



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YENİ NESİL OPIOİDLERİN BAĞIMLILIK TEDAVİSİNDE
KULLANILAN NALTREKSON VE METABOLİTİNİN
ANALİZLERİ İÇİN YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ceren Hacer BOZMAOĞLU

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ NESİL OPIOİDLERİN BAĞIMLILIK TEDAVİSİNDE
KULLANILAN NALTREKSON VE METABOLİTİNİN
ANALİZLERİ İÇİN YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ceren Hacer BOZMAOĞLU

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr.Mehmet GÜMÜŞTAŞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
TYL-2022-2581 proje numarası ile desteklenmiştir**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni Nesil Opioidlerin Bağımlılık Tedavisinde Kullanılan Naltrekson ve Metabolitinin Analizi için Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel, ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Ana Bilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Yüksek Lisans Programında
Ceren Hacer BOZMAOĞLU tarafından hazırlanan “Yeni Nesil Opioidlerin
Bağımlılık Tedavisinde Kullanılan Naltrekson ve Metabolitinin Analizi için
Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/2023

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hilal Torul
Gazi Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1. GİRİŞ	1
1.1. Opioidler	2
1.2. Opioidlerin Sınıflandırılması	3
1.3. Endojen Opioid Reseptörleri	4
1.3.1. Mu Opioid Reseptörü (MOR)	6
1.3.2. Kappa Opioid Reseptörü (KOR)	7
1.3.3. Delta Opioid Reseptörü (DOR)	7
1.3.4. Nosiseptin Opioid Reseptörü (NOR)	8
1.4. Opioid Kullanım Bozukluğu	8
1.4.1. Opioid Kullanım Bozukluğu ICD-10 Tanı Kriterleri	9
1.4.2. Opioid Kullanım Bozukluğu DSM-5 Tanı Kriterleri	10
1.4.3. Opioid Kullanım Bozukluğu Güncel Tedavi Yöntemleri	12
1.5. Naltrekson	13
1.5.1. Naltrekson Depo Formları	14
1.5.2. Naltrekson Farmakokinetiği	16
1.5.3. Naltrekson Farmakodinamiği	19
1.5.4. Naltreksonun Bağımlılık Dışı Kullanımı	20
1.5.5. Naltrekson'un Yan Etkileri	20
1.5.6. Naltrekson'un Analitik Tayin Yöntemleri	21
1.5.7. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol ile Yapılmış Literatür Çalışmaları	23
1.5.8. Analitik Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri	26

2. GEREÇ ve YÖNTEM	28
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	28
2.2. Kullanılan Cihazlar	30
2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	31
2.4. Kullanılan Analitik Kolonlar	32
2.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	32
2.6. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol için Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	33
2.7. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları	34
2.7.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması	34
2.7.2. Hareketli Faz pH Denemeleri	34
2.7.3. HPLC Kolon Denemeleri	35
2.7.4. HPLC Kolon Sıcaklık Denemeleri	35
2.7.5. HPLC Hareketli Faz Akış Hızı Denemeleri	36

2.7.6. HPLC Enjeksiyon Hacmi Denemeleri	36
2.8. HPLC Analizi için Yöntem Validasyon Çalışmaları	37
2.8.1. Seçicilik	37
2.8.2. Doğruluk	37
2.8.3. Kesinlik	38
2.8.4. Doğrusallık	38
2.8.5. Çalışma Aralığı	39
2.8.6. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	39
2.8.7. Sağlamlık	40
2.9. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntemi	40
2.10. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu	41
2.10.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi	41
2.10.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Denemeleri	41
2.10.3. Ekstraksiyon pH Denemeleri	41
2.11. Belirlenen En Uygun HPLC Koşulu	42
3. BULGULAR	43
3.1. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları	43
3.1.1. Hareketli Faz Denemeleri	43
3.1.2. Hareketli Faz pH Denemeleri	43
3.1.3. Hareketli Faz Akış Denemeleri	44
3.1.4. HPLC Kolon Denemeleri	46
3.1.5. HPLC Kolon Sıcaklık Denemeleri	46
3.1.6. İç Standart Denemeleri	47
3.2. HPLC için Analitik Yöntem Validasyon Çalışmaları	47
3.2.1. Seçicilik	47
3.2.2. Doğruluk	49
3.2.3. Kesinlik	50
3.2.4. Doğrusallık	51
3.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	53
3.3. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu	53
3.3.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi	53
3.3.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Denemeleri	54
3.3.3. Ekstraksiyon pH Denemeleri	54
3.4. Yöntemin Ekstraksiyon Verimliliği	56
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZET	62
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Bu çalışmada opioid kullanım bozukluğu tanısı almış hastaların tedavisinde kullanılan naltrekson ve ana metaboliti 6-beta-naltreksol için yeni nesil kolonlar kullanılarak hızlı, seçici ve hassas bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin, biyolojik numunelerin analizinde de kullanılabilmesi için geleneksel sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi kolaylaştırılarak ve ekstraksiyon için harcanan zamanının kısaltıldığı bir ekstraksiyon prosedürü sunulan tez kapsamında gösterilmiştir. Literatüre alternatif geliştirilen bu yöntem daha hızlı, hassas göreceli olarak çevreci ve düşük tayin limitlerine ulaşılmasını sağlamıştır. Geliştirilen analiz yönteminin analitik yöntem validasyon testlerinin de gerçekleşmesiyle, uluslararası geçerliliği de gösterilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yol gösterici ve cesaretlendirici tavrıyla tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, öğrenmeye teşvik eden kıymetli hocam Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN'e,

Öğrencisi olduğum için şanslı hissettiğim, eğitimim süresince bilgi ve birikiminin yanında yenilikçi fikirleriyle her zaman bakış açımı değiştiren, her soruna çözümle yaklaşan, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim değerli tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a,

Eğitimime başladığım günden beri bana destek olan, laboratuvar ortamında birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve enerjisiyle tam bir ekip olarak hissettiğim, bilimsel anlamda tüm bilgi ve becerilerini benimle paylaşan sevgili Araş. Gör. Dr. Kenan Can TOK'a,

Her soruyu rahatlıkla sorabildiğim ve aynı laboratuvarda birlikte çalışmaktan keyif aldığım Doç. Dr. Dilek AKYÜZLÜ ve Dr. Öğr. Gör. Selin ÖZKAN-KOTİLOĞLU'na,

Tüm destekleri için Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü çalışanlarına,
Tüm hayatımı borçlu olduğum, eğitim hayatımın ilk hocaları annem ve babama,
Varlığıyla güç aldığım kardeşime,

Son olarak yüksek lisans tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne tüm destekleri için teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

% BSS	Yüzde Bağlı Standart Sapma
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
6BNTX	6-beta-naltreksol
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
ANOVA	Varyans Analizi
APA	Amerikan Psikiyatri Birliği
AUD	Alkol Kullanım Bozukluğu
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
C	Karbon
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
CSID	Chemspider Kimlik Numarası
CYP450	Sitokrom P450 Enzimi
DAD	Diyot Dedektör
dk	Dakika
DOR	Delta Opioid Reseptörü
DSM	Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ESCAPE	Avrupa Şırınga Toplama ve Analiz Proje Teşebbüsü
ESI	Elektro Sprey İyonizasyonu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi Dairesi
FFT	Hızlı Fourier Dönüşümü
FIA	Akış Enjeksiyon Analizi
GABA	γ-Aminobütirik asit
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
Gly	Glisin
GPCRs	G-proteine Bağlı Reseptörler
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICD	Uluslararası Hastalık Sınıflandırılması
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi (International Council for Harmonization)
IM	İntramüsküler
Kg	kilogram
KOR	Kappa Opioid Reseptörü
LAAM	Levasetilmetadol
LC	Sıvı Kromatografi
LDN	Düşük Doz Naltrekson
Leu	Lösün
LLE	Sıvı Sıvı Ekstraksiyon
LOD	Tayin Sınırı
LogP	Ayrılım Katsayısı
LOQ	Teşhis Sınırı
m	Eğim
m	Metre
Met	Metiyonin
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MOR	Mu Opioid Reseptörü
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MS	Kütle Spektrometri
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifloroasetamid
MTBE	Metil tert-bütil Eter
MW	Moleküler Kütle
n	Kesişim
ng	Nanogram
Nm	Nanometre
NOR	Nosiseptin Opioid Reseptörü

NSP	İğne ve Şırınga Programı
NTX	Naltrekson
°C	Derece Santigrat
OST	Opioid İkame Tedavisi
ODU	Opioid Kullanım Bozukluğu
PFC	Pre-frontal Korteks
PFP	Pentaflorofenilpropil
pH	Hidrojen İyon Derişimi
Phe	Fenilalanin
pKa	Asit Ayrışma Sabiti
PLG	Polilaktid Glikolid
POMC	Proopiomelanokortin
QC	Kalite Kontrol
R ²	Belirleme Katsayısı
s	Saniye
SBM-NTX	Deri Altı İmplant Formdaki Naltrekson
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
T _{1/2}	Yarılama Ömrü
TBA	Tribütülin
TEA	Trietilamin
TFA	Trifloroasetik Asit
TSIM	1-(trimetilsilil)-imidazol
Tyr	Tirozin
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
v/v	Hacim/Hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XR-NTX	Uzatılmış Salınımlı Naltrekson
YY	Yüzyıl

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Endojen opioid reseptörleri ve majör peptitlerin kimyasal yapıları	6
Şekil 1.2.	ODT tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizması	12
Şekil 1.3.	Morfin, nalokson ve naltreksonun kimyasal yapıları	13
Şekil 1.4.	Naltreksonun metabolizması	18
Şekil 2.1.	Geri kazanım hesaplama denklemi	38
Şekil 2.2.	Bağıl standart sapma hesaplama denklemi	38
Şekil 2.3.	Teorik olarak teşhis ve tayin sınırı hesaplama denklemi	39
Şekil 2.4.	Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) şematik gösterimi	40
Şekil 3. 1.	Hareketli faz pH denemelerine ait kromatogramlar	44
Şekil 3.2.	Farklı hareketli faz bileşimleri ile yapılan analizlere ait kromatogramlar	45
Şekil 3.3.	Gradyent akış kromatogramlarının karşılaştırılması	45
Şekil 3.4.	Kolon sıcaklık denemelerine ait kromatogramlar	47
Şekil 3.5.	Kör matris ile 80 ng/mL naltrekson ve 6-beta-naltreksol içeren QC kromatogramları karşılaştırılması	48
Şekil 3.6.	Analitik standartların kromatogramları (1 ng/mL)	48
Şekil 3.7.	Kalite kontrol noktalarının kromatogramları	50
Şekil 3.8.	Naltrekson ve 6-beta-naltreksol (1 ng/mL (LOQ)) tekrarlı enjeksiyonlarının kromatogramı	51
Şekil 3.9.	Naltrekson kalibrasyon grafiği	52
Şekil 3. 10.	6-beta-naltreksol kalibrasyon grafiği	52
Şekil 3.11.	Analitik standart ve ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar	54
Şekil 3.12.	Ekstraksiyon ortamını bazik hale getirmek için kullanılan 0,1 M Na ₂ CO ₃ hacim denemeleri sonrası kromatogramların karşılaştırılması	55
Şekil 3.13.	Ekstraksiyon ortamını asidik hale getirmek için kullanılan 0,1 M HClO ₄ hacim denemeleri sonrası kromatogramların karşılaştırılması	55
Şekil 3.14.	Naltreksol için hesaplanan ekstraksiyon verimi grafiği	56
Şekil 3.15.	6-beta-naltreksol için hesaplanan ekstraksiyon verimi grafiği	56

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Opiooidlerin oluşum ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2.	Endojen opiooid reseptörlerinin özellikleri	5
Çizelge 1.3.	Biyolojik örneklerde naltrekson ve 6-beta-naltreksol ile ilgili kromatografik yöntemlerle yapılmış literatür çalışmaları	24
Çizelge 1.4.	Analitik yöntem validasyon parametreleri ve tanımları	26
Çizelge 2.1.	Kullanılan kimyasalların listesi	29
Çizelge 2.2.	Kullanılan cihazların listesi	30
Çizelge 2.3.	Kullanılan sarf malzemelerin listesi	31
Çizelge 2.4.	Kullanılan analitik kolonların listesi	32
Çizelge 2.5.	Analitik standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri	33
Çizelge 2.6.	Standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri	33
Çizelge 2.7.	Kalibrasyon noktalarının hazırlanış şekli	34
Çizelge 2.8.	Hareketli faz pH denemeleri için kullanılan analitik parametreler	35
Çizelge 2.9.	HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri	36
Çizelge 2.10.	Naltrekson ve 6-beta-naltreksol tayini için oluşturulan gradiyent akış oranları	36
Çizelge 2.11.	Valide HPLC-UV analitik yöntem koşulları	42
Çizelge 3.1.	Naltrekson ve 6-beta-naltreksolün sistem uygunluk parametreleri (SUT) sonuçları	49
Çizelge 3.2.	Naltrekson ve 6-beta-naltreksol kesinlik ve doğruluk verileri	50
Çizelge 3.3.	Naltrekson ve 6-beta-naltreksol kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler	53

1. GİRİŞ

Bağımlılık türlerinden hem opioid hem de alkol kullanım bozukluğu dünya çapında temel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Opioid kullanım bozukluğu (OUD) kronik olarak tekrarlayan bir hastalık olmakla birlikte bireyler tipik olarak opioidlere tolerans geliştirir ve bıraktıktan sonra yoksunluk semptomları yaşarlar. OUD'li bireylerin ölüm oranı, genel popülasyondaki ölüm oranlarından 6-20 kat daha fazladır. Naltrekson hem opioid kullanımı hem de alkol bağımlılığı tedavisi için umut verici bir ilaçtır (Sofuoglu ve ark., 2019).

Avrupa Uyuşturucu Raporu'na göre 2022 yılında ölümcül doz aşımalarının % 74'ü opioid içermekteydi. Avrupa genelinde opioid kullanımı diğer uyuşturucu türevlerine göre daha az orana sahip olsa da yasadışı uyuşturucu kullanımında en büyük zarara yola açan maddeler arasında en büyük orana sahiptir. ESCAPE ağı tarafından 2020-2021 yıllarında 8 Avrupa şehriden toplanan 1392 şırınga analizlerde uyarıcı ve opioid karışımı en sık karşılaşılan örnek olmuştur.

Şırıngalarla ilgili bir diğer önemli husus ise bireyler arası aynı enjektörün kullanımı kan yoluyla bulaşan HIV ve viral hepatit gibi enfeksiyonlar için taşıyıcı görevi görmektedir. Örneğin, 2017-2020 yıllarında Polonya, Estonya, Litvanya ve Romanya'da uyuşturucu enjekte eden bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda HIV antikörlerinin %20'den fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 2020 yılında Avrupa Birliği'nde enjeksiyonlar uyuşturucu kullanan bireylere 563 yeni HIV teşhisi ve 128 AIDS tanısı konmuştur (European Monitoring Centre for ve Drug, 2022).

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu Raporu'na göre ise 2020 yılında Türkiye'de 14 ton eroin, 0,8 ton afyon ve 0,03 ton morfin ele geçirilmiştir. Bu tabloya göre opioid kaçakçılığının “Balkan güzergahı” olarak tanımlanan bir rota üzerinden Afganistan'dan İran İslam Cumhuriyeti'ne oradan Türkiye'ye ve ardından Balkan ülkeleri üzerinden Batı ve Orta Avrupa'ya yayılım gösterdiği düşünülmektedir (UNODC, 2021).

Yeni psikoaktif maddelerden olan opioid grubu bileşenlerin kullanımı gittikçe büyüyen bir küresel problemdir. Bu bağımlılığın önüne geçmek için Naltrekson (NTX), son 50 yıldır yaygın olarak kullanılan bir opioid antagonistidir ve opioid agonist ilaçlara göre herhangi öforik bir etki yaratmadığı için tedavi gören hastaların tedaviye uyumluluk oranı düşüktür. Bu nedenle hastaların biyolojik örneklerinde naltrekson ve ana metabolitinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

1.1. Opioidler

Opioidler terim olarak hem doğrudan haşhaş bitkisinden (*Papaver Somniferum*) elde edilen morfin ve kodein gibi afyon alkaloidlerini içeren opiyatlar grubunu hem de sentetik olarak üretilen oksikodon ve hidromorfon gibi pek çok opioid grubunu içeren geniş bir sınıfı kapsamaktadır (Sharma B, 2017).Yüzyıllar boyunca haşhaş bitkisi ağrıyı azaltmak ve psikolojik rahatsızlıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Klinik olarak kullanımı 19 yy. başlarında Friedrich Serturmer'in haşhaş bitkisinden morfini izole etmesinden sonra başlamıştır.

Günümüzde opioidler orta ila şiddetli akut ve kanser ağrısı tedavisinde net klinik değeri olan altın standart analjezik ilaç sınıfıdır. Bununla birlikte kronik kanser dışı ağrı yönetiminde kullanımına ilişkin kanıtlar eksiktir ve uzun süreli kullanım sonucu zarar riski ortaya çıkmaktadır. Buna rağmen, kronik ağrı yönetiminde opioid kullanımı son 30 yılda önemli ölçüde artmıştır. ABD ve Batı Avrupa ülkelerinde kronik ağrı için serbest reçete yazmanın ve postoperatif ortamda uzun etkili opioidlerin reçetesinin kaldırılmamasının bir sonucu olarak bir opioid kriziyle karşı karşıya olduğu düşünülmektedir (Casely ve Laycock, 2022).

Opioid kullanımının ilerlemesi genellikle maddenin biyoyararlanımı ve etkisini en üst düzeye çıkaran oral reçeteli opioidlerden inhale reçeteli opioidlere, inhale eroin kullanımı ve enjeksiyonla eroin kullanımı olmak üzere bir model izler. İnhalasyon, eroini folyoda ısıtıp dumanını solumak ya da toz haline getirilmiş eroini burundan çekmek olarak tanımlanabilir (Sharma B, 2017).

Opioidlere genel olarak bakıldığında klinik olarak ağrı yönetimi ve bağımlılık arasındaki ilişkisi büyük bir ikilemdir. Devam eden opioid krizlerini hafifletmek, ağrı yaşayan hastalarda yeterli rahatlama oluşturmak ve aynı zamanda kötüye kullanımının olumsuz etkilerini azaltmak gibi pek çok durum ile karşı karşıya kalınmaktadır (Higginbotham ve ark., 2022).

1.2. Opioidlerin Sınıflandırılması

Opioidler üç geniş alt başlıkta sınıflandırılabilir; Doğal olarak oluşan afyon alkaloidleri, Yarı sentetik opioidler (Doğal olarak oluşan alkaloidlerin modifikasyonları), Sentetik opioidler. Genel olarak kullanılan opioidlerin isimleri ve sınıflandırılması Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Opioidlerin oluşum ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması (Royal Society of, 2022).

Opioid Sınıfı	Etki Mekanizması	İsmi	CSID*
Doğal	Agonist	Morfin	4450907
Doğal	Agonist	Kodein	5028089
Doğal	Agonist	Tebain	361110
Yarı sentetik	Agonist	Hidrokodeon	4447623
Yarı sentetik	Agonist	Oksimorfon	4447650
Yarı sentetik	Agonist	Diasetilmorfin (Eroin)	4575379
Yarı sentetik	Agonist	Hidromorfon	4447624
Yarı sentetik	Agonist	Oksikodon	4447649
Sentetik	Agonist	Fentanil	3228
Sentetik	Agonist	Piritramid	8967
Sentetik	Agonist	Alfentanil	46451
Sentetik	Agonist	Sufentanil	38043
Sentetik	Agonist	Metadon	3953
Sentetik	Agonist	Meperidin	3918
Sentetik	Agonist & Antagonist	Buprenorfin	559124
Sentetik	Agonist & Antagonist	Tramadol	31105
Sentetik	Agonist & Antagonist	Nalbufin	4470813
Sentetik	Agonist & Antagonist	Pentazosin	390041

Çizelge 1.1. Devamı. Opioidlerin oluşum ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması (Royal Society of, 2022).

Opioid Sınıfı	Etki Mekanizması	İsmi	CSID*
Sentetik	Agonist & Antagonist	Pentazosin	390041
Sentetik	Agonist & Antagonist	Butarfanol	1673514
Sentetik	Antagonist	Naltrekson	4514524
Sentetik	Antagonist	Nalokson	4447644
Sentetik	Antagonist	Nalmefen	4447642

*CSID: Chemspider Kimlik Numarası

Kimyasal yapıları farklı olmasına rağmen hem doğal hem de sentetik opioid formları fizyolojik etkilerini endojen opioid reseptörlerine bağlanarak gösterirler (Casely ve Laycock, 2022).

1.3. Endojen Opioid Reseptörleri

Opioid bağımlılığı, endojen opioid peptitleri (β -endorfin, dinorfin, endomorfin ve enkefalin) ve opioid reseptörlerini kapsayan karmaşık bir nöromodulatör sistem olan endojen opioid sisteminin ele geçirilmesi sonucu ortaya çıkar. Endojen opioid peptitler ve reseptörler merkezi sinir sistemi (CNS) ve periferel dokular boyunca eksprese edilir. Bu geniş dağılımın nedeniyle ortaya çıkan ödül duyarlılığı, ruh hali, stres reaktivitesi, solunum, gastrointestinal, endokrin ve bağışıklık fonksiyonları gibi pek çok fizyolojik tepkilerle ilişkilidir. Tüm endojen opioid peptitleri N terminal ucunda benzer enkefalin dizisini (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu ya da Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) paylaşır ancak C terminal uçları birbirinden farklı uzantılara sahiptir (Pasternak ve Pan, 2013). Bu aminoasit dizilimi endojen opioid reseptörlerine bağlanmaları ve biyoaktiviteleri için oldukça önemlidir.

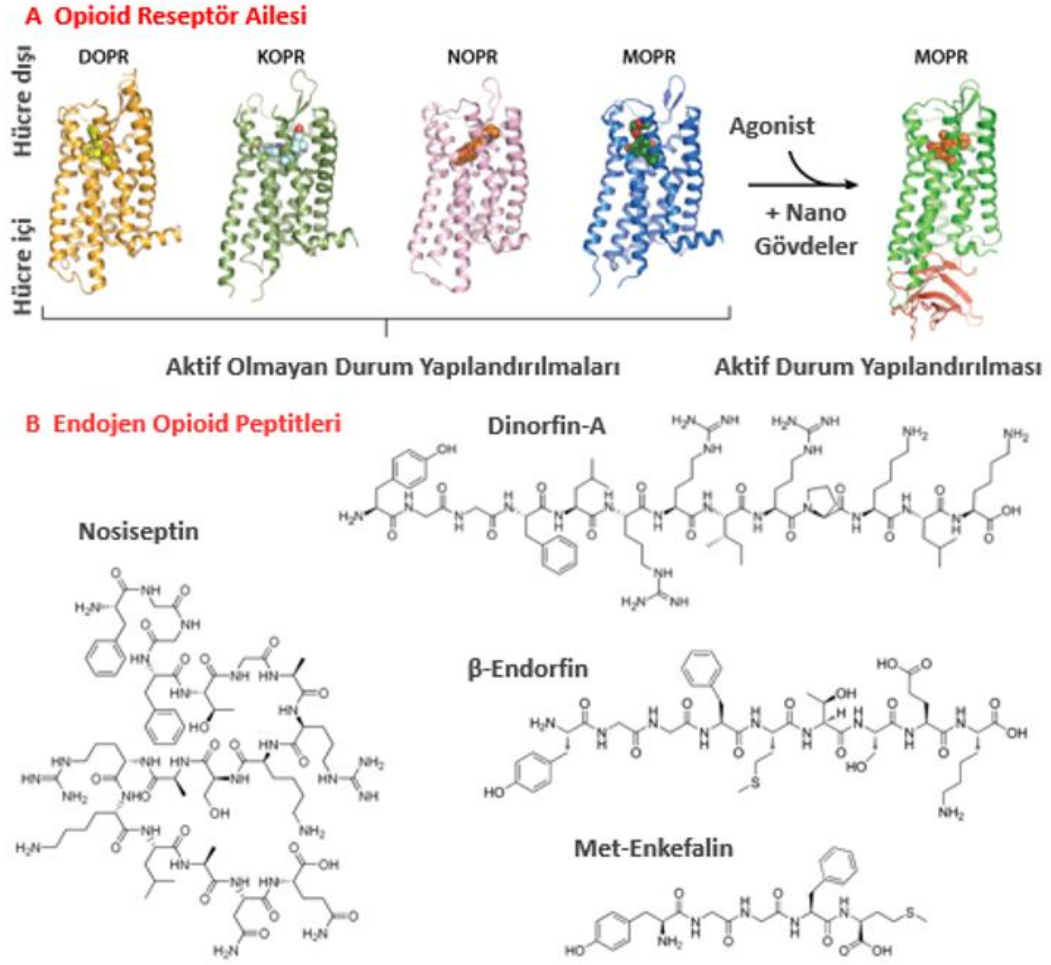
Endojen opioid reseptörleri, opioidleri hedefleyen ve onların etkilerinin ortaya çıkmasına aracılık eden G-proteine bağlı reseptörler (GPCRs) grubundandır. Bu reseptörler ilki 1996 yılında olmak üzere 2000'de ikinci olarak tekrar isimlendirilmişlerdir. OP1 reseptörü MOR, OP2 reseptörü KOR ve OP3 reseptörü ise

DOR olarak bilinmektedir. Nosisseptin peptiti ise 1994’te opioid reseptörü benzeri etkiye sahip olduğunun kanıtlanmasıyla birlikte literatüre nosisseptin opioid reseptörü (NOR) olarak geçmiştir (Toubia ve Khalife, 2019).

Çizelge 1.2. Endojen opioid reseptörlerinin özellikleri (Toubia ve Khalife, 2019).

Opioid Reseptörleri	Endojen Prekürsörleri	Endojen Ligandları	Agonist Etki Sonrası Yaşanan Klinik Etkiler
MOR	POMC ve bilinmeyen prekürsör	β -endorfin, Endomorfın 1 ve Endomorfın 2	Analjezi, solunum depresyonu, sedasyon, bradikardi, bulantı ve kusma ve mide hareketliliğinde azalma
DOR	Proenkefalin	Met-Enkefalin ve Leu-Enkefalin	Spinal ve supraspinal analjezi ve gastrik motilitede azalma
KOR	Prodinorfin	Dinorfin A ve Dinorfin B	Spinal analjezi, diürez ve disfori
NOR	Pre-pronosiseptin	Nosisseptin/Orfanin FQ	Analjezi ve hiperaljezi (konsantrasyona bağlı) ve allodini. Supraspinal intravasküler uygulama pronosisseptif anti analjezik etkiye neden olur (endojen opioidlerin inhibisyonu ile)

Bu reseptörler arasında mu opioid reseptörlerini hedefleyenler en yüksek kötüye kullanım sorumluluğuna sahiptir. Naltrekson eroinden 100 kat daha fazla afiniteye sahip bir mu opioid reseptör antagonistidir (Trigo ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Endojen opioid reseptörleri ve majör peptitlerin kimyasal yapıları.

(a) Dört opioid reseptörünün (DOPR, KOPR, NOPR ve MOPR) inaktif kristal yapıları. Bir opioid agonisti ve nanokorların ilgili reseptörün bağlanma noktası ile birleştiğinde nöral fonksiyon aktive edilir. (b) Dört ana opioid peptitlerinin kimyasal yapıları: met-enkefalin, dinorfin-A, nosiseptin ve β -endorfin. Kısaltmalar: DOPR, delta opioid reseptörü; KOPR, kappa opioid reseptörü; MOPR, mu opioid reseptörü; NOPR, nosiseptin opioid reseptörü (Corder ve ark., 2018)

1.3.1. Mu Opioid Reseptörü (MOR)

Morfinin primer bağlanma bölgesi olduğunun keşfi sonrasında mu opioid reseptörü ismini almıştır. Opioidlerin hem terapötik hem de istenmeyen etkileri mu opioid reseptörüne bağlanması sonucu ortaya çıkar. Alkol, nikotin ve kannabinoidler gibi opioid olmayan uyarıcı/uyuşturucu maddelerin ödül mekanizmalarına da aracılık eder (Cansız ve ark., 2021). MOR delesyonu olan fare deneylerinde morfin kullanımı

sonrası ortaya çıkan ödüllendirici, analjezik ve bağımlılık etkileri ortadan kalkmıştır. MOR'lar merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi boyunca yaygın olarak bulunurlar. Ayrıca neokorteks, hipokampus, striatum, amigdala, talamus, hipotalamus, gri madde, medulla ve pons dahil olmak üzere çeşitli beyin bölgelerinde tespit edilebilir (Zhang ve ark., 2022)

1.3.2. Kappa Opioid Reseptörü (KOR)

MOR'un oluşturduğu ödüllendirici mekanizmaların aksine kappa opioid reseptörü genellikle disfori, anhedoni ve isteksizlik gibi etkilerle ilişkilendirilir. Dinorfinin reseptör üzerindeki aktivitesi ise olumsuz duygu durumu, ağrı, analjezi, stres ve bağımlılıkla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalara göre kemirgen ve insanlarda ağrı oluşumu sonrasında omurilikte dinorfin mRNA ekspresyonu ve peptit üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Omurilikte daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. KOR analjezik etkiye neden olsa bile disforik etkisi sebebiyle halüsinasyonlar ve bozulmuş stresle başa çıkma becerileri gibi pek çok istenmeyen etki oluşturması nedeniyle KOR agonistlerinin terapötik alternatifler olarak klinik kullanımını sınırlar (Higginbotham ve ark., 2022).

1.3.3. Delta Opioid Reseptörü (DOR)

Delta opioid reseptörü (DOR) diğer opioid reseptörlerine kıyasla merkezi sinir sisteminde daha az bir yayılıma sahiptir ve genellikle beyin kortikolimbik alanlarında bulunmaktadır. Anksiyete ve depresyon gibi ruh hali değişiklikleri, solunum depresyonu, konvülsiyon ve hiperaljezi ile ilişkilidir. Solunum ve analjezik etkileri MOR'un ortamdaki varlığına bağlıdır. MOR ile karşılıklı sinerjiye sahiptir ve heterodimerler oluşturabilir. Hem farmakolojik hem de genetik çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda DOR aktivitesi, kötüye kullanılan maddenin ödüllendirici etkisini düzenlediği ve uyuşturucu arama, duygusal tepkiler dahil olmak üzere bağımlılık davranışlarının çeşitli yönlerini etkilediğini göstermektedir. Ancak

doğrudan DOR aktivasyonunun ödül üretip üretmediği, farmakolojik kanıtlara göre belirsizdir. Bu nedenle farmakolojik araştırmalar için rolü oldukça büyüktür (Casely ve Laycock, 2022; Pradhan ve ark., 2011). DOR'lar yapılan in vitro ve deneysel çalışmalarda beynin oksijensiz kalması durumunda (hipoksik ya da iskemik hasar) nöroprotektif bir role sahiptir (Benarroch, 2012).

1.3.4. Nosisseptin Opioid Reseptörü (NOR)

Nosisseptin opioid reseptörü (NOR) merkezi sistem boyunca ve periferel pek çok organda geniş bir yayılım göstermektedir. Orfanin FQ olarak da bilinmektedir. NOR kötüye kullanılan ilaçların (opioid, alkol, nikotin gibi) kullanımı sonrasında maddeye bağılı oluşıan dopamin salınımını bastırdığı ve kötüye kullanılan ilaçların ödüllendirici etkilerini azalttığı için potansiyel bir araştırma alanı olarak görülmektedir (Lambert, 2008).

1.4. Opioid Kullanım Bozukluğu

Opioid bağımlılığı genel olarak bir opioid maddeyi arama ve alma kompulsiyonu, madde alımını sınırlamada kontrol kaybı ve maddeye ulaşamadığı durumlarda olumsuz bir duygu durumu gelişmesi olarak tanımlanabilir. Bu bağımlılık döngüsü üç aşamadan oluşmaktadır: aşırı tüketme/intoksikasyon, yoksunluk/olumsuz duygu durum ve uzaklaştırılamayan düşünce/beklenti. Bu üç aşama, üç ana sinir devresinin aracılık ettiği üç işlevsel alandaki düzensizliği temsil eder. Öncelikle aşırı tüketme/intoksikasyon aşamasında teşvik edici pozitif duygu durumu hakimdir. Bu patolojik alışkanlık işlev bozukluğunu temsil eder ve buna bazal ganglionlar aracılık eder. İkinci olarak yoksunluk/olumsuz duygu durum aşaması, olumsuz duygu durumlarının ortaya çıkmasını temsil eder, maddeye istek negatif olarak artmıştır ve genişletilmiş amigdala bu duruma aracılık eder. Üçüncü aşama olarak uzaklaştırılamayan düşünce/beklenti, prefrontal korteksin (PFC) aracılık ettiği yürütücü işlevdeki işlev bozukluğunu temsil eder. Madde arama isteği kaçınılmazdır.

Kronik olarak maddeye maruz kalma ile üç aşama birbirini besler. Alışkanlıklar yoğun bir hal alır ve nihayetinde bağımlılığa yol açar (Strang ve ark., 2020).

Bireylerin OUD sahip olduğunu belirlemek için Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1993 yılında yürürlüğe giren ve 10. revizyon olan Uluslararası Hastalık Sınıflandırılması (ICD-10) tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bazı değişiklikler ile tamamlanan 11. Revizyon ise Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (ICD-11) 1 Ocak 2022'de yürürlüğe girmiştir.(J. E. Harrison ve ark., 2021) Ülkemizde güncel olarak ICD-10 ve DSM-5 kriterleri kullanılmaktadır (Dilbaz, 2012).

1.4.1. Opioid Kullanım Bozukluğu ICD-10 Tanı Kriterleri

- 1- Opioidleri almak için güçlü bir istek ya da zorunluluk hissi
- 2- Opioid kullanım sürecinde yaşanan başlama, sonlanma veya kullanım düzeyi açısından kontrol etmede yaşanan zorluklar
- 3- Opioid kullanımı kesildiğinde veya azaldığında fizyolojik yoksunluk durumu; karakteristik yoksunluk sendromu ya da yoksunluk semptomlarını hafifletmek veya önlemek amacıyla opioidlerin (veya yakından ilişki maddelerin) kullanımı
- 4- Tolerans gelişiminin kanıtı (başlangıçta istenilen etkiyi yaratması için alınan düşük dozların giderek artması)
- 5- Opioid kullanımı nedeniyle alternatif ilgi alanların ve zevklerin ihmal edilmesi; opiodi elde etmek veya etkilerinden kurtulmak için harcanan zamanın artması
- 6- Ağır madde kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen depresif duygu durumları gibi belirgin zararlı sonuçlara rağmen opiod kullanımına devam etmek ya da ilaca bağlı ortaya çıkan bilişsel işlev bozukluğu (Kullanıcının

kim olduğunu belirlemek için çaba sarf edilmelidir ya da zararın doğasını ve kapsamını anlaması beklenmelidir. (WHO, 2009)

1.4.2. Opioid Kullanım Bozukluğu DSM-5 Tanı Kriterleri

Amerikan Psikiyatri Birliği'nin (APA) Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın beşinci baskısına göre (DSM-5) opioid kullanım bozukluğu, 12 aylık bir süre içerisinde aşağıdaki tanı kriterlerinden en az iki tanesini taşıyan bireylerin klinik açıdan sorunlu bir opioid kullanım şekline sahip olması olarak tanımlanır.

DSM-5 Tanı Kriterleri:

- 1- Opioidleri amaçlanandan daha fazla miktarda ya da daha uzun süreli kullanmak
- 2- Opioid kullanımı azaltmak veya kontrol etmek için uzun süreli çaba ya da başarısız sonuçlar
- 3- Opioidi elde etmek, kullanmak veya etkilerinden kurtulmak için çok fazla zaman harcamak
- 4- Opioidleri kullanmak için güçlü bir dürtü ya da istek, aşırma
- 5- İşte, okulda ve evde önemli rol ve sorumlulukları yerine getirememe ile sonuçlanan yeniden opioid kullanımı
- 6- Opioidlerin neden olduğu ya da arttırdığı tekrarlayan veya kalıcı olan sosyal ya da kişilerarası sorunlara rağmen opioid kullanımına devam edilmesi
- 7- Opioid kullanımı nedeniyle önemli sosyal, mesleki veya eğlenceli etkinliklerden vazgeçilmesi veya azaltılması

8- Fiziksel olarak tehlikeli olduğu durumlarda opioid kullanımına devam edilmesi

9- Opioid kullanımının neden olduğu ya da alevlendirdiği kalıcı ya da tekrarlayan bir fiziksel veya psikolojik problemin olmasına rağmen opioid kullanımına devam edilmesi

10- Tolerans sergilenmesi

Tolerans, iki farklı şekilde tanımlanır:

- I. İstenilen etkiyi hissetmek için belirgin şekilde artan miktarlardaki opioid ihtiyacı veya opioid intoksikasyon
- II. Aynı miktarda kullanılan opioid miktarının giderek azalan etkisi

11- Yoksunluk sergilenmesi

Yoksunluk kriterini sağlaması için iki farklı değerlendirmeye başvurulabilir.

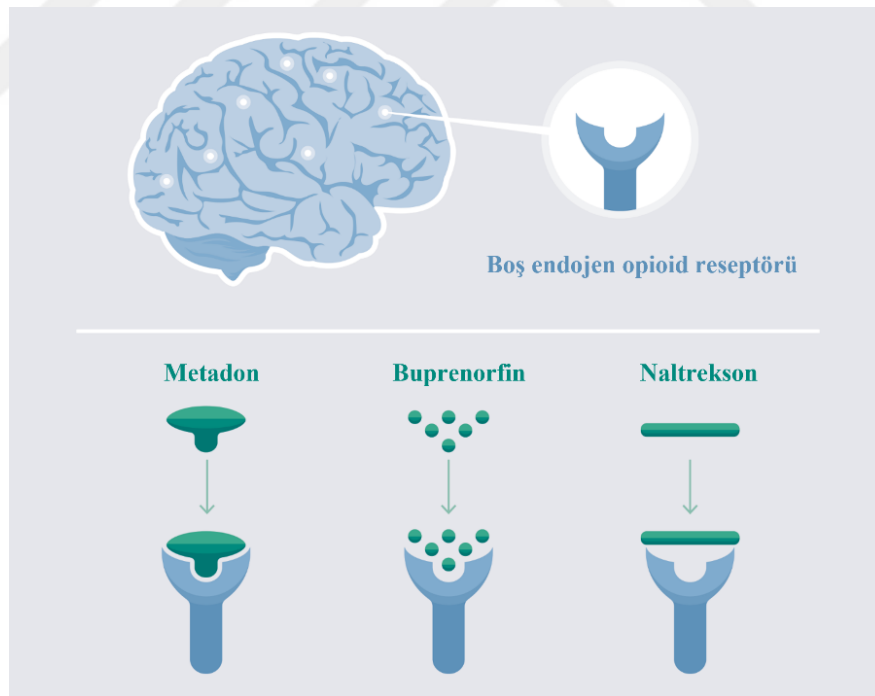
- I. Yüksek miktarda ya da uzun süreli opioid kullanımının kesilmesi ya da azaltılması veya bir opioid kullanımı sonrasında bir opioid antagonisti uygulanması
- II. Tanı ölçütünden sonra gelişen belirtilen semptomlardan üçünü ya da daha fazlasını taşıması; uykusuzluk, mide bulantısı ya da kusma, disforik duygudurum, kas ağrıları, burun ya da gözyaşı akıntısı, göz bebeği genişlemesi, terleme, ishal, esneme sıklığının artması, ateş. (CDC, 2016)

Belirtilen tanı kriterleri doğrultusunda hastalığın derecesi eğer hasta 2-3 semptom gösteriyorsa hafif, 5-6 semptom gösteriyorsa orta ve 6 veya daha fazla semptom gösteriyorsa şiddetli olarak tanımlanmaktadır.

1.4.3. Opioid Kullanım Bozukluğu Güncel Tedavi Yöntemleri

FDA'nın onayladığı opioid kullanım bozukluğunu hedef alan 3 tane tedavi yöntemi vardır; Metadon (oral veya enjekte edilebilir formlar), Tek başına Buprenorfin (dilaltı tabletleri veya Probufin intradermal implant) veya Nalokson ile kombine edilen dilaltı tabletleri, Naltrekson (jenerik tabletler ya da uzun salınımlı enjekte edilebilir formlar).

İlk ikisi opioid agonist tedavisidir. Bu iki tedavi yönteminde kullanılan ilaç grupları uzun etkili opioid grubudur ve uyuşturucuya özlemi yönlendiren fizyolojik istekleri azalttığına inanılmaktadır. Üçüncü olarak ise naltrekson bir antagonist tedavi yöntemidir. Opioid reseptörlerini bloke ederek opioidlerin bağlanmasını engeller. Ayrıca, rekabetçi mekanizmasıyla ödül yolunu da sıfırlayabilir (T. K. Harrison ve ark., 2018).



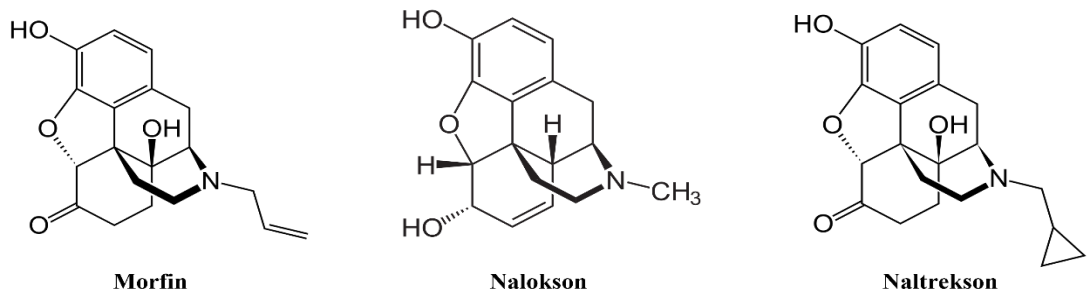
Şekil 1.2. OUD tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizması (Pew Charitable, 2020).

Naltrekson, mu opioid reseptörlerine opioidlerden 100 kat daha fazla tutunur, ancak zevk duygularını üreten beyin süreçlerini desteklemez. Naltrekson bazen hastaları opioid bağımlılığından hızla arındırmak için de kullanılır. Bu durumda, naltrekson, bağımlılık yapan opioid moleküllerini mu opioid reseptörlerinden uzak tutarken, ekstra klonidin kullanımı da yoksunluğun birincil nedeni olan aşırı nöradrenalin çıkışını bastırmaya yardımcı olabilir.

Günümüzde iğne ve şırınga programı (NSP) ve opioid ikame tedavisi (OST) gibi zarar azaltma müdahaleleri, damar içi madde kullanımı sırasında HIV (insan immün yetmezlik virüsü) yayılımının önlenmesinde uluslararası altın standartlardır (Hopwood ve Treloar, 2013). Türkiye’de ise maalesef NSP ve OST zarar azaltma müdahaleleri mevcut değildir. Yalnızca en az bir opioid tedavi programı çalışır durumdadır (Harm Reduction, 2011).

1.5. Naltrekson

Naltrekson, oksimorfondan türetilen yarı sentetik bir opioid antagonistidir. N-metil grubunun metilsiklopropil grubu ile reaksiyonu sonucu oluşur. Naltrekson’un (N-siklopropilmetilnoroksimorfon) kimyasal formülü $C_{20}H_{23}NO_4$ ve moleküler ağırlığı 341.4’tür. Beyaz kristal toz görünümünde olup erime noktası 168-170 °C’dır. LogP’si 1.18 olup suda oldukça çözünür formdadır (PubChem, 2022).



Şekil 1.3. Morfin, nalokson ve naltreksonun kimyasal yapıları.

Kimyasal yapısı nalokson ve morfin ile benzerdir (Şekil 1.3). İlk olarak 1963 yılında morfinin öforik etkilerini engellemek amacıyla sentezlenmiştir ve genellikle hidroklorür formda (MW 377.9 g/mol) bulunur. Naltrekson hidroklorür azot üzerindeki proton ve fenolik proton nedeniyle iki tane pKa noktasına sahiptir. Yapılan çalışmalarda 20°C’de azot üzerindeki proton için (pKa₁) 8.38 fenolik proton için (pKa₂) ise 9.93 değerleri ise 37°C de bulunmuştur (Kaufman Jj, 1975).

Oral formülasyonu opioid kullanım bozukluğu tedavisi için 1984 yılında FDA onayı almıştır. Alkol kullanım bozukluğu (AUD) tedavisi için ise 1994 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Center for Substance Abuse, 2009).

Naltrekson’nun fetüs üzerindeki etkileri bilinmediğinden FDA gebelik kategorisi C olarak kabul edilir (Center for Substance Abuse, 2009).

1.5.1. Naltrekson Depo Formları

Yeterli naltrekson dozu alan bir kişi, bağımlılık yapan opioidlerden herhangi bir zevk almaz ve bunları kullanmak için daha az motive olur. Bu durum hastaların tedaviye kötü uyum sağlamasına neden olabilir. Ne yazık ki, ilaç uyumu naltrekson kullanımında kritik bir sorundur çünkü metadon veya LAAM’den farklı olarak, naltrekson zevkli duygular üretmez. Hastaların tedaviye başlamadan önce opioidlerden mutlaka arındırılması gerekir; aksi takdirde bağımlılık ciddi bir şekilde artan kullanım miktarı ile devam edebilir (Kosten ve George, 2002).

Oral olarak her gün alınması gerektiğinden de tedavinin güvenliği açısından önerilen yöntemler arasında depo formülasyon türleri vardır. Naltreksonun biyoyararlanımını ve etkinliğini artırmak için, iki uzun etkili depo formülasyonu geliştirilmiştir: Uzatılmış salınımlı kas içi enjeksiyon (XR-NTX), Deri altı implant (SBM NTX).

XR-NTX, naltreksonun bir mikro küre formülasyonudur. Bu formülasyon polilaktid ve polilaktid glikolid (PLG) polimerleri denenerek doğal olarak oluşan laktik asit ve glikolik asit ile oluşturulmuştur. PLG formu FDA tarafından onay almıştır. Ayda bir kez intramüsküler (IM) gluteal enjeksiyon ile uygulanır (Center for Substance Abuse, 2009). Yaklaşık 1 ay boyunca sabit naltrekson konsantrasyonları ile opioid blokajı sağlar (Samhsa, 2021).

XR-NTX kullanımının oral kullanıma göre plasebo etkilerinin ve opioid kullanım isteklerini azalttığı ve tedavinin kalıcılığını arttırdığı belirlenmiştir. Ancak diğer opioid tedavilerine kıyasla hiçbir kanıt en iyi şekilde tedavinin uzatılmış salınlı naltrekson ile sağlandığını söyleyemez. Örneğin. 2018 yılında 34 uzatılmış salınlı NTX araştırmalarının sistematik incelenmesine göre indüksiyon başarısının düşük olduğu belirlenmiştir ve aşırı doz ve ölüm riski üzerinde önemli bir etkisi bulunamamıştır. Bunun nedeni, gözleme dayalı yapılan bu çalışmalarda genellikle bu tedaviyi kullanan az sayıda insan bulunması olabilir (Buresh ve ark., 2021). Ayrıca Rusya’da yürütülen XR-NTX ve plasebo çalışmasında incelenen 25 değişken arasında demografik özellikler, işlevsellik düzeyi, aşırma ve HIV antikorlarının incelenmesi dâhil olmak üzere plasebo üzerindeki XR-NTX başarısının hiçbir temel belirleyicisi bulunamamıştır (Samhsa, 2021).

SBM NTX, implantasyondan sonra, naltreksonun kinetik plazma konsantrasyon profili, bir başlangıç piki ile karakterizedir. Plazmada 10-12 haftadan daha uzun bir süre boyunca ölçülebilir seviyededir, sonrasında sonra yavaş yavaş düşmeye başlar (NIH, 2018). SBM NTX henüz FDA onayı almamasına rağmen Avrupa ve Avustralya’da umut verici sonuçlar göstermiştir ancak implantların güvenliğini ve etkinliğini incelemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Edinoff ve ark., 2022).

1.5.2. Naltrekson Farmakokinetiği

İlaçların büyük bir bölümünün biyotransformasyonu ardışık olarak meydana gelen Faz I ve Faz II reaksiyonlarından oluşur. Faz I süreci lipofilik formdaki yapılara oksidasyon, indirgeme ve hidroliz gibi reaksiyonlar sonucu molekül üzerinde reaktif bir grubun (hidroksil grubu gibi) oluşmasıyla sonuçlanır. Fonksiyonel grubun oluşması moleküle işlevsellik kazandırır. Faz II reaksiyonlarında ise molekülün kolayca vücuttan atılması için gerekli konjugasyon ve eliminasyon reaksiyonları gerçekleşir. Bu durumda ilgili ilaç suda daha kolay çözünebilen bir forma dönüşerek böbreklerden kolayca atılmaktadır (Liska, 1998). Naltrekson gibi ksenobiyotik ketonların metabolizması pek çok dokularda meydana gelebilir ancak metabolik aktivite memelilerde öncelikli olarak karaciğer ve böbrek sitozolünde meydana gelir.

1.5.2.1. Absorbsiyon

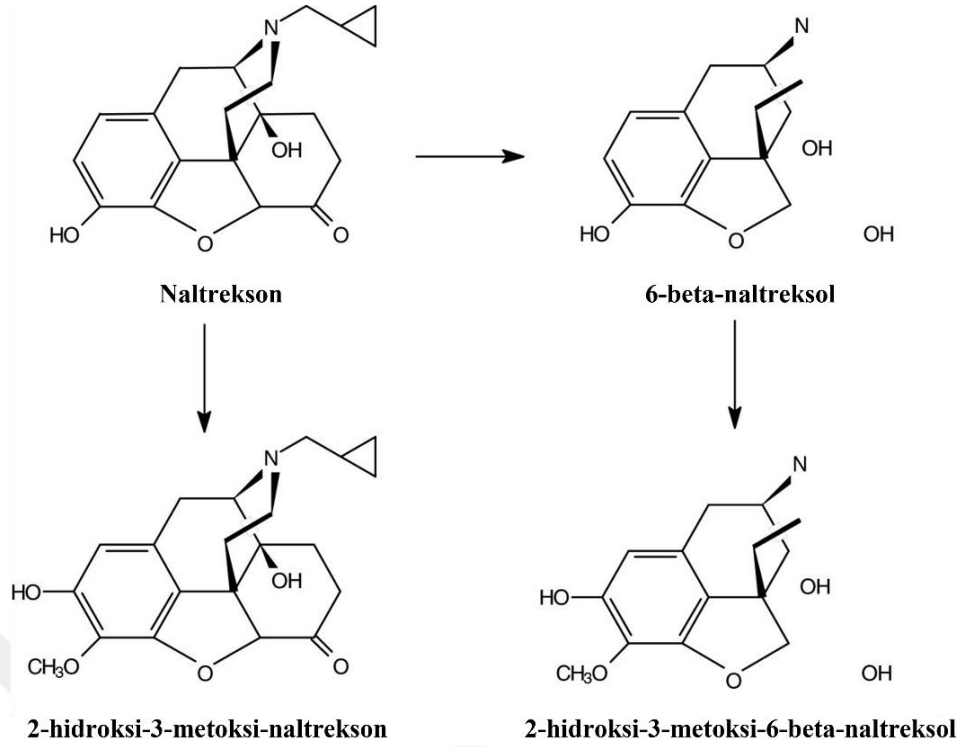
Naltrekson oral kullanımı takiben hızlıca ve neredeyse tamamen (%96) emilir. Karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve sadece %5'i sistemik dolaşıma katılır (Quinn ve ark., 1997). Yaklaşık 1-2 saat içerisinde maksimum konsantrasyona ulaşır. Ana metaboliti olan 6- β -naltreksol, uzun biyoyararlanımı sayesinde naltreksonun gösterdiği etkinin devamlılığını sağlar ve plazmada naltreksona oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Oral kullanımı takiben naltrekson ve 6- β -naltreksolün ortalama yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) sırasıyla 4 ve 13 saattir. Naltreksonun depo formülasyonu olan uzatılmış salımlı kas içi enjeksiyon sonrası mikrokürelerden naltrekson hızla salınır ve uygulamadan 1-2 saat sonra plazma konsantrasyonlarında ilk zirveye neden olur. Mikrokürelerdeki salınımın devam etmesiyle birlikte yaklaşık 2 gün sonra ikinci ve daha yüksek bir tepe noktasına ulaşır. Plazma seviyelerinde 35 günden daha uzun süre naltrekson ve ana metabolitinin konsantrasyonları ölçülebilir ve daha sonrasında kademeli olarak azalır (Mooney ve Saxon, 2018; Samhsa, 2021).

1.5.2.2. Dağılım

Naltreksonun uzatılmış salınımlı kas için enjeksiyon uygulamasını takiben dağılım hacminin 1350 litre olduğu tahmin edilmektedir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %21'dir. Tek başına oral olarak kullanıldığında NTX plazma seviyeleri 5. gün $13,4 \pm 14,4$ ng/mL, 6. gün $14,4 \pm 4,2$ ng/mL ve 7. gün $14,3 \pm 3,5$ ng/mL olarak bulunmuştur (Mason vd., 2002). Oral naltrekson tedavisi gören 135 hastanın plazmaları HPLC/UV ve LC-MS/MS ile analiz edildiğinde sırasıyla plazma naltrekson seviyeleri 13 ± 20 ng/ml ve 14 ± 20 ng/ml ve 6-beta-naltreksol seviyeleri 58 ± 33 ve 57 ± 32 ng/ml bulunmuştur (Brünen ve ark., 2010).

1.5.2.3. Metabolizma

İnsanda naltrekson metabolizmasının ana yolu C-6 karbonil grubunun indirgenmesidir. İndirgenme meydana geldiğinde molekülün farmakolojik aktivitesi önemli ölçüde etkilenmezken yapısında meydana gelen fizikokimyasal değişiklikler hidrofobiklik üzerinde etkiler yaratır. Bunun sonucu olarak molekülün doku ve hücre içi dağılımı, zar geçirgenliği ve proteine bağlanma oranında farklılıklar meydana gelir ve molekülün farmakolojik dağılımı etkilenir. Yapılan çalışmalarda naltreksonu metabolize eden DD1 (AKR1C1), DD2 (AKR1C2) ve DD4 (AKR1C4) redüktaz izoformları karakterize edilmiştir. DD4'ün (AKR1C4) en fazla sitozolik etkinliğe sahip olduğunu bulunmuştur (Alshogran ve Zayed, 2019; Breyer-Pfaff ve Nill, 2010).



Şekil 1.4. Naltreksonun metabolizması (Heinälä ve ark., 2012).

Karaciğerde yüksek ölçüde dihidrodiol dehidrojenaz enzimi (DD4) yardımıyla ana metaboliti olan 6-beta-naltreksol'e ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimi tarafından minör metaboliti 2-hidroksi-3-metoksi-6-beta-naltreksol'e hidroksillenir. (Porter ve ark., 2000) Naltrekson, CYP450 enzimleriyle metabolize edilmediği için diğer ilaçların metabolizmasını etkilemez.

1.5.2.4. Eliminasyon

Naltrekson gibi karbonil grup içeren bileşikler genellikle hidrofobik olduğundan ve dokularda tutunabildiğinden vücuttan uzaklaştırılması kritik öneme sahiptir. Naltreksonun öncelikli eliminasyon yolu renaldır. Plazma eliminasyon yarı ömrü naltrekson ve ana metabolitinin sırasıyla 16 ± 8 ve 25 ± 14 saattir (Porter, 2010). Yaklaşık %60'ı 48 saat içinde glukuronidize 6-beta-naltreksol ve naltrekson olarak idrarla atılmaktadır (EMC, 2016). Minör olarak fekal yolla atılım da gerçekleşmektedir (Mooney ve Saxon, 2018). Naltreksonun farmakokinetik profili

enterohepatik geri dönüşümle tekrar metabolizmaya geri dönebileceğini düşündürmektedir.

Naltreksonun depo formülasyonu olan uzatılmış salımlı kas içi enjeksiyonunun eliminasyon yarı ömrü 5-10 gündür. Tedavi süresince diğer aylarda tekrarlanan uygulamalar, naltrekson veya metabolitlerinin dokularda birikmesine neden olmaz (Samhsa, 2021).

1.5.3. Naltrekson Farmakodinamiği

Yapılan hayvan denemelerinde naltrekson fareler üzerinde herhangi bir analjezik etkiye neden olmazken sıçanların kıvrınma testlerinde sınırlı ya da ihmal edilebilir opioid agonist etkiler üretmiştir. Morfine bağımlı Rhesus maymunlarında 0,05 mg/kg naltreksonun intravenöz uygulama sonrasında güçlü bir şekilde opioid yoksunluğu nalorfenden en az 12 kat ve naloksondan 2,5 kat daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir. Yoksunluk belirtileri şiddetli huysuzluk, saldırganlık, hiper-refleksi ve somatik yoksunluk belirtileri ile karakterize edilmiştir.

İnsanlar üzerinde de naltrekson uygulamasını takiben disfori ve göz bebeğinde küçülme gibi agonist etkilere dair izole raporlar mevcuttur. Bağımlılık sonrasında gönüllülere 100 mg oral naltrekson tedavisi sonucunda intravenöz eroін kullanımının yarattığı öfori dâhil olmak üzere öznel ya da nesnel tepkilerin % 90'nını bloke etmiştir ve en az 72 saat boyunca antagonizma sürdüğü tespit edilmiştir (Gonzalez ve Brogden, 1988).

Naltreksonun antagonizmi merkezi ve periferik sistemde bulunan bu reseptörlere sterospesifik rekabet yoluyla gerçekleşir. Rekabetçi bir şekilde bağlandıktan sonra Mu-opioid reseptör agonistlerinin (hidromorfon gibi) subjektif, güçlendirici ve fizyolojik etkilerini etkili bir şekilde bloke eder. Ayrıca eksojen olarak alınan opioidlere erişimi engeller (Farid ve ark., 2008). Bu durumda etki mekanizması olarak orta beyin dopaminerjik nöronlarının GABAerjik inhibisyonunu azalttığı, böylece

striatolimbik devre üzerinde etkili olan maddelerin subjektif uyarıcı etkilerini ve bu maddelere yönelik özlemi azalttığı ileri sürülmektedir (Lim ve ark., 2021).

1.5.4. Naltreksonun Bağımlılık Dışı Kullanımı

Naltrekson, dopamin ve norepinefrin için presinaptik taşıyıcıları bloke eden ve monoamin geri alımı inhibitörü olan bupropion ile uygulandığında özellikle iştah kesme ve kilo kaybı üzerinde etkilidir. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanan Mysimba, düşük kalorili bir diyet ve fiziksel aktiviteye ek olarak obeziteye karşı tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Sadece reçete ile temin edilebilecek bu ilaç, vücut kitle endeksi (BMI) 27-30 veya $>30 \text{ kg/m}^2$ olan yetişkinler için önerilmektedir. (EMA, 2014) Bu sinerjik uygulama, obeziteye karşı bir kullanılabilecek olması nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır. Bir yandan da disülfiram benzeri bir reaksiyona neden olmadığı için sigarayı bırakma alternatifi oluşturmaktadır (Kossoski ve ark., 2013).

Farklı kullanım dozları ve süreleri göz önünde bulundurulduğunda otizmlı çocuklarda naltrekson kullanımı, otizmin yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır (Elchaar ve ark., 2006). Kendine zarar verme ve hiperaktivite davranışı görülen çocuklarda ağrı duyarlılığının azaldığı ve yüksek BOS endorfin konsantrasyonlarına sahip olduğu bilinmektedir (Anderson ve Coté, 2019). Otizmlı çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre 4 hafta boyunca günlük 1mg/kg naltrekson dozu ile tedavi edilmiştir ve araştırmanın sonucunda çocuklarda hiperaktivite ve irritabilitede azalma belirlenmiştir (Willemsen-Swinkels ve ark., 1996).

1.5.5. Naltrekson'un Yan Etkileri

Naltrekson'un yan etkilerini gözlemlemeden önce hastalarda var olan son opioid kullanım zamanı, opioidin kesilmesine ilişkin semptomları, HIV, Hepatit B virüs ve Hepatit C virüs enfeksiyonları açısından değerlendirilmelidir. Naltrekson kullanımındaki yan etkiler tedavinin dozuna ya da uygulama şekline göre değişiklik

gösterir. Oral olarak 50-100 mg Naltrekson tedavisi gören hastalarda yaygın yan etkiler olarak gastrointestinal sorunlar (karın krampları, karın ağrısı, mide bulantısı), kas iskelet sistemi rahatsızlıkları (atraljiler ve miyaljiler), nörolojik rahatsızlıklar (uykuda güçlük, baş ağrısı ve enerji eksikliği) ve bazı psikolojik rahatsızlıklar (anksiyete ve sinirlilik) yer alır. Alkolizm tedavisi gören hastalarda ise hepatoksisite gözlemlenmiştir (Lee ve Elston, 2019). Buna karşılık düşük doz Naltrekson (LDN) tedavisinde ciddi yan etkilere dair çok az kanıt vardır. Genellikle bildirilen yan etkiler canlı rüyalar, kâbuslar ve baş ağrısıdır. LDN'nin belirli ticari bir formülasyonu olmadığı için yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılan miktar 4.5 mg'dır. İlaç genellikle yatmadan 1 saat önce verilir. Yapılan bir çalışmada hastaların $\leq$ %37'sinde yan etki olarak canlı rüyalar bildirilmiş ancak zamanla azalmıştır. Canlı rüyaların plasebo grubunda görülen en yaygın yan etki olduğu belirtilmelidir. Bu gibi şikayetleri olan hastalarda sabah dozuna geçilir ve diğer yan etkiler bildiren hastalarda kullanılan doz 3.0 mg'a indirilir. Bu düşürülen dozaj kullanımı sonrası semptomları iyileştigiğine dair kanıtlar vardır (Younger ve ark., 2014).

1.5.6. Naltrekson'un Analitik Tayin Yöntemleri

Literatür çalışmalarında NTX ve ana metabolitinin analizi için çeşitli analitik yöntemler mevcuttur. Bu çalışmalarda insan ve hayvan plazması (Clavijo ve ark., 2008; Slawson ve ark., 2007), anne sütü (Chan ve ark., 2001), serum (Heinälä ve ark., 2012), tükürük (Verebey, 1981) ve idrar (Abdel-Gawad ve El-Gamal, 2018) gibi biyolojik numune analizlerinin dışında hidrojel (Alvarez-Rivera ve ark., 2019) ve mikropartikül taşıyıcı (Hua ve ark., 2021; Sharifi ve ark., 2020) ile terapötik ilaç izlenmesi için yöntemler geliştirilmiştir.

1.5.6.1. Sıvı Kromatografisi

Sıvı Kromatografi (LC) için UV ve Floresans dedektörlerin yanı sıra MS ve MS/MS dedektörleri de tercih edilmektedir. LC-MS ve LC-MS/MS için kullanılan

ekstraksiyon yöntemleri arasında sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), on-line ekstraksiyon (Brünen ve ark., 2010) ve enzimatik yöntemler (Liu ve ark., 2014) yer almaktadır. Bu yöntemler sonucu tayin edilirken iyonlaştırıcı kaynaklar da kullanılabilir. Bunlar arasında elektro sprey iyonizasyonu (ESI) vardır. Naltrekson ve metabolitinin analizlerinde yüksek voltaj uygulanıp aerosol oluşturarak elektron spreyi yardımıyla iyon oluşturma prensibine dayanan ve bu yöntemle yapılan pek çok analiz mevcuttur (Valiveti ve ark., 2004). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri öncesinde örnekler için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri LLE, katı faz ekstraksiyon (SPE) ve online ekstraksiyon olmak üzere farklı şekillerde yapılabilmektedir. Ekstrakte edilen örnekler, HPLC analizlerindeki hareketli faz akışlarında izokratik veya gradiyent olarak değişiklik yapılarak düşük tayin sınırlarına ulaşmak mümkündür. Ayrıca analiz süresi hazırlanacak hareketli fazın akışına ve kolon sıcaklığına göre azalmaktadır. Tayin yöntemleri arasında çeşitli dalga boylarında uygun koşullarda NTX ve ana metabolitinin analizlerini yapmak mümkündür.

1.5.6.2. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC) için yaygın olarak kullanılan dedektör kütle spektroskopisidir (MS). Hareketli faz olarak kullanılan gaz inert olmalıdır. Bunlar arasında azot, helyum ve hidrojen gibi gazlar bulunmaktadır. MS yardımıyla NTX molekülünün iyonlarına ayrıştırılması sonucu kütle tayini yapılmaktadır. GC-MS’de düşük örnek hacmi ile düşük tayin limitlerine hızlıca ulaşılabilir ancak analizi yapılan örnek uçucu olmalıdır. Bu nedenle ekstraksiyon için de organik çözücüler kullanılmaktadır. Numune uçucu değilse derivatizasyon (türevleme) işlemlerine tabi tutulur. NTX molekülü için kullanılan türevleme ajanları arasında asetik anhidrit (Chan ve ark., 2001), MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifloroasetamid) ve TSIM (1-(trimetilsilil)-imidazol) vardır (Toennes ve ark., 2004). Ancak türevleme basamağı çok fazla numunenin analizinin eş zamanlı yapılacağı durumlarda hiç etkili olmamakla birlikte büyük bir zaman kaybına sebep olmaktadır.

1.5.6.3. Diğer Analitik Yöntemler

Voltametrik teknikler sulu örneklerde organik ve inorganik bileşenlerin belirlenmesinde hızlı ve ekonomik olmasından dolayı tercih sebebidir. NTX ve ana metaboliti için kullanılan voltametrik teknikler arasında akış enjeksiyon analizi (FIA) ve hızlı fourier dönüşümlü (FFT) döngüsel voltametriler yer alır (Norouzi ve ark., 2007).

UV-Görünür (UV-Vis) Spektrofotometre kolay ve çevre dostu olması nedeniyle farmakolojik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Naltrekson ve ana metaboliti için obezite ve bağımlılık önleyici etkilerinden yola çıkılarak UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 279 ve 281 nm dalga boylarında ölçümler rapor edilmiştir. 281 nm bu teknik için optimum dalga boyu seçilmiştir (Kossoski ve ark., 2013).

1.5.7. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol ile Yapılmış Literatür Çalışmaları

Biyolojik örneklerde naltrekson ve 6-beta-naltreksolün kromatografik yöntemler kullanılarak yapılan literatür çalışmalarından bazıları Çizelge 1.3'te listelenmiştir.

Çizelge 1.3. Biyolojik örneklerde naltrekson ve 6-beta-naltrekson ile ilgili kromatografik yöntemlerle yapılmış literatür çalışmaları.

Örnek	Ekstraksiyon Yöntemi	Hareketli Faz	Kolon	LOD	LOQ	Cihaz	Kaynak
Serum	LLE	Asetonitril: (19 mM) Potasyum dihidrojenfosfat 10:45 (v/v) ile 1-oktan sülfonik asit (5 mM) ve tetraetilamonyum hidrojen sülfat (5 mM)	Hewlett Packard ODS Hypersil RP (125 mm x 4 mm id., 5 µm)	-	NTX: 5 6βNTX:1	HPLC	(Heinälä ve ark., 2012)
Guinea pig plazma	LLE	35:65 (v/v) Asetonitril: 2mM Amonyum Asetat	Waters Symmetry®C18 (150 mm, x 2,1 mm id., 5 µm)	-	0,75	LC-MS ve ESI	(Valiveti ve ark., 2004)
Keçi Plazması	LLE	30:70 (v/v) Asetonitril / 10 mM Amonyum Asetat ve 0,1 mM Sitrat (pH: 4,4)	Zirchrom PBD (50 mm x 2,1 mm id., 3 µm)	-	0,21	LC-MS	(Hunter ve ark., 2003)
İdrar	-	0,175 M sodyum dodesil sülfat (SDS), % 0,3 trietanolamin (TEA) ve 0,02 M orto (o) - fosforik asit içinde % 12 n-propanol karışımı	RP-18 LiChrosorb (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	0,1	0,303	HPLC	(Abdel-Gawad ve El-Gamal, 2018)
Köpek ve İnsan plazması	On-line Ekstraksiyon	20:80 (v/v) Metanol (% 0,1 asetik asit içeren) - 2 mmol/L amonyum asetat içinde % 0,1 asetik asit	Agilent C18 Zorbax XDB (12.5mm x 4,6 mm id., 5 µm)	-	0,005	LC-MS/MS	(Clavijo ve ark., 2008)
Plazma	SPE ve LLE	% 0,06 TEA (pH 2.8) - Asetonitril 92:8 (v/v)	Waters Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)		<8	HPLC	(Kambia ve ark., 2000)
Plazma	LLE	20:80 (v/v) 0,1 formik asit su içeren: 0,1 formik asit (metanol içeren)	Inert Sustain C18 (50 mm x 2,1 mm id., 5 µm)		NTX: 0,50 6βNTX: 10	LC-MS/MS	(Alshogran ve Zayed, 2019)
Plazma	SPE	85:15 (v/v) 0,01 M Potasyum Fosfat (pH:3,00) - Asetonitril	Supercosil LC 18 (150 ya da 250 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	5	-	HPLC	(Zuccaro ve ark., 1991)
Plazma	SPE	-	Chrompack CP-Sil5 CB lowbleed/MS (30 m x 0,25 mm id., 0,25 µm)	0,1		GC-MS	(Toennes ve ark., 2004)

Çizelge 1.3. Devamı. Biyolojik örneklerde naltrekson ve 6-beta-naltreksol ile ilgili kromatografik yöntemlerle yapılmış literatür çalışmaları.

Örnek	Ekstraksiyon Yöntemi	Hareketli Faz	Kolon İsmi	LOD	LOQ	Cihaz	Kaynak
Tavşan Plazması	LLE	-	FactorFour, VF-5 ms, (30 m × 0,025 mm id., 0,25 µm)	0,2		GC-MS	(Rezaei ve ark., 2009)
İdrar	Enzimatik	98:2 (v/v) % 5 mM Amonyum format (% 10 metanol içeren): metanol	Phenomenex Fenil Hekzil kolon (50 mm x 4,6 mm id., 2,6 µm)	5	100	LC-MS/MS	(Erin C. Strickland, 2016)
İdrar	Enzimatik	% 0,1 formik asit (su içeren), % 0,1 formik asit (asetonitril içeren)	Zorbax SB-C18 (50 mm x 2,1 mm id., 1,8 µm)	-	10	LC-MS ve ESI	(Liu ve ark., 2014)
Plazma	LLE	35:65 (v/v) 10 mM fosfat tamponu (pH 6,6)-Metanol	Zorbax® C18 (150 mm × 4,6 mm id., 5µm)		0,5	LC-MS/MS	(Andhariya ve ark., 2017)
Plazma	On-line Ekstraksiyon	Asetik asit ile pH 6 olacak şekilde ayarlanmış deiyonize su içinde % 11,5 (v / v) asetonitril ve % 0,4 (v/v) N, N, N-tetrametiletilendiamin	ODS Hypersil C18 (150 mm × 3,0 mm id., 3µm)	1,2	2	HPLC	(Brünen ve ark., 2010)
Plazma	On-line Ekstraksiyon	% 0,1 (v / v) formik asit (su içeren) ve % 0,1 (v / v) formik asit (metanol içeren)	MZ-Aqua Perfect C18 (150 mm x 2,1 mm id., 5µm)	0,2	0,5	LC-MS/MS	(Brünen ve ark., 2010)

1.5.8. Analitik Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri

Analitik yöntem geçerlilik testleri (validasyon), analitik yöntemlerin oluşturulmasında ve bir laboratuvarında güvenilir analitik veriler elde edilmesi için yapılması gereken çok sayıda değerlendirme parametrelerinden oluşmaktadır. İstenilen çalışma koşullarında ve çalışması hedeflenen örnekler için doğru ve kesin analitik veriler elde edilmesi için yöntem validasyon testleri kilit bir unsurdur (Segneanu ve ark., 2013). Yöntem validasyon parametrelerinin isimleri ve tanımları Çizelge 1.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 1.4. Analitik yöntem validasyon parametreleri ve tanımları (Segneanu ve ark., 2013).

Validasyon Parametreleri	Tanımları
Seçicilik/Özgüllük	Numune matrisinde bulunması beklenebilen girişim oluşturabilecek maddelerin varlığında hedef analiti doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğidir.
Doğruluk	Yöntem tarafından bulunan test sonuçlarının gerçek değerle uyuma derecesidir.
Kesinlik	Yöntemin aynı numuneye uygulandığında elde edilen yanıtın tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür.
Doğrusallık	Belirli bir aralıktaki analitlerin konsantrasyonu ile elde edilen sinyallerin doğru orantılı şekilde grafiksel olarak değerlendirilmesidir.
Çalışma Aralığı	Analitik bir yöntemin aralığı, kesinlik, doğruluk ve doğrusallıkla belirlendiği gösterilen üst ve alt seviyeler arasındaki aralıktır.
Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	LOD terimi, cihazın tespit edebildiği ancak ölçemediği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. LOQ terimi, cihazın tespit edip ölçebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır.
Sağlamlık	Numune çözeltilerinin hazırlanması sırasında pH gibi sıcaklık gibi etmenler, numune saklanma koşulları, aynı numunenin farklı laboratuvarlar, analistler ve farklı cihazlar gibi çeşitli pek çok farklı koşullarda yapılan analizlerin tekrar elde edilebilmesi olarak tanımlanabilir.

Bu tez kapsamında yapılacak olan çalışmalarda naltrekson ve 6-beta-naltreksol analizleri için dşşşk maliyetli, hassas ve dşşşk tayin limitlerine ulaşabilmek adına yeni bir analiz yşntemi geliştirilecektir. Naltrekson ve ana metaboliti olan 6-beta-naltreksolün plazmadan miktar tayini için şrnek hazırlama sresinin kısaltılarak ekstraksiyondaki řn hazırlık aşamalarının kolaylaştırılması, maddelerin kromatografik olarak incelenmesi ve valide bir yşntem geliştirilmesi, geliştirilen yşntemin literatüre alternatif getirecek daha hızlı hassas ve dşşşk dedeksiyon limitlerine ulaşılmasının sağlanması hedeflenmektedir. Araştırma sonuçlarına dayanarak rutin analizlerde kullanılan naltrekson yşntemlerine alternatif yeni modifikasyonlar şnerilecektir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

HPLC’de kullanılmak üzere % 0,1 orto-fosforik asit ile metanol ya da asetonitril hareketli faz bileşenleri hazırlanmıştır. pH optimizasyonu sulu faz üzerinde asidik pH için orto-fosforik asit ile bazik pH için 1 M NaOH kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ters faz kromatografik yöntemlerde iyon oluşturabilen analitlerin kolondan ayrımına yardımcı olması sebebiyle hareketli faz denemelerinde % 0,1 Trietilamin, % 0,1 Tribütilamin ve % 0,1 Trifloroasetik asit ve 5 mM Heptan sülfonik asit sodyum tuzu gibi iyon çifti oluşturan ajanlar kullanılmış ve analize etkisi incelenmiştir.

Naltrekson ve 6-beta-naltreksol referans standartları kullanılarak ana stoklar 1 mg/mL konsantrasyonda metanol içerisinde hazırlanmıştır. İç standart denemeleri için Rasajilin, Favipiravir, Klonazepam, Klomipiramin, Klozapin, Piroksikam, Meloksikam, Lornoksikam, Ketoprofen, Flutikazon Propiyonat, Sefpodoksim, Sinakalset, Amlodipin, Desloratadin ve Ketokonazol gibi maddeler temin edilip metanol içerisinde 1 mg/mL ana stokları hazırlanmıştır. Kromatografik denemeler için referans standartlar ana stoklardan Çizelge 2.5’teki iç standartlar ise Çizelge 2.6’daki gibi hazırlanarak ara stok stoklar üzerinden yapılmıştır. Tüm stok çözeltiler -20°C’de karanlıkta saklanmıştır.

Ticari plazma ve idrardan sıvı sıvı ekstraksiyon çalışması için 0,1 M Na₂CO₃ , metil tert bütül eter (MTBE), Diklorometan, Bütilasetat ve 0,1 M HClO₄ kullanılmıştır. Ticari plazma -20°C’de karanlıkta saklanmıştır.

Kullanılan tüm kimyasalların listesi Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal İsmi	Markası
Asetonitril (HPLC Kalite)	Merck
Metanol (Kromatografik Kalite)	Isolab
% 60 Perklorik Asit (HClO ₄)	Agilent 1100
% 80 Orto-fosforik Asit	Mirak Thermolyne
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Bandelin Sonorex TK 100 H
Sodyum Hidroksit	Biosan Multi Vortex V-32
Diklorometan	Sigma Aldrich
Metil Tert Bütil Eter (MTBE)	Sigma Aldrich
Trietilamin (TEA)	Sigma Aldrich
Tribütilamin (TBA)	Sigma Aldrich
Trifloroasetik Asit (TFA)	Sigma Aldrich
Rasajilin	Clearsynth
Naltrekson Hidroklorür	Sigma Aldrich
6-beta-naltreksol Hidrat	Sigma Aldrich
Ticari Plazma	Sigma Aldrich
Heptan Sülfonik Asit Sodyum Tuzu	Merck

2.2. Kullanılan Cihazlar

Tez boyunca kullanılan cihazlar marka ve modelleri ile birlikte Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz İsmi	Markası
pH metre	Thermo Scientific Orion 3 Star
Hassas Terazı	Mettler Toledo XS204
HPLC	Agilent 1100
Manyetik Karıştırıcı	Mirak Thermolyne
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex TK 100 H
Çoklu Vorteks	Biosan Multi Vortex V-32
Santrifüj	Heraeus Labofuge 200
Ultra Saf Su Cihazı	Human Up 900 Scholar-UV
Saf Su Cihazı	Nüve ND8
2-20 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
20-200 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
100-1000 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
Vakum Pompası	Knf Neuberger D 79112
Vorteks	Velp Scientifica Classic

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez boyunca kullanılan sarf malzemelerin listesi Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Sarf Malzeme İsmi	Markası
200 µL Mikropipet Ucu	Jet Biofil
1000 µL Mikropipet Ucu	Jet Biofil
2 mL N9 HPLC vial	Isolab
2 mL N9 HPLC vial kapağı	Isolab
200 µL İnsert	Isolab
1000 mL Borosilikat Cam Şişe	Isolab
500 mL Borosilikat Cam Şişe	Isolab
Selüloz Asetat Membran Filtre	Isolab
3 mL Pastör Pipeti	Süber Cam
1000 mL Erlen	Isolab
Filtrasyon Adaptörü	Isolab
300 mL Filtre Hunisi	Isolab
Cam Tartım Küveti	Süber Cam
10 mL Balon joje	İldam Cam
50 mL Balon joje	İldam Cam
1000 mL Mezür	İldam Cam
500 mL Mezür	İldam Cam
Parafilm	Isolab
Metal Spatül	Isolab
Polipropilen Deney Tüpü (12 x 75 mm)	Isolab
Polietilen Tıpa (15/16 mm)	Isolab

2.4. Kullanılan Analitik Kolonlar

Tez süresince kullanılan analitik kolonlar Çizelge 8’de listelenmiştir. Çalışmalar koruyucu kolon Trident Level 3 LC kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 2.4. Kullanılan analitik kolonların listesi.

Kolon İsmi	Markası	Kolon Özellikleri
Kinetex F5 (150 mm x 4,6 mm id., 2,6 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Kinetex F5 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm id., 2,6 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 2,6 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Chromolith RP 18E (100 mm x 4,6 mm id.)	Merck	Monolitik Silika Teknolojisi

2.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Bu tez kapsamında tüm analitik standart ve iç standart ana stokları aynı hazırlama yöntemi kullanılarak ve aynı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Tüm ana stok konsantrasyonları 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. Kullanılan tüm kimyasal maddeler katı formda olduğu için hassas terazi kullanılarak cam tartım küveti üzerine her bir analit 10 mg tartılıp 10 mL balon joje içerisinde MeOH ile çözülerek hazırlanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılmak üzere ana stok kullanılarak 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ve 10 µg/mL olmak üzere 3 adet ara stok hazırlanmıştır. Ara stok hazırlama tablosu Çizelge 2.5’te verilmiştir.

Çizelge 2. 5. Analitik standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri.

Ara Stok Konsantrasyonları	Hazırlama Yöntemi
10 µg/mL	1 mg/mL ana stoktan 100 µL alınmış, MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
1 µg/mL	10 µg/mL ara stoktan 1 mL alınmış, MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
0,1 µg/mL	1 µg/mL ara stoktan 1 mL alınmış, MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Çalışmada kullanılmak üzere iç standart denemeleri için 2 adet ara stok hazırlanmıştır. Ara stokların konsantrasyonları ve hazırlanış şekli Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri.

Ara Stok Konsantrasyonları	Hazırlama Yöntemi
100 µg/mL	1 mg/mL ana stoktan 1 mL alınmış, MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
10 µg/mL	100 µg/mL ana stoktan 1mL alınmış, MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.6. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol için Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Naltrekson ve 6-beta-naltreksolün doğrusal aralığını belirlemek için 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olmak üzere 7 derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonları hazırlanmak için 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ve 10 µg/mL ara stokları kullanılmıştır. Standart çözeltileri hazırlanma yöntemleri Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Kalibrasyon noktalarının hazırlanış şekli.

Konsantrasyon (µg/mL)	0,1 µg/mL Ara Stoktan Eklenilen Hacim (µL)	1 µg/mL Ara Stoktan Eklenilen Hacim (µL)	10 µg/mL Ara Stoktan Eklenilen Hacim (µL)	Eklenilen ddH ₂ O Hacmi (µL)
1	10	-	-	900
2	20	-	-	980
5	50	-	-	950
10	-	10	-	990
25	-	25	-	975
50	-	50	-	950
100	-	-	10	990

2.7. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

2.7.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

Kullanılan hareketli faz her gün taze olarak hazırlanmıştır. Sulu faz % 0,1 orto-fosforik asit içermektedir. Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlardaki pik şekillerine etkisini ölçmek amacıyla % 0,1 Trietilamin (TEA), % 0,1 Tribütülin (TBA) ve % 0,1 Trifloroasetik asit (TFA) ve 5 mM Heptan sülfonik asit sodyum tuzu ayrı ayrı denenmiştir. Hareketli faz çiftlerinde uygun organik solvent seçimi için asetronitril ve metanol kullanılmıştır. Sulu hareketli fazın hazırlanışı sırasında organik faz olarak kullanılmasına karar verilen organik solvent 20 dk ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir.

2.7.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu

Hareketli fazın pH değerlerinin naltrekson ve ana metabolitinin analizine etkisinin belirlenmesi amacıyla pH sırasıyla 2, 3, 4 ve 5 olmak üzere deneyler yapılmıştır. Analizin yapıldığı kromatografik koşullar Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Hareketli faz pH denemeleri için kullanılan analitik parametreler.

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,1 fosforik asit ve % 0,1 TEA karışımı ve metanol 85:15 (v/v)
Akış Hızı	0,4 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	204 nm

2.7.3. HPLC Kolon Denemeleri

Tez boyunca yeni nesil analitik kolonların naltrekson ve ana metabolitinin tayinine etkisinin belirlenmesi amacıyla 6 adet farklı kolon denemesi yapılmıştır. Kolon isimleri Çizelge 2.4’te verilmiştir. Kinetex EVO C18 geleneksel kolonlara göre asidik ve bazik geniş pH aralıklarında ve % 100 sulu çözeltilerle çalışma imkânı sağlaması yönüyle diğerlerinden ayrılmaktadır. Kinetex F5 serisi piyasadaki pentaflorofenilpropil (PFP) çekirdek-kabuk fazlı F5 ürünlerine göre performans sınırlarının üzerinde ve farklı laboratuvarlarda kullanıldığında da aynı sonuçları verme olanağı sayesinde diğerlerinden ayrılmaktadır. Kinetex C18 serisi geleneksel gözenekli partiküllere kıyasla daha fazla verimlilik ve geliştirilmiş performans sağlamak üzere tasarlanmıştır. Chromolith RP18E serisi ise 2 µm partikül boyutu ile diğerlerinden oldukça düşük partikül boyutuna sahiptir. Dolgu maddesi için kullanılan monolitik silika, düşük geri basınç ve daha geniş aktif yüzey alanına sahip yenilikçi bir çift modlu yapıya sahiptir.

2.7.4. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu

HPLC metodu için uygun sıcaklık değerlerinin bulunması amacıyla Çizelge 2.9’da belirtilen kromatografik koşullarda sırasıyla 10 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C’de sıcaklık denemeleri yapılmıştır.

Çizelge 2.9. HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,1 fosforik asit ve % 0,1 TEA (pH:5) karışımı ve metanol 85:15(v/v)
Akış Hızı	0,4 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	204 nm

2.7.5. HPLC Hareketli Faz Akış Hızı Optimizasyonu

Hareketli faz izokratik ve gradiyent olarak ayarlanarak iki farklı akış yönteminin karşılaştırmaları yapılmıştır. İzokratik akış oranları asetonytrilin metanole göre düşük geri basınç sağlaması ve kullanılan kolon tiplerinin farklı olması nedeniyle değişiklik göstermektedir. Gradiyent akış oranları ise Çizelge 2.10’da verilmiştir.

Çizelge 2.10. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol tayini için oluşturulan gradiyent akış oranları.

	Zaman (dk)	MeOH Oranı (%)	% 0,1 H ₃ PO ₄ ve % 0,1 TEA Karışımı (%)
Gradiyent Yöntem I	0	20	80
	20	60	40
	22	20	80
	28	20	80
Gradiyent Yöntem II	0	25	75
	6	25	75
	20	60	40
	22	25	75
	25	25	75

2.7.6. HPLC Enjeksiyon Hacmi Optimizasyonu

Analizlerde uygun enjeksiyon hacminin belirlenmesi amacıyla Kinetex EVO C18 (150 mm, 4,6 mm id., 2,6 µm) kolonu hareketli faz olarak % 0,1 H₃PO₄ ile %0,1

TEA karışımı ve metanol 80:20 (v/v) kullanılarak kolon sıcaklığı 15 °C 'de ve 0,4 mL/dk akışta 10 µL, 20 µL ve 30 µL enjeksiyonlar yapılmıştır.

2.8. HPLC Analizi için Yöntem Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntem validasyon parametreleri Uluslararası Uyum Konseyi (ICH), Avrupa İlaç Konseyi (EMA), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi Dairesi (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması ve dikkat edilmesi önerilen testleri içermektedir.

2.8.1. Seçicilik

Sıvı kromatografi yöntemlerinde seçicilik yöntemin güvenilirliği için oldukça önemlidir. Örnek matriksindeki bileşenlerin hedef analitle girişim yapmadığı ve analitin doğru ve spesifik olarak ölçülebildiği yöntem seçici olarak tanımlanabilir. Analitik standartları içeren 10 µg/mL ara stok ve içermeyen metanol çözeltisi doğrudan analiz edilip elde edilen kromatogramlarda bozunma ürünlerin varlığı incelenmiştir. HPLC-UV analitik koşulları Çizelge 2.11'deki gibidir. Ticari plazma ve idrar matrikslerinde hedef analitlerin matriksteki herhangi bir bileşen (safsızlık) ile girişim yapıp yapmadığı elde edilen kromatogramlar sonucunda kontrol edilmiştir.

2.8.2. Doğruluk

Doğruluk, yöntem validasyon çalışmaları için en önemli kriterlerden biridir. Ölçülen değerlerin gerçek değerlere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak doğruluk geri kazanım çalışmaları (%) olarak da ifade edilir.

Geliştirilen yöntem kullanılarak 20 ng/mL, 40 ng/mL ve 80 ng/mL konsantrasyonlarda analitik standartları içeren 3 farklı kalite kontrol (QC) noktası seçilmiştir. HPLC analizi sonrası % geri kazanım Şekil 2.1'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan Konsantrasyon Sonucu}}{\text{Gerçek Konsantrasyon}} \times 100$$

Şekil 2.1. Geri kazanım hesaplama denklemi.

2.8.3. Kesinlik

Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin çalışma koşullarında bireysel örneklerin analizi sonucu elde edilen verilerin birbiri arasındaki uyumluluk, tekrar edilebilirliğinin bir göstergesidir. Sonuçların birbirine yakınlığı standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) olarak ifade edilir. Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi uygulanarak matriks üzerine 20 ng/mL, 40 ng/mL ve 80 ng/mL konsantrasyonlarda analitik standartları içeren 3 farklı kalite kontrol noktası (QC) 5 farklı gün ayrı ayrı hazırlanmış olup en az 3 tekrarlı analiz yapılarak SS ve % BSS olarak Şekil 2.2'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ BSS} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Şekil 2.2. Bağıl standart sapma hesaplama denklemi.

2.8.4. Doğrusallık

Kantitatif olarak konsantrasyon hesabının belirlendiği çalışmalarda doğrusallık geliştirilen metodun güvenilirliği için oldukça önemlidir. En az 5 farklı derişimde hazırlanan hedef analit konsantrasyonlarının ölçülen analitik cihazlarda aldığı sinyallerin grafiksel ortamda yorumlanmasıyla değerlendirilir. Bu tez çalışmasında 7 adet farklı derişim noktası seçilmiştir. Hazırlanan ara stoklar kullanılarak seçilen

matrikste son konsantrasyonu sırasıyla 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve HPLC-UV 'de Çizelge 2.11'deki analitik koşullar kullanılarak analiz edilmiştir. Oluşturulan grafikte regresyon denkleminin başarısını belirlemek amacıyla eğim (m), kesişim (n) ve belirleme katsayısı (R^2) parametreleri incelenmiştir.

2.8.5. Çalışma Aralığı

Yöntemin çalışma aralığı doğrusallığın bir göstergesidir ve en iyi çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin %50'si ile % 150'si arasında en iyi performansı veren aralık olarak tanımlanmaktadır.(Gumustas ve Ozkan, 2011) Geliştirilen yöntemin çalışma aralığı doğrusallık çalışması için belirlenen konsantrasyon değerleri arasında olacaktır ve genellikle çalışma aralığının en alt değeri LOQ değeri olarak tanımlanmaktadır.

2.8.6. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Teşhis sınırı (LOD), cihazın algıladığı ve kromatogramda görünen ancak herhangi bir miktar tayininin yapılamadığı en küçük derişim olarak tanımlanmaktadır. Tayin sınırı (LOQ) ise analiz sonrasında cihazın algılayabildiği ve kromatogramda ölçülebilen en düşük konsantrasyondur. Genellikle LOD ve LOQ hesaplamaları için kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için herhangi bir analit içermeyen kör örnek ile en düşük analit konsantrasyonu bilinen örnekler karşılaştırılır. LOD için sinyal/gürültü oranı 3 olmalıdır. LOQ için ise sinyal/gürültü oranı 10'dur. Teorik olarak LOD ve LOQ hesaplama denklemleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{m} \quad LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m}$$

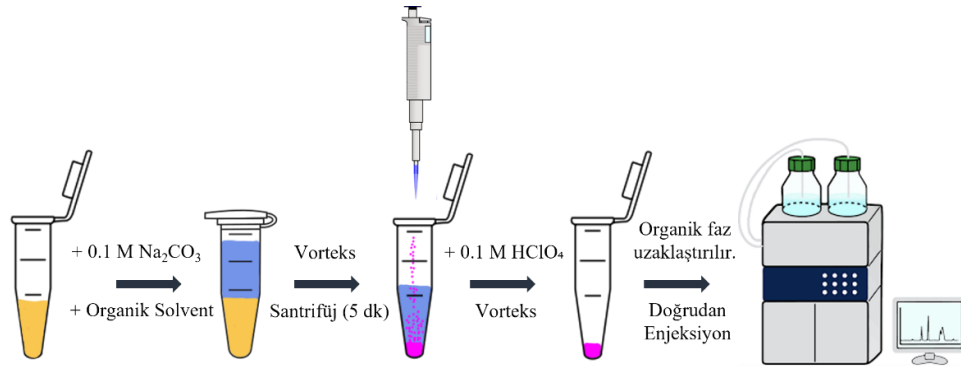
Şekil 2.3. Teorik olarak teşhis ve tayin sınırı hesaplama denklemi.

2.8.7. Sağlamlık

Sağlamlık testi yöntem validasyonunun önemli bir parçasıdır. USP’de bir analitik yöntemin sağlamlığı aynı numunenin farklı laboratuvarlar, analistler ve farklı cihazlar gibi çeşitli pek çok farklı koşullarda yapılan analizlerin sonuçlarının tekrar elde edilebilmesi olarak tanımlanmaktadır. Oluşturulan metodun sağlamlığı test edilmiştir.

2.9. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntemi

500 µL ticari plazma üzerine belirli konsantrasyonda naltrekson ve 6-beta-naltreksol analitik standartları ve iç standart eklenmiştir ve 10 s vorteks uygulanmıştır. Ekstraksiyon pH’ı 9 olarak belirlenmiş olup ortamı bazik hale getirmek için 20 µL Na_2CO_3 (0,1 M) eklenip 10 s vorteks yapılmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak 2.5 mL MTBE ticari plazma üzerine eklenmiş ve 2 dk vorteks yapılmıştır. Vorteks sonrasında 3500 RPM’de 5 dk santrifüj edilerek organik solvent yeni polipropilen tüpe alınmıştır. Ortamı asidik hale getirmek için 100 µL HClO_4 (0,1 M) eklenmiştir ve sonrasında 2 dk vorteks yapılmıştır. Sonrasında tüpler 3500 RPM’de 5 dk santrifüj edilip organik solvent ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ortamda kalan HClO_4 direkt olarak HPLC’de analiz edilmiştir. Ticari plazma üzerinden geliştirilen ekstraksiyon yöntemi Şekil 2.4’te şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) şematik gösterimi.

2.10. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu

2.10.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi

Ekstraksiyona hazırlık aşamalarından sonra naltrekson ve ana metaboliti için uygun ekstraksiyon solventinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla Metil tert-bütil eter (MTBE), diklorometan (DCM) ve bütilasetat kullanılmıştır.

2.10.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu

Kullanılan ekstraksiyon solvent hacminin ekstraksiyon verimine etkisinin belirlemek amacıyla sırasıyla 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL ve 2,5 mL MTBE kullanılmıştır.

2.10.3. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu

Geliştirilen ekstraksiyon yönteminde naltrekson ve 6-beta-naltreksol sulu ortamda bazik özelliğe sahip olması nedeniyle analitlerin öncelikle bazik ortama alınması daha sonrasında asidik ortama geçmesi hedeflenmektedir. Bu ekstraksiyon ortamının değişikliği geri ekstraksiyon olarak da adlandırılmaktadır.

Ekstraksiyon verimliliğine etkisinin ölçülmesi amacıyla öncelikle bazik ortam oluşturmak için 0,1 M Na_2CO_3 kullanılarak plazmaya 10 μL ve 20 μL hacim denemeleri yapılmıştır. Daha sonrasında ilgili ekstraksiyon adımlarının ardından analitlerin asidik ortama geçmesi için 0,1 M HClO_4 kullanılarak organik solvent üzerine 50 μL ve 100 μL hacim denemeleri yapılmıştır.

2.11. Belirlenen En Uygun HPLC Koşulu

Optimizasyon çalışması sonrasında belirlenen en uygun HPLC yöntemi Çizelge 2.11’de verilmiştir.

Çizelge 2.11. Valide HPLC-UV analitik yöntem koşulları.

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,1 fosforik asit ve % 0,1 TEA karışımı (pH: 2,5) ve metanol 80:20 (v/v)
Akış Hızı	0,4 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	15 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	204 nm

3. BULGULAR

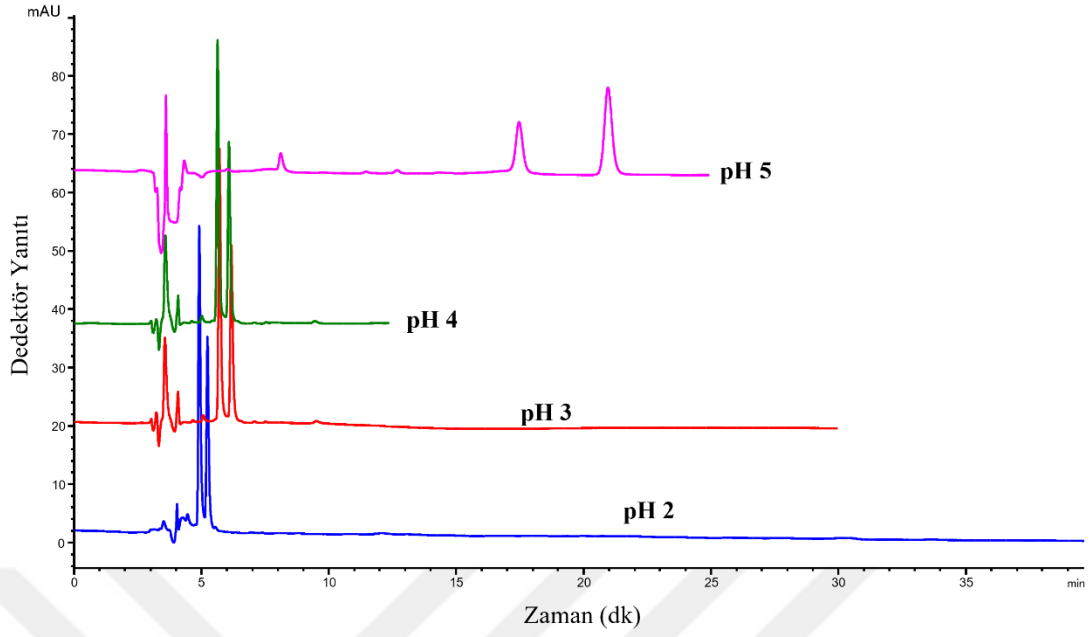
3.1. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

3.1.1. Hareketli Faz Optimizasyonu

Kolon içerisinde iyon eşleşmesi sağlayan % 0,1 Trietilamin (TEA), % 0,1 Tribütilamin (TBA) ve % 0,1 Trifloroasetik asit (TFA) ve 5 mM Heptan sülfonik asit sodyum tuzu ayrı ayrı denenmiştir. Elden edilen verilere bakıldığında % 0,1 TEA kromatogramdaki gürültü oranını düşürdüğü için tercih sebebidir. %0,1 orto-fosforik asitle % 0,1 TEA kullanımı, % 0,1 TBA ve % 0,1 TFA ile kıyaslandığında analitik standartların en iyi ayrım yakaladığı sulu faz sistemi olmuştur. Heptan sülfonik asit sodyum tuzu kolonla analit arasında iyon eşleşmesinde başarılı olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır ancak kolonun uzun süreli kullanımı için genellikle önerilmemektedir. TEA ile arasında anlamlı farklılık bulunmadığı için tercih edilmemiştir. Her bir kolon için ayrı ayrı hareketli faz denemeleri yapılmıştır. Analitik standartların en iyi ayrımı Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm) kolonunda % 0,1 fosforik asit ve % 0,1 TEA (pH:2,5) karışımı ve metanol 80:20 (v/v) oranında tespit edilmiştir. Diğer kolon parametreleri Çizelge 2.11’de verilmiştir.

3.1.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu

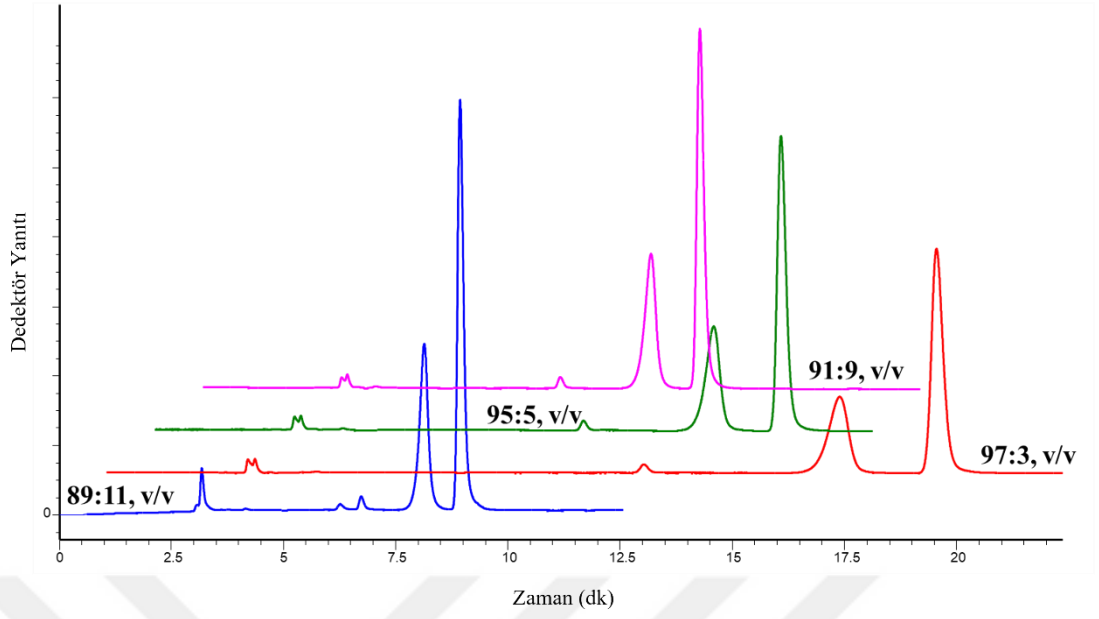
Seçilen hareketli fazın pH denemeleri kolon kararlılığının devam edebilmesi için yüksek asidik ve bazik koşullarda dayanıklılığı sebebiyle Kinetex EVO C18 serisi ile yapılmıştır. Aynı analitik koşullar altında yapılan denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Hareketli faz pH denemelerine ait kromatogramlar.

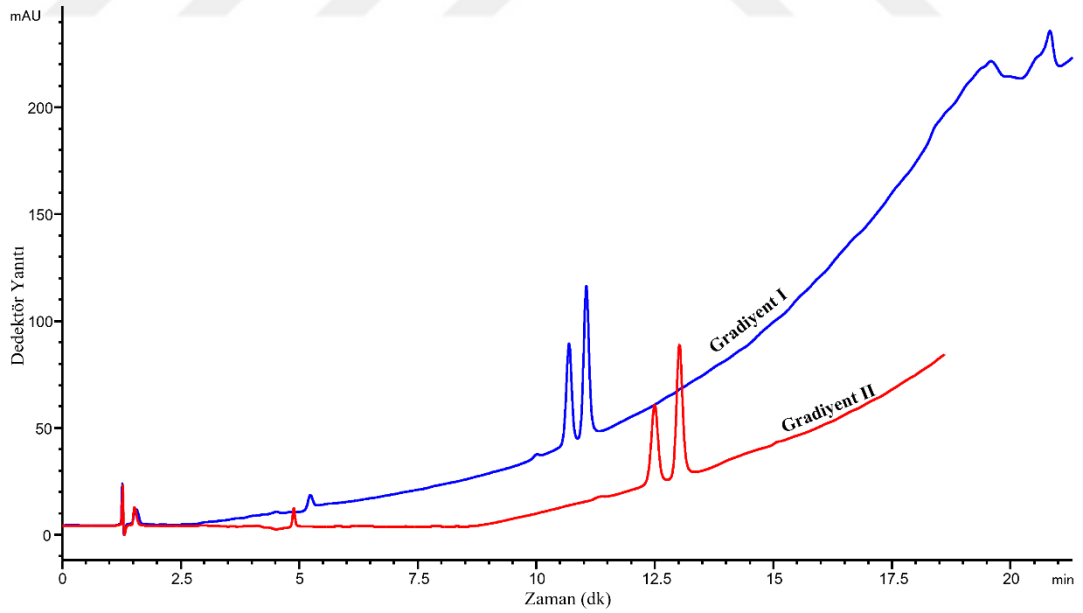
3.1.3. Hareketli Faz Bileşimi ve Akış Hızı Optimizasyonu

Uygun kromatografik koşulun belirlenmesi amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları için hareketli faz sistemlerin hacimsel oranlarındaki değişiminin analitik standartların ayırımına olan etkisi incelenmiştir. İzokratik akış kullanılarak analiz edilen kromatografik koşullar için hareketli faz pH'yi 5 tercih edilmiş olup 204 nm'de 45°C 'de 0,5 mL/dk akış hızı ile Kinetex F5 (150 mm x 4,6 mm id. 2,6 µm) kolonda kromatografik ayırım yapılmıştır. Hareketli faz içeriği % 0,1 orto-fosforik asit ile % 0,1 TEA karışımı ve metanol sırasıyla 89:11 (v/v), 91:9 (v/v), 95:5 (v/v) ve 97:3 (v/v) oranlarında denenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Farklı hareketli faz bileşimleri ile yapılan analizlere ait kromatogramlar.

Gradyent akış için kullanılan kromatografik koşullar için hareketli faz oranları Çizelge 2.10’da belirtilmiştir ve ilgili kromatogramlar Şekil 3.3’te verilmiştir.



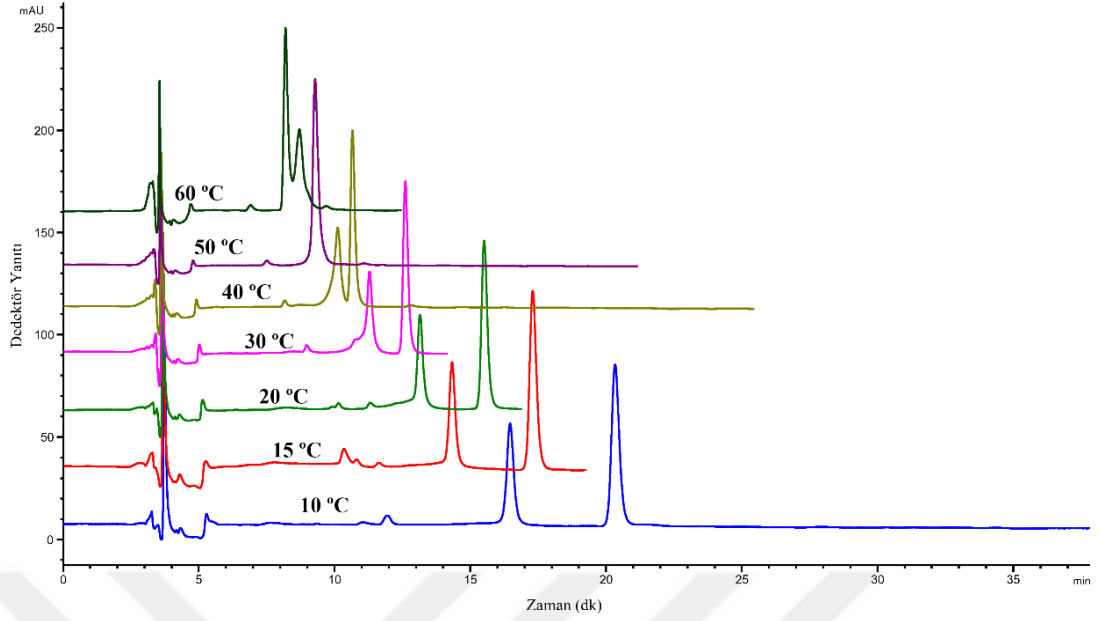
Şekil 3.3. Gradyent akış kromatogramlarının karşılaştırılması.

3.1.4. HPLC Kolon Denemeleri

Farklı partikül boyutuna ve dolgu materyaline sahip 6 adet farklı sıvı kromatografik kolon incelenmiştir. 5 adet kolon core-shell teknolojisine sahip olup 1 adet kolon monolitik silikalardan oluşmaktadır. Chromalith RP 18E monolitik silika bazlı kolon diğer kolonlara göre hızlı analiz imkânı sağlamıştır. Pik yüksekliği diğer kolonlara kıyasla yüksek olmasına rağmen düşük ayırma gücü ve optimizasyon sırasında karşılaşılan kromatogramdaki gürültü sebebiyle tercih edilmemiştir. Yapılan çalışmalarda EVO C18 serisinin yüksek asidik ve bazik koşullarda çalışma uyumluluğu farklı pH'lerde çalışma imkânı sağlamıştır. EVO C18 analitik kolon diğer kolonlara kıyasla analitlerin ayırma gücünün en yüksek olduğu kolon olmuştur.

3.1.5. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu

Geliştirilen HPLC metodu için uygun sıcaklık koşullarının bulunması amacıyla Çizelge 2.9'daki kromatografik koşullar kullanılmış olup 10°C, 15°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C değerleri için elde edilen kromatogramlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Kolon sıcaklık denemelerine ait kromatogramlar.

3.1.6. İç Standart Denemeleri

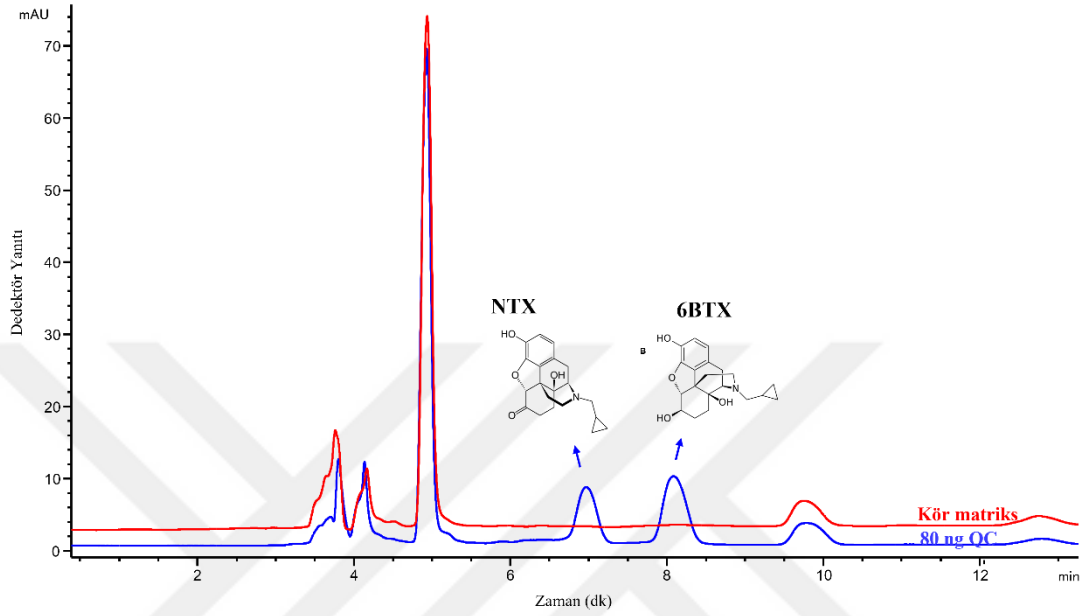
15 adet farklı iç standart için denemeler yapılmıştır. Geliştirilen HPLC-UV yönteminde (Çizelge 2.11) yapılan analizler sonucunda kromatogramlar incelendiğinde ayırım gücü en yüksek olan Favipiravir ve Rasajilin analitleri olmuştur. Favipiravir alıkonma zamanı 4,99 dk'dır. Alıkonma zamanı ve pik yüksekliği olarak en iyi sonuç alınan analit olmasına rağmen plazmadan gelen safsızlıklarla girişim yapmaktadır. Bu sebeple rasajilin iç standart olarak seçilmiştir ve alıkonma süresi 11. dk'dır. Ticari plazmadan gelen safsızlıklarla girişim oluşturmamaktadır.

3.2. HPLC için Analitik Yöntem Validasyon Çalışmaları

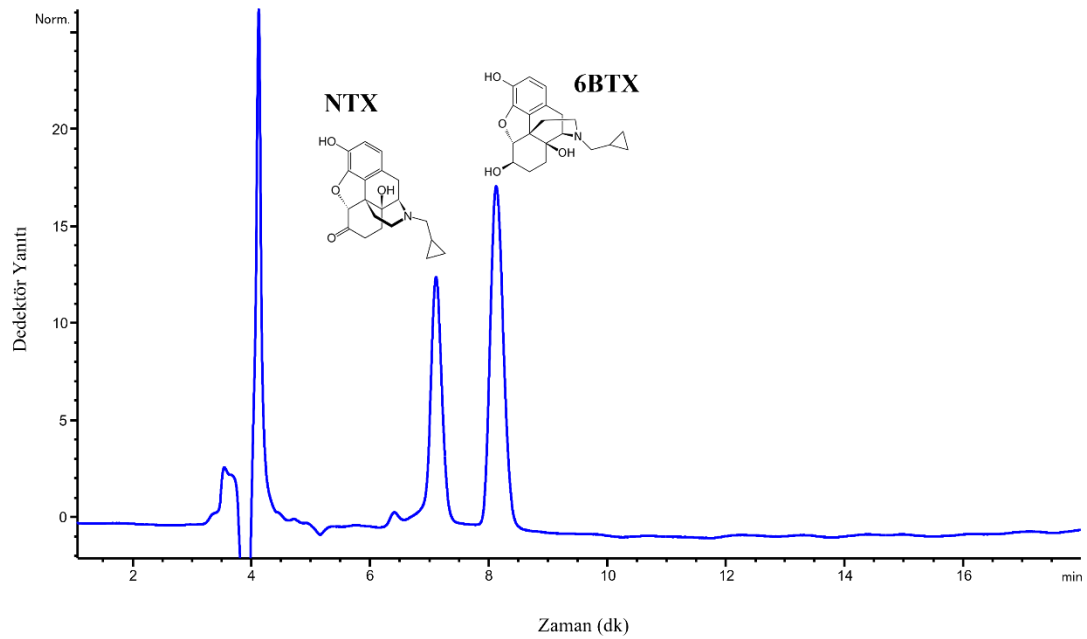
3.2.1. Seçicilik

Geliştirilen ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan naltrekson ve 6-beta-naltreksol için hazırlanan kalite kontrol noktaları herhangi farmakolojik bir bileşen içermeyen

ticari plazma ile karşılaştırılmıştır. Analitlerin alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim bulunmamaktadır (Şekil 3.5). Ticari plazmadan gelen bileşenler kendi içerisinde tekrar edilebilir.



Şekil 3.5. Kör matris ile 80 ng/mL naltrekson ve 6-beta-naltreksol içeren QC kromatogramları karşılaştırılması.



Şekil 3.6. Analitik standartların kromatogramları (1 ng/mL).

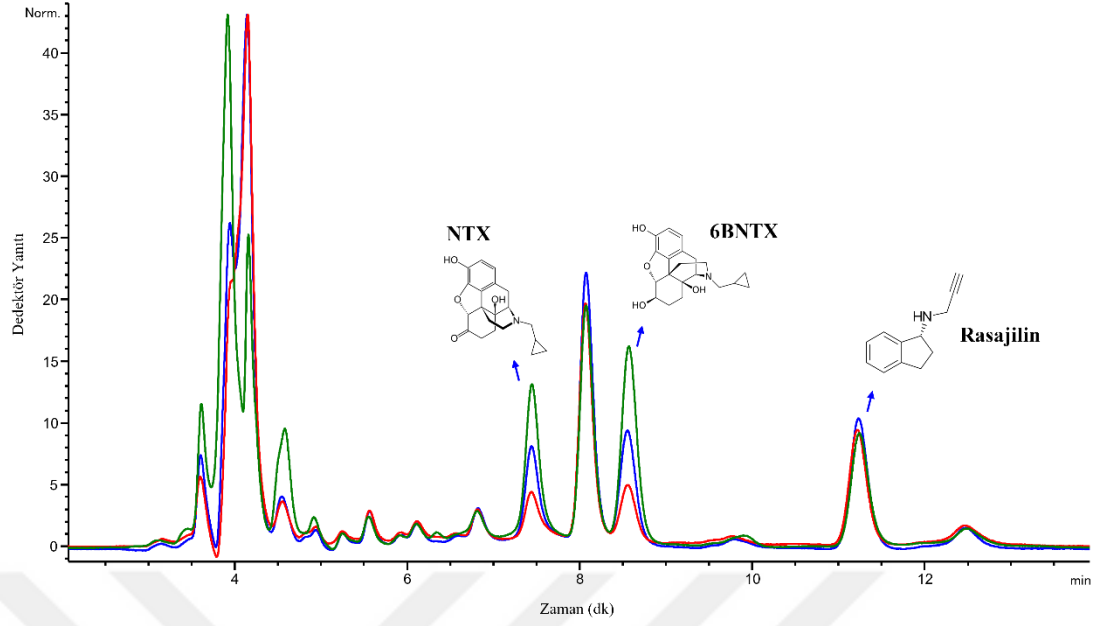
Analitik standart enjeksiyon (1 µg/mL) sonrası sistem uygunluk testi parametreleri hesaplanmış ve çizelgede sunulmuştur. (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Naltrekson ve 6-beta-naltreksolün sistem uygunluk parametreleri (SUT) sonuçları.

Parametreler	Naltrekson	6-beta-naltreksol
Alıkonma Zamanı (dk)	7,017	8,159
Alıkonma Zamanının Tekrar Edilebilirliği (%BSS)	0,42	0,6
Kapasite Faktörü (k)	0,822	1,119
Seçicilik (a)	-	1,36
Ayrım Gücü (Rs)	-	2,106
Kolon Etkinliği N ₁ (Plaka/kolon)	22191	26626
Kolon Etkinliği N ₂ (Plaka/metre)	3327	3992
Kuyruklanma Faktörü (T)	0,854	1,006

3.2.2. Doğruluk

Üç farklı QC noktaları 20 ng/mL, 40 ng/mL ve 80 ng/mL analitik standartları içeren konsantrasyonlarda hazırlanmış ve en az 5 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Bulunan sonuçlar Şekil 2.1'deki gibi hesaplanarak Çizelge 3.2'de raporlanmıştır.



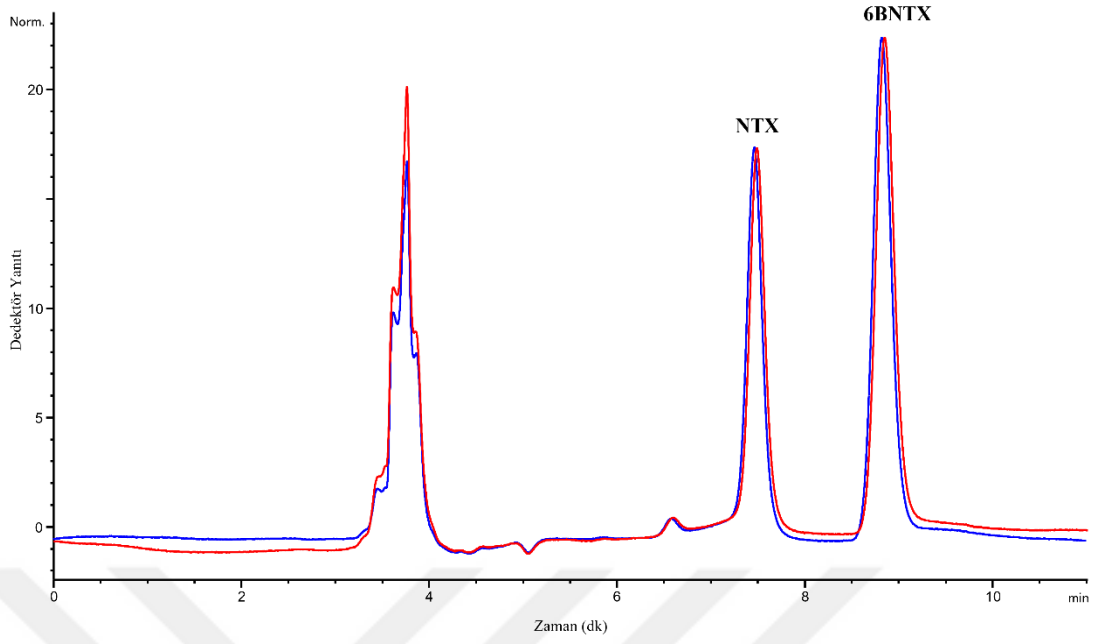
Şekil 3.7. Kalite kontrol noktalarının kromatogramları.

3.2.3. Kesinlik

Kalite kontrol noktaları belirlenen konsantrasyonlarda en az 5 tekrarlı olacak şekilde Şekil 2.11'deki koşullarda analiz edilmiş olup kesinlik hesaplamaları için analiz sonuçları Şekil 2.2'de belirtilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol kesinlik ve doğruluk verileri.

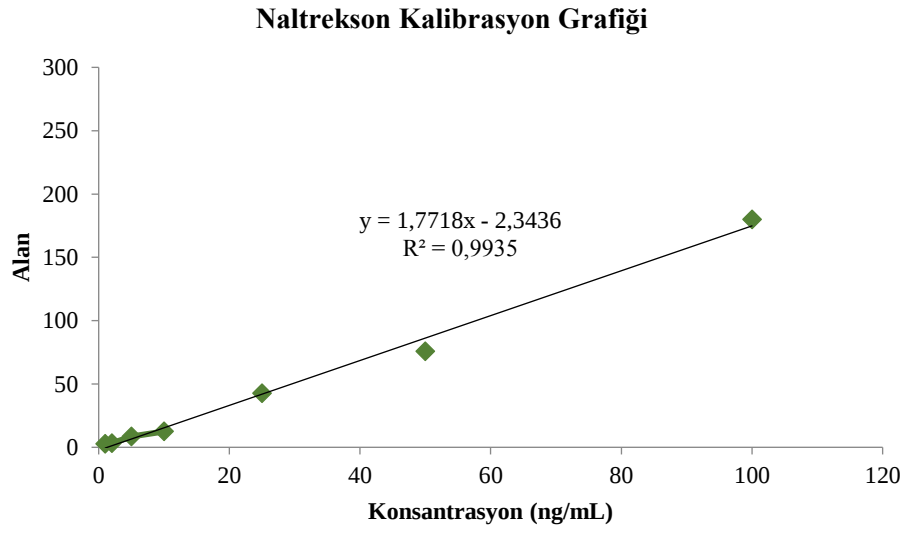
	Kalite Kontrol Konsantrasyonları (ng/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
		Standart Sapma (SS)	% BS S	% Geri Kazanım	Standart Sapma (SS)	%BS S	% Geri Kazanım
Naltrekson	20	0,69	1,82	106	1,44	3,90	111,11
	40	0,99	1,44	106,6	2,96	4,42	101,11
	80	4,18	3,01	103,8	8,97	7,10	95,46
6-beta-naltreksol	20	1,06	2,06	104,9	1,84	3,47	108,39
	40	1,39	1,37	105,9	5,43	5,05	112,7
	80	0,14	0,07	102,9	12,14	6,78	94,96



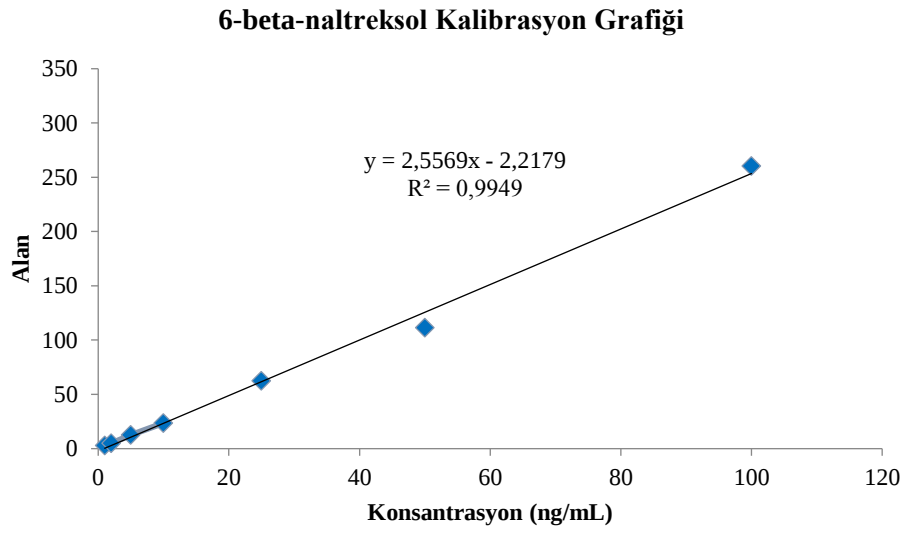
Şekil 3.8. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol (1 ng/mL (LOQ)) tekrarlı enjeksiyonlarının kromatogramı.

3.2.4. Doğrusallık

Bu tez çalışmasında miktar tayini çalışmaları için HPLC-UV kullanılarak dedektör cevabına göre naltrekson (Şekil 3.9) ve 6-beta-naltreksol (Şekil 3.10) için 7 adet farklı derişim noktası ile kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Her iki analit için 1-100 ng/mL derişimleri arasında doğrusallık saptanmıştır.



Şekil 3.9. Naltrekson kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.10. 6-beta-naltreksol kalibrasyon grafiği.

3.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Kalibrasyon eğrisi için belirlenen konsantrasyonların en az 5 tekrarlı analizi sonrasında elde edilen verilerin ANOVA testi sonrasında elde edilen verileri Çizelge 3.3'te raporlanmıştır.

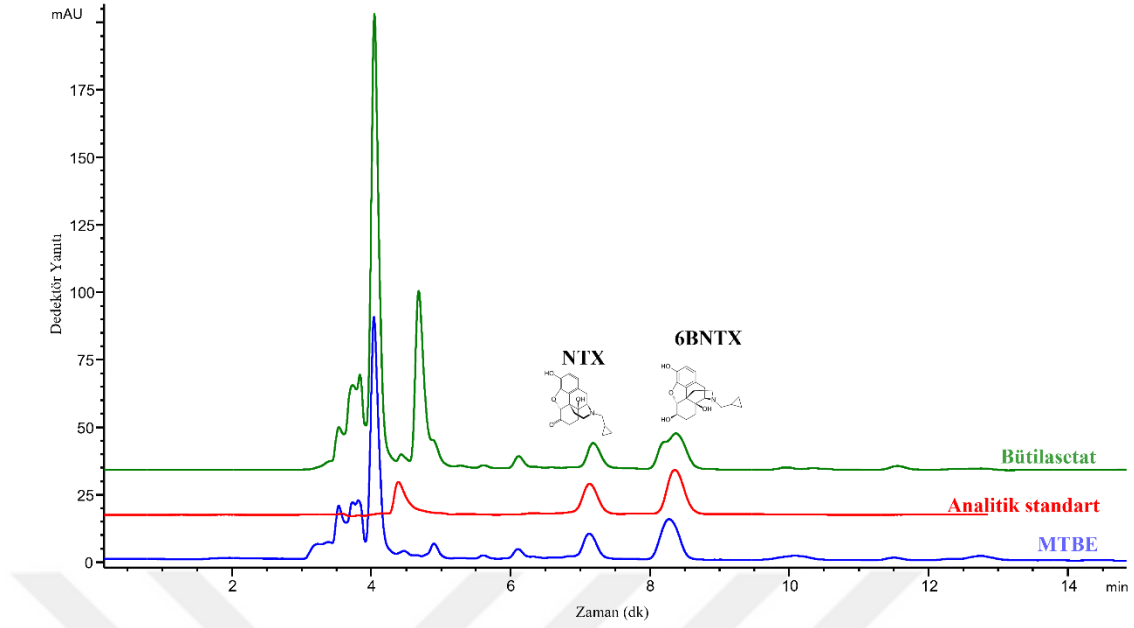
Çizelge 3.3. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler.

Parametreler	Naltrekson(n=5)	6-beta-naltreksol(n=5)
Doğrusallık (ng/mL)	1-100	1-100
Eğim (m)	1,7718	2,5569
Kesişim (n)	-2,3436	-2,2179
Belirleme katsayısı (R ²)	0,9935	0,9949
LOD (ng/mL)	0,5	0,3
LOQ (ng/mL)	1	1

3.3. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu

3.3.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi

Ekstraksiyon solventi olarak sırasıyla Metil tert-bütil eter (MTBE), diklorometan (DCM) ve bütilasetat denenmiştir. Örnek matriksinde son konsantrasyon 1 µg/mL olacak şekilde ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 3.11'de verilmiştir.



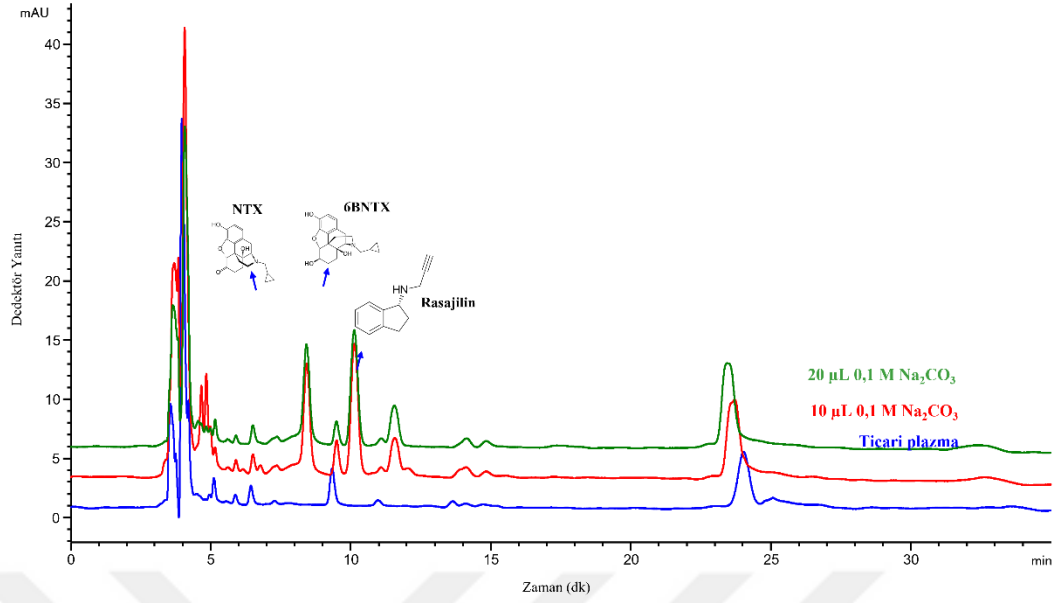
Şekil 3.11. Analitik standart ve ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar.

3.3.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu

Ekstraksiyon solventi MTBE olarak seçildikten sonra MTBE hacminin optimizasyonu sırasıyla 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL ve 2,5 mL olarak yapılmıştır. 0,5-1,5 mL MTBE denemeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. 2 mL MTBE kullanılarak yapılan ekstraksiyonda daha kullanılan düşük hacimli MTBE sonuçlarına göre alanda küçük bir artış olmuştur. Son olarak yapılan 2,5 mL MTBE ile denemede kromatogramdaki pik şekilleri yükseklik ve alansal olarak kıyaslandığında en iyi sonuç aldığımız deneme olmuştur.

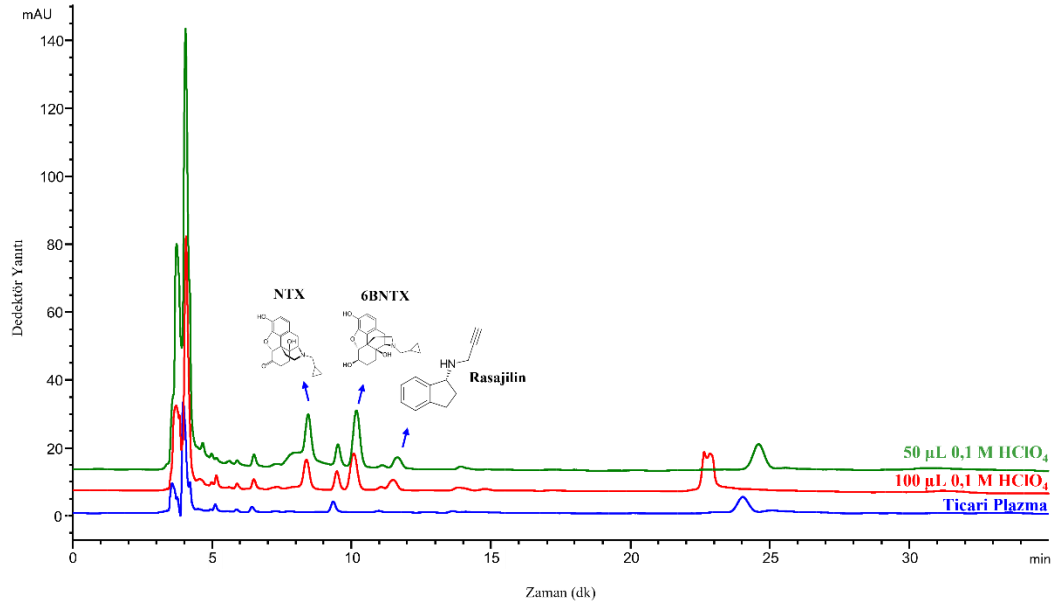
3.3.3. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu

Ekstraksiyon koşullarına karar verildikten sonra ortamın bazik ve asidik koşulları için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Ortamı bazik hale getirmek yapılan optimizasyon sonrası elde edilen kromatogramlar Şekil 3.12.'de verilmiştir.



Şekil 3. 12. Ekstraksiyon ortamını bazik hale getirmek için kullanılan 0,1 M Na_2CO_3 hacim denemeleri sonrası kromatogramların karşılaştırılması.

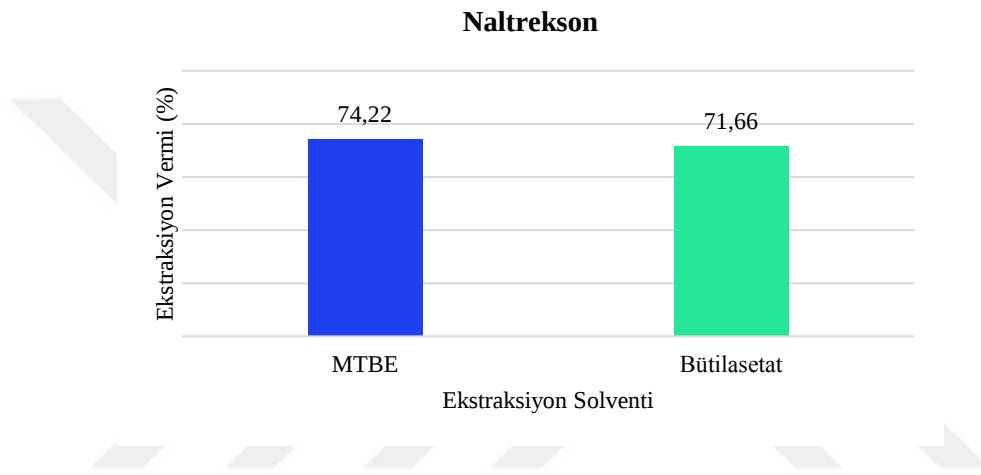
Geri ekstraksiyon olarak da tanımlanan analitleri bazik ortamdan asidik ortama geçirmek için ortamın asiditesinin optimizasyonu sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 3.13’te verilmiştir.



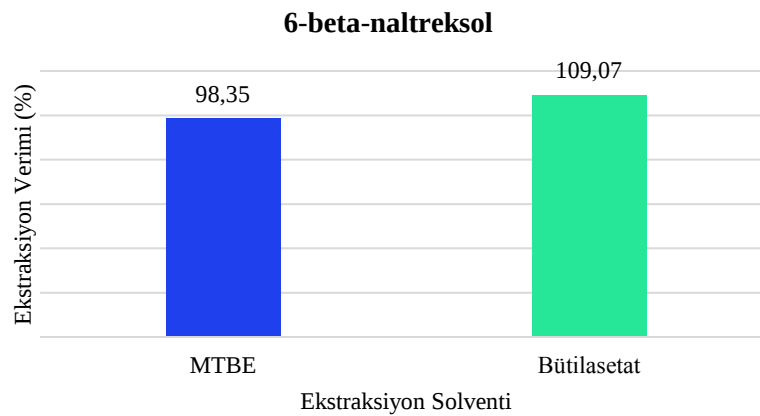
Şekil 3. 13. Ekstraksiyon ortamını asidik hale getirmek için kullanılan 0,1 M HClO_4 hacim denemeleri sonrası kromatogramların karşılaştırılması.

3.4. Yöntemin Ekstraksiyon Verimliliği

Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak son konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde ticari plazmadan ekstraksiyon solventi olarak MTBE ve bütülasetat ekstraksiyonlarını Şekil 2.1'deki denkleme göre bilinen konsantrasyon 1 ng/mL'den elde edilen derişim miktarı (ng/mL) kabul edilerek naltrekson (Şekil 3.14) ve 6-beta-naltreksol (Şekil 3.15) için hesaplanmıştır.



Şekil 3.14. Naltreksol için hesaplanan ekstraksiyon verimi grafiği.



Şekil 3.15. 6-beta-naltreksol için hesaplanan ekstraksiyon verimi grafiği.

4. TARTIŞMA

Naltreksonla bağımlılık tedavisi gören OUD hastalarının tedaviye uyumu oldukça düşük olması nedeniyle naltrekson ve ana metaboliti olan 6-beta-naltreksolün plazma ve idrar gibi biyolojik numunelerden tayin edilmesi tedavi süreci açısından oldukça önem taşımaktadır. Naltrekson ve 6-beta-naltreksol moleküllerinin biyolojik numunelerden tayini için çeşitli analitik yöntemler mevcuttur ancak oldukça sınırlıdır (Çizelge 1.3). Bu tez çalışmasında naltrekson ve ana metaboliti olan 6-beta-naltreksolün kromatografik koşullarının incelenmiş ve HPLC kullanılarak literatüre alternatif olarak yeni nesil kolonlar kullanılarak hızlı, duyarlı ve hassas valide edilmiş bir yöntem geliştirilmiştir.

Analiz yöntemi geliştirme sırasında yeni nesil kolonlar denenmiş olup kolon sıcaklığı, hareketli faz sistemleri, hareketli faz pH ve akış hızı yöntem optimizasyonları yapılmıştır. Chromolith RP 18E (100 mm x 4,6 mm) monolitik silika bazlı kolon, diğer kolonlara göre uzunluk olarak kısa olması nedeniyle hızlı analiz imkânı sağlamaktadır ancak ayırım gücü Kinetex serisine göre düşük olarak belirlenmiştir. Kinetex EVO C18 serisi analizlerde en yüksek ayırımı sağladığımız ve düşük sinyal/oranına sahip analitik kolon olmuştur. Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 2,6 µm) küçük partikül boyutu ve keskin pik şekilleri ile hızlı analize olanağı sağlamasına rağmen yüksek sistem geri basıncı nedeniyle tercih edilmemiştir. Bu nedenle en yüksek seçicilik ve ayırım gücüne ulaştığımız kolon olan Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm) yöntem için uygun seçilmiştir.

Kolon sıcaklığı optimizasyon sonuçlarına bakıldığında sıcaklık arttıkça piklerin birbirine yaklaştığı ve ayırım gücünün kaybedildiği tespit edilmiştir. Pikler 50°C birleşmiş ve 60°C’de naltrekson ve 6-beta-naltreksolün alıkonma sıraları yer değiştirmiştir. Kolon sıcaklığı arttıkça analiz süresi kısalmaktadır ancak ayırım gücü analitik standartlarımız için azalmıştır. Bu nedenle ayırım gücünün en yüksek olduğu sıcaklık olan 15°C, yönteme uygun seçilmiştir.

Hareketli faz optimizasyon çalışmalarında iyon eşleyici ajanlar olarak bilinen TEA, TBA, TFA ve Heptan sülfonik asit sodyum tuzu denemeleri sonucunda % 0,1 TEA analitik standartların kolondan ayırım gücünü arttırmış ve pik şekillerindeki kuyruklanmayı azaltmıştır. Diğer iyon çifti oluşturan ajanlara göre tercih edilmesinin sebebi % 0,1 TBA ve TFA kullanımında göre yüksek ayırım gücü ve düşük sinyal/gürültü oranıdır. Heptan sülfonik asit sodyum tuzu, % 0,1 TEA kullanımına göre kromatogramlarda belirgin farklılık göstermemiştir. Ayrıca hareketli faz içerisinde uzun süreli tuz kullanımı kolon ömrünü azalttığı için tercih sebebi değildir.

Hareketli faz pH'ı üzerinde yapılan denemeler sonucunda Şekil 3.1'de görüldüğü gibi pH arttıkça analitik standartların alıkonma sürelerinde uzama ve pik yüksekliğinde düşüş meydana gelmiştir. Bunun nedeni hareketli fazın pH'si analitlerin pKa değerlerine yaklaştıkça analitlerin kolondaki tutulumunun artmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada rutin analizlere kıyasla hızlı bir analiz yöntemi geliştirilmek istendiği için uygun pH 2,5 olarak seçilmiştir.

İzokratik akış çalışmasında F5 kolonda farklı oranlarda hareketli faz denemeleri yapılmıştır (Şekil 3.2). Bunun sonucunda farklı kimyalardaki core-shell kolonlarda analitik standartların ayırımı hakkında ön bilgi edinilmiştir. Gradyent akış çalışmasında ise Şekil 3.3'te görüldüğü gibi analiz sonrasında yüksek bir kuyruklanma ve kromatogram taban çizgisinde yukarı doğru kayma meydana gelmiştir. İzokratik analizler ile ayırım sağlandığı için gradyent ayırma gerek duyulmamıştır. Bu nedenle farklı oranlarda izokratik akış denemeleri yapılmıştır (Çizelge 3.2) En uygun hareketli faz sistemi olarak Kinetex EVO C18 kolonda % 0,1 orto-fosforik asit ile % 0,1 TEA karışımı ve metanol 80:20 (v/v) seçilmiştir (Şekil 3.6).

Yöntem validasyonu sırasında seçicilik, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, yöntemin LOD ve LOQ verileri ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Yöntemde naltrekson ve 6-beta-naltreksol herhangi bir girişim olmadan analiz edilebilmektedir. ICH'ye (1995) göre biyolojik numunelerde %BSS en düşük konsantrasyon değeri için % 20 ve diğer değerler için % 15'in altında olmalıdır. Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi analitlerin gün içi ve günler arası olmak üzere yapılan analizler sonrası tüm kalite

kontrol noktalarının %BSS'ı %8'in altındadır. Yöntemin % geri kazanım, SS değerleri ve diğer parametreler incelendiğinde UCP'e göre yöntem validasyonu tamamlandığı ve doğru, kesin ve seçici bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen HPLC-UV yöntemi 10 dk içerisinde naltrekson ve 6-beta-naltreksol ve iç standart olarak rasajilin hızlı ve seçici olarak tayin edebilmektedir. Bu yöntemde iç standart olarak alikonma süresi en erken olan Rasajilin (11 dk) seçilmiştir. Ancak geliştirilen yöntemde iç standart olarak kullanılmamasının sebebi analiz süresini uzatması, % BSS ve SS değerlerinin analizin doğruluk ve seçiciliği için kabul edilebilir değerler olmasıdır.

Bu tez çalışmasında ticari plazma üzerinde geliştirilen ekstraksiyon yöntemi farklı organik solventler kullandığında bile eş zamanlı olarak naltrekson ve ana metaboliti olan 6-beta-naltreksolü ekstrakte edebilmekte ve valide edilmiş yöntem ile analiz imkânı sağlamaktadır. Ekstraksiyon yönteminin verimliliğini arttırmak için çeşitli optimizasyon adımları yapılmıştır.

Ekstraksiyon solventi olarak 2.10.11'de belirtilen 3 adet farklı solvent ayrı ayrı denenmiştir. Diklorometan kullanımı sırasında ticari plazmayla ciddi bir emülsiyon oluşturduğu için denemelere MTBE ve bütilasetat ile devam edilmiştir. Ekstraksiyon solvent hacmine karar verilirken yapılan denemeler sonrasında en yüksek pik yüksekliği ve alansal birim 2,5 mL ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilmiştir. Bu nedenle ekstraksiyon solvent hacmi 2,5 mL olarak belirlenmiştir.

Ekstraksiyon koşullarına karar verildikten sonra ortamın bazik ve asidik koşulları için optimizasyonlar yapılmıştır. Öncelikle bazik ortamın optimizasyonu için yapılan 2 ayrı 10 µL ve 20 µL 0,1 M Na₂CO₃ hacim denemelerine göre Şekil 3.12.'deki kromatogramlar incelendiğinde 10 µL kullanılan 0,1 M Na₂CO₃ sonrası kromatogramlarda ekstra pikler gözlenmiş ve gürültü oranında artış tespit edilmiştir. Alansal olarak ise 20 µL 0,1 M Na₂CO₃ kullanımına göre düşük kalmıştır. Bu nedenle düşük gürültü oranı ve alansal artış nedeniyle 20 µL 0,1 M Na₂CO₃ hacmi belirlenmiş olup ortamın pH'ı 9 olarak tespit edilmiştir. Asidik ortamın optimizasyonu için 2 ayrı 50 µL ve 100 µL 0,1 M HClO₄ hacim denemeleri sonrasında Şekil 3.13 incelendiğinde

50 µL ile yapılan ekstraksiyon sonucunda yüksek oranda safsızlıklar gözlemlenmiştir. Bu nedenle ortamın asiditesi 100 µL 0,1 M HClO₄ kullanılarak yapılmıştır.

Ekstraksiyon verimleri kıyaslandığında naltrekson için Şekil 3.14.'te verildiği gibi MTBE ile ekstraksiyonu sonucu % 74,22 bütilasetat ile ekstraksiyonu sonucu ise % 71,66'dır. Sonuçlar incelendiğinde naltrekson analiti için ticari plazmada her iki solventle yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen kromatogramlarda herhangi bir bileşenle girişim yapmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.11). 6-beta-naltreksol için ekstraksiyon verimi Şekil 3.15'te MTBE ile ekstraksiyonu sonucu % 98,35 bütilasetat ile ekstraksiyon sonucu ise % 109,7 bulunmuştur. Şekil 3.11'e bakıldığında 6-beta-naltreksol için bütilasetat ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogramlarda ticari plazmadan gelen bir bileşenle girişim yaptığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ekstraksiyon verimi % 100'ün üzerinde bulunmuştur. Beklenen konsantrasyonun üzerinde bir hesaplama söz konusu olduğu için bütilasetat geliştirilen ekstraksiyon solventi olarak seçilmemiştir. Ayrıca kör örnek ve bütilasetat ekstraksiyon sonucu sonrası elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında ekstra pikler tespit edilmiştir. Bu verilere göre ticari plazmadan farklı bileşenlerin de ekstrakte edildiği gözlemlenmiş ancak MS sistemleri kullanılmadığı için gözlemlenen ekstra piklerin kimliği belirlenememiştir. 6-beta-naltreksol için MTBE ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogram, kör matriks karşılaştırıldığında alıkonma süresinde herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Yapılan optimizasyon sonrasında ekstraksiyon solventi MTBE seçilmiştir.

Geliştirilen LLE yöntemi, ICH Kılavuzlarına göre tamamen valide edilmiş ve yöntemin LOQ değerleri sırasıyla 0,5 ve 0,3 ng/mL, yöntemin LOD değerleri NTX ve 6BNTX için 1 ng/ml bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırıldığında düşük dedeksiyon limitlerine ulaşması ile HPLC kullanılarak yapılan çalışmalara göre geliştirilen yöntemin üstünlüğü belirlenmiştir.

Tez sırasında karşılaşılan sınırlama, çalışma HPLC-UV ile yapıldığından kromatogramlarda tespit edilen safsızlıkların kimliklendirilmesi yapılamamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Naltrekson tedavisine hastaların devam etme oranları düşüktür ve bu nedenle hastaların doktorun önerdiği şekilde naltrekson tedavisine devam etmelerini sağlamak ve bunları kontrol etmek için tayin yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Naltrekson ve ana metaboliti 6-beta-naltreksol için analitik yöntemler mevcuttur ancak oldukça sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemle eş zamanlı olarak hem naltreksonu hem de 6-beta-naltreksol başarıyla düşük dedeksiyon limitlerinde tespit ve tayin edilmiştir. Elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında literatüre alternatif olacağı belirlenmiş olup düşük tayin limitlerine ulaşması nedeniyle gerçek hasta numunelerine uygulanabilir hazır bir yöntemdir.

Analitik yöntemlerle kıyaslandığında geleneksel kullanılan silika teknolojilerine kıyasla bu tez çalışmasında monolitik ve core-shell teknolojiye sahip yeni nesil kolonların üstünlüğü belirlenmiştir. Hızlı, hassas ve seçici analiz imkânı ile laboratuvarda analiz için harcanacak zamanın kısılması ve spesifik olarak hedeflenen analitlerin 10 dk gibi kısa bir sürede tayin edilmesi ile özgünlük yaratmıştır.

Gerçek hasta numunelerinde geniş ve yüksek örnek sayısı ile çalışılmak istenildiği için planlanan bir sonraki aşama ekstraksiyon seviyesini mikro seviyeye indirmek, toksik ve pahalı çözücü miktarlarına sınırlama getirerek sürdürülebilir kimya yöntemleri geliştirmektir.

ÖZET

Yeni Nesil Opioidlerin Bağımlılık Tedavisinde kullanılan Naltrekson ve Metabolitinin Analizleri için Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi

Yeni psikoaktif maddelerden olan Opioid grubu bileşenlerin kullanımı (OUD) gittikçe büyüyen bir küresel problemdir. Bu bağımlılığın önüne geçmek için Naltrekson (NTX), son 50 yıldır yaygın olarak kullanılan bir opioid antagonistidir. Majör metaboliti olan 6-β-Naltreksol uzun biyoyararlanımı sayesinde Naltreksonun gösterdiği etkinin devamlılığını sağlar. Buna rağmen naltrekson ve ana metaboliti olan 6-β-Naltreksol için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri ve analiz teknikleri halen çok sınırlıdır.

Bu çalışma kapsamında sentetik biyolojik numuneler kullanılarak Naltrekson ve ana metaboliti(6-β-Naltreksol) için hassas, hızlı ve düşük tayin sınırlarına ulaşılabilen bir yöntem oluşturularak farklı kromatografik tekniklerle birlikte yeni analitik geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Geliştirilen LLE yöntemi, ICH Kılavuzlarına göre tamamen valide edilmiştir ve yöntemin LOQ değerleri sırasıyla 0,5 ve 0,3 ng/mL, yöntemin LOD değerleri NTX ve 6BNTX için 1 ng/ml bulunmuştur. Validasyon parametreleri optimize edilmiş yöntemin yeterince kesin ve doğru olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 6-β-Naltreksol, HPLC, Naltrekson, plazma, sıvı-sıvı ekstraksiyon

SUMMARY

New Perspectives for the Determination of Naltrexone and Its Metabolite Used in the Treatment of Addiction for New Generation Opioids

Opioids which are classified as new psychoactive substances that use disorder (OUD) is a growing global problem. To prevent this addiction, Naltrexone (NTX) is an opioid antagonist used for treatment that has been widely used for the last 50 years. Thanks to its long bioavailability, 6- β -Naltrexol, the major metabolite, ensures the continuity of the effect of Naltrexone. However, the extraction methods and analysis techniques used for naltrexone and main metabolite 6- β -Naltrexol are still very limited.

In this study, it is aimed to develop new methodologies with different chromatographic techniques by creating a sensitive, fast, and low detection limit for Naltrexone and its main metabolite (6- β -Naltrexol) using commercial plasma. The developed LLE method was fully validated according to the ICH Guidelines and the LOQ of the method was 0.5 and 0.3 ng/mL respectively, LOD of the method was found 1 ng/ml for NTX and 6BNTX. The validation characteristics showed that optimized method is precise and accurate enough.

Keywords: 6- β -Naltrexol, HPLC, liquid liquid extraction, Naltrexone, plasma

KAYNAKLAR

- ABDEL-GAWAD SA, EL-GAMAL RM (2018). Simultaneous determination of naltrexone and bupropion in their co-formulated tablet utilizing green chromatographic approach with application to human urine. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **26(2)**: 169-176. doi:10.1016/j.jsps.2017.12.014
- ALSHOGRAN OY, ZAYED AL (2019). A Simple HPLC-MS/MS Method for Quantification of Naltrexone and 6-beta Naltrexol: An Application to Effect of Uremic Toxins on Metabolic Reduction. *Journal of Young Pharmacists*, **11(3)**: 261-265. doi:10.5530/jyp.2019.11.53
- ALVAREZ-RIVERA F, SERRO AP, SILVA D, CONCEIRO A, ALVAREZ-LORENZO C (2019). Hydrogels for diabetic eyes: Naltrexone loading, release profiles and cornea penetration. *Materials Science and Engineering C*, **105**: 1-9. doi:10.1016/j.msec.2019.110092
- ANDERSON BJ, COTÉ CJ. (2019). Pharmacokinetics and Pharmacology of Drugs Used in Children. (Ed. Sixth Edit): Elsevier Inc.
- ANDHARIYA JV, SHEN J, CHOI S, WANG Y, ZOU Y, BURGESS DJ (2017). Development of in vitro-in vivo correlation of parenteral naltrexone loaded polymeric microspheres. *Journal of Controlled Release*, **255**: 27-35. doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.396
- BENARROCH EE (2012). Endogenous opioid systems: Current concepts and clinical correlations. *Neurology*, **79(8)**: 807-814. doi:10.1212/WNL.0b013e3182662098
- BREYER-PFAFF U, NILL K (2010). Carbonyl reduction of naltrexone and dolasetron by oxidoreductases isolated from human liver cytosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56(12)**: 1601-1606. doi:10.1211/0022357045020
- BRÜNEN S, KRÜGER R, FINGER S, KORF F, KIEFER F, WIEDEMANN K, LACKNER KJ, HIEMKE C (2010). Determination of naltrexone and 6 β -naltrexol in human blood: Comparison of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and tandem-mass-spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396(3)**: 1249-1257. doi:10.1007/s00216-009-3301-z
- BURESH M, STERN R, RASTEGAR D (2021). Treatment of opioid use disorder in primary care. *Bmj*: n784-n784. doi:10.1136/bmj.n784
- CANSIZ D, EMEKLI ALTURFAN E, ALTURFAN AA (2021). Effects of Endogenous Opioids on Pain Mechanism. *Experimed*, **11(1)**: 49-56. doi:10.26650/experimed.2021.884254
- CASELY E, LAYCOCK H (2022). Opioids in pain medicine. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, **23(7)**: 384-390. doi:10.1016/j.mpaic.2022.03.004
- CDC (2016). Module 5 : Assessing and Addressing Opioid Use Disorder (OUD) Assessing and Addressing Opioid Use Disorder (OUD) CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain Opioid Misuse in the United States.
- CENTER FOR SUBSTANCE ABUSE T (2009). Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice. *Center for Substance Abuse Treatment*, **114**: 126-126.
- CHAN CF, CHISWELL GM, BENCINI R, HACKETT LP, DUSCI LJ, ILETT KF (2001). Quantification of naltrexone and 6 β -naltrexol in plasma and milk using gas chromatography-mass spectrometry: Application to studies in the lactating sheep. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **761(1)**: 85-92. doi:10.1016/S0378-4347(01)00309-7
- CLAVIJO C, BENDRICK-PEART J, ZHANG YL, JOHNSON G, GASPARIC A, CHRISTIANS U (2008). An automated, highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of the opiate antagonist naltrexone and its major metabolite 6 β -naltrexol in dog and human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **874(1-2)**: 33-41. doi:10.1016/j.jchromb.2008.08.021
- CORDER G, CASTRO DC, BRUCHAS MR, SCHERRER G (2018). Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annual Review of Neuroscience*, **41**: 453-473. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061522
- DILBAZ N. (2012). Madde Bağımlılığında Korunma ve Tedavi İlkeleri. (Ed.).
- EDINOFF AN, NIX CA, ORELLANA CV, STPIERRE SM, CRANE EA, BULLOCH BT, CORNETT EM, KOZINN RL, KAYE AM, MURNANE KS, KAYE AD (2022). Naltrexone Implant for Opioid Use Disorder. *Neurology International*, **14(1)**: 49-61. doi:10.3390/neurolint14010004

- ELCHAAR GM, MAISCH NM, GIANNI AUGUSTO LM, WEHRING HJ (2006). Efficacy and safety of naltrexone use in pediatric patients with autistic disorder. *Annals of Pharmacotherapy*, **40**(6): 1086-1095. doi:10.1345/aph.1G499
- EMA (2014). Mysimba recommended for approval in weight management in adults **44**: 19-20.
- EMC (2016). [Accord Healthcare Limited, Naltrexone Hydrochloride 50 mg Film -Coated Tablets].
- ERIN C. STRICKLAND GLMOTC (2016). A Rapid, Selective, and Sensitive Method for the Analysis of Naltrexone and 6 β -Naltrexol in Urine. *Special Issues*, **14**(1): 14-24.
- EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR D, DRUG A. (2022). European Drug Report 2022: Trends and Developments, Publications Office of the European Union. (Ed.).
- FARID W, DUNLOP S, TAIT R, HULSE G (2008). The Effects of Maternally Administered Methadone, Buprenorphine and Naltrexone on Offspring: Review of Human and Animal Data. *Current Neuropharmacology*, **6**(2): 125-150. doi:10.2174/157015908784533842
- GONZALEZ JP, BROGDEN RN (1988). Naltrexone: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of Opioid Dependence. *Drugs*, **35**(3): 192-213. doi:10.2165/00003495-198835030-00002
- GUMUSTAS M, OZKAN S (2011). The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, **5**(1): 1-21. doi:10.2174/187406500115010001
- HARM REDUCTION I. (2011). Global State of Harm Reduction 2020. (Ed.).
- HARRISON JE, WEBER S, JAKOB R, CHUTE CG (2021). ICD - 11 : an international classification of diseases for the twenty - first century. *BMC Medical Informatics and Decision Making*: 1-10. doi:10.1186/s12911-021-01534-6
- HARRISON TK, KORNFELD H, AGGARWAL AK, LEMBKE A (2018). Perioperative Considerations for the Patient with Opioid Use Disorder on Buprenorphine, Methadone, or Naltrexone Maintenance Therapy. *Anesthesiology Clinics*, **36**(3): 345-359. doi:10.1016/j.anclin.2018.04.002
- HEINÄLÄ P, LAHTI T, SINCLAIR D, ARINIEMI K, LILLSUNDE P, ALHO H (2012). Analysis of naltrexone and its metabolite 6-beta-naltrexol in serum with high-performance liquid chromatography. *BMC Research Notes*, **5**. doi:10.1186/1756-0500-5-439
- HIGGINBOTHAM JA, MARKOVIC T, MASSALY N, MORÓN JA, REED B (2022). Endogenous opioid systems alterations in pain and opioid use disorder. : 1-24. doi:10.3389/fnsys.2022.1014768
- HOPWOOD M, TRELOAR C. (2013). International Policies to Reduce Illicit Drug-Related Harm and Illicit Drug Use. (Ed.): Elsevier Inc.
- HUA Y, WANG Z, WANG D, LIN X, LIU B, ZHANG H, GAO J, ZHENG A (2021). Key Factor Study for Generic Long-Acting PLGA Microspheres Based on a Reverse Engineering of Vivitrol®. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **26**(5). doi:10.3390/molecules26051247
- HUNTER RP, KOCH DE, MUTLOW A, ISAZA R (2003). Extraction and quantitation of carfentanil and naltrexone in goat plasma with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **793**(2): 351-355. doi:10.1016/S1570-0232(03)00351-9
- ICH EMA. (1995). ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures. (Ed.).
- KAMBIA K, BAH S, DINE T, AZAR R, ODOU P, GRESSIER B, LUYCKX M, BRUNET C, BALLESTER L, CAZIN M, CAZIN JC (2000). High-performance liquid chromatographic determination of naltrexone in plasma of hemodialysis patients. *Biomedical Chromatography*, **14**(3): 151-155. doi:10.1002/1099-0801(200005)14:3<151::AID-BMC941>3.0.CO;2-E
- KAUFMAN JJ SNMKWS (1975). Microelectrometric titration measurement of the pKa's and partition and drug distribution coefficients of narcotics and narcotic antagonists and their pH and temperature dependence. *J Med Chem*, **18**(7): 647-655.
- KOSSOSKI ADC, PONTAROLO R, BARREIRA SMW, GERMANO S, MALUF DF (2013). Analytical validation of a quantification method by uv-vis spectrometry of naltrexone hydrochloride in capsules. *Latin American Journal of Pharmacy*, **32**(4): 616-620.
- KOSTEN TR, GEORGE TP (2002). The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Science & practice perspectives*, **1**(1): 13-20. doi:10.1151/spp021113
- LAMBERT DG (2008). The nociceptin/orphanin FQ receptor: A target with broad therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**(8): 694-710. doi:10.1038/nrd2572
- LEE B, ELSTON DM (2019). The uses of naltrexone in dermatologic conditions. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **80**(6): 1746-1752. doi:10.1016/j.jaad.2018.12.031

- LIM AC, GRODIN EN, GREEN R, VENEGAS A, LINDSAY R, COURTNEY KE, MOALLEM NR, SAYEGH P, LONDON ED, RAY LA, ANGELES L, ANGELES L, DIEGO S, DIEGO S, SCIENCES B, PHARMACOLOGY M, ANGELES L (2021). HHS Public Access. **46(5)**: 565-576. doi:10.1080/00952990.2020.1741002.Executive
- LISKA DAJ (1998). The detoxification enzyme systems. *Alternative Medicine Review*, **3(3)**: 187-198.
- LIU JC, MA JD, MORELLO CM, ATAYEE RS, BEST BM (2014). Naltrexone metabolism and concomitant drug concentrations in chronic pain patients. *Journal of Analytical Toxicology*, **38(4)**: 212-217. doi:10.1093/jat/bku019
- MOONEY LJ, SAXON A. (2018). State-of-the-art treatment of opioid use disorder. (Ed.): Elsevier Inc.
- NIH. (2018). Naltrexone implant, 200 mg, NDC:6 9 36 4-3143, Complete Pharmacy and Medical Solution
- NOROUZI P, GANJALI MR, ZARE M, MOHAMMADI A (2007). Nano-level detection of naltrexone hydrochloride in its pharmaceutical preparation at Au microelectrode in flowing solutions by fast Fourier transforms continuous cyclic voltammetry as a novel detector. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96(8)**: 2009-2017. doi:10.1002/jps.20851
- PASTERNAK GW, PAN YX (2013). Mu opioids and their receptors: Evolution of a concept. *Pharmacological Reviews*, **65(4)**: 1257-1317. doi:10.1124/pr.112.007138
- PEW CHARITABLE T (2020). Opioid Use Disorder Treatment in Jails and Prisons. **2009**.
- PORTER SJ. (2010). *The in vitro and in vivo Formation and Potency of 6 β -Naltrexol , the Major Human Metabolite of Naltrexone.*
- PORTER SJ, SOMOGYI AA, WHITE JM (2000). Naltrexone in Human Liver Cytosol. *Science*.
- PRADHAN AA, BEFORT K, NOZAKI C, GAVÉRIAUX-RUFF C, KIEFFER BL (2011). The delta opioid receptor: An evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, **32(10)**: 581-590. doi:10.1016/j.tips.2011.06.008
- PUBCHEM. (2022). National Center for Biotechnology for Information, PubChem Compound Summary for CID 5360515, Naltrexone. Retrieved December 28, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naltrexone>
- QUINN DI, WODAK A, DAY RO (1997). Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clinical Pharmacokinetics*, **33(5)**: 344-400. doi:10.2165/00003088-199733050-00003
- REZAEI M, ABDI K, DINARVAND R, VOSOUGH-GHANABRI S, AMINI M (2009). A Simple and sensitive analytical method for determination of naltrexone level in plasma by GC-MS. *Chromatographia*, **70(9-10)**: 1491-1494. doi:10.1365/s10337-009-1309-3
- ROYAL SOCIETY OF C (2022). [Chemspider].
- SAMHSA. (2021). TIP 63: Medications for Opioid Use Disorder Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (Ed.): PEP21-02-01-002.
- SEGNEANU AE, ORBECI C, LAZAU C, SFIRLOAGA P, VLAZAN P, BANDAS C, GROZESCU I (2013). Methods Validation. *Web of science*: 29-29.
- SHARIFI F, OTTE A, YOON G, PARK K (2020). Continuous in-line homogenization process for scale-up production of naltrexone-loaded PLGA microparticles. *Journal of Controlled Release*, **325**: 347-358. doi:10.1016/j.jconrel.2020.06.023
- SHARMA B BABGFM (2017). Opioid Use Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2016 Jul;25(3):473-87. *Physiology & behavior*, **176(12)**: 139-148. doi:10.1016/j.chc.2016.03.002.Opioid
- SLAWSON MH, CHEN M, MOODY DE, COMER SD, NUWAYSER ES, FANG WB, FOLTZ RL (2007). Quantitative analysis of naltrexone and 6 β -naltrexol in human, rat, and rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with application to the pharmacokinetics of Depotrex® in rabbits. *Journal of Analytical Toxicology*, **31(8)**: 453-461. doi:10.1093/jat/31.8.453
- SOFUOGLU M, DEVITO EE, CARROLL KM (2019). Pharmacological and Behavioral Treatment of Opioid Use Disorder. *Psychiatric Research and Clinical Practice*, **1(1)**: 4-15. doi:10.1176/appi.prpc.20180006
- STRANG J, VOLKOW ND, DEGENHARDT L, HICKMAN M, JOHNSON K, KOOB GF, MARSHALL BDL, TYNDALL M, WALSH SL (2020). Opioid use disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, **6(1)**. doi:10.1038/s41572-019-0137-5
- TOENNES SW, KAUERT GF, GRÜSSER SM, JÄKEL W, PARTECKE G (2004). Determination of naltrexone and 6- β -naltrexol in human plasma following implantation of naltrexone pellets

- using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**(1): 169-176. doi:10.1016/j.jpba.2004.01.013
- TOUBIA T, KHALIFE T (2019). The Endogenous Opioid System: Role and Dysfunction Caused by Opioid Therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **62**(1): 3-10. doi:10.1097/GRF.0000000000000409
- TRIGO JM, MARTIN-GARCÍA E, BERRENDERO F, ROBLEDO P, MALDONADO R (2010). The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, **108**(3): 183-194. doi:10.1016/j.drugalcdep.2009.10.011
- UNODC. (2021). Drug Market Trends : Cannabis Opioids. (Ed.).
- VALIVETI S, NALLURI BN, HAMMELL DC, PAUDEL KS, STINCHCOMB AL (2004). Development and validation of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantitation of naltrexone and 6 β -naltrexol in guinea pig plasma. *Journal of Chromatography B*, **810**(2): 259-267. doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.016
- VEREBEY K (1981). Quantitative determination of naltrexone, 6 β -naltrexol and 2-hydroxy-3-methoxy-6 β -naltrexol (HMN) in human plasma, red blood cells, saliva and urine by gas liquid chromatography. *NIDA Research Monograph Series*, **No. 28**: 36-51.
- WHO (2009). Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioid Dependence, ICD-10 codes for conditions covered in these guidelines
- WILLEMSSEN-SWINKELS SHN, BUITELAAR JK, VAN ENGELAND H (1996). The effects of chronic naltrexone treatment in young autistic children: A double-blind placebo-controlled crossover study. *Biological Psychiatry*, **39**(12): 1023-1031. doi:10.1016/0006-3223(95)00297-9
- YOUNGER J, PARKITNY L, MCLAIN D (2014). The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. *Clinical Rheumatology*, **33**(4): 451-459. doi:10.1007/s10067-014-2517-2
- ZHANG JJ, SONG CG, DAI JM, LI L, YANG XM, CHEN ZN (2022). Mechanism of opioid addiction and its intervention therapy: Focusing on the reward circuitry and mu-opioid receptor. *MedComm*, **3**(3): 1-31. doi:10.1002/mco2.148
- ZUCCARO P, ALTIERI I, BETTO P, PACIFICI R, RICCIARELLO G, PINI LA, STERNIERI E, PICHINI S (1991). Determination of naltrexone and 6 β -naltrexol in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **567**(2): 485-490. doi:10.1016/0378-4347(91)80156-7