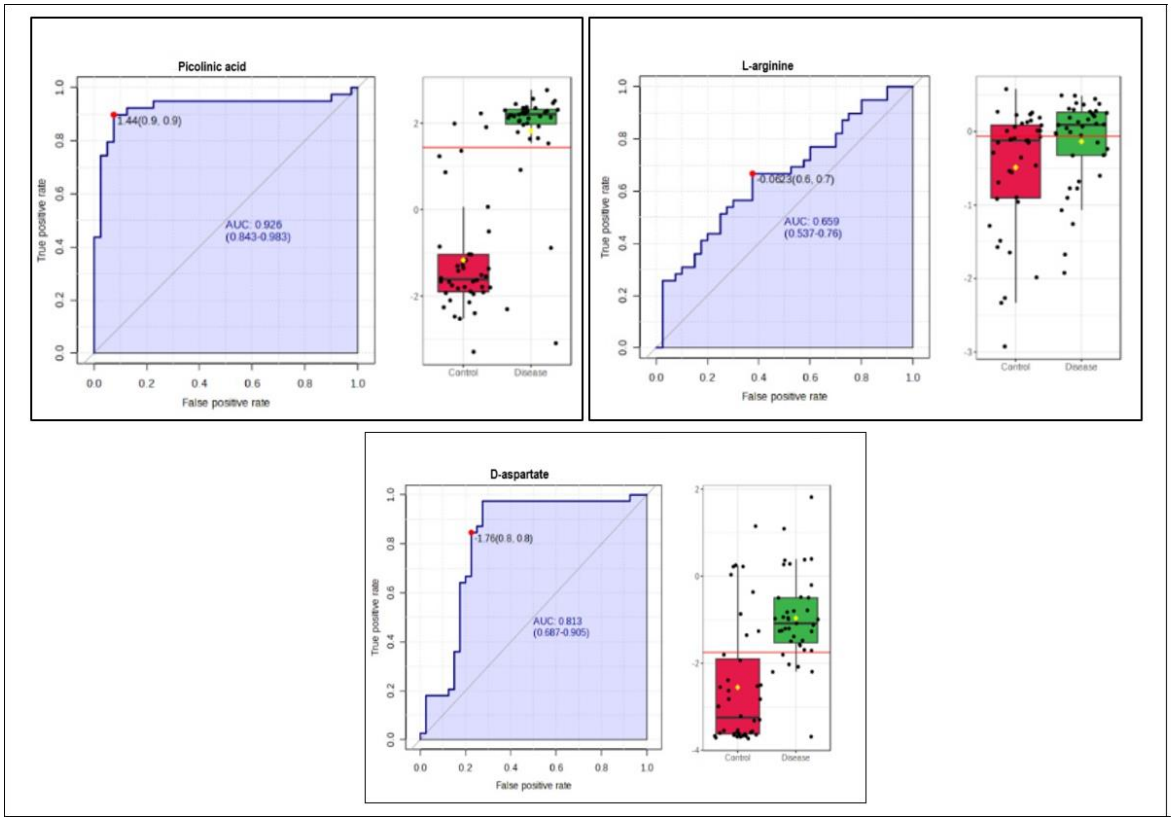


Şekil 4.25. Nitrojen metabolizması KEGG haritası

4.3.3. Biyobelirteç Keşfi

Şekil 4.28'de sol taraftaki grafik ROC eğrisidir. Burada dikey eksenin %100'e yakınlığı, yatay eksenin ise %0'a yakınlığı önemlidir. AUC, "Area Under the Curve" (Eğrinin Altında Kalan Alan) anlamına gelir. Bu değer, testin genel ayırt etme gücünü gösteren en önemli ölçüttür. AUC değeri 0.5 ile 1.0 arasında değişir. 1.0: mükemmel ayrımı, 0.8 - 0.9: iyi bir ayrımı, 0.6 - 0.8: kabul edilebilir bir ayrımı ifade eder. 0.5 ve altı ise ayırt edici değildir. Sağ taraftaki grafik ise kutu grafiğidir ve incelenen değerin kontrol ve ilaç verilen gruplar arasındaki dağılımı görsel olarak karşılaştırır. Kırmızı kutu (Kontrol): İlaç verilmeden önce alınan kandaki değerlerin dağılımını gösterirken yeşil kutu (Grup 2): İlaç verildikten 60 dk sonra alınan kandaki değerlerin dağılımını gösterir.

ROC analizi sonuçlarına göre pikolinik asit, D-aspartat ve L-arjinin için AUC değerleri sırası ile 0.926, 0.813 ve 0.659 olarak bulundu.



Şekil 4.26. Biyobelirteç olabilecek metabolitlerin ROC eğrileri ve kutu grafikleri

5. TARTIŞMA

Analitik Kimya bir numunedeki bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi, valide edilmesi ve gerçek numunelerde uygulanabilir olduğunu göstermek üzere yapılan çalışmaların bir bütününü oluşturmaktadır. İlaçların araştırılması ve kalite kontrol çalışmalarında da Analitik Kimya önemli bir yere sahiptir. Bundan dolayı, İlaç araştırma ve AR-GE çalışmalarında ilaç ve etken maddelerinin farklı ortamlarda miktar tayinleri için çeşitli analitik yöntemleri geliştirmek ve valide etmek üzerine çok sayıda çalışmalar yürütülmektedir.

Pirasetam nootropik özelliklerinin yanı sıra bilişsel işlev üzerindeki iyileştirici etkileri nedeniyle günümüzde sadece reçeteli değil reçetesiz olarak da sıklıkla tercih edilen ilaçlardan biri olmuştur. Bu çalışmada pirasetam etken maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda (tablet) miktar tayini için UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi, insan plazmasında pirasetam etken maddesinin miktar tayini için LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi ve validasyonun yapılması, bu geliştirilen ve valide edilen yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için ile Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Acil Servise baş dönmesi şikayeti ile gelen hastalara Nootropil tablet verildikten sonra alınan kan örneklerinde pirasetam miktar tayinlerinin yapılması ve ayrıca bu hastaların plazmalarında metabolomiks analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda standart çalışma çözeltilerinde ve farmasötik preparatlarda (tablet) pirasetam miktar tayini için iki yeni analitik yöntem UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri geliştirilip valide edildi. Her iki yöntemin pirasetam için 2-35 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlendi. 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarda pirasetam çalışma çözeltilerinin UV-

Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri ile spektrumları alındı ve önceden belirlenen dalga boylarında absorbansları okundu. Konsantrasyona karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri için doğrusal regresyon denklemi A = 0.030x + 0.039 ve korelasyon katsayısı 0.9990 bulundu. 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemi için doğrusal regresyon denklemi A_1 = 0.316x + 0.623 ve korelasyon katsayısı 0.9992 bulundu. Her iki yöntem de çok yüksek R^2 değerleri (0.999) ile mükemmel doğrusallık sergilemektedir; bu da belirtilen konsantrasyon aralığında pirasetam konsantrasyonunun güvenilir ve doğru ölçümlerini sağladıkları anlamına gelmektedir. Kalibrasyon eğrisi içerisine düşen üç farklı konsantrasyonda kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin gün içi ve günler arası her iki yöntemle spektrumları alındı ve absorbans değerleri belirlendi. Doğruluk %Bağıl Hata ile kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma ile verildi. Bu çalışmada, her iki yöntem için de doğruluk değerleri kabul edilebilir aralıklardadır. %BSS değerleri genel olarak düşüktür, bu da her iki yöntemin de yüksek kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir. 1. Derece Türev Spektrofotometri yönteminin hem gün içi hem de günler arası ölçümlerde daha düşük %BSS değerleri elde edildiğinden yöntemin kesinliği UV-Gör. Bölge Spektrofotometri yöntemine göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca konsantrasyon artıkça %BSS değeride artmaktadır. 33 µg/mL pirasetam konsantrasyonu için %0.10 ve %0.12 gibi çok düşük değerler elde edildi. Tablo 4.2'de verilen değerler incelendiğinde farmasötik praparatlarda her iki yöntemin pirasetam miktar tayinlerinda belirli konsantrasyon aralıklarında analitik amaçlar için uygun doğruluk ve kesinlik değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak, özellikle yüksek kesinlik gerektiren uygulamalarda 1. Derece Türev Spektroskopisi'nin daha avantajlı olduğu söylenebilir. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin farmasötik preaparatlarda geri kazanım çalışması

standart ekleme yöntemine göre yapıldı. % Analitik Geri Kazanım (%AGK) değerleri her iki yöntem için %98.09 - %100.13 aralığında bulundu. Analitik geri kazanım değerleri oldukça tutarlı ve kabul edilebilir sınırlar içindedir. Analitik Geri Kazanım çalışmasında elde edilen %BSS değerleri incelendiğinde %0.05 ile %3.73 aralığında değiştiği görülmektedir. Oldukça düşük bir %BSS değeri yapılan çalışmanın kesinliğinin yüksek olduğunu gösterir. UV-Gör. Bölge Spektrofotometri yönteminde en düşük derişimde %BSS değeri %3.73 olarakbelirlendi. Bu değer diğer konsantrasyonlarda belirlenen değerlere göre yüksektir. Düşük derişimlerde UV-Gör. Bölge Spektrofotometri yöntemiyle ölçülen değerin kesinliğinin düşük olabileceğini göstermektedir. Konsantrasyon arttıkça %BSS değerleri (%0.68 ve %0.59) kabul edilebilir seviyelere gedliği görülmektedir. Bu, yöntemin üç farklı derişim seviyesinde de analiti doğruya yakın bir şekilde ölçtüğünü gösterir. 1. Derece Türev Spektrofotometri yönteminde ise tüm konsantrasyon seviyelerinde %BSS değerlerinin (%0.97, %0.13, %0.05) oldukça düşük olduğu görülmektedir ve bu yöntem için Analitik Geri kazanım değerlerinin (%99.15, %100.13, %99.16) yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin, pirasetam etken maddesine sahip farmasötik preparatlarda kalite kontrol çalışmalarında UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve 1. Derece Türev Spektrofotometri yöntemlerinin uygulanabilir olduğu sonucunu göstermektedir.

Plazmada pirasetam etken maddesinin miktar tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Yöntemin 25-1000 ng/mL aralığında doğrusal olduğu bulundu. 25, 50, 75, 100, 200, 500, 750 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri ve plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. LC-MS/MS yöntemiyle kromatogramları alındı, pik alanları tespit edildi. Konsantrasyona karşı pik alanları grafiğe geiçirilerek kalibrasyon eğrileri türeitldi. LC-MS/MS yönteminin standart çalışma çözeltilerinin doğrusal regresyon denklemi y = 11.052x + 50.599 ve korelasyon katsayısı

0.9999 ve plazma çalışma çözeltileri için doğrusal regresyon denklemi y = 8.226x + 52.627 ve korelasyon katsayısı 0.9993 olarak belirlendi. Standart çözeltilerden hazırlanan eğrinin eğimi, plazma çözeltilerinin eğrisinin eğiminden daha yüksektir. Bu, aynı pirasetam konsantrasyonu için yanıtın genellikle plazma çözeltisine kıyasla standart çözeltide daha yüksek olduğunu göstermektedir. Eğimdeki bu fark, plazmadaki diğer bileşenlerin sinyali bastırması veya matris etkilerinden dolayı olabilir. Her iki eğri de mükemmel doğrusallık göstermektedir, bu da test edilen konsantrasyon aralığında nicel analiz için yöntemlerin uygun olduğunu göstermektedir. Hem gün içi hem de günler arası ölçümler için düşük bağıl hata yüzdeleri (%BH), yöntemin standart ve plazma örnekleri için gerçek konsantrasyona yakın sonuçları tutarlı bir şekilde sağlayabildiğini göstermektedir. Ayrıca hem gün içi hem de günler arası ölçümler için düşük bağıl standart sapma yüzdeleri (%BSS), yöntemin yüksek derecede tekrarlanabilir olduğunu ve tekrarlandığında tutarlı sonuçlar verdiğini göstermektedir. Analitik yöntemler için kabul edilebilir geri kazanım aralığı genellikle %80-120 aralığındadır. Tablo 4.6'ya göre, yöntem belirtilen konsantrasyon aralıklarında bir geri kazanım göstermektedir. Yani, eklenen analitin oldukça büyük bir kısmı tespit edilebilmektedir. Araştırma Hastanesi Acil Servise baş dönmesi şikayeti ile başvuran hastalara tedavi amacıyla Nootropil (800 mg pirasetam) içeren ilaçtan iki tablet (1600 mg pirasetam) verildikten sonra 30. dk ve 60. Dk'da kan örnekleri alındı ve plazmaları ayrıldı. Bu plazmalarda pirasetam etken madde miktar analizleri geliştirilip valide edilen LC-MS/MS yöntemiyle yapıldı. Çalışma sonucunda, ilaç verildikten sonra alınan plazmalarda tespit edilen pirasetam konsantrasyonu 60 dakikada arttığı tespit edildi. Ayrıca metabolom analizlerinin scor plot tablosuna göre kontrol grubu ile 2.grup arasındaki ayrımın kontrol grubu ile 1. grup arasındaki ayrımdan daha belirgin olduğunu ortaya koymaktaydı . Bu da göstermektedir ki pirasetamın plazmada konsantrasyonun artması kontrol grubu ve ilaç verilen gruplar

arasındaki farkı daha belirgin hale getirmektedir Pirasetamın plazmadan miktar tayini için; Wang ve ark. (2020) geliştirdikleri LC-MS/MS yönteminin 0.1-20 µg/mL, Curticapean ve Imre, (2007) geliştirdikleri HPLC yönteminin 1-100 µg/mL, Mendes ve ark. (2016) geliştiridiği HPLC-MS/MS yönteminin 0.5-50 µg/mL, Barkat ve ark. (2014) geliştirdikleri HPLC yönteminin 0.39-50 µg/mL çalışma aralığına sahip oldukları görülmektedir. Bizim çalışma aralığımız ise 25-1000 ng/mL'dir. Bu değer bu çalışmalara göre daha düşük konsantrasyonlarda miktar tayinin yapılma imkanını sunmaktadır. Sahu ve ark. (2013), ise UPLC-MS/MS ile rat plazmasında 10-200 ng/mL aralığında çalışmışlardır. Başlangıç konsantrasyon değeri bizim çalışmaya göre daha düşük olsa da bizim çalışma aralığımız daha geniştir (25-1000 ng/mL). Ayrıca bu çalışmalarda mobil faz olarak tampon çözeltiler kullanımıştır. Analizlerde tampon çözelti kullanımından mümkün olduğunca kaçınmak gerekir çünkü cihazda tuz birikimine yol açarak kolonun ya da çözücünün taşındığı kanalların tıkanmasına neden olabilir. Çalışmamızda tampon çözelti kullanımına gerek kalmamıştır ve bu da büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Nootropikler sınıfına dahil olan pirasetam ve benzeri biliş arttırıcılar, mükemmel tolere edilebilen, farklı endikasyonlar geliştirilebilecek kadar dinamik ve esnek olan ve bilinen önemli yan etkileri olmamasına rağmen hiçbir zaman genel kabule ulaşmamıştır çünkü etki mekanizmaları hala kocaman bir soru işareti olmakla birlikte endikasyon dışı kullanımıyla ilişkili uzun vadeli sonuçlar ve potansiyel riskler tanımlanmamıştır (Malykh ve Sadaie, 2010). Nitekim Cohen ve ark. Amerika'da yaptıkları bir çalışmada bilişsel gücü artırmak için pirasetamın bilişsel güçlendirme takviyelerine ilave edildiğini, satışlarının milyon doları aştığını ancak riskleri ve güvenliği konusunda yeterli çalışmaların hala eksik olduğundan bahsetmişlerdir(Cohen ve ark., 2020). Çünkü beyin fonksiyonlarının karmaşıklığı uzun ve pahalı klinik çalışmalar gerektirmekte ve hayvan testleri de yeteri kadar güven vermemektedir. Pirasetamın ve analoglarının etkilerini

gerçekleştirilme mekanizması çok bileşenlidir, ancak her şeyden önce metabolik süreçler ve serebral dolaşım üzerindeki etki ile ilişkili olduğundan yaptığmız metabolomik çalışma reçete dışı kullanımı yaygın olan pirasetamın yan etki profilini incelemeye ve etki mekanizmasını aydınlatmaya yardımcı olacaktır (Voronina, 2023). Yapılan çalışma sonucunda en fazla eşleşmeyi sağlayan ve en yüksek p değerine sahip olan alanin, aspartat ve glutamat metabolizması dikkat çekmektedir. Özellikle glutamat ve aspartat, öğrenme ve hafıza üzerinde anahtar rol oynayan iki önemli nörotransmiterlerdir. Çünkü bu nörotransmitterlerin metabolizması sinir hücrelerinin iletişimini doğrudan etkilemektedir. L-glutamin de glutamatın öncüsü olup beynin en önemli uyarıcı nörotransmiteri olan glutamatın sentezinde kullanılır. Yani L-glutamin doğrudan bir nörotransmiter olmasa da, beynin işleyişi ve özellikle de öğrenme ile hafıza gibi bilişsel süreçler için hayati öneme sahip olan glutamat ve GABA gibi nörotransmiterlerin üretimi için temel bir yapı taşıdır. Müller ve ark. yaptıkları bir çalışmada pirasetamın düşük konsantrasyonlarda bile L-glutamat reseptöründe önemli ölçüde etkili olduğunu ve etki mekanizmasının buna bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (Müller ve ark, 1997). Glutamat metabolizması üzerine elde edilen bu sonuçlar Müller ve ark. tahminini kanıtlar niteliktedir. Yine başka bir çalışmada glutamik asit ve ilgili maddelerin metabolizmasının beyin fonksiyonlarını düzenlemede rol oynadığından bahsedilmiştir (Tsukada, 1966). Yeni bilgilerin işlenmesi ve kodlanması için hayati öneme sahip olan sinyal iletimi glutamatın nöronları hızlı ve etkin bir şekilde ateşlemesiyle gerçekleşir. Glutamat kısa süreli çalışma belleğinde etkin olduğu gibi uzun süreli hafızada da etkilidir çünkü her tekrarlanan maruz kalma ile glutamat, aynı nöronları uyararak aynı sinir yollarını güçlendirir ve bilginin kalıcılığını artırır. Nörotransmiter rolünün yanı sıra, glutamat hücrelerde önemli bir karbon ve nitrojen kaynağıdır ve TCA (trikarboksilik asit) döngüsünde rol oynar, hücresel enerji üretimine katkıda bulunur. Mendes ve ark. yaptıkları bir çalışmada pirasetamın en önemli

özelliklerinden birinin, özelllikle stres koşulları altında beyin enerjisi, ATP'yi iyileştirme yeteneği olduğundan bahsetmişlerdir ve elde ettiğimiz sonuçlar bu bilgiyi kanıtlar niteliktedir(Mendes ve ark, 2016). NMDA reseptörlerini aktive ederek sinaptik plastisite, hafıza oluşumu ve öğrenmede önemli bir rol oynayan aspartat da glutamat gibi merkezi sinir sisteminde uyarıcı bir nörotransmiter olarak işlev görür. Aspartat, NMDA reseptörlerinin düzgün çalışmasını sağlayarak bilişsel sürece katkı sağlar. Raevski ve Nerush pirasetam ve N-Asetil aspartik asidin (NAA) hafıza ve iletici aminoasitler üzerine yaptıkları bir çalışmada hafıza üzerindeki olumlu etkilerinden bahsetmişlerdir(Raevskii ve Nerush, 1993). Scheuer ve ark. yaptıkları çalışmada pirasetam tedavisinin etkinliğini hipokampusta bilişsel süreçlerde önemli rol oynayan NMDA reseptör yoğunluğu, frontal korteks ve striatumdaki muskarinik kolinerjik reseptör yoğunlukları üzerine olumlu etkilerine bağlamışlardır. Aspartat metabolizması üzerine elde ettiğimiz bu veriler bu çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Alanin aspartat glutamat metabolizmasından sonra 1.0616E-8'lik P değeri ve 5/14'lük bir eşleşmeyle arjinin biyosentez metabolizması yolu dikkat çekmektedir. İşlevsel bir amino asit olan ve proteinin yapı taşı olarak rol oynayan L-arginin, aynı zamanda kreatin, nitrik oksit (NO), poliaminler, homoarginin ve agmatinin sentezi için temel bir substrat olarak da görev yapar. (Wu ve ark, 2021). Arjinin, beyinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla nitrik okside dönüştürülür. Sinir ileticisi olarak işlev gören NO öğrenme ve belleğin temel hücresel mekanizmalarından biri olan sinaptik plastisiteyi iyileştirir ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi sağlar. Bundan dolayı NO uzun süreli potansiyelizasyonda ve belleğin oluşumunda anahtar rol oynar(Cherian ve ark, 2004). Bunun dışında NO'nun vazodilasyon etkileri de vardır. Kan damarlarının genişlemesini sağlar bu da beyne giden kan akışını artırır. Daha iyi kan akışı, beyin dokusuna daha fazla oksijen ve besin maddesi ulaşması anlamına gelir ki bu beyin sağlığı ve bilişsel fonksiyonlar için oldukça faydalıdır. Bu da göstermektedir ki

pirasetamın arjinin biyosentez metabolizması ile olan ilişkisi bazı araştırmacıların pirasetamın beyne giden kan akışını artırdığı teorilerini desteklemektedir.

6.4166E-4'lük P değeri ve 2/6'lık bir eşleşmeyle nitrojen metabolizması da pirasetamın etkilediği yolaklardan biridir. Nitrojen, proteinler ve nükleik asitler gibi önemli biyomoleküllerin yapısında yer aldığı için canlılar için hayati öneme sahiptir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi glutamattan glutamin oluşumu görülmektedir. Glutamat, birçok amino asidin sentezinde olduğu gibi nitrojen taşınmasında kilit rol oynayan bir amino asittir. Şekilde yolun son çıktısı glutamindir ve görüldüğü üzere glutamin de nitrojen metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Çünkü; kandan veya beyin omurulik sıvısından difüzyonla beyne giren amonyağın fazlası merkezi sinir sistemi için toksiktir ve beyindeki konsantrasyonunn düşük tutulması gereklidir. Glutamin de amonyak detoksifikasyonunda ve hücreler arası nitrojen taşınmasında görev alarak amonyağı uzaklaştırır. (Cooper, 2001; Miflin ve Habash, 2002). Çünkü beyindeki amonyak atılımının ana yolu, glutamat sentaz enzimi aracılığıyla glutamattan glutamin sentezidir. Buradan da anlaşılacağı üzere beyindeki glutamat-glutamin döngüsü nöronlar arasında azot taşımaya ve glutamat seviyelerini kontrol etmeye yarar (Shamis ve ark., 2012) Buradan da anlaşılacağı gibi beynin sorunsuz çalışabilmesi için beyindeki amonyağın etkili bir şekilde atılması gerekmektedir. Grafikte görüldüğü üzere glutamat bir amonyak molekülü daha alarak glutamine dönüşmüş ve böylece amonyak uzaklaştırılmıştır. Bu da beyin sağlığı için gerekli bir süreçtir ve dolaylı olarak pirasetamın öğrenme üzerindeki etkilerini destekler niteliktedir.

Pirasetamın etkilediği diğer bir yolak da beyin sağlığı ve fonksiyonları için hayati öneme sahip karmaşık bir süreç olan glutatyon metabolizması yolağıdır. Glutatyon, glutamat, sistein ve glisin gibi vücutta doğal olarak bulunan, üç amino asitten oluşan bir tripeptittir ve oldukça güçlü bir antioksidandır. Beyin, sürekli olarak reaktif oksijen türleri

ve reaktif nitrojen türleri gibi serbest radikaller üretir. Bu radikaller, DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vererek oksidatif strese yol açar. Glutatyon, bu serbest radikalleri doğrudan nötralize ederek hücreleri hasardan korur (Dringen R., 2000). Bulunan metabolitler arasında 16.6 katlanma değerine ve 2.23115e-11 P değerine sahip piroglutamik asit glutamin amino asidinin bir türevidir. 5-okso pirolin olarak da adlandırılmaktadır. Gama glutamil döngüsü sırasında ortaya çıkar ve yeniden glutamata dönüştürülerek yeni glutatyon sentezinde kullanılabilir (Kumar ve Bachhawat; 2012) Grioli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada deneklere 60 gün boyunca piroglutamik asit verilmiş ve pleaseboya kıyasla öğrenmelerinde iyileşme olduklarını kanıtlamışlardır (Grioli ve ark., 1990). Yine Drago ve ark. sıçanların öğrenme ve hafıza kapasiteleri üzerine yaptıkları bir çalışmada piroglutamik asidin yaşlı sıçanlarda öğrenme ve hafıza kapasitelerini iyileştirmesi bakımından aktif bir bileşik olduğunu kanıtlamışlardır (Drago ve ark., 1988)

0.0049428'lik P değeriyle histidin metabolizması da dikkat çeken diğer bir yolaktır. Histidin, histamin öncüsüdür. Histamin ise uyanıklık, dikkat ve öğrenmede rol oynayan bir nöromodülatördür (Dere ve ark., 2010). Histidin metabolizmasının değişimi, pirasetamın bu nöromodülatör sistemler aracılığıyla bilişsel iyileşmeye katkıda bulunabileceğini gösterebilir. Alvarez bir araştırmasında histaminin öğrenme ve hafıza gibi karmaşık süreçlerde rol oynayabileceğine dair kanıtlardan bahsetmiştir (Alvarez, 2009).

Yapılan metabolom analizi sonucunda ROC eğrileri incelendiğinde biyobelirteç olabilecek 3 adet metabolit tespit edildi. Bunlardan ilki oldukça yüksek bir AUC değerine (0.926) sahip olan pikolinik asittir (PA). Triptofan amino asidinin metabolizması sırasında oluşan pikolinik asit son zamanlarda beyin sağlığı ve öğrenme üzerindeki potansiyel etkileri ile dikkat çekmektedir (Alghareeb ve ark., 2025). Ancak, pikolinik

asidin doğrudan bilişsel performansı artırdığına dair kapsamlı ve kesin insan çalışmaları hala sınırlıdır. Pikolinik asit; çinko, demir, bakır ve manganez gibi esansiyel mineralleri şelatlama kapasitesi oldukça yüksek olduğundan bu minerallerin bağırsaklardan emilimini artırır (Savita ve ark., 2023). Bu minerallerden çinko nörotransmitterlerin sentezi ve salınımında, sinir hücresi büyümesinde ve sinaptik plastisitede merkezi bir rol oynar (Sandstead ve ark., 2000). Demir ise beynin enerji üretimi ve oksijenlenmesi için hayati öneme sahiptir ve eksikliğinde dikkat eksikliği ve bilişsel yavaşlama görülmektedir. Pikolinik asit bu hayati minerallerin beyne taşınımını kolaylaştırarak bilişsel fonksiyonlar ve öğrenme üzerinde dolaylı olarak etki gösterebilir. Ayrıca PA'nın, kinolinik asit (KA) üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu da PA'nın nöroprotektif etkisini açıklayabilir çünkü KA beyinde inflamasyon ve oksidatif strese neden olabilen nörotoksik bir ajandır (Savita ve ark., 2023). Ek olarak pikolinik asit, beyin ile arasında yakın bir ilişki olan bağışıklık sistemi üzerinde modüle edici etkilere sahip olabilir. Beyindeki sağlıklı bir bağışıklık tepkisi, nöronların korunmasına ve optimal çalışmasına yardımcı olabilir. Bu da pirasetamın bilişsel işlev üzerindeki etkilerine yeni bir yaklaşım getirmektedir.

Biyobelirteç olabilecek diğer bir metabolit 0.813 AUC değerine sahip D-aspartattır. D-Aspartat, merkezi sinir sisteminde bulunur ve nörotransmitter olarak işlev görebilir. Özellikle NMDA reseptörleri ile etkileşime girerek sinyal iletiminde rol oynayabilir (Errico ve ark., 2018; Ota ve ark., 2012). Bu reseptörler yukarıda da bahsedildiği gibi hafıza oluşumu ve öğrenme gibi bilişsel süreçlerde kritik öneme sahiptir. D-Aspartat, yeni bilgilerin öğrenilmesi ve hafızanın pekiştirilmesi için hayati öneme sahip olan sinaptik iletimde de görevli olabileceği ifade edilmiştir. Sinaptik iletim, nöronlar arasındaki iletişimde temel rol oynar ve sinapsların gücünü ve verimliliğini değiştirebilme yeteneğidir (D'Aniello ve ark., 2011). Bazı araştırmalar, D-Aspartatın

sinir sistemi üzerinde olumlu etkiler yaratarak zihinsel odaklanmayı artırabileceğini ve daha iyi hafıza ve konsantrasyon sağlayabileceğini göstermektedir. Topo ve ark. yaptıkları bir çalışmada oral yoldan D-aspartat verdikleri sıçanların Morris su labirent sisteminde gizli bir platform bulma konusundaki bilişsel yeteneklerini geliştirdiğini kanıtlamışlardır (Topo ve ark., 2010). Ancak bu konudaki bilimsel kanıtlar henüz tam olarak güçlü değildir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bir diğer biyobelirteç ise 0.659 AUC değerine sahip ve beyin metabolizması ve öğrenme fonksiyonları üzerinde önemli etkilere sahip olduğu düşünülen bir aminoasit olan L-arjinindir. Bu etkileri ise NO üretimi ve antioksidan özellikleriyle bağlantılı olabiceği düşünükmektedir. L-arjinin, beyindeki nitrik oksit sentaz enzimi için temel bir substrattır ve nitrik oksit oluşumunun öncüsüdür(Moncada ve Higgs., 1993). Nitrik oksit, beyindeki kan damarlarının genişlemesini sağlayarak beyin kan akışını düzenler. Daha iyi kan akışı, beyin hücrelerine daha fazla oksijen ve besin ulaşması anlamına gelir, bu da bilişsel fonksiyonlar, öğrenme ve hafıza için hayati önem taşır. Bu da Al-Kuraishy ve ark. yaptıkları bir çalışmada pirasetamın kan akışını artırdığı yönündeki teorilerini destekler niteliktedir (Al-Kuraishy ve ark., 2025). NO ayrıca beyinde bir sinyal molekülü olarak görev yaparak sinaptik plastisitede rol oynar. Sinaptik plastisite ise yukarıda bahsedildiği gibi öğrenme ve hafıza oluşumu için temel bir mekanizmadır. L-arjininin NO üretimi yoluyla sinaptik plastisiteyi destekleyerek öğrenme ve hafıza süreçlerini iyileştirebileceği düşünülmektedir. L-arjinin ve NO'nun çeşitli nörobiyolojik süreçlerde önemli roller oynadığına dair giderek artan kanıtlar bulunmaktadır (Džoljić ve ark., 2015). Nitekim; Mone ve ark. hipertansif yaşlı yetişkinler üzerinde yaptığı bir çalışmada L-Argininin bilişsel bozukluğu önemli ölçüde iyileştirdiği sonucuna varmışlardır (Mone ve ark., 2022). Yi ve ark. L-arjininin nörotransmisyon, nörogenez ve nöroplastisite ve serebral kan akışının düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde

rol oynayan temel bir amino asit olduğunu yaptıkları çalışma ile kanıtlamışlardır (Yi ve ark., 2008). Okere ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada nitrik oksitin dışsal uygulanmasının feromona özgü koku hafızasını artırdığı sonucuna varmışlardır (Okere ve ark., 1996). Yanagihara ve ark. kediler üzerinde yaptığı bir çalışmada serebellumdaki NO'nun motor öğrenmede kilit bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır Yanagihara ve Kondo, 1996). Hawkins ve ark. yaptıkları derlemede NO'nun nöronal plastisitede rol oynayarak beyincik ve hipokampüs gibi farklı beyin bölgelerinde çeşitli öğrenme türlerine katkıda bulunduğunu kanıtlayan çalışmaları sunmuşlardır (Hawkins ve ark., 1998).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, pirasetamın farmasötik formulasyonda (NOOTROPİL) miktar tayini için UV-Gör. Bölge Spektrofotometrisi ve 1. Derece Türev Spektrofotometrisi olmak üzere iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Her iki yöntemin de farmasötik analizler için gerekli olan yüksek geri kazanım kriterlerini karşıladığı görülmektedir. 1. Derece Türev Spektrofotometrisi, geri kazanım verilerindeki çok düşük standart sapmalarla dikkat çekerek, bu parametrede üstün bir performans sergilemektedir. Geliştirilen yöntemler, tablet formülasyonlarının yanı sıra, Pirasetam içeren diğer farmasötik dozaj formlarının (örneğin enjeksiyonluk solüsyonlar, şuruplar) analizi için de güvenle uygulanabilir. Ayrıca yöntemin karmaşık olmaması, tampon kullanımı gerektirmemesi, basit ve hızlı olması nedeniyle birçok laboratuvarda kolaylıkla uygulanabilir.

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminde elde edilen verilere bakılarak pirasetamın hem standart çözeltilerde hem de insan plazmasında geliştirilen analitik yöntemin başarılı bir şekilde valide edildiği görülmektedir. Yöntem geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek doğrusallık, kabul edilebilir doğruluk, mükemmel bir kesinlik ve yeterli geri kazanım göstermektedir. Bu yöntem farmakokinetik çalışmalar, terapötik ilaç takibi veya adli toksikoloji gibi biyolojik örneklerde pirasetamın güvenilir bir şekilde miktar tayini için kullanılabileceğini göstermektedir. Geliştirilen yöntem sadece plazmada değil idrar, BOS gibi diğer biyolojik sıvılarda da valide edilerek uygulama alanı genişletilebilir.

Çalışmamız pirasetamın insan plazmasında çeşitli metabolik ve biyokimyasal yolaklar üzerindeki etkilerinin kapsamlı bir analizini sunmaktadır. Elde edilen veriler pirasetamın etki mekanizmasına dair soru işaretlerine kanıtlar sunmakta ve yeni yaklaşımlar getirmektedir. Pirasetam özellikle nörotransmitter metabolizması (glutamat, histidin, tirozin), enerji metabolizması ve antioksidan sistemler (glutatyon

metabolizması) gibi bilişsel işlevler için kritik olan çeşitli metabolik yolları etkilemektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler alanin-aspartat-glutamat metabolizmasının en belirgin şekilde etkilendiğini göstermektedir ki bu da pirasetamın nöroplastisite ve hafıza süreçlerinde doğrudan bir rol oynayabileceği fikrini destekler ve pirasetamın etki mekanizmasını glutamat ve diğer nörotransmitter maddelerin salınımına bağlı olduğuna dayandıran çalışmalara kanıt sunar. Pirasetam kullanımından sonra L-arjinin seviyesindeki artış NO sentezini tetikler. Nitrik oksit ise kan akışı düzenlemesi ve sinaptik plastisitede önemli bir sinyal molekülüdür. Bu yolun değişimi, nitrik oksit oluşumuna bağlı olarak pirasetamın beyindeki kan akışını ve sinaptik bağlantıları iyileştirme potansiyeline sahip olabileceğini akla getirebilir. Glutatyon, güçlü bir antioksidandır ve oksidatif stresten hücreleri korur. Beyin ise yüksek metabolik hızı nedeniyle oksidatif strese karşı hassastır. Glutatyon metabolizmasının pirasetam tarafından etkilenmesi, beyin hücrelerinin korunmasına ve böylece optimal bilişsel işlevin sürdürülmesine yardımcı olabileceğini düşündürebilir. Literatürden farklı yeni bir yaklaşım olarak pirasetamın bilişsel işlev üzerindeki pozitif etkilerinin pikolinik aside bağlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla ilaç verilen gruplarda belirgin şekilde artış göstermesi ve yapılan son çalışmalarda pikolinik asidin beyin sağlığı üzerine etkileri bu teoriyi destekler niteliktedir. Bu çalışma hedeflenmemiş metabolomiks olarak planlanmıştır. İlerleyen zamanda biyobelirteç olarak belirlenen metabolitleri ve anlamlı şekilde etkilenen yolaklarda rol oynayan metabolitleri hedef alan metabolomiks çalışma planlanarak elde edilen veriler güçlendirilebilir. Sonuç olarak elde edilen veriler pirasetamın etki mekanizmalarına dair soru işaretlerini aydınlatmıştır ve yeni yaklaşımlar getirmiştir.

KAYNAKLAR

Abdelgawad, M. A., Abdelaleem, E. A., Gamal, M., Abourehab, M. A., ve Abdelhamid, N. S. (2022). A new green approach for the reduction of consumed solvents and simultaneous quality control analysis of several pharmaceuticals using a fast and economic RP-HPLC method; a case study for a mixture of piracetam, ketoprofen and omeprazole drugs. *RSC Advances*, *12*(25), 16301-16309. https://doi.org/10.1039/D2RA02395D

Abdelrahman, M. M., Ahmed, A. B., Omar, M. A., Derayea, S. M., ve Abdelwahab, N. S. (2020). Development and validation of stability indicating chromatographic methods for simultaneous determination of citicoline and piracetam. *Journal of Separation Science*, *43*(15), 2981-2988. https://doi.org/10.1002/jssc.202000346

Abu Shmais, G. A., Al-Ayadhi, L. Y., Al-Dbass, A. M., & El-Ansary, A. K. (2012). Mechanism of nitrogen metabolism-related parameters and enzyme activities in the pathophysiology of autism. Journal of neurodevelopmental disorders, 4, 1-11.

Acharya, M., Ak, J., ve Garud, N. (2016). Stability indicating reversed phase-high performance liquid chromatography method development and validation for simultaneous determination of related substances of citicoline and piracetam in pharmaceutical dosage form. *Asian J Pharm Clin Res*, *9*(2), 292-297.

Al Hajeri, A., ve Fedorowicz, Z. (2016). Piracetam for reducing the incidence of painful sickle cell disease crises. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 2. Art. No.: CD006111. https://doi.org/10.1002/14651858.CD006111.pub2

Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Eliwa, D., Alexiou, A., Papadakis, M., Alruwaili, M., & Batiha, G. E. S. (2025). The mechanistic role of piracetam in the

management of vascular dementia. Behavioural Brain Research, 115551. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2025.115551

Alarcon-Barrera, J. C., Kostidis, S., Ondo-Mendez, A., ve Giera, M. (2022). Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1763-1773. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.018

Alenezi, S. S., Gouda, A. A., El Sheikh, R., Badahdah, N. A., Alzuhiri, M. E., Magrabi, A. H., Jilani, A. L., ve Darwish, A. S. (2025). Environmental sustainability profiles assessment of HPLC stability indicating method for quantitation of piracetam and vincamine in pharmaceutical medications. *Talanta Open*, *11*, 100407. https://doi.org/10.1016/j.talo.2025.100407

Alghareeb, S. A., Alsughayyir, J., & Alfhili, M. A. (2025). Picolinic acid, a tryptophan metabolite, triggers cellular senescence by targeting NOS/p38 MAPK/CK1α/MLKL signaling and metabolic exhaustion in red blood cells. Toxicological Research, 1-9. https://doi.org/10.1007/s43188-025-00280-5

Alvarez, E. O. (2009). The role of histamine on cognition. Behavioural brain research, 199(2), 183-189. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.010

Andrews, D. L. (2017). Electromagnetic radiation. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition), pp. 427-431. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11153-9 https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374413-5.00131-7

Ansari, M., Kazemipour, M., Baradaran, R. M., ve Jalallzadeh, H. (2004). Derivative spectrophotometric method for determination of losartan in pharmaceutical formulations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(10), 1166-1170.

Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, *877*(23), 2224-2234. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030

Arayne, M. S., Sultana, N., Siddiqui, F. A., Mirza, A. Z., Qureshi, F., ve Zuberi, M. H. (2010). Simultaneous determination of piracetam and its four impurities by RP-HPLC with UV detection. *Journal of Chromatographic Science*, *48*(7), 589-594. https://doi.org/10.1093/chromsci/48.7.589

Atiri, S. O., ve Popoola, O. A. (2023). A Comparative study of piracetam, donepezil and captopril on short-and long-term memory in mice. *West African Journal of Pharmacy*, *34*(1), 42-52. https://doi.org/10.60787/wapcp-34-1-304

Awad, H., Khamis, M. M., ve El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, *50*(2), 158-175. https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046

Bajad, S., ve Shulaev, V. (2011). LC-MS-based metabolomics. *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*, 213-228.

Baloh, R. W. (1998). Vertigo. *The Lancet*, *352*(9143), 1841-1846.

Barkat, K., Ahmad, M., Minhas, M., Malik, M., ve Sohail, M. (2014). Development of a simple chromatographic method for the determination of piracetam in human plasma and its pharmacokinetic evaluation. *Drug Research*, *64*(07), 384-388. https://doi.org/10.1055/s-0033-1363248

Beccaria, M., ve Cabooter, D. (2020). Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst*, *145*(4), 1129-1157. https://doi.org/10.1039/C9AN02145K

Beger, R. D. (2013). A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, *3*(3), 552-574. https://doi.org/10.3390/metabo3030552

Benchev, R., ve Zhelyazkova, Z. (2003). Piracetam* in Patients with Chronic Vertigo. *Balkan Journal of Otology ve Neuro-Otology*, *3*(1), 43-45.

Bering, B., ve Müller, W. (1985). Interaction of piracetam with several neurotransmitter receptors in the central nervous system. Relative specificity for 3H-glutamate sites. *Arzneimittel-forschung*, *35*(9), 1350-1352.

Bhowmick, A.A., Khandelwai, K.R., Mhaske, D.V., Khadke S. (2010) Analytical method development and validation for piracetam as bulk and in pharmaceutical formulation. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 201-204.

Brown, P., Steiger, M., Thompson, P., Rothwell, J., Day, B., Salama, M., Waegemans, T., ve Marsden, C. (1993). Effectiveness of piracetam in cortical myoclonus. *Movement Disorders*, *8*(1), 63-68. https://doi.org/10.1002/mds.870080112

Budczies, J., ve Denkert, C. (2016). Tissue-based metabolomics to analyze the breast cancer metabolome. In: Cramer, T., Schmitt, A.C. (eds) *Metabolism in Cancer*. *Recent Results in Cance Research*, Vol. 207. Springer, Charm. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42118-6_7

Cao, M., Zhao, L., Chen, H., Xue, W., ve Lin, D. (2012). NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. *Analytical Sciences*, *28*(5), 451-456. https://doi.org/10.2116/analsci.28.451

Centon, P., Guerrini, R., ve Remy, C. (1999). Piracetam in the treatment of cortical myoclonus. *Pharmacopsychiatry*, *32*(S 1), 49-53. https://doi.org/10.1055/s-2007-979237

Chaudhry, S. (2021). Scrupulously managing vertigo. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, *9*(1), 1.

Chavan, S. D., ve Desai, D. M. (2022). Analytical method validation: A brief review. *World J. Adv. Res. Rev*, *16*, 389-402. https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1165

Chen, C. J., Lee, D. Y., Yu, J., Lin, Y. N., ve Lin, T. M. (2023). Recent advances in LC-MS-based metabolomics for clinical biomarker discovery. *Mass spectrometry reviews*, *42*(6), 2349-2378. https://doi.org/10.1002/mas.21785

Chen, Y., Li, E.-M., ve Xu, L.-Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites*, *12*(4), 357. https://doi.org/10.3390/metabo12040357

Cherian, L., Hlatky, R., ve Robertson, C. S. (2004). Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain pathology*, *14*(2), 195-201. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00053.x

Cohen, P. A., Zakharevich, I., ve Gerona, R. (2020). Presence of piracetam in cognitive enhancement dietary supplements. *JAMA internal Medicine*, *180*(3), 458-459. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.5507

Cooper, A. J. (2001). Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. Mental retardation and developmental disabilities research reviews, 7(4), 280-286. https://doi.org/10.1002/mrdd.1039

Consonni, R., Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Tsiangali, M., ve Tsimidou, M. Z. (2016). On the traceability of commercial saffron samples using 1H-NMR and FT-IR metabolomics. *Molecules*, *21*(3), 286. https://doi.org/10.3390/molecules21030286

Croisile, B., Trillet, M., Fondarai, J., Laurent, B., Mauguiere, F., ve Billardon, M. (1993). Long-term and high-dose piracetam treatment of Alzheimer's disease. *Neurology*, *43*(2), 301-301. https://doi.org/10.1212/WNL.43.2.301

Curticapean, A., ve Imre, S. (2007). New validated method for piracetam HPLC determination in human plasma. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(3), 273-281. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.001

Dame, Z. T., Aziat, F., Mandal, R., Krishnamurthy, R., Bouatra, S., Borzouie, S., Guo, A. C., Sajed, T., Deng, L., ve Lin, H. (2015). The human saliva metabolome. *Metabolomics*, *11*, 1864-1883.

D'Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernàndez, J., Topo, E., & D'Aniello, A. (2011). D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. The FASEB Journal, 25(3), 1014-1027. https://doi.org/10.1096/fj.10-168492

De Deyn, P. P., De Reuck, J., Deberdt, W., Vlietinck, R., ve Orgogozo, J.-M. (1997). Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. *Stroke*, 28(12), 2347-2352. https://doi.org/10.1161/01.STR.28.12.2347

Dere, E., Zlomuzica, A., Silva, M. D. S., Ruocco, L. A., Sadile, A. G., & Huston, J. P. (2010). Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behavioural brain research*, *215*(2), 209-220. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.045

Di Ianni, M., Wilsher, C. R., Blank, M. S., Conners, C. K., Chase, C. H., Funkenstein, H. H., Helfgott, E., Holmes, J. M., Lougee, L., ve Maletta, G. J. (1985). The effects of piracetam in children with dyslexia. *Journal of clinical psychopharmacology*, *5*(5), 272-278.

Drago, F., Valerio, C., D'Agata, V., Astuto, C., Spadaro, F., Continella, G., & Scapagnini, U. (1988). Pyroglutamic acid improves learning and memory capacities in old rats. Functional Neurology, 3(2), 137-143.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. Progress in neurobiology, 62(6), 649-671. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00060-X

Dwi Lestari, A., Tri Prasetyo, A., Palupi, T., Umayah, E., Yuwono, M., ve Indrayanto, G. (2005). HPLC Determination of piracetam in tablets; Validation of the method.

Journal of Liquid Chromatography ve Related Technologies, *28*(9), 1407-1416. https://doi.org/10.1081/JLC-200054893

Džoljić, E., Grabatinić, I., & Kostić, V. (2015). Why is nitric oxide important for our brain?. Functional neurology, 30(3), 159. https://doi.org/10.11138/FNeur/2015.30.3.159

Ebrahimi, S., Esfahani, S. A., ve Ebrahimi, A. (2022). Comparison of the effects of citicoline and piracetam on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rabbits. *Iranian journal of child neurology*, *16*(1), 77. https://doi.org/10.22037/ijcn.v15i4.29816

Errico, F., Nuzzo, T., Carella, M., Bertolino, A., & Usiello, A. (2018). The emerging role of altered d-aspartate metabolism in schizophrenia: new insights from preclinical models and human studies. Frontiers in psychiatry, 9, 559. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00559

Fancy, S.-A., ve Rumpel, K. (2008). GC-MS-based metabolomics. *Biomarker methods in drug discovery and development*, 317-340.

Fang, Z.-Z., ve Gonzalez, F. J. (2014). LC–MS-based metabolomics: an update. *Archives of toxicology*, *88*, 1491-1502. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1234-6

Fernandes, C., ve Samuel, J. (1985). The use of piracetam in vertigo. *South African Medical Journal*, *68*(11), 806-808.

Ferrer, I., ve Thurman, E. M. (2003). Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *22*(10), 750-756. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01013-6

Firstova, Y. Y., ve Kovalev, G. (2023). The Effect of Piracetam and Noopept on NMDA and 5-HT 2A Receptors in the Brain of Mice with Congenital β-Arrestin

Deficiency. *Nejrohimiâ*, *40*(2), 179-185. https://doi.org/10.31857/S102781332302005X

Gardner, A., Carpenter, G., ve So, P.-W. (2020). Salivary metabolomics: from diagnostic biomarker discovery to investigating biological function. *Metabolites*, *10*(2), 47. https://doi.org/10.3390/metabo10020047

Genton, P., ve Van Vleymen, B. (2000). Piracetam and levetiracetam: close structural similarities but different pharmacological and clinical profiles. *Epileptic disorders*, 2(2), 99-105. https://doi.org/10.1684/j.1950-6945.2000.tb00363.x

Giurgea, C. (1973). The "nootropic" approach to the pharmacology of the integrative activity of the brain 1, 2. *Conditional reflex: a Pavlovian journal of research ve therapy*, *8*, 108-115.

Grioli, S., Lomeo, C., Quattropani, M. C., Spignoli, G., & Villardita, C. (1990). Pyroglutamic acid improves the age associated memory impairment. Fundamental & clinical pharmacology, 4(2), 169-173. https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1990.tb00485.x

Godzien, J., Ciborowski, M., Martínez-Alcázar, M. P., Samczuk, P., Kretowski, A., ve Barbas, C. (2015). Rapid and reliable identification of phospholipids for untargeted Metabolomics with LC–ESI–QTOF–MS/MS. *Journal of Proteome Research*, *14*(8), 3204-3216. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00169

Gouliaev, A. H., ve Senning, A. (1994). Piracetam and other structurally related nootropics. *Brain research reviews*, *19*(2), 180-222. https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90011-6

Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M., ve Ghelardini, C. (2002). Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of

cognition-enhancing drugs. *Current Pharmaceutical Design*, *8*(2), 125-138. https://doi.org/10.2174/1381612023396582

Gündüz, T. (1988). *İnstrumental analiz*. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi.

Hadad, G., Abdel-Salam, R., ve Emara, S. (2011). Optimized and validated flow-injection spectrophotometric analysis of topiramate, piracetam and levetiracetam in pharmaceutical formulations. *Acta Pharmaceutica*, *61*(4), 377.

Hawkins, R. D., Son, H., & Arancio, O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. Progress in brain research, 118, 155-172. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63206-9

Hegeman, A. D. (2010). Plant metabolomics—meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. *Briefings in functional genomics*, *9*(2), 139-148. https://doi.org/10.1093/bfgp/elp053

Herlenius, E., ve Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*, 190, 8-21. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.027

Hitzenberger, G., Rameis, H., ve Manigley, C. (1998). Pharmacological properties of piracetam: Rationale for use in stroke patients. *CNS drugs*, *9*, 19-27.

Hofmann, A. (2010). Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In. Citeseer.

Huang, Q., Tan, Y., Yin, P., Ye, G., Gao, P., Lu, X., Wang, H., ve Xu, G. (2013). Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer research*, *73*(16), 4992-5002. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0308

Hyvärinen, E., Savolainen, M., Mikkonen, J. J., ve Kullaa, A. M. (2021). Salivary metabolomics for diagnosis and monitoring diseases: challenges and possibilities. *Metabolites*, 11(9), 587. https://doi.org/10.3390/metabo11090587

ICH Q2 (R1) (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, CPMP/ICH/381/95.

Jemal, M., ve Xia, Y.-Q. (2006). LC-MS development strategies for quantitative bioanalysis. *Current Drug Metabolism*, 7(5), 491-502. https://doi.org/10.2174/138920006777697927

Karimi shayan, T., Abdolmaleki, A., Asadi, A., ve Hassanpour, H. (2024). Piracetam as neuroprotective, anticonvulsant, and anti-anxiety agent: An In Vivo study on Ptz epileptic rats. Archives of Razi Institute, 79(5), 1057-1064. https://doi.org/10.32592/ARI.2024.79.5.1057

Kumar, A., & Bachhawat, A. K. (2012). Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. Current Science, 288-297.

Kiseleva, O., Kurbatov, I., Ilgisonis, E., ve Poverennaya, E. (2021). Defining blood plasma and serum metabolome by GC-MS. *Metabolites*, 12(1), 15. https://doi.org/10.3390/metabo12010015

Kumar, A., Mishra, G., Dhama, N., ve Verma, V. (2022). Piracetam Pharmacological Effects: A Review. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 11(12), 5648-5661.

Lavanya, G., Sunil, M., Eswarudu, M., Eswaraiah, M. C., Harisudha, K., ve Spandana, B. N. (2013). Analytical method validation: an updated review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(4), 1280.

Li, L., Hao, X., Chen, H., Wang, L., Chen, A., Song, X., Hu, Z., Su, Y., Lin, H., ve Fan, P. (2020). Metabolomic characterization of semen from asthenozoospermic

patients using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 34(9), e4897. https://doi.org/10.1002/bmc.4897

Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., ve Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical reviews in food science and nutrition*, *61*(9), 1448-1469. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761287

Liu, J., Yang, N., Wang, X., ve Wang, W. (2024). Piracetam reduces oxidative stress and mitochondrial function impairment in an in vitro model of vascular dementia. *Experimental Brain Research*, *242*(8), 1841-1850. https://doi.org/10.1007/s00221-024-06868-x

Loscertales, M., Rose, S. P., Daisley, J. N., ve Sandi, C. (1998). Piracetam facilitates long-term memory for a passive avoidance task in chicks through a mechanism that requires a brain corticosteroid action. *European Journal of Neuroscience*, *10*(7), 2238-2243. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00234.x

Louchahi, K., Tod, M., Bonnardel, P., ve Petitjean, O. (1995). Determination of piracetam in human plasma and urine by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *663*(2), 385-389. https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00448-E

Maass, B., ve Soetanto, R. (1988). Prüfung der Wirkung von Piracetam (Nootrop*) auf die Wasserstoff-Clearance am Innenohr. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie und ihre Grenzgebiete*, *67*(03), 132-135. https://doi.org/10.1055/s-2007-998469

Malkawi, A. K., Alzoubi, K. H., Jacob, M., Matic, G., Ali, A., Al Faraj, A., Almuhanna, F., Dasouki, M., ve Abdel Rahman, A. M. (2018). Metabolomics based profiling

of dexamethasone side effects in rats. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 46. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00046

Mallik, B., Chakravarti, B., ve Chakravarti, D. N. (2008). Overview of chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*(1), 6.1. 1-6.1. 22. https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0601s00

Malykh, A. G., ve Sadaie, M. R. (2010). Piracetam and piracetam-like drugs. *Drugs*, *70*(3), 287-312.

Mandal, R., Guo, A. C., Chaudhary, K. K., Liu, P., Yallou, F. S., Dong, E., Aziat, F., ve Wishart, D. S. (2012). Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: a comprehensive and quantitative update. *Genome medicine*, *4*, 1-11. https://doi.org/10.1186/gm337

Mani, V. (2022). Piracetam-induced neuroprotection in lipopolysaccharides-challenged EOC-20 cells and mouse brain via attenuating oxidative stress. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *58*, e21530. https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e21530

Mansour, N. M., El-Sherbiny, D. T., Ibrahim, F. A., ve El Subbagh, H. I. (2021). Development of an inexpensive, sensitive and green HPLC method for the simultaneous determination of brivaracetam, piracetam and carbamazepine; application to pharmaceuticals and human plasma. *Microchemical Journal*, *163*, 105863. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105863

Marczenko, Z., ve Balcerzak, M. (2000). Principles of spectrophotometry. *Analytical Spectroscopy Library* 10, 26-38. DOI: 10.1016/S0926-4345(00)80066-8 https://doi.org/10.1016/S0926-4345(00)80066-8

Maslarska, V. (2013). Analytical Method Development and validation for piracetam in pharmaceutical formulation. *Pharmacia*, 60(4), 42-45.

Medhe, S. (2018). Ionization techniques in mass spectrometry: a review. *Mass Spectrom Purif Tech*, *4*(01), 1000126. https://doi.org/10.4172/2469-9861.1000126

Mendes, G. D., Zaffalon, G. T., Silveira, A. S., Ramacciato, J. C., Motta, R. H. L., Gagliano-Jucá, T., Lopes, A. G., de Almeida Magalhães, J. C., ve De Nucci, G. (2016). Assessment of pharmacokinetic interaction between piracetam and l-carnitine in healthy subjects. *Biomedical Chromatography*, *30*(4), 536-542. https://doi.org/10.1002/bmc.3579

Merwid-Ląd, A., Passon, M., Drymluch, P., Głuszyński, M., Szeląg, A., ve Matuszewska, A. (2023). Do medical universities students use cognitive enhancers while learning?—conclusions from the study in Poland. *Life*, *13*(3), 820. https://doi.org/10.3390/life13030820

Metwally, F. H., Elzeany, B., ve Darwish, H. (2005). New methods for determination of cinnarizine in mixture with piracetam by spectrodensitometry, spectrophotometry, and liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, *88*(6), 1666-1676. https://doi.org/10.1093/jaoac/88.6.1666

Miflin, B. J., & Habash, D. Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. Journal of experimental botany, 53(370), 979-987. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.979

Mikati, M. A., Solh, H. M., Deryan, D. E., Sahli, I. F., ve Dabbous, I. A. (1983). A preliminary report on piracetam in sickle cell anemia: a double-blind crossover clinical trial and effects on erythrocyte survival. *Annals of Saudi Medicine*, *3*(4), 233-235. https://doi.org/10.5144/0256-4947.1983.233

Mittal, A., Parmar, S., Gilani, S. J., Imam, S. S., ve Taleuzzaman, M. (2017). Optimization and validation for simultaneous estimation of citicoline and

piracetam in bulk and tablet formulations using RP-HPLC method: Analytical quality by design approach. *Asian Journal of Research in Chemistry*, *10*(2), 198-205. https://doi.org/10.5958/0974-4150.2017.00034.7

Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. New England journal of medicine, 329(27), 2002-2012. https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706

Mone, P., Pansini, A., Jankauskas, S. S., Varzideh, F., Kansakar, U., Lombardi, A., ... & Santulli, G. (2022). L-arginine improves cognitive impairment in hypertensive frail older adults. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 9, 868521. https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.868521

Monteiro, M., Carvalho, M., Bastos, M., ve Guedes de Pinho, P. (2013). Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Current medicinal chemistry*, *20*(2), 257-271. https://doi.org/10.2174/0929867311320020006

Moriau, M., Crasborn, L., Lavenne-Pardonge, E., Von Frenckell, R., ve Col-Debeys, C. (1993). Platelet anti-aggregant and rheological properties of piracetam. A pharmacodynamic study in normal subjects. *Arzneimittel-forschung*, 43(2), 110-118.

Mostafa, H., Tayel, S. A., Abdelrahim, M., Khamees, A., El Maraghy, M. A., ve Meabed, M. H. (2012). The role of piracetam in treatment of sickle cell anemia. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, *2*(1), 58-65. https://doi.org/10.5455/njppp.2012.v2.i1.9

Müller, W. E., Koch, S., Scheuer, K., Rostock, A., ve Bartsch, R. (1997). Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochemical Pharmacology*, *53*(2), 135-140. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00463-7

Nalbandian, R. M., Henry, R. L., Burek, C. L., Diglio, C. A., Goldman, A. I., Taylor, G. W., ve Hoffman, W. H. (1983). Diminished adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium by piracetam. *American journal of hematology*, 15(2), 147-151. https://doi.org/10.1002/ajh.2830150206

Nikolaev, E. N., Kostyukevich, Y. I., ve Vladimirov, G. N. (2016). Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. *Mass spectrometry reviews*, *35*(2), 219-258. https://doi.org/10.1002/mas.21422

Noga, M. J., Dane, A., Shi, S., Attali, A., van Aken, H., Suidgeest, E., Tuinstra, T., Muilwijk, B., Coulier, L., ve Luider, T. (2012). Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics*, *8*, 253-263. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0306-3

Okere, C. O., Kaba, H., & Higuchi, T. (1996). Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. Neuroscience, 71(2), 349-354. https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00467-X

Oosterveld, W. (1999). The effectiveness of piracetam in vertigo. *Pharmacopsychiatry*, *32*(S 1), 54-59. https://doi.org/10.1055/s-2007-979238

Ota, N., Shi, T., & Sweedler, J. V. (2012). D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. Amino acids, 43, 1873-1886.

Passos, M. L., ve Saraiva, M. L. M. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, *135*, 896-904. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045

Patel, J., King, A., Malempati, M., ve Patel, M. (2024). Understanding nootropics and cognitive enhancement: mechanism of action and ethical considerations. *Health Open Research*, *6*, 2. https://doi.org/10.12688/healthopenres.13504.1

Patil, P., Patil, M., ve Patil, D. D. (2018). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of Piracetam and Vinpocetine. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, *8*(2), 103-108.

Penner, M. H. (2017). Basic principles of spectroscopy. *Food analysis*, 79-88.

Pepeu, G., ve Spignoli, G. (1989). Nootropic drugs and brain cholinergic mechanisms. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 13, S77-S88. https://doi.org/10.1016/0278-5846(89)90112-7

Peris-Vicente, J., Esteve-Romero, J., ve Carda-Broch, S. (2015). Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. *Analytical separation science*, 1757-1808. https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064

Pilch, H., ve Müller, W. (1988). Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice. *Psychopharmacology*, 94, 74-78.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.

Premnath, S. M., ve Zubair, M. (2024). Chromatography. *StatPearls*.

Raevskii, K., ve Nerush, P. (1993). Comparison of the effects of piracetam and N-acetylaspartic acid on memory and on the content of transmitter amino acids in the rat brain during simulation of a neurotic state. *Bulletin of experimental biology and medicine*, *116*, 1393-1395.

Rao, M. G., Holla, B., Varambally, S., Raveendranathan, D., Venkatasubramanian, G., ve Gangadhar, B. N. (2013). Piracetam treatment in patients with cognitive impairment. *General hospital psychiatry*, *35*(4), 451. e455-451. e456. https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2012.05.009

Raposo, F., ve Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *129*, 115913. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913

Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., ve Sri, D. N. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR J Pharm*, *5*(10), 7-19.

Rosenhall, U., Deberdt, W., Friberg, U., Kerr, A., ve Oosterveld, W. (1996). Piracetam in patients with chronic vertigo: results of a double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Drug Investigation*, *11*, 251-260.

Sahu, K., Siddiqui, A. A., Shaharyar, M., Ahmad, N., Anwar, M., ve Ahmad, F. J. (2013). Chromatographic separation of piracetam and its metabolite in a mixture of microsomal preparations, followed by an MS/MS analysis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *65*, 94-101. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.053

Sandstead, H. H., Frederickson, C. J., & Penland, J. G. (2000). History of zinc as related to brain function. The Journal of nutrition, 130(2), 496S-502S. https://doi.org/10.1093/jn/130.2.496S

Saoi, M., ve Britz-McKibbin, P. (2021). New advances in tissue metabolomics: a review. *Metabolites*, *11*(10), 672. https://doi.org/10.3390/metabo11100672

Sato, M., ve Heiss, W. (1985). Effect of piracetam on cerebral blood flow and somatosensory evoked potential during normotension and hypotensive ischemia in cats. *Arzneimittel-forschung*, *35*(5), 790-792.

Savita, V., Pal, V. S., Bagul, K., & Mudgal, V. (2023). A Comparative Study of Picolinic Acid Levels in Patients of Severe Depression with and without Suicidality. Archives of Medicine and Health Sciences, 11(2), 198-202. https://doi.org/10.4103/amhs.amhs_79_23

Scheuer, K., Rostock, A., Bartsch, R., ve Müller, W. (1999). Piracetam improves cognitive performance by restoring neurochemical deficits of the aged rat brain. *Pharmacopsychiatry*, *32*(S 1), 10-16. https://doi.org/10.1055/s-2007-979231

Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., ve McLean, J. A. (2016). Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *27*(12), 1897-1905. https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y

Sharma, S., Goyal, S., ve Chauhan, K. (2018). A review on analytical method development and validation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *10*(6), 8-15. http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28279

Shaywitz, S. E., ve Shaywitz, B. A. (2005). Dyslexia (specific reading disability). *Biological Psychiatry*, *57*(11), 1301-1309. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.043

Shorvon, S. D. (2015). Piracetam. In Edts: Shovron, S., Perucca, E. *The treatment of Epilepsy*, pp. 589-594. https://doi.org/10.1002/9781118936979.ch44 https://doi.org/10.1002/9781118936979.ch44

Siddiqui, F. A., Sher, N., Shafi, N., Wafa Sial, A., Ahmad, M., Mehjebeen, ve Naseem, H. (2014). Development of new method for simultaneous analysis of piracetam and levetiracetam in pharmaceuticals and biological fluids: application in stability studies. *BioMed Research International*, *2014*(1), 758283. https://doi.org/10.1155/2014/758283

Sivadas, A., Sathi, A., Sathi, K., ve Rahate, K. P. (2013). Development and validation of spectrophotometric methods for simultaneous estimation of citicoline and piracetam in tablet dosage form. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(3), 202-207. https://doi.org/10.4103/0975-7406.116818

Solmaz, G. D., ve Erbaş, O. (2023). Nootropics as Cognitive Enhancers: Pharmacological Properties and Therapeutic Use. *Journal of Experimental and Basic Medical Sciences, 4*(1), 052-061. https://doi.org/10.5606/jebms.2023.1046

Stoop, M. P., Coulier, L., Rosenling, T., Shi, S., Smolinska, A. M., Buydens, L., Ampt, K., Stingl, C., Dane, A., ve Muilwijk, B. (2010). Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples. *Molecular ve Cellular Proteomics, 9*(9), 2063-2075. https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000877

Swartz, M., ve Krull, I. (2006). Method validation and robustness. 24(5), 480-490.

Tijssen, M., Thom, M., Ellison, D., Wilkins, P., Barnes, D., Thompson, P., ve Brown, P. (2000). Cortical myoclonus and cerebellar pathology. *Neurology*, 54(6), 1350-1356. https://doi.org/10.1212/WNL.54.6.1350

Tisdale, J. F., Thein, S. L., ve Eaton, W. A. (2020). Treating sickle cell anemia. *Science, 367*(6483), 1198-1199. https://doi.org/10.1126/science.aba3827

Topo, E., Soricelli, A., Di Maio, A., D'Aniello, E., Di Fiore, M. M., & D'Aniello, A. (2010). Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. Amino acids, 38, 1561-1569.

Tsukada, Y. (1966). Amino acid metabolism and its relation to brain functions. Progress in Brain Research, 21, 268-291. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62981-7

Vahith, E., Balakrishnan, A., Ramaswamy, V., ve Natesan, S. (2024). Stability-Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous estimation of Cinnarizine and Piracetam bulk and in Capsule dosage form. *African Journal of Biomedical Research, 27*(3), 362-369.

Valenzuela, C. F., Puglia, M. P., ve Zucca, S. (2011). Focus on: neurotransmitter systems. *Alcohol Research ve Health, 34*(1), 106.

Vane, J., ve Corin, R. E. (2003). Prostacyclin: a vascular mediator. *European journal of vascular and endovascular surgery*, *26*(6), 571-578. https://doi.org/10.1016/S1078-5884(03)00385-X

Velho, A. L. C., Menezes, E., Dinh, T., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., ve Memili, E. (2018). Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PloS one*, *13*(4), e0195279. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195279

Vermeersch, K. A., ve Styczynski, M. P. (2013). Applications of metabolomics in cancer research. *Journal of Carcinogenesis*, *12*, 9. https://doi.org/10.4103/1477-3163.113622

Vernon, M. W., ve Sorkin, E. M. (1991). Piracetam: an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in senile cognitive disorders. *Drugs ve Aging*, *1*, 17-35.

Vidushi, Y., Meenakshi, B., ve Bharkatiya, M. (2017). A review on HPLC method development and validation. *Res J Life Sci, Bioinform, Pharm Chem Sci*, *2*(6), 178. https://doi.org/10.26479/2017.0206.12

Vignoli, A., Tenori, L., Morsiani, C., Turano, P., Capri, M., ve Luchinat, C. (2022). Serum or plasma (and which plasma), that is the question. *Journal of Proteome Research*, *21*(4), 1061-1072.

Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., ve Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, *24*(5), 613-646. https://doi.org/10.1002/mas.20032

Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., ve Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *78*, 23-35. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005

Vinayavekhin, N., Homan, E. A., ve Saghatelian, A. (2010). Exploring disease through metabolomics. *ACS chemical biology*, *5*(1), 91-103. https://doi.org/10.1021/cb900271r

Voronina, T. (2023). Cognitive Impairment and Nootropic Drugs: Mechanism of Action and Spectrum of Effects. *Neurochemical Journal*, *17*(2), 180-188. https://doi.org/10.1134/S1819712423020198

Waegemans, T., Wilsher, C. R., Danniau, A., Ferris, S. H., Kurz, A., ve Winblad, B. (2002). Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis. In (Vol. 13, pp. 217-224): S. Karger AG Basel, Switzerland. https://doi.org/10.1159/000057700

Wang, X., Zhu, J., Xu, R., Yang, X., Wu, H., Lin, D., Ye, F., ve Hu, L. (2010). Determination of piracetam in rat plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Biomedical Chromatography*, *24*(10), 1108-1112. https://doi.org/10.1002/bmc.1412

Webster, R.A. (2001). Neurotransmitter systems and function: overview. Edited by Roy Webster. *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*, John Wiley ve Sons Ltd. pp. 1-32. https://doi.org/10.1002/0470846577.ch1

Wedge, D. C., Allwood, J. W., Dunn, W., Vaughan, A. A., Simpson, K., Brown, M., Priest, L., Blackhall, F. H., Whetton, A. D., ve Dive, C. (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. https://doi.org/10.1021/ac2012224

Weis, S., Sonnberger, M., Dunzinger, A., Voglmayr, E., Aichholzer, M., Kleiser, R., Strasser, P. (2019). Neurotransmitter Systems. *Imaging Brain Diseases: A*

Neuroradiology, Nuclear Medicine, Neurosurgery, Neuropathology and Molecular Biology-based Approach, Springer. pp. 369-399.

Wilsher, C. R., Bennett, D., Chase, C. H., Conners, C. K., Diianni, M., Feagans, L., Hanvik, L. J., Helfgott, E., Koplewicz, H., ve Overby, P. (1987). Piracetam and dyslexia: effects on reading tests. *Journal of clinical psychopharmacology*, *7*(4), 230-237.

Winblad, B. (2005). Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Reviews*, *11*(2), 169-182. https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2005.tb00268.x

Winnicka, K., Tomasiak, M., ve Bielawska, A. (2005). Piracetam-an old drug with novel properties. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, *62*(5), 405-409.

Wishart, D. S., Lewis, M. J., Morrissey, J. A., Flegel, M. D., Jeroncic, K., Xiong, Y., Cheng, D., Eisner, R., Gautam, B., ve Tzur, D. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B*, *871*(2), 164-173. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.00

Wojszel, Z. B. (2021). Nootropics (piracetam, pyritinol, co-dergocrine, meclophenoxat, pentoxifylline, nimodipine). In *NeuroPsychopharmacotherapy* (pp. 1-45). Springer.

Wu, G., Meininger, C. J., McNeal, C. J., Bazer, F. W., ve Rhoads, J. M. (2021). Role of L-arginine in nitric oxide synthesis and health in humans. In *Amino acids in nutrition and health* (pp. 167-187). Springer.

Xu, B., Bai, X., Zhang, J., Li, B., Zhang, Y., Su, R., Wang, R., Wang, Z., Lv, Q., ve Zhang, J. (2023). Metabolomic analysis of seminal plasma to identify goat semen freezability markers. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1132373. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1132373

Yan, J., Kuzhiumparambil, U., Bandodkar, S., Dale, R. C., ve Fu, S. (2021). Cerebrospinal fluid metabolomics: detection of neuroinflammation in human central nervous system disease. *Clinical ve Translational Immunology*, *10*(8), e1318. https://doi.org/10.1002/cti2.1318

Yanagihara, D., & Kondo, I. (1996). Nitric oxide plays a key role in adaptive control of locomotion in cat. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(23), 13292-13297. https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13292

Yi, J., Horky, L. L., Friedlich, A. L., Shi, Y., Rogers, J. T., & Huang, X. (2008). L-arginine and Alzheimer's disease. International journal of clinical and experimental pathology, 2(3), 211

Yuwono, M., ve Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, *32*, 243-259. https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., ve Wang, X. (2012a). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, *137*(2), 293-300. https://doi.org/10.1039/C1AN15605E

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., ve Wang, X. (2012b). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of proteomics*, *75*(4), 1079-1088. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.027

Zhang, A., Sun, H., ve Wang, X. (2012). Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, *168*, 1718-1727. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9891-5

Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., ve Ressom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, *8*(2), 470-481. https://doi.org/10.1039/C1MB05350G

EKLER

EK-1. Etik Bildirim İntihal Beyan Formu

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU[1]

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Büşra YÜKSEL
Öğrencinin Numarası	
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	%4	% 15
II. Genel Bilgiler	%8	% 35
III. Materyal ve Metod	%9	% 35
IV. Bulgular	%8	% 15
V. Tartışma	%2	% 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

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/ 394
Konu : Etik Kurul Kararı

28.04.2022

Sayın: Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU
Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz **"Pirasetam Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilip Valide Edilmesi ve Baş Dönmesi Şikayeti Olan Hastaların Pirasetam Kullanımı Esnasında Metabolom Profillerindeki Değişimlerin Belirlenmesi"** isimli bilimsel **tez** çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		**Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU**
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		**Pirasetam Etkin Maddesinin Farklı Ortamlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilip Valide Edilmesi ve Baş Dönmesi Şikayeti Olan Hastaların Pirasetam Kullanımı Esnasında Metabolom Profillerindeki Değişimlerin Belirlenmesi**
KARAR BİLGİLERİ	**Toplantı Sayısı: 4 Karar No: 48**	**Tarih:**28.04.2022
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin **TÜBİTAK tarafından** karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. **Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.** Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	