



**GLİSİN, GABA, GLUTAMAT VE SERİN'İN KULOMETRİK
DETEKTÖRLÜ SIVI KROMATOĞRAFİSİ KULLANILARAK
MİKRODİYALİZ ÖRNEKLERİNDEN TAYİNİ**

Wlaa ALQASIM

Yüksek Lisans Tezi

Eskişehir 2022

**GLİSİN, GABA, GLUTAMAT VE SERİN'İN KULOMETRİK DETEKTÖRLÜ
SIVI KROMATOĞRAFİSİ KULLANILARAK MİKRODİYALİZ
ÖRNEKLERİNDEN TAYİNİ**

Wlaa ALQASIM

Yüksek Lisans Tezi

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Şubat 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Wlaa ALQASIM'ın "Glisin, GABA, Glutamat ve Serin'in kulometrik detektörlü sıvı kromatografisi kullanılarak mikrodiyaliz örneklerinden tayini" başlıklı tezi 04.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. Erol ŞENER
Üye	: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR
Üye	: Doç. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

GLİSİN, GABA, GLUTAMAT VE SERİN'İN KULOMETRİK DETEKTÖRLÜ SIVI KROMATOĞRAFİSİ KULLANILARAK MİKRODİYALİZ ÖRNEKLERİNDEN TAYİNİ

Wlaa ALQASIM

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2022

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erol ŞENER

Amino asitler beyinde en çok bulunan nörotransmitterlerdir. Bu nedenle, beyin hücre dışı konsantrasyonlarının ölçülmesi sinirbilim alanında ilgi konusudur. Uyarıcı amino asitlerin seviyesinde bir artış veya inhibe edici asitlerin seviyesinde bir azalma meydana gelirse epilepsi hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, mikrodializ numunelerinde amino asitlerin beyin dokularındaki tayini için ön kolon *o*-ftalaldehit ile türevlendirme kullanılarak ve elektrokimyasal saptama ile ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem sırasında sabit faz olarak bir silika Agilent Zorbax Eclipse C18 (3.0mm x 150 mm, 5 µm partikül boyutuna) kolonu, hareketli faz olarak ise gradiyent elünte kullanılmıştır. Çalışma tamponu olarak fosfat tamponu (50 mM, pH: 6,5) belirlenmiştir. 0,8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. 10 µL enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

Geliştirilen yöntem ilgili ICH kılavuzu'ne göre valide edilmiş; yöntem kesinlik, doğruluk, doğrusallık, seçicilik parametreleri yönünden uygun bulunmuştur. Saptama sınırı ve tayin sınırı değerleri sırasıyla Glutamik Asit 0,02 µg/mL ve 0,06 µg/mL, Glisin için 0,05 µg/mL ve 0,02 µg/mL'dir. Gamma aminobutirik asit için 0,3 µg/mL ve 1,01 µg/mL, Serin için 0,13 µg/mL ve 0,4 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,05-2 µg/mL bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Amino Asit, HPLC-EKD, Mikrodializ, Epilepsi, *o*-ftalaldehit.

ABSTRACT

Determination of Glycine, GABA, Glutamate and Serine from microdialysis samples using liquid chromatography with coulometric detector

Wlaa ALQASIM

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, February 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erol ŞENER

Amino acids are the most abundant neurotransmitters in the brain. Therefore, the measurement of Amino acids concentrations in the brain extracellular is of importance in the field of neuroscience. Epilepsy occurs whenever an increase in the level of excitatory amino acids or a decrease in the level of inhibitory acids. In this study, the reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrochemical detection method has been developed for the determination of amino acids in microdialysis samples of brain tissues, utilized derivatization with front column *o*-ftalaldehit and electrochemical detection. The chromatographic separation was performed on, a silica Agilent Zorbax Eclipse C18 (3.0mm x 150 mm, 5 µm particle size) column, using phosphate buffer (50 mM, pH: 6,5) was determined as working buffer. The method was conducted in a gradient mode with a flow rate 0,8 ml/min, 10 µL injection volume, and 40°C.

The method was developed and validated, according the ICH guideline; Analytical parameters system suitability, specificity, linearity, precision, repeatability accuracy, LOD/LOQ and stability of standard solution were determined by validation procedure and found to be satisfactory. The values of the detection limit and quantity limitations were calculated as follows 0,02 µg/mL, 0,06 µg/mL for Glutamic acid, 0,05 µg/mL, 0,02 µg/mL for Glisine, 0,3 µg/mL, 1,01 µg/mL for Gamma aminobutiric acid, 0,13 µg/mL, 0,4 µg/mL for Serine. The linearity range of the method was 0,05-2 µg/mL.

Keywords: Amino acid, HPLC-ECD, Microdialysis, Epilepsy, *o*-ftalaldehit.

TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca sabır ve ilgiyle bana yardımcı olan, her zaman bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli hocam Erol ŞENER'e,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına ve arkadaşlarıma ve her zaman benim destekleyicim olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1. Amino Asitler Genel Bilgi.....	2
2.1.1. Glutamat.....	2
2.1.2. Glisin.....	3
2.1.3. Gama aminobütirik asit.....	4
2.1.4. Serin.....	4
2.2. Amino Asit Reseptörleri.....	5
2.2.1. Glutamat reseptörü.....	5
2.2.2. Glisin reseptörü.....	6
2.2.3. GABA reseptörleri.....	6
2.2.3.1. <i>GABA_A</i> reseptörü.....	6
2.2.3.2. <i>GABA_B</i> reseptörü.....	7
2.2.3.3. <i>GABA_C</i> reseptörü.....	7
2.3. Amino Asitlerin Metabolizması.....	7
2.3.1. Glutamat metabolizması.....	7
2.3.2. GABA'in metabolizması.....	7
2.3.3. Glisin'in metabolizması.....	8
2.3.4. Serin'nin metabolizması.....	8

	<u>Sayfa</u>
2.4. Epilepsi.....	8
2.5. Ortho-Phthalaldehyde (OPA)	9
2.6. Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	10
2.7. Amino Asit Tayini ile İlgili Çalışmalar.....	11
2.8. Mikrodiyaliz (MD)	16
2.9. Elektrokimyasal Dedektör.....	17
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	18
3.1. Kimyasal Maddeler.....	18
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	19
3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
3.4. Türevlendirme Ajanları.....	20
3.5. OPA Türev Çözeltisinin Hazırlanması.....	20
3.6. Çalışma Tamponu.....	20
3.7. Kromatografik Koşullar.....	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Yöntemin Optimizasyonu.....	24
4.2.1. Kesinlik.....	24
4.2.2. Doğruluk.....	26
4.2.3. Doğrusallık.....	26
4.2.4. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	29
4.2.5. Seçicilik.....	29
4.3. Mikrodiyaliz Örneklerin Analizi.....	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKÇA.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Optimum YPSK koşulları.....	22
Çizelge 4.2. AA'lerin ve IS tayininde kullanılan gradient programı.....	22
Çizelge 4.3. Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları.....	23
Çizelge 4.4. GA'in doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	24
Çizelge 4.5. Serin'in doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	25
Çizelge 4.6. GLY'in doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	25
Çizelge 4.7. GABA'in doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	26
Çizelge 4.8. GA'in doğrusallık sonuçları.....	27
Çizelge 4.9. Serin'in doğrusallık sonuçları.....	27
Çizelge 4.10. GLY'in doğrusallık sonuçları.....	28
Çizelge 4.11. GABA'in doğrusallık sonuçları.....	28
Çizelge 4.12. Mikrodiyaliz örneklerin sonuçları.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. GA'in molekül formülü.....	2
Şekil 2.2. GLY'in molekül formülü.....	3
Şekil 2.3. GABA'nın molekül formülü.....	4
Şekil 2.4. Serin'in molekül formülü.....	5
Şekil 2.5. OPA (o- ftaldaldehit), 2-merkaptetanol varlığında bir amino asit ile reaksiyonu.....	10
Şekil 2.6. Elektrokimyasal dedektör (EKD).....	17
Şekil 4.1. AA (0.1 µg/mL) ve IS (5 µg/mL) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı	23
Şekil 4.2. Boş örnek kromotogramı (a), İç standart kromotogramı (b), AA (0.1 µg/mL) ve IS (5 µg/mL) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı (c).....	30
Şekil 4.3. Mikrodiyaliz örneklerinde optimum koşullarda yürütülen bir analizinden elde edilen kromatogramı	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Amino Asit
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
ECD	: Elektro kimyasal Dedektörü
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic asid
GA	: Glutamik Asit
GABA	: Gamma Aminobütirik Asit
GAD	: Glutamat Dekarboksilaz
G. K	: Geri Kazanım
GLY	: Glisin
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı
IS	: İç Standart
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MeOH	: Metanol
2-MCE	: 2-Merkaptoetanol
n	: Deney Sayı
OPA	: Ortho-Phthalaldehyde
ort	: Ortalama
r^2	: Tayin Katsayısı
ss	: Standart Sapma
SIA	: Sıralı enjeksiyon analizi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amino asitler beyinde en çok bulunan nörotransmitterlerdir. Nörotransmitterler sentezlenir ve presinaptik terminalerde depolanır ve postsinaptik hücrelerdeki spesifik reseptörlerle stimülasyon üzerine terminalerden salınır. Çeşitli amino asitlerin [örn., Glutamat (Glu), glisin (Gly), ve γ -aminobütirik asit (GABA), serin 'nın, beyin nörotransmisyonunda ve farklı alanlarda önemli rol oynar. Bu nedenle, beyin hücre dışı konsantrasyonlarının ölçülmesi, sinirbilim alanında ilgi konusudur (Piepponen ve Skujins, 2001).

Amino asitlerin genel eksikliği konsantrasyon bozukluğuna, motivasyon kaybına, uykusuzluğa, duyu bozukluklarına, anksiyeteye, depresyona neden olabilen beyin aktivitesi için hayati öneme sahiptir. Amino asitler sinir sistemi için gerekli nörotransmitterlerin üretimi için gereklidir ve önemli proteinlerin yapımında rol alırlar. Kötü beslenme, amino asit eksikliğine yol açabilir ve amino asit eksikliği için genetik bir potansiyele yol açabilir. Amino asit kullanımı, paroksizmal bozukluklar ve epilepsinin psikopatolojik bileşenleri üzerinde büyük ölçüde etkilidir. Ayrıca, amino asitler genelleşmiş epilepsiyi fokal epilepsiye dönüştürmede ve epileptik nöbet sıklığını azaltmada etkili olabilir (Ebrahim ve Ebrahimi, 2015).

Mikrodiyaliz, çeşitli farmakolojik veya fizyolojik manipülasyonlar sırasında amino asit nörotransmitterlerinin hücre dışı konsantrasyonunun belirlenmesine izin veren güçlü bir tekniktir. Mikro diyaliz numunelerinde nispeten düşük konsantrasyonlarda amino asit varlığı, bunların belirlenmesi için hassas bir analitik yöntem gerektirmektedir. Ön kolon türevlendirme ve elektrokimyasal saptama ile ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), mikrodiyaliz yöntemi amino asitlerin analizi için tercih edilen yöntemlerdir. Bu çalışmada, 5 μ m partikül boyutuna sahip bir silika Agilent Zorbax Eclipse C18 (3.0mm x 150 mm) kolon üzerinde gradient kromatografi ve YPSK elektrokimyasal dedektör (EKD) kullanılmıştır. Amino asitler *o*-ftalaldehit (OPA) ile türevlendirilmiştir (Piepponen ve Skujins, 2001).

Bu çalışmanın amacı, beyin alanlarında amino asitlerin tayini için (GABA, GA, serin ve GLY)'nin önerilen (OPA) türevlendirme reaksiyonu kullanılarak güvenilir, basit, doğru, daha hızlı ve ekonomik bir gradient YPKS-EKD yöntemi geliştirmektir.

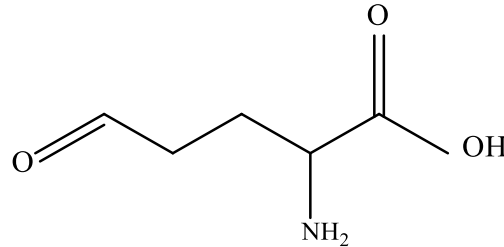
2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Amino Asitler Genel Bilgi

Amino asitler (AA) proteinin yapı taşlarıdır ve metabolik işlemlerde önemlidirler. Amino asitler ayrıca canlı organizmaların büyük kısmını oluştururlar. Bazı hastalıklarda ve parenteral nütrisiyonda gerekli olan amino asitlerin gereksinimi gıda ile karşılanmıyorsa gerektiğinde aminoasitler takviye edilmelidir. Amino asitler aynı zamanda ilaç ve hammadde olarak kullanılır. Bu nedenle, farmasötik kullanım maddeleri olarak muamele edilmeleri ve buna göre Farmakope'de tek parça haline getirilerek tutulmaları gereklidir (European Pharmacopoeia 8th EditionEDQM, Strasbourg, 2016).

2.1.1. Glutamat

Kimyasal adı 2-Aminopentandioik asit ve kimyasal formülü $C_5H_9NO_4$. 147, 13 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Şekil 2.1.'de GA'in molekül formülü görülmektedir. Beyaz kristal toz şeklindedir, suda çözünür (8,64 mg/mL). pKa değeri a-karboksilik asit için (2,10), a-amino (9,47), yan zincir (4,07'dir). Polar özellik gösteren bir amino asittir.



Şekil 2.1. GA'in molekül formülü (<http-3>)

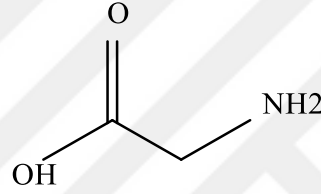
Glutamat esansiyel olmayan amino asitlerden biridir. L-Glutamat, beyinde en çok bulunan serbest amino asittir ve omurgalı merkezi sinir sisteminin baskın uyarıcı nörotransmitterlerindedir. Birçok işlevi arasında L-Glutamat, sinaptik bakım ve plastiklikte kritik bir rol oynar (McDonald ve Johnston, 1990).

NMDA reseptörleri uyarıldığında, hücre içine Na^+ ve Ca^{2+} geçişini artırarak hücrenin depolarizasyonuna neden olur (Willetts, Balster ve Leander, 1990).

Glutamat nöronları spesifik olarak serebral kortekste bulunur. Patolojik koşullar altında, L-Glutamat ve diğer uyarıcı amino asitlerin aşırı salınımı, sinir hücrelerinin aşırı uyarılmasından dolayı beyinde eksitotoksik lezyonlara yol açabilir. Eksitotoksitenin travma, inme, epilepsi ve hipoglisemi gibi hastalıklarda ortaya çıkan nöral hasarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Meldrum, 1993).

2.1.2. Glisin

Kimyasal adı 2-Aminoetanoik asit ve kimyasal formülü $C_2H_5NO_2$ 'dir. 75,067 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Suda iyi çözünür (24,99 g / 100 mL 25°C'de). Erime noktası 233°C'dir. Renksiz, kokusuz, tatlı tatlandırıcı kristal şekilde katı bir amino asittir. Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi apolar bir amino asittir.



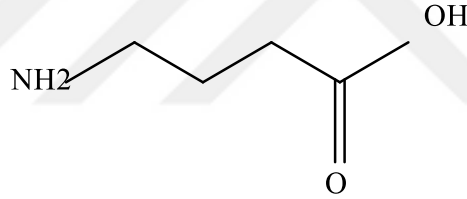
Şekil 2.2. Gly'nin molekül formülü(<http-4>)

Glisin, bir amino grubu ve bir karbon atomuna bağlı bir karboksil (asidik) grubundan oluşan en basit amino asittir. Memelilerde glisin, gerekli olmayan amino asitlere aittir (Vannier ve Triller, 1997). Glisin amino asidi, sinir sistemi tarafından kullanılır ve epileptik nöbetlerin önlenmesinde, sinir sisteminde bir nörotransmitter inhibitörü olarak fonksiyon gösterir aynı zamanda manik depresyon ve hiperaktiviteyi tedavide kullanılır. Glisin, merkezi sinir sisteminde, özellikle omurilik, beyin kökü ve retinada kendi reseptörüne bağlandığında klorür iletkenliklerini aktive eden önemli bir inhibe edici nörotransmitterdir. Glisin, hücrelerdeki birçok makro molekül için önemli bir bileşendir. Doğadaki en basit amino asittir, D veya L kimyasal konfigürasyonu yoktur. Glisin, vücuttaki endojen sentezinin varlığından dolayı geleneksel olarak memeliler (insanlar, domuzlar ve kemirgenler dahil) için esinseyel olarak gerekli olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılmıştır. Glisin, vücut proteinlerinde toplam amino asitlerin %11,5'ini ve amino asit azotunun %20'sini temsil eder. Glisinin faydaları şu şekildedir:

1. Glisin, beyinde çalışarak potasyum ve klorürü ortadan kaldırıp sinir sisteminin aşırı uyarılmasını durdurur.
2. Doku hasarını önler.
3. Anti-oksidatif kapasiteyi artırır.
4. Protein sentezini arttırır ve yara iyileşmesini hızlandırır.
5. Bağışıklığı kuvvetlendirir.
6. Kanserler ve çeşitli enflamatuar hastalıklardaki metabolik bozuklukları tedavi eder (Wang ve Wu, 2013).

2.1.3. Gama aminobütirik asit

Kimyasal adı 4-Aminobutanoik asit ve kimyasal formülü $C_4H_9NO_2$ 'dir. 103,120 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir. Şekil 2.3'te GABA'nın molekül formülü görülmektedir. Beyaz mikrokristal toz şeklindedir. 130 g/100mL suda çözünür. PKa değeri karboksil grubu 4,031, amino grubu 10,556'dır.

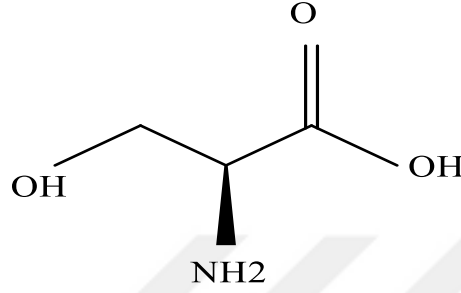


Şekil 2. 3. GABA'nın molekül formülü(<http-5>)

GABA, beyindeki en yaygın engelleyici nörotransmitterdir. GABA 1883'te keşfedilmiş ve inhibe edici işlevi 1950'lerin sonlarında ilk kez beyinde tespit edilerek Bazemore ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (Bazemore ve Elliott vd, 1956). Omurgalı ve omurgasızların sinir sistemlerinde nörotransmitter olarak kullanılan ilk amino asittir. GABA protein olmayan bir amino asittir. Son yıllarda, benzodiazepinler gibi ilaçların GABA'nın etkilerini arttırdığı tespit edilmiş ve bu ilaçlar epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Michaeli ve Fromm, 2015). GABA, prokaryotlarda ve ökaryotlarda serbest amino asit havuzunun önemli bir parçasıdır. GABA, hayvanların beyin hücrelerinde, aynı bölgedeki diğer nörotransmitterlerden yaklaşık 1000 kat daha fazla olan yüksek konsantrasyonda bulunur (Zanan ve John vd, 2018, Moss vd, 1996).

2.1.4. Serin

Kimyasal adı 2-Amino-3-hidroksipropanoik asittir. $C_3H_7NO_3$ kimyasal formülüne sahip, 105,09 g/mol moleküler ağırlığında bir amino asittir. Beyaz katı kristal görünümlüdür. Suda iyi çözülür 360g/100mL. PKa değeri karboksil grubu 2,21, amino grubu 9,15'tir. Proteinlerin biyosentezinde kullanılan bir polar α -amino asittir.



Şekil 2.4. Serin'in molekül formülü (<http-2>)

Serin, gıdalardan temin edilen veya vücut tarafından glisin de dahil olmak üzere bir dizi metabolitlerden sentezlenen, gerekli olmayan bir amino asittir. Serin; soya fasulyesi, fındık (özellikle yer fıstığı, badem ve ceviz), yumurta, nohut, mercimek, et ve balıkta (özellikle kabuklu deniz hayvanlarında) bulunur. Yeterli miktarda alınmadığında vücut tarafından üretilir. Çoğu amino asitte olduğu gibi serin içeren yiyecekler alındığında, molekül ince bağırsakta ekstrakte edilir ve dolaşım esnasında emilir. Glisin vücutta dolaştığı esnada kan-beyin bariyerini geçer ve diğer birçok molekülle metabolize olduktan nöronlara geçer. Böylece hücrelerdeki serin miktarı bu metabolik süreçlerle düzenlenir. Çok fazla alındığında, sadece bir kısmı glisine dönüştürülür ve geri kalanı folat ve diğer birçok proteine metabolize edilir (Kapalka, 2010).

2.2. Amino Asit Reseptörleri

2.2.1. Glutamat reseptörü

Merkezi sinir sistemindeki uyarıcı iletimin birincil araçlarıdır ve çoğunlukla astrositler ve oligodendrositler gibi postsinaptik nöronal ve glial hücrelerin dendritlerinde bulunur. İki sınıf reseptörden oluşur; birincisi ligand kapılı iyon kanalları (iyonotropik reseptörler) ve ikincisi G-protein bağlı (metabotropik) reseptörlerdir. Glutamat reseptörleri; iyonotropik reseptörler, metil-D-aspartat (NMDA), amino-3-hidroksi-5-

metilizoksazolpropiyonik asit (AMPA), kainat N -metil- d-ve quisqualate reseptörlerinden oluşur.

İyonotropik reseptörlerin kendileri ligand kapılı iyon kanallarıdır, yani kanallar yalnızca glutamat gibi bir ligand molekülünün bağlanmasına karşı açılır. Ligand reseptöre bağlandığında, Na⁺ ve Ca²⁺ gibi yüklü iyonlar reseptör kompleksinin merkezindeki bir kanaldan geçer. Bu iyon akışı, plazma zarının depolarizasyonuna ve nöron sürecinde (dendritler ve aksonlar) bir sonraki elektrik akımının oluşmasına neden olur. Glutamat reseptörleri, nöronal gelişim, sinaptik plastisite, eksitotoksisite, ağrı algılama, öğrenme ve hafıza için gereklidir (Jonas ve Monyer, 1999).

2.2.2. Glisin reseptörü

Glisin reseptörleri (GlyR'ler), omurilikte ve beyin sapında hızlı inhibe edici nörotransmisyonu aracılık eden ligand kapılı klorür iyon kanallarıdır (Avila vd, 2013).

2.2.3. GABA reseptörleri

GABA erjik nörotransmisyonla ilgili üç tip reseptör vardır: GABA_A, GABA_B ve GABA_C. Bu reseptörler, yapı ve farmakolojideki farklılıklara göre sınıflandırılmıştır. GABA_A ve GABA_C, iyonotropik reseptörlerdir. GABA_B, metabotropik G proteinine bağlı bir reseptördür (Moss ve McDonald vd, 1996).

2.2.3.1. GABA_A reseptörü

Merkezi sinir sisteminin toplam sinapslarının yaklaşık %20-50'si inhibitör GABA_A reseptörleri içerir ve beyindeki ana reseptörlerdir. GABA, sırasıyla hem hızlı hem de yavaş inhibe edici reseptörler (GABA_A ve GABA_B) üzerinde hareket edebilir (Stein ve Nicoll, 2003, Zanan ve John vd, 2018).

GABA_A reseptörleri, Cys ilmiği ligand kapılı iyon kanalı süper ailesinin üyeleridir. Bu kanallar, iki sistein (Cys) kalıntısı arasında yer alan yüksek oranda korunmuş 13 amino asitten oluşan tipik bir döngüden oluştuğu için Cys döngüsü olarak adlandırılır. GABA_A reseptörleri hücre zarı boyunca klorür iletkenliğini artırır (Stein ve Nicoll, 2003, Zanan ve John vd, 2018, Goetz ve Arslan vd, 2007).

2.2.3.2. GABA_B reseptörü

GABA_B reseptörleri, metabotropik G proteinine bağlı reseptörlerdir ve kalsiyum ve potasyum sinyal mekanizması yoluyla sinyal ileten G proteini yoluyla etki eder (Bettler vd, 2004, Zanan vd, 2018).

GABA_B reseptörünün, presinaptik fazda kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmisyonu inhibe ederken, postsinaptik fazda G proteinine bağlı potasyum sinyali yoluyla inhibitör etki ürettiği bulunmuştur (Rahman ve FRS, 2002). Klonlama ve mutageniz gibi moleküler çalışmalar, GABA_B reseptörlerinin merkezi sinir sisteminin önemli bir parçası olduğunu göstermiştir (Sanger ve Munonyara vd, 2002).

2.2.3.3. GABA_C reseptörü

GABA_C reseptörleri, verici kapılı iyon kanallarının süper ailesinin ve GABA_A reseptörlerinin alt sınıfının üyeleridir. Bu reseptörler, rho alt birimlerinden oluşur ve retinada yüksek ekspresyona sahiptir. GABA_C reseptörleri yapısal olarak GABA_A reseptörlerine benzer ve dört transmembran alanı olan beş alt birimden oluşur. Bununla birlikte, bu reseptörlerin her ikisi de biyokimyasal, farmakolojik ve fizyolojik olarak farklıdır. GABA_C reseptörleri, kanalın uzun ortalama açılma süresi, düşük iletkenlik ve düşük duyarsızlaştırma oranı gibi üç ayırt edici özelliğe sahiptir (Zanan ve John vd, 2018).

2.3. Amino Asitlerin Metabolizması

2.3.1. Glutamat metabolizması

Glutamat transaminasyon ile sentezlenir. Glutamat, elfe ketoglutarat ve amonyaktan glutamat dehidrojenaz etkisiyle de sentezlenir. Glutamat dehidrojenaz (GDH), ko-enzim olarak NAD⁺ veya NADP⁺ kullanarak glutamat, αKG ve amonyak arasındaki reaksiyonu katalize eder. Beyinde, bu reaksiyon normalde bir oksidatif deaminasyon olarak ilerler, yani glutamat αKG'ye ve amonyağa oksitlenir (Madsen ve Schousboe vd, 2012).

2.3.2. GABA'in metabolizması

GABA metabolizması, glutamata göre daha az karmaşıktır. İlk olarak Roberts ve Frankel tarafından gösterildiği gibi GABA, glutamatın glutamik asit dekarboksilaz

(GAD) tarafından dekarboksilasyonu ile sentezlenir. GAD, farklı moleküler ağırlıklara, katalitik ve kinetik özelliklere ve hücre altı lokalizasyonuna sahip iki izoformda bulunur. GAD₆₅ ve GAD₆₇'de nöbet kontrolü için önemlidirler (Madsen vd, 2012).

2.3.3. Glisin'in metabolizması

Glisinin genelde birkaç yolla sentezlenir:

- Serin, serin hidroksimetiltransferaz (SHMT) yoluyla
- Sarkozin oluşumu yoluyla
- Treonin, treonin dehidrojenaz yolu (çoğu memelide ancak insanlarda değil)
- Glyoxalat, α KG transmineyiz yoluyla
- L-karnitinin endojen sentezi sırasında sentezlenir (Wang vd, 2013).

2.3.4. Serin'in metabolizması

Serin, 3-fosfogliserrattan şu şekilde sentezlenir:



3-fosfogliserrattan fosfohidroksil-piruvata dönüşüm fosfogliserrat dehidrojenaz enzimi ile sentezlenme sağlanır. Bu enzim, bu yoldaki anahtar düzenleyici adımdır. Fosfogliserrat dehidrojenaz, hücredeki serin konsantrasyonu ile düzenlenir. Yüksek konsantrasyonlarda bu enzim inaktif olacak ve serin üretilmeyecektir. Düşük serin konsantrasyonlarında enzim tamamen aktif olacak ve serin bakteri tarafından üretilecektir (Pilzer ve LI, 1963).

2.4. Epilepsi

Epilepsi, dünya nüfusunun neredeyse %1'ini etkileyen merkezi sinir sisteminin en yaygın nörolojik hastalıklarından biridir. GABA_A ve GABA_B reseptörleri GABAerjik nörotransmisyonunda rol oynar. GABAerjik iletimde genetik veya başka nedenlerle gerçekleşen herhangi bir eksiklik, epileptik nöbetlere yol açabilir (Yudkoff vd, 2005). Epilepsi, diğer nedenlerin yanı sıra, bu iki işlev arasındaki dengede meydana gelen bozukluklardan kaynaklanır: uyarıcı amino asitlerin seviyesinde bir artış veya inhibe edici

asitlerin seviyesinde bir azalma. Beyindeki uyarıcı ve inhibitör nörotransmitter arasındaki dengesizlik, insan ve hayvan modellerinde epileptik nöbetlerin neden olduğu bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Epileptojenik serebral kortekste glutamat, aspartat ve glisin konsantrasyonları önemli ölçüde artar. Glutamat metabolizmasında yer alan enzimlerin, glutamat dehidrojenazın aktivitesi de artar.

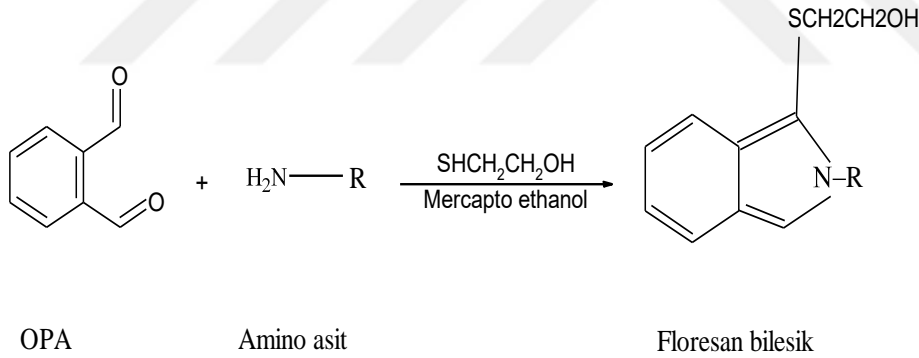
Glutamat konsantrasyonları, epileptik hipokamlarda daha yüksektir ve nöbet başlangıcında potansiyel olarak eksitotoksik seviyelere ulaşmadan önce artar, frontal veya temporal kortikal epileptojenik odaklar. Ayrıca özellikle yoğun nöbetler veya status epileptikus sırasında aspartat, glutamat ve serin salgılar. GABA ise tam tersine, epileptik hipokampta muhtemelen bağlı olarak gecikmiş ve zayıf GABA taşıyıcılarının sayısında ve verimliliğinde bir azalma gösterir (Sherwin, 1999).

Glutamat, memeli merkezi sinir sisteminde (CNS) önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir, öğrenme ve hafıza gibi daha yüksek beyin fonksiyonları için anahtardır. Bununla birlikte beyindeki aşırı glutamat, eksitotoksisteye, bu da epilepsi dahil olmak üzere çok sayıda CNS patogenezine neden olur. Örneğin, glutamat eksitotoksistesi, epileptik aktivitenin başlangıcında, yayılmasında ve devamında önemli bir rol oynar. GABA ise bunun aksine, CNS'de majör bir inhibitör nörotransmitterdir. GABA esas olarak glutamattan ve nöron terminalindeki glutamat dekarboksilaz tarafından sentezlenir. Hem insan hem de hayvan modellerinde, GABA'nın epilepsinin patogenezinde ve tedavisinde kritik bir rol oynadığı da gösterilmiştir. BOS'taki GABA konsantrasyonları, epileptik hastalarda ve hayvan nöbet modellerinde azalmıştır. Glutamat ve GABA'ya ek olarak, aspartat, glisin, serin ve taurin gibi diğer amino asitler, nörotransmitterler olarak çalışır ve epilepsinin patofizyolojisini değiştirebilir. Glisin, inhibe edici amino asitlerden biridir. Beyindeki glisin konsantrasyonunun artması antiepileptik etkiye sebep olmaktadır. Fakat, glisini doğal haliyle hastalara uygulamak imkansızdır; çünkü CNS hedef bölgelerine ilaçların ulaşmasını engelleyen kan-beyin bariyerini geçememektedir (Ogawa vd, 2019).

2.5. Ortho-Phthalaldehyde (OPA)

Dialdehit grubunun en önemli bileşiği ve genel olarak amino asit'lerin türevlendirilmesi için en çok kullanılan reaktiflerden biridir. OPA, yüksek güvenilirlik gösterir ve kullanımı kolaydır. Bir borat tamponu ve tiol bileşiğindeki birincil AA'larla bir flüoresan izoindol türevine bir dakika veya daha kısa sürede reaksiyona girer ve florimetrik saptamaya uygun bir süstitüe edilmiş izoindol türevi oluşturur. Şekil 2.5'te OPA (o- ftaldialdehit), 2-merkptoetanol varlığında bir amino asit ile reaksiyonu görülmektedir.

Bu yöntemle, bir kolonla ayrılan her bir amino asit, aşağıda gösterildiği gibi bir floresan bileşik oluşturmak için OPA ve merkptoetanol ile reaksiyona sokulur ve bileşiğin floresans veya absorbansının yoğunluğu, kalitatif veya kantitatif belirleme için ölçülür. AA'lerin OPA türevlerinin stabilitesini etkilediği faktörler; OPA reaktiflerinin hazırlama ve saklama koşulları, AA'lerin davranışı ve moleküler yapılarıdır (Hanczk ve Perl, 2003, Kühnreich, 2016).



Şekil 2.5. OPA (o- ftaldialdehit), 2-merkptoetanol varlığında bir amino asit ile reaksiyonu

2.6. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Etkili bir ayırma metodu, birbirine benzer çok sayıda analitin bulunduğu karışımları analiz edebilmelidir. YPSK ile yapılmış araştırmalara bakıldığında, kromatogramlar doğrudan hem kalitatif hem de kantitatif gibi bilgiler sağlar, karışımdaki her bileşen önceden belirlenen koşullar altında kendine ait bir alıkonma zamanına sahiptir ve her bir sinyalin hem alanı hem de yüksekliği ilgili bileşen miktarı ile doğru orantılıdır.

YPSK tekniği ile yapılmış araştırmalar, bu tekniğin oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Diğer bir avantajı; bu teknik kısa zamanda hatasız sonuçlara olanak sağlar. Bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Martin ve Syngge, teorik olarak; sabit fazın oldukça küçük partiküllere sahip olması gerektiğini bundan dolayı da hareketli fazın kolon içerisinde srklenebilmesi için yüksek bir basıncın gerekli olduğunu 1941'den de önce biliyorlardı. Bu yöntemler arasında YPSK-EKD testi, yüksek duyarlılığı ve kesinliği nedeniyle klinik alanda en yaygın kullanılanıdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) nörobilimde en yaygın kullanılanlardan biri olmasına rağmen, amino asit nörotransmitterlerinin analizi için birçok ayırma yaklaşımı mevcuttur ve bu nedenle bu yöntemlerin tespiti için bir türevlendirme prosedürü gerekmektedir (Zandy ve Doherty vd, 2017).

Beyin dokusundaki amino asit seviyelerinin belirlenmesi, geleneksel olarak elektrokimyasal saptama (EKD) ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amino asitler (OPA) kullanılarak kolondan önce türetilmesi, miktarlarının belirlenmesi için en yaygın kullanılan yöntem olmuştur (Chan ve Lin vd., 2010). YPSK için EKD saptamasının iki tekniği vardır: amperometrik ve kulometrik. Amperometrik tekniğinde, analitin bir kısmı (genellikle %5 ila %15) oksitlenir veya indirgenir. Bu, analitin esasen %100 dönüştürülmesini sağlayan kulometrik dedektörün tersidir. Analitik hücrenin önüne ek bir elektrokimyasal hücre yerleştirerek, ilgilenilen analit ile birlikte ayrışabilen bileşikleri oksitlemek veya azaltmak mümkündür, böylece analize müdahale etmek engellenir. Hem amperometrik hem de kulometrik EKD yöntemleri, mobil faz (znen) ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferine bağlıdır. Bu nedenle, mobil faz kompozisyonu kritiktir. Mobil faz, elektrolitin iyonlaşmasına izin vermek için yeterince yüksek bir dielektrik sabitine sahip olmalı ve elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak inert olmalıdır (yani arka plan akımı düşük olmalıdır). Kolon ve bileşimlerin boyutu yöntemin duyarlılığını belirlemede önemli faktörlerdir (Acuņaa ve Trías, 2009).

2.7. Amino Asit Tayini ile İlgili Çalışmalar

Dorresteijn vd. (1996), birincil amino asitlerin o -ftalaldehit-2-merkaptetanol türetme kullanılarak kantitatif tayininin doğruluğu ve duyarlılığı açısından optimal reaksiyon koşullarını belirlemek için bir YPSK floresanları dedektör kullanılarak yeni yöntem geliştirmişlerdir. Bir 335 nm'lik uyarma dalga boyu ve bir emisyon 425 nm dalga boyu kullanılmıştır. 1 mL/dk'lık bir akış hızı kullanılmıştır ve 35°C'de (150x3,9 mm) kolon kullanılarak AA'lerin ayrılması gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, Milli-Q Su (pH 6,8) olarak %32 (v/v) metanol ve 20 mmol/L fosfatan oluşuyordu. Çalışmanın belirlenen koşulları altında, LOD GA, SER, GLY sırayla (71, 125, 224 fmol) iyi bir doğruluk, %0,6'lık bir kesinlik ile sonuçlandırmışlardır.

Khuhawar vd (2003), beyin-omurilik sıvısında (BOS) GABA tayini için, 2 hidroksi ftaldialdehit ile kolon öncesi türevlendirilerek 330 nm'de UV deteksiyon ile bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. YPSK yönteminde ise Phenomenex C18 (150x4,6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak, metanol: su (62:38 v/v) izokratik elüsyon kullanılarak, enjeksiyon hacmi 5mL olacak şekilde ve 1 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. GABA analiz yapılan karışımda çok amin ve amino asit varlığında GABA'nin seçici olarak ayrıldığı gösterilmiştir. Yöntemin beyin-omurilik sıvısındaki GABA miktarının 19-22 µg/mL olarak ölçüldüğü bulunmuştur. Yöntemin doğrusalığı GABA için 1,2-28,0 µg/mL aralığında bir kalibrasyon eğrisi elde edildiği ve bağıl hata ±%0 ila %2,5 arasında ve 2,8 ng/mL saptama sınırı LOD değeri bulunmuştur.

Zacharis vd (2004), insan biyolojik sıvılarında GABA'in otomatik olarak OPA ile türevlendirilerek YPSK yöntemiyle online tayini için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. YPSK yönteminde ise, bir koruma kolonuyla C₁₈ bağlı silika korunan (250 mm x 4,6 mm) ve C₁₈ Kromasil (4 µm) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak, A hattında ise (0,015 mol/ mL) sulu CH₃COONH₄ ve B hattında CH₃ bir gradient elüsyon kullanılarak, 1,2 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Sıralı enjeksiyon analizi (SIA) tekniği ile o-ftaldialdehitin floresans ajan olarak kullanıldığı türevlendirme işlemlerinde optimize edilen maksimum duyarlık koşullarında analizlerin yapıldığı bildirilmektedir. GABA'in tutulma süresi 12,1 dakikadır. Yöntem GABA için 0,01–3,0 µg/mL aralığında doğrusaldır ve geri kazanımı GABA için %96–103 aralığında bulunmuştur. Yöntem iyi hassasiyet, kesinlik ve doğruluk sağlamaktadır. İnsan idrarı ve beyin-omurilik sıvısında µg/mL (ppb) düzeyinde GABA tayini gösterilmiştir.

Clarke ve Malone (2007), sıçan beyin hipokampus bölgesinde GABA ve L-GA'nun naftalin-2,3-dikarboksaldehit (NDA) ile türevlendirilerek YPSK EKD ve FLD yöntemle ile tayinleri için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. EKD sisteminde ise, ters fazlı Luna C18 Phenomenex (250 mm×4,6 mm, 5 µ) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak, 0,1M Na₂HPO₄ + 50 µM EDTA (pH 5,6) ve MEOH (35:65) YPSK dereceli bir karışımdan oluşuyordu. Enjeksiyon hacmi 20 mL olacak şekilde ve 0,65 mL/dk akış hızında çalışılmış. Kolon 30°C'lik bir sıcaklıkta tutulmuş ve karbon çalışma elektrodu +0.8'de ayarlanmıştır. FLD sisteminde ise, ters fazlı Luna C18 Phenomenex (150 mm x 2 mm, 3 µ) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak, 0,1 M Na₂HPO₄ /+50 µM EDTA (PH = 5,3) ve MeOH (35:65) YPSK dereceli bir karışımdan oluşmaktadır. Enjeksiyon hacmi 20 mL olacak şekilde ve 0,1 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Kolon, 30°C'lik bir sıcaklıkta tutulmuştur. Yöntem elüsyon izokratik olarak bir programda sağlanmış ve 20 dk'dan az bir sürede tamamlanmıştır. Yöntemin validasyonu geniş bir derişim aralığında gösterilmiştir. Yöntemin 4-0,03 µg/mL aralığında hem GABA hem de GA için doğrusaldır. EKD uygulaması için LOD değerleri GABA için 8 ng/mL ve GA için 13 ng/mL ve LOQ değerleri GABA için 20 ng/mL ve GA için 32 ng/mL. FLD uygulaması için LOD GABA için 1,1 ng/mL ve GA için 1,8 ng/mL olarak bulunmuştur.

Ogawa vd (2019), üç grup ailesel spontan epilepsili (FSEC) kedilerin beyin omurilik sıvısındaki (BOS) uyarıcı ve inhibe edici amino asitlerin OPA önkolon türevlendirmesi ile seviyelerini tayini için bir YPSK flüoresan dedektörü kullanılarak yöntemi geliştirmişlerdir. YPSK yönteminde ise, sıralı olarak iki kolon ODS (4,6 mm×30 mm ve 4,6 mm×250 mm) kullanılmıştır. Kolon, 40°C sıcaklıkta tutulmuştur. Mobil faz olarak, A hattında (50 mM CH₃COONa+%3 N, N-dimetilformamid (PH = 5,8)) ve B hattında MeOH'den oluşuyordu. Enjeksiyon hacmi 10 mL olacak şekilde ve 1 mL/dk bir akış hızında çalışılmıştır. Amino asitlerin çözünmesi, gradyanlı elüsyon kullanılarak ve 55 dakika bir analiz süresiyle gerçekleştirilmiştir. Etkilenmemiş gruptaki glutamat düzeyi sağlıklı grubundan önemli ölçüde düşükken, aspartat, serin, glisin veya taurinin CSF düzeylerinde önemli bir fark olmadığını kanıtlanmıştır. Etkilenen gruptaki birkaç kedi de yüksek GABA konsantrasyonları rastlanmıştır.

Acuña vd (2009), sıçan beyinde GA, glutamin ve GABA'nın OPA ve sodyum sülfid ile kolon öncesi ile türevlendirerek YPSK- EKD ile tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. YPSK yönteminde ise ODS C18 (5 µm;4,6 mm×250 mm) kolonu

kullanmıştır ve 5–7°C sıcaklığında ayarlanmıştır. 0,3 mL/dk akış hızı ve 35 dk'lık bir analiz süresinde çalışılmıştır. 850 mV voltaj uygulanmıştır. Mobil faz olarak, %23 MeOH (PH =5,52) +0,1 M NaH₂PO₄ +0,5 mM EDTA'den oluşuyordu. Yöntem 0,1–3,2 ng/mL aralığında doğrusaldır. Yöntem %10'un altında bir kesinlik ve %85'ten fazla doğruluk göstermiştir.

Chan vd (2010), 5 farklı beyin bölgesinden amino asitlerin aynı anda, sodyum sülfid varlığında OPA ile türevlendirilerek belirlenmesi için ters fazlı YPSK elektrokimyasal tespit ile gradyanlı elüsyon kullanılarak bir yöntem geliştirmişlerdir. YPSK yönteminde ise C18 Adsorbosphere koruma kolonu (5 µm, 7,5 mm×4,6 mm) ile bir C18 ters fazlı Adsorbosphere OPA-HR kolonu (150 mm×4,6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. 0,8 ml/dk'lık bir akış hızında çalışılmıştır. Mobil faz olarak, A (0,1 M NaH₂PO₄ + 0,05 mM EDTA +(pH= 5) %2 MeOH, B saf MeOH' dan oluşuyordu. Yöntem doğru, tekrarlanabilirdi ve iyi bir doğrusallık gösterdi. Yöntem miktar tayini sınırı (LOQ) 0,4 – 1,1 µg/2mL arasında değişiyordu. Yöntem 2,2–33,8 µg/2mL aralığında doğrusaldır.

Agustin vd (2009), beyin mikrodializatlarında beş amino asit nörotransmitterinin OPA ile türevlendirilerek ve izokratik elüsyon kullanılarak eş zamanlı belirlenmesi için EKD ile YPSK ile basit bir yöntem geliştirmişlerdir. 17 dakika bir analiz süresi ve C18 kolon (2,1×150 mm, 3,5 µm) kullanılarak çalışma gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak, ((pH=3,75) 100 mM sitrat + %10 asetonitrilden) oluşuyordu. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. 0,2 mL/dk'lık bir akış hızında ve 3 µL enjeksiyon hacminde çalışılmıştır. Yöntem miktar tayini sınırı LOQ (ng/mL) 1,1 GLY, 6,6 GLU, 5,9 GABA ve saptama sınırı LOD değerleri ise (ng/mL) 0,3 GLY, 2,0 GLU, 1,8 GABA bulunmuştur.

Akula vd (2015), sıçan beyin doku preparatlarında GABA'in benzoil klorür ile kolon öncesi türevlendirilmesi ile hızlı ve spesifik bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik (RP-YPSK) yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, 210 ila 400 nm arasında değişen ultraviyole (UV) –foto diyot array (PDA) tespitine sahip bir RP-Inertsil ODS3 C-18 (250×4,6 mm; 5 µm) 30°C'de kolon kullanılmıştır. Mobil faz ise, (65:35, 0,025 M M NaH₂PO₄ +MeOH v/ v (pH=6)), izokratik bir karışım'dan oluşuyordu. 1 mL/dk'lık bir akış hızında ve 20 µl bir injecte hacmi ayarlanmıştır. Analiz süresi 10 dakikaydı. Yöntem 1–25,8 ng/mL aralığında doğrusaldır. Düşük LOQ ve LOD değerleri 1 ve 0,05 ng/mL bulmuşlardır. GABA türevinin analitik geri kazanımı %96,31 olarak bulunmuştur.

Silva vd (2009), glutamat ve GABA ekstraksiyonu için verimli bir yöntem geliştirmişlerdir ve bu nörotransmitterlerin OPA/3mercaptopyronic asit türevlerini, izokratik ve hızlı YPSK yöntemi aracılığıyla, flüoresan özelliklerine göre sıçan beyin dokusunda ölçmüşlerdir. Glutamat ve GABA'nın eşzamanlı tespiti için bir ters fazlı C18 (150 mm×4,6 mm, 3 µm) kolon kullanmışlardır. Mobil faz olarak, (0,05 M sodyum asetat, tetrahidrofuran ve MeOH (50: 1: 49, v / v pH = 4,0)) oluşuyordu. 1 mL/dk'lık bir akış hızında 9 dakikalık bir çalışma süresinde gerçekleşmişti. Yöntem Glutamat için 1–10 µg/mL ve GABA için 0,1–0,75 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Geri kazanım testleri, GABA için yöntemin doğruluğunun %99,6 ± 2,3 ve glutamat için %101,9 ± 1,8 olduğunu göstermiştir.

Panrod vd (2016), GABA fizyolojik fonksiyonlarda, 2-hidroksinaftaldehit (HN) ile veya OPA /3mercaptopyronic asit ile türetildikten sonra, iki farklı YPSK fotodiyotdizi algılama bir floresans dedektör yöntem ile tayini ve sonuçlarının karşılaştırılması üzerine çalışmıştır. GABA-HN türevi bir C18 donatılmıştır analitik kolonu ile (4,6 mm×250 mm 5 µm) gerçekleşmiştir. Mobil faz olarak, MeOH + H₂O'dan (66:34, v/v) oluşuyordu. 10 µl türetilmiş örnek hacmi ile 0,8 mL/dk'lık bir akış hızında enjekte edilmiş ve izokratik olarak çalışmışlardır. GABA-OPA / MPA türevi bir C18 ile donatılmıştır analitik sütun (4,6 mm×150 mm 3,5 µm idi). Mobil faz 0,05 M sodyum asetat + tetrahidrofuran + MeOH (50: 1: 49, h / h, (pH= 4.0)) oluşuyordu. 10 µl enjekte hacmi ile izokratik olarak 1 mL/dk akış hızında çalışmışlardır. GABA-HN ve GABA-OPA / MPA için sırasıyla 40-600 µg/mL ve 0,2-0,9 µg/mL aralıklarında doğrusaldır. GABA-HN için düşük LOD 1 µg/mL ve LOQ 5 µg/mL iken GABA-OPA / MPA'nın LOD değeri 0,004 µg/mL ve LOQ'su 0,02 µg/mL idi.

Buck vd (2009), beyin mikrodializatlarında GABA ve glutamatın tespiti için bir YPSK ve LC-MS/MS floresan dedektörü kullanılarak yöntem geliştirmişlerdir. İki yöntemde bir HILIC (hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi) kolonu kullanmışlardır. Mobil faz ise, su + asetonitril + %0,1 formik asit içeren bir ikili gradyanlı elüsyondan oluşuyordu. 10 µl bir enjeksiyon hacminde çalışılmışlardır. LOQ değerleri GABA için 0,1 ng/mL ve glutamat için 1,5 ng/mL olarak bulunduğu belirtmişlerdir.

Defaix vd (2018), serbestçe hareket eden farelerde mikrodializ tekniği ile prefrontal korteks örneklerinden elde edilen L-GA, glutamin ve GABA'nın, LC-MS bir yöntemi ile miktar tayinleri ölçmüşlerdir. 25 mM pH 3,5 amonyum format tamponu ve

asetonitrilden oluşan mobil fazlar ile gradyan elüsyonu kullanmışlar. LOQ GABA için 0,63 ng/mL, L-GA için 1,25 ng/mL idi ve glutamin için 3,15 ng/mL bulmuşlar.

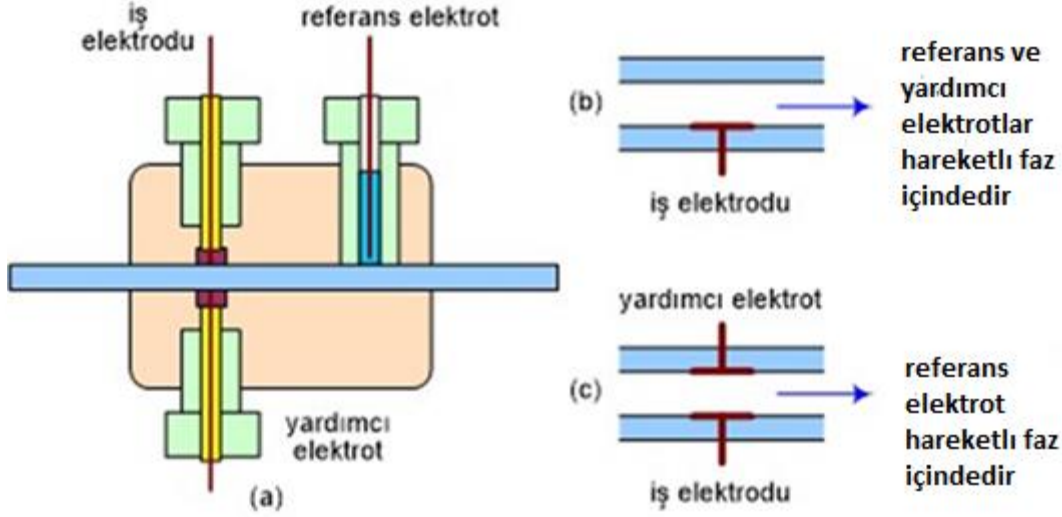
2.8. Mikrodiyaliz (MD)

Mikrodiyaliz kan, karaciğer, deri, kalp, plasenta, böbrek dahil olmak üzere hemen hemen her canlı doku ve organdaki biyolojik moleküllerin, ilaçların ve diğer maddelerin miktarlarının sürekli gerçek zamanlı izlenmesini sağlayan etkili bir in vivo örnekleme yöntemidir. Mikrodiyaliz tekniği, ilgili dokuya veya fizyolojik bölgeye yerleştirilen mikrodiyaliz sondası içindeki yarı geçirgen bir zardan bileşiklerin pasif difüzyonuna dayanan spesifik bir diyaliz türüdür. Yöntem hem hayvan hem de insan çalışmalarına uygulanabilir. Genel olarak, teknik, yoğun farmakokinetik, farmakodinamik, nörolojik ve aynı zamanda ilaç salım çalışmalarında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, kan, beyin ve diğer dokulardaki endojen maddelerin konsantrasyonlarının aynı anda ölçülmesine olanak sağlar. Hayvan uyanık olduğunda, bu belirlemeler zamansal olarak davranışla ilişkilendirilebilir. Mikrodiyaliz örnekleme hem anestezi uygulanmış hem de uyanık, serbestçe hareket eden hayvanlarda gerçekleştirilebilir. Öte yandan, uyanık, serbestçe hareket eden sıçanlarda mikrodiyaliz örnekleme, anestezi altında mikrodiyaliz örneklemesinden açıkça üstündür. Beyin kimyası ve kan-beyin bariyerinin (BBB) geçirgenliği anestezi ve uyanık mikrodiyaliz altında farklıdır. Uyanık mikrodiyaliz, normal fizyolojik koşulları daha yakından yansıtır. Ek olarak, uyanık ve bilinçli laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, 72 saate kadar süren uzun süreler boyunca çalışmaya izin verir. Mikrodiyaliz tekniğinin avantajları şu şekildedir:

- Tüm organizmayı ve bozulmamış ortamı yansıtır.
- Herhangi bir sıvı kaybı olmaksızın sürekli izleme ve gerçek zamanlı örnekleme sağlar.
- Daha fazla temizleme prosedürü gerektirmeyen ve fizyolojik sistemde minimum bozulma ile uzun süreli çalışmalara olanak tanıyan çok temiz bir diyalizat elde etmek mümkündür.
- Mikrodiyaliz problemleri son derece küçüktür ve doğaları gereği nispeten invazif değildirler. Bu şekilde, tek bir hayvanda birden fazla sonda kullanmak mümkündür.

- Bilinçli hayvanlarla yapılan deneyler, eş zamanlı davranış gözlemine izin verir ve fareler anestezi kullanımıyla tehlikeye girmez (Zapata ve Chefer, 2009).

2.9. Elektrokimyasal Dedektör



Şekil 2.6. Elektrokimyasal dedektör (EKD)(http-1)

Elektrokimyasal algılama (EKD), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile bağlantılı olduğunda, çok seçici ve hassas bir analitik araçtır. İlgili analitin elektroaktif olmasına bağlıdır, yani molekül, kendisine bir elektrik potansiyeli uygulandığında oksitlenecek veya indirgenecektir. EKD dedektörlerinin çoğu, çalışan bir elektrot (oksidlenme veya indirgenme reaksiyonunun olduğu iş elektrodu), bir referans elektrotu (hareketli fazın taban iletkenliğinde olabilecek değişiklikleri dengeler) ve bir yardımcı elektrottan (hücre içindeki potansiyeli sabit tutmak için kullanılır) oluşur. Madde elektrokimyasal hücreden geçerken bir reaksiyon oluşur, böylece akım yükselir. Gözlenen akım maddenin konsantrasyonuna bağlı olacaktır. Teknik ilk olarak Shoup ve Kissinger tarafından birçok farklı molekülü analiz etmek için geliştirildi ve kullanıldı (Forster ve Marsden, S 55-62). Geleneksel elektrokimyasal dedektörler çalışma elektrotu olarak camsı bir karbon elektrot veya gözenekli bir karbon elektrot kullanır. Bununla birlikte, çoğu amino asit elektrokimyasal olarak daha az aktif olduğu için, türevlendirme yöntemleri de elektrokimyasal tespit ile YPSK'de kullanılmaktadır (Kotani ve Kitamura vd, 2018, Zandyve Doherty vd, 2017).

Elektrokimyasal dedektör avantajları şu şekilde verilebilir:

- Bir spektrometrik dedektöre kıyasla ucuzdur.
- Sadece mobil faz iletken olduğu zaman çalışabilir. Bu yüzden mobil faz bir miktar su ve bir elektrolit içermelidir.
- Bu dedektörler fenoller, aromatik aminler ve nitrozobileşikleri gibi elektroaktif bileşiklerin analizinde kullanılır.
- Hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle özellikle doğal ürünler ve yiyecek maddeleri incelmelerinde kullanılır ve biyolojik veya çevresel numunelerin rutin ölçümleri için kullanılır. Katekolaminler, asetilkolin, glutamat, glisin, GABA ve diğerleri gibi femtomol / L (10-15 M) aralığında tespit yapabilir.
- Basit prosedürlerle taşınabilir bir sensör geliştirmek için kolayca minimize edilebilir ve laboratuvarında kullanılabilen düşük enerji gereksinimi veya yerinde ölçümler için kullanılır.
- Geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa sahip olmalıdır.
- Düşük gürültü seviyesine sahip olmalıdır.
- Basınç ve sıcaklık değişikliklere de duyarsız olmalıdır (Zandy ve Doherty vd, 2017).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Fosforik asit	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Su	: Sartorius Stedim Biotech, Almanya
di-sodium tetraborate	: Poole England
di-Potassium hydrogen fosfat	: Merck, Almanya
Phthaldialdehyde(OPA)	: Sigma-ALDRich,USA
2-Mercaptoethanol	: Merck, Almanya
4-Aminobutyric asit	: Acros-USA
D-Serin	: Sigma-ALDRich,USA
Glycin	: Sigma-ALDRich,USA
L-Glutamic asit	: Sigma-ALDRich,USA
4-Amino-3-hydroxybenzoicasit	: Sigma-ALDRich,USA

3.2. Kullanılan Cihazlar

YPSK	: Agilent 1290Infinity binary, Almanya
Elektrokimyasal Dedektörü	: Esainc, Newyork,USA
Guard Cell 5020	: Esa Biosciences, USA
Microdialysis Cell5014B	: Esa Biosciences, USA
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, KORE
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
Su banyosu	: Memmert, WNB 14, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion met S220, İsviçre
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye

3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1 mg/mL derişimdeki A.A stok çözeltileri, A.A standart maddeleri (1:1) MeOH+H₂O karışımı içinde hazırlandı ve -4°C'de saklandı. Bu A.A stok çözeltilerinden 0,001 perklorik asit ile gerekli seyreltmeler yapılarak, çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. İç standart için birkaç madde denenmiş, en iyi sonuç veren 4-Amino-3-hydroxybenzoicasit kullanılmıştır. 4-Amino-3-hydroxybenzoicasit'nin stok çözeltisi 1 mg/mL derişimde (1:1) MeOH+H₂O içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu çözelti 0,001 perklorik asit ile seyreltilerek 5 ppm'lik derişim elde edilmiştir. Gerekli seyreltmeler 0,001 perklorik asit ile yapılmış ve analiz edilen bütün çözeltiler 3 mg/mL 4-Amino-3-hydroxybenzoicasit içerecek şekilde eklemeler yapılmıştır.

3.4. Türevlendirme Ajanları

1- Orto fitalaldehit (OPA)

Kimyasal formülü C₆H₄-1,2-(CHO)₂, 134,1 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir. PH < 11,5 olduğu için su çözeltisinde çözülür.

2- Merkaptoetanol

C₂H₆OS formüllü bir tiyol bileşimidir. 78,13 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir. Suda iyi çözünür.

3.5. OPA Türev Çözeltisinin Hazırlanması

Türev çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır; 27 mg OPA tartılıp, 1 mL MeOH içinde çözdürülmüş ve 5µL 2-merkaptoetanol (2-MCE) ve 9 mL borat tamponundan (pH 9,3) eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Bu çözelti - 4°C'de tutularak haftada bir defa hazırlanmıştır. OPA çözeltisinden 2,5µL alınarak ve üzerine 7,5µL 0.1M borat (pH 9) eklenmesiyle hazırlanmıştır. Çözeltiler günlük taze hazırlanmıştır.

3.6. Çalışma Tamponu

Bu çalışmada iki tampon hazırlanmıştır. İlk olarak fosfat tamponu hazırlamak için 50 mM K₂HPO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi hazırlamak için K₂HPO₄'ten 4,3545 g tartım alınarak bir miktar suda çözülmüş ve 500 mL ye distile su ile tamamlanmıştır. Tamponun pH'ı (6-7) arasında fosforik asit ile ayarlanmıştır. Borat tamponu ise 0.1M Na₂B₄O₇·10H₂O çözeltisini hazırlamak için Na₂B₄O₇·10H₂O'ten 9,5345 g tartım alınarak

bir miktar suda çözülmüş ve 500 mL ye distile su ile tamamlanmıştır. pH'ı 9,3'e fosforik asit kullanılarak ayarlanmıştır.

3.7. Kromatografik Koşullar

Çalışmada Agilent Zorbax Eclipse C18 (3,0mm x 150mm; 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak gradient elünte kullanılmıştır. A hattında 50 mM fosfat tamponu ve B hattında su ve MeOH (50:50, h/h) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 0,8 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 µL ve kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. İki analitik cell kullanılmıştır. Bunlar Guard Cell ve Mikrodiyaliz Cell'dir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yöntemin Optimizasyonu

YPSK-EKD yöntem optimizasyonu çalışmalarında, aletsel ve deneysel parametrelerin değiştirilmesi ile amino asitlerin bileşiklerden (GA, serin, GLY, GABA) aynı anda ayrılması ve tayinleri için en iyi sonuç veren ve en uygun olan koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla çeşitli kolonlar, farklı hareketli faz bileşimleri ile ve farklı konsantrasyon değeri gibi parametreler araştırılmıştır. Aynı zamanda deneylerde en uygun IS'ı belirlemek için farklı maddeler kullanılmıştır. Bunlardan aspartat maddesi ve en sonda 4-Amino-3-hydroxybenzoic asit kullanmasına karar verilmiştir.

Kolon seçimi; Deneylerde DB-C18 kolonu (3 mm×150 mm×3,5 µm) ve SB-C18 kolonu (4,6 mm×100 mm×3,5 µm) gibi farklı kolonlar denenmiştir. Ancak bu kolonlarda AA'lar aynı yerde pik vermemiştir. Yapılan deneyler sonucunda AA'lar ve IS için en iyi ayırım kolonunda Agilent Zorbax Eclipse C18 (3,0 mm x 150 mm; 5 µm) gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz seçimi; AA'lerin tayini için en uygun hareketli fazı bulmak amacıyla deneylerde fosfat ve su+MeOH karışımlarının farklı oranlarda kullanılarak çeşitli deneyler yapılmıştır. Sonuç olarak en uygun hareketli faz A hattında (50 mM fosfat tampon) karışımı ve B hattında (su + MeOH (50:50, h/h)) karışımı kullanılmıştır.

Akış hızı optimizasyonu; Yapılan çalışmalarda AA'lerin en iyi ayırım elde edilebilmesi için farklı akış hızları (0,5; 0,7; 0,8; 1,0 mL/dk) denenmiştir. En uygun akış hızı 0,8 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen en uygun kromatografik koşullar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Ayrıca, YPSK deneylerinde AA ve IS'ın ayırımında uygulanan gradient programı Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

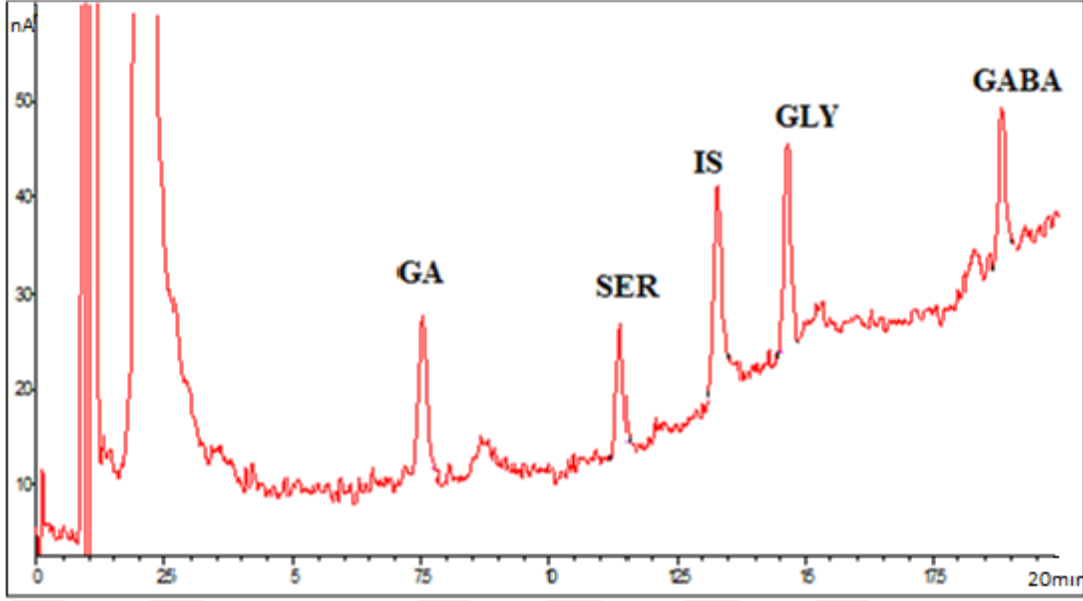
Çizelge 4.1. *Optimum YPSK koşulları*

Kolon	Agilent Zorbax Eclipse C18 (3,0 mm x 150 mm; 5 µm)
Hareketli faz	A hattında (50 mM fosfat tamponu) B hattında (su + MEOH 50:50, h/h)
Kolon sıcaklığı	40°C
Akış hızı	0,8 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Uygulanan Potansiyel	+600 mV,+150 mV
Çalışma Elektrodu	+700 mV
Toplam Analiz Süresi	21,1dk

Çizelge 4.2. *AA'lerin ve IS tayininde kullanılan gradient programı*

Zaman (dk)	A (%)	B (%)
0	90	10
20	10	90
21.1	90	10

AA'lerin (0,1 µg/mL) ve IS (5 µg/mL) standart maddelerini içeren bir çözeltinin optimum koşullarda yürütülen bir analizinden elde edilen kromatogramı Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. AA (0,1 µg/mL) ve IS (5 µg/mL) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı

Optimum koşullarda yürütülen analizlerde gözlenen sistem uygunluk parametreleri ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları

Parametre değer (n=6;0.25µg/mL)	Gözlenen değer				Önerilen
	GA	Serinn	GLY	GABA	
Alıkonma zamanı (dakika)	7,5	11	14,6	18,7	-
Teorik tabaka sayısı (N)	19602	32057	49459	83961	>2000
Rezolüsyon (Rs)	31,494	16,805	4,856	16,187	>2
Kapasite faktörü (k')	6	9,8	12	16	2-10
Kuyruklanma faktörü (T)	1,08	1,13	0,11	1,104	≤2
Alıkonma zamanının %BSS's	1,1	0,58	0,66	0,76	<1

4.2. Yöntemin Validasyonu

Validasyon çalışmaları ICH (ICH Q2(R1), 2005) tavsiye ettiği şekilde yöntem geçerliliği uygulamaları geliştirilen yonteme uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı kontrol edilmiştir. Yöntem geçerliliği için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, LOD, LOQ ve sistem uygunluk testleri (SUT) yapılmıştır. Deneylerde standartların ve iç standardın pik normalizasyon oranları (PNO; $PNO = \frac{PN \text{ Std}}{PN \text{ IS}}$, PN= pik alanı/pik alıkonma zamanı) kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

4.2.1. Kesinlik

Sunulan YPSK yöntemi için kesinlik ve doğruluk incelemesi için 3 farklı kalite kontrol (QC) noktası derişimlerden (düşük, orta, yüksek) ve 5 µg/mL IS içeren çözeltilerden oluşmaktadır. Bu çözeltilerin her derişimi için aynı gün içerisinde 6'şar enjeksiyon olacak şekilde (gün içi ve günler arası) analizler yapılmıştır. Kesinlik, % BSS [$(\text{Standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100$] ile gösterilmiştir. % BSS'nin gün içi ve günler arası değerleri Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir. %2'nin altında % BSS değerleri yöntemin kesinliği ve tekrar edilebilirlikte olduğunu kanıtlanmış denenebilir.

Çizelge 4.4. GA'in doğruluk ve kesinlik sonuçları

Eklenen Derişim (µg/mL)	Gün içi degerler (n=6)				Günler arası (n=18)			
	Ölçülen Derişim	% G. K	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	% BSS
0,05	0,051	101,5	1,46	0,91	0,05	101,3	1,36	0,87
0,25	0,248	100,4	0,5	1,3	0,251	101,6	1,62	1,23
2	2,00	100,6	0,7	1,15	2,02	100,87	0,87	1,12

Çizelge 4.5. Serin'in doğruluk ve kesinlik sonuçları

Eklenen Derişim (µg/mL)	Gün içi degerler (n=6)				Günler arası (n=18)			
	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS
0,025	0,0254	100,3	0,3	0,76	0,0247	100,98	0,98	0,76
0,25	0,2521	100,8	0,8	1,12	0,25	100,07	0,07	1,12
2	1,998	100,03	0,03	1,01	2,02	99,99	- 0,01	1,01

Çizelge 4.6. GLY'in doğruluk ve kesinlik sonuçları

Eklenen Derişim (µg/mL)	Gün içi degerler (n=6)				Günler arası (n=18)			
	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS
0,01	0,0102	101,17	1,17	0,97	0,0101	101,183	1,17	0,97
0,25	0,252	100,23	0,23	0,66	0,256	100,27	0,27	0,73
2	1,993	100,01	0,01	0,83	2,0002	100,1	0,1	0,91

Çizelge 4.7. GABA'in doğruluk ve kesinlik sonuçları

Eklenen Derişim (µg/mL)	Gün içi degerler (n=6)				Günler arası (n=18)			
	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	%G. K	SH	%BSS
0,01	0,009	100,15	0,15	0,913	0,01	100,63	0,63	0,91
0,25	0,253	101,43	0,43	0,84	0,251	100,31	0,31	0,76
2	2,021	101,05	1,05	0,78	2,01	100,56	0,56	0,44

4.2.2. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunu araştırmak için yedişer tekrarlı 3 setin analiz verileri ile yapılan hesaplamalar sonucunda %99,9-101,62 arasında değişkenlik gösteren % geri kazanım değerleri ve %2'den az % hata değerleri elde edilmiştir. Çizelge 4.4, 4.5, 4.6, 4.7'de gösterilmiş olan % geri kazanım ve % hata değerleri yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

4.2.3. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık çalışması kapsamında 6 farklı derişimde analiz edilmiş ve derişim aralığı 0,05 - 2 µg/mL olarak belirlenmiştir. AA çözeltilerinin üç ayrı günde ve 6'şar kez enjeksiyonları yapılmıştır. Doğrusallık sonuçları AA'lerin (GA, Serin, GLY, GABA) için sırasıyla çizelge 4.8, 4.9, 4.10, 4.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. GA'in doğrusallık sonuçları

Parametre (0,05-2 µg/mL)	1.GÜN (n=6)	2.GÜN (n=6)	3. GÜN (n=6)	Günler Arası (n=18)
Eğim	1,631803	1,762936	1,761543	1,718761
Kesim	0,0094	-0,01961	-0,01921	-0,01175
Kesim standart Sapma	0,048588	0,105427	0,108162	0,087392
r ²	0,999	1	0,995	0,996
LOD(µg/mL)	0,02			
LOQ(µg/mL)	0,06			

Çizelge 4.9. Serin'nin doğrusallık sonuçları

Parametre (0,05-2 µg/mL)	1.GÜN (n=6)	2.GÜN (n=6)	3. GÜN (n=6)	Günler Arası (n=18)
Eğim	3,787038	3,781902	3,781906	3,783615
Kesim	0,1527	0,162319	0,161294	0,1588
Kesim standart sapma	0,063227	0,064051	0,070887	0,066055
r ²	0,9996	0,9996	0,9995	0,9996
LOD(µg/mL)	0,13			
LOQ(µg/mL)	0,4			

Çizelge 4.10. *GLY'in doğrusallık sonuçları*

Parametre	1.GÜN	2.GÜN	3. GÜN	Günler Arası
(0,05-2 µg/mL)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=18)
Eğim	6,785103	6,786226	6,791562	5,090723
Kesim	0,010948	0,006565	0,008662	0,008725
Kesim standart sapma	0,087961	0,091174	0,089089	0,089408
r ²	0,9998	0,9997	0,9998	0,9998
LOD(µg/mL)	0,05			
LOQ(µg/mL)	0,02			

Çizelge 4.11. *GABA'in doğrusallık sonuçları*

Parametre	1.GÜN	2.GÜN	3. GÜN	Günler Arası
(0,05-2 µg/mL)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=18)
Eğim	3,9846	3,9843	3,9874	3,9855
Kesim	0,040217	0,040449	0,039688	0,040118
Kesim standart sapma	0,073382	0,07742	0,076795	0,075866
r ²	0,9995	0,9995	0,9995	0,9995
LOD (µg/mL)	0,3			
LOQ (µg/mL)	1,01			

4.2.4. Saptama sınırı ve tayin sınırı

Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır.

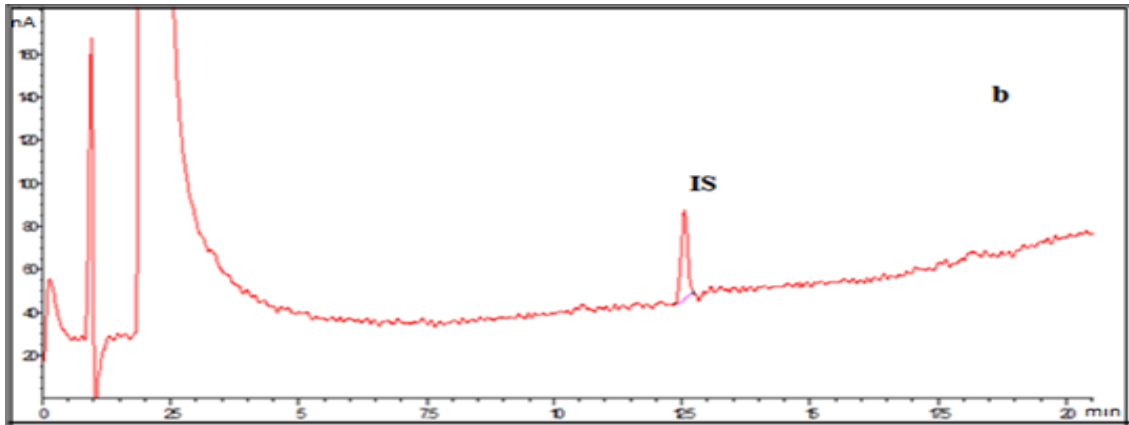
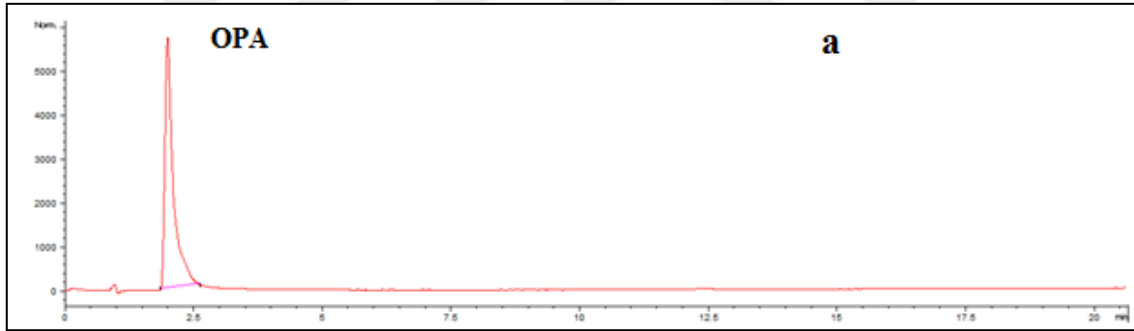
$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{standart sapma (ss)}/\text{eğim (m)}$$

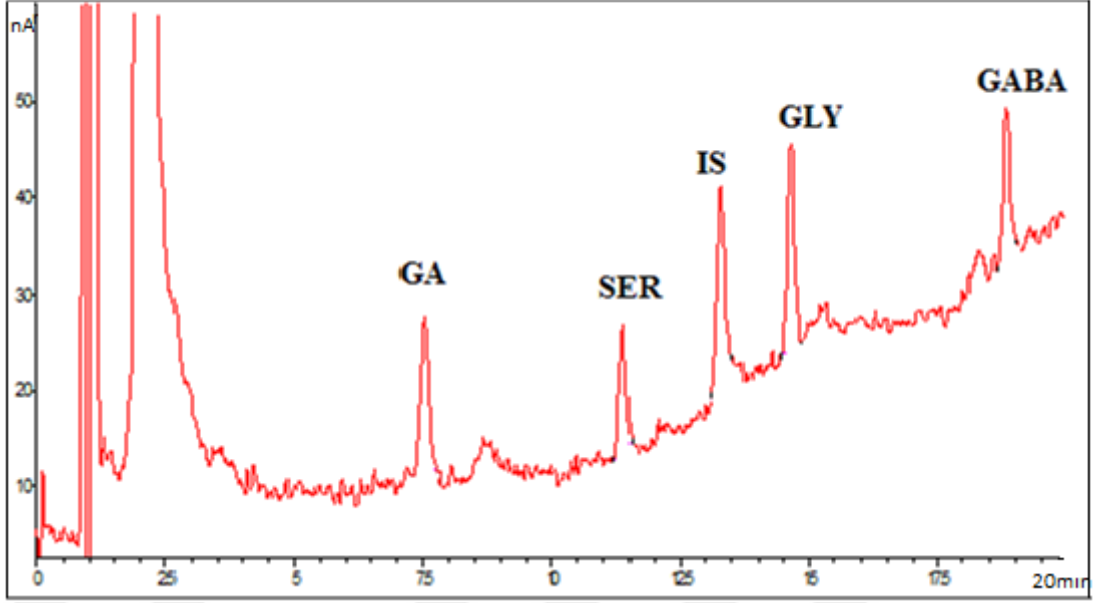
$$\text{LOQ} = 10 \times \text{standart sapma (ss)}/\text{eğim (m)}$$

Bu formüllerde yer alan 'SS' düşük derişimdeki madde çözeltisinin standart sapma değeri ve 'm' kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir. Geliştirilen yöntemle AA'lerin (GA, Serin, GLY, GABA) tayini için LOD değerleri sırayla (0,02; 0,13; 0,05; 0,3 µg/mL), LOQ değerleri ise sırayla (0,06; 0,4; 0,02; 1,01 µg/mL) olarak bulunmuştur.

4.2.5. Seçicilik

Seçicilik çalışması için hareketli faz, İS, AA standartından elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2.'de verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, AA ve İS piklerinin birbirlerinden iyi bir biçimde ayrıldığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre, yöntem seçici olduğu gösterilmiştir.

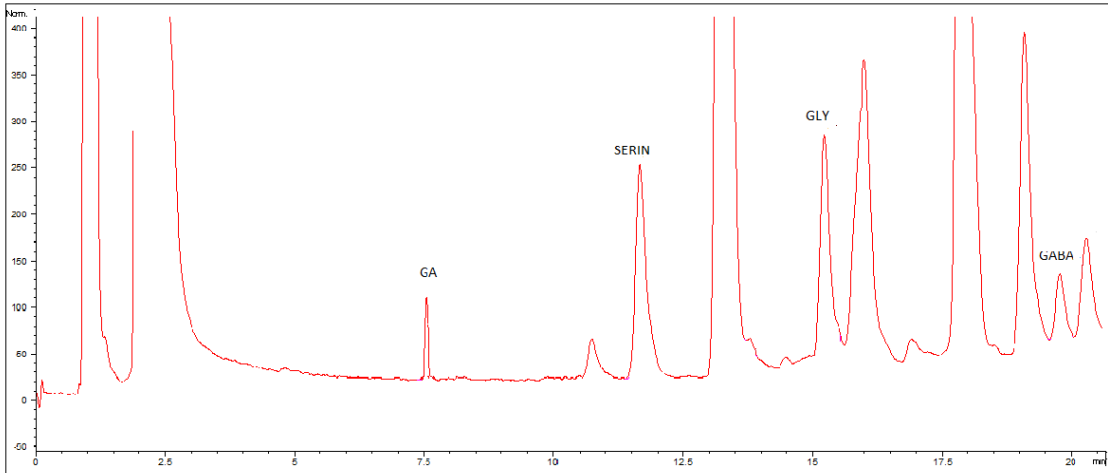




Şekil 4.2. Boş örnek kromatogramı (a), İç standart kromatogramı (b), AA (0,1 µg/mL) ve IS (5 µg/mL) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı (c)

4.3. Mikrodiyaliz Örneklerin Analizi

Mikrodiyaliz çalışmalarında ise mikrodiyaliz yüd den fazla örneklerinde içeren dört amino asiti optimum koşullarda yürütülen bir analizinden elde edilen kromatogramı aşağıdaki Şekil 4.3.'te görülmektedir.



Şekil 4.3. Mikrodiyaliz örneklerinde optimum koşullarda yürütülen bir analizinden elde edilen kromatogramı

Çizelge 4.12. Mikrodiyaliz örneklerin sonuçları

Örnek adı	Ölçülen AA derişimi (µg/mL)			
	GA	SERİN	GLY	GABA
VK6.14	0,063	1,571	0,014	0,329
VK5.14	0,104	2,605	0,020	0,378
VD6.14	0,280	0,607	0,013	0,034
VD5.14	0,312	3,743	0,027	0,558
VD4.14	0,311	okunmadı	0,013	0,031
VD3.14	0,411	1,819	0,028	0,366
VD1.14	0,223	0,517	0,298	0,022
VD2.14	0,177	0,014	0,005	okunmadı
VK1.14	0,022	0,018	0,010	okunmadı
VK2.14	0,016	1,108	0,841	0,896
VK3.14	0,043	2,332	0,913	1,531
VK4.14	0,020	0,257	0,309	0,633
VK1.13	0,558	2,246	0,625	0,800
VK2.13	0,104	1,612	1,034	1,201
VK3.13	0,077	2,704	0,991	1,515
VK4.13	0,074	0,355	0,449	0,805
VK5.12	0,069	1,767	1,135	0,886
VK6.12	0,086	1,788	0,952	0,356
VK6.13	0,067	3,096	1,970	0,653
VK5.13	0,030	1,472	0,953	0,212
VD6.13	0,199	0,423	1,036	0,038
VD5.13	0,365	3,391	4,573	2,718
VD4.13	0,224	0,035	0,552	0,485
VD3.13	0,244	2,673	4,132	1,834
VD2.13	0,163	okunmadı	0,440	0,337
VD1.13	0,224	0,362	0,527	0,368
VK1.12	1,572	6,293	1,771	0,419
VK2.12	0,034	3,863	2,119	0,223
VK3.12	0,126	4,146	1,185	0,380
VK4.12	0,045	0,683	0,736	0,007
VD1.12	0,542	0,836	0,851	0,067
VD2.12	0,022	0,001	0,009	0,018
VD3.12	2,002	30,211	0,221	4,003
VD4.12	0,336	0,330	0,005	0,077
VD5.12	0,545	16,909	0,106	2,159
VD6.12	0,234	1,28	0,257	2,572

Çizelge 4.12. Mikrodiyaliz örneklerin sonuçları (devamı)

Örnek adı	Ölçülen AA derişimi (µg/mL)			
	GA	SERİN	GLY	GABA
VK1.11	0,889	3,424	1,244	0,417
VK2.11	0,127	3,349	2,307	0,457
VK3.11	0,068	3,311	0,816	0,280
VK4.11	0,119	2,070	1,083	0,663
VD1.11	1,637	3,010	4,166	1,691
VD2.11	0,133	0,162	0,014	0,167
VD3.11	2,034	2,601	9,835	2,803
VD4.11	0,610	1,607	0,073	0,024
VD5.11	0,122	2,359	1,438	0,374
VD6.10	0,782	3,175	6,438	0,087
VD1.10	0,638	1,690	1,537	0,829
VD2.10	0,260	0,523	0,062	0,031
VD3.10	3,834	38,313	22,590	6,645
VD4.10	0,674	2,529	1,984	0,241
VD5.10	0,691	14,009	7,713	2,043
VD6.10	0,782	3,175	6,438	0,087
VK5.10	3,543	36,817	19,389	3,983
VK6.10	4,2581	0,596	32,110	10,524
VK6.11	1,611	59,311	27,246	9,096
VK5.11	2,2634	5,028	21,806	4,350
VK4.10	0,017	0,090	0,006	okunmadı
VK3.10	0,055	3,922	5,067	0,661
VK2.10	8,9289	4,1666	8,188	3,580
VK1.10	2,965	15,769	8,998	0,314
VK1.9	6,524	27,606	15,910	0,551
VK2.9	12,4277	8,319	52,617	3,807
VK3.9	6,298	81,553	45,755	2,133
VK4.9	0,702	31,014	24,563	2,494
VD1.9	4,931	44,525	41,102	2,246
VD2.9	0,537	2,301	2,988	0,451
VD3.9	0,779	10,244	8,004	0,118
VD4.9	0,880	2,099	4,705	0,292
VD5.9	0,661	8,164	6,394	0,227
VD6.9	1,327	3,213	14,357	0,339
VK5.9	0,543	6,324	5,872	0,124
VK6.9	0,966	7,717	5,341	0,110
VK6.8	0,699	8,443	6,047	0,177
VK5.8	1,139	8,582	8,074	0,222
VD6.8	0,289	2,864	8,265	0,247
VD5.8	0,337	8,4123	0,892	0,115
VD4.8	1,162	2,094	2,003	0,220

Çizelge 4.12. Mikrodiyaliz örneklerin sonuçları (devamı)

Örnek adı	Ölçülen AA derişimi (µg/mL)			
	GA	SERİN	GLY	GABA
VD3.8	0,412	4,552	3,449	0,386
VD2.8	0,499	2,268	1,449	0,196
VD1.8	0,203	1,567	0,746	0,011
VK4.8	0,067	2,705	0,662	0,042
VK3.8	0,241	4,336	0,902	0,048
VK2.8	0,641	2,606	1,061	0,011
VK1.8	0,457	1,646	0,380	0,086
VK1.7	0,421	1,465	0,375	0,085
VK2.7	0,685	2,050	0,756	0,144
VK3.7	0,171	2,263	0,363	0,103
VK4.7	0,162	2,415	0,563	0,069
VD1.7	0,028	0,889	0,346	0,072
VD2.7	0,100	0,329	0,242	0,009
VD3.7	2,298	12,248	8,085	1,424
VD4.7	1,210	2,125	2,741	0,034
VD5.7	0,320	8,582	4,866	0,868
VD6.7	0,750	4,151	4,380	0,034
VK5.7	1,404	6,231	3,447	0,494
VK6.7	1,239	9,826	5,668	1,191
VK6.6	2,2071	3,301	8,536	1,756
VK5.6	1,212	8,514	5,130	0,588
VD6.6	0,203	1,054	0,962	0,004
VD5.6	0,384	3,596	1,958	0,287
VD4.6	0,299	1,015	0,831	0,015
VD3.6	0,897	5,634	3,711	0,362
VD2.6	0,149	0,684	0,045	0,597

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, beyin biyolojik sıvılarında kullanılan mikrodiyaliz örneklerinde içeren amino asitlerin analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Analiz çapı 5µm, uzunluğu 3,0 mm, toplam uzunluğu 15cm olan bir Agilent Zorbax Eclipse C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. En iyi sonuçlar yapılan deneyler sonucu derişimi 50mM ve pH'ı 6,5 olan fosfat tamponu ile +600 mV+150 mV Potansiyel ve 700 mV çalışma elektrodu kullanılarak elde edilmiştir. Bu koşullarda amino asitlerinin alıkonma zamanları yaklaşık 7,5 dk (GA), 11 dk (SERİN), 14,6 dk (GLY), 18,7 dk (GABA)'dır. İç standart olarak kullanılan 4-Amino-3-hydroxybenzoic acid'in alıkonma zamanı ise 12,5 dk olarak bulunmuştur.

Amino asitlerin analizi için; ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Clarke vd, 2007), sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) (Defaix vd, 2018), LOQ GABA için 0,63 ng/mL, L-GA için 1,25 ng/mL bulmuşlardır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi YPSK-EKD (Agustin vd, 2009), için EKD ile YPSK yöntemleri literatürde yer almaktadır. Akula ve Akur, 2015 sıçan beyin doku preparatlarında GABA'in bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik (RP-YPSK) yöntemi geliştirmişlerdir. İzokratik bir karışım'dan oluşuyordu. Yöntem 1-25,8 ng/mL aralığında doğrusaldır. Düşük GABA LOQ ve LOD değerlerini 1 ve 0,05 ng/mL bulmuşlardır. Bu çalışma Gutamat, Glisin, GABA ve Serin analizi için geliştirilen ilk ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (EKD) yöntemidir.

Yöntemin validasyon parametreleri ICH'ye göre yapılmıştır. Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve seçicilik testleri yapılmıştır. Yöntemin 0,05 - 2 µg/mL derişim aralığında doğrusal'dır ve günler arası R^2 değeri 0,996- 0,9998 arasında olarak bulunmuştur. Doğruluk ve kesinlik için %geri kazanım ve %BSS değerleri hesaplanmıştır. %BSS değeri %2'nin altında olduğu görülmüştür, bu da yöntemin kesinliği ve tekrar edilebilirlikte olduğunu kanıtlamaktadır. Doğruluk için %geri kazanım değeri %99,9-101,62 arasında değişmektedir ve %2'den az % hata değerleri elde edilmiştir. Sisteme uygunluk parametreleri de verilmiştir ve değerler kabul sınırları içindedir.

Yöntemin geçerliliği bulunduktan sonra mikrodiyaliz amino asitleri içeren örneklerinde uygulanmıştır. Mikrodiyaliz örneklerinde amino asit içeren yüzden fazla örnek analiz edilmiştir. Mikrodiyaliz örneklerinde optimum koşullarda yürütülen bir

analizinden elde edilen kromatogramı Şekil 4.2’de görülmektedir. Yapılan bu yöntem mikrodiyaliz örneklerinde amino asitleri içeren analizi için geliştirilen ilk ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (EKD) yöntemidir.

Sonuç olarak, tez kapsamında, mikrodiyaliz örneklerinde amino asitleri tayinine yönelik geliştirilmiş olan RP-HPLC (EKD) yönteminin literatüre katkı sağlayacağı söylenebilir.



KAYNAKÇA

Acuña, A. A. M., Trías, J. F. (2009). A high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates. *Journal of Neuroscience Methods*, 183 (2), 176-181.

Agustin, Z., Vladimir, I., Chefer, T. S., Shippenberg, L. D. (2009). Detection and Quantification of Neurotransmitters in Dialysates, (7)(430).

Akula, K. K., Candrasekaran, B., Kaur, M. S. K., Kulkarni, S.K. (2015). Development and Validation of a Specific RP-HPLC Method for the Estimation of γ -Aminobutyric Acid in Rat Brain Tissue Samples Using Benzoyl Chloride Derivatization and PDA Detection. *Acta Chromatographica*, (27) (3) .

Avila, A., Nguyen, L., Rigo, J.M. (2013). Glycine receptors and brain development. *Front Cell Neurosci*, (7)(184).

Bartolomeo, M.P ve Maisano, F. (2006). Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. *Biomol Tech*, 17(2), 131–137.

Bazemore, A., Elliott, K.A., Florey, E. (1956). factor \bar{I} and gamma-aminobutyric acid. *Nature*, 1052-1053.

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., Gassmann, M. (2004). Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. *the American Physiological Society*, 835 – 867.

Buck, K., Voehringer, P., Feger, B. (2009) . Rapid analysis of GABA and glutamate in microdialysis samples using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry *Journal of Neuroscience Methods*, (182), 78-84.

Chan, W.S., Lin, G., Yamamoto, K., Yew, D.T.W., Rudd, J.A. (2010). Simultaneous determination of amino acids in discrete brain areas in *Suncus murinus* by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (53), 705-709.

Clarke, G., O'Mahony, S., Malone, G., Dinan, T.G. (2007). An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain, *J. Neurosci. Meth*, (160), 223-230.

Dahlin, M., Elfving, A., Ungerstedt, U., Åmarka, P. (2005). The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Research*, V (64), 115-125.

Defaix, C., Solgadi, A., Pham, T. H., Gardier, A. M., Chaminade, P., Tritschler, L. (2018). Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, V(152), 31-38.

Dorresteyn, R. C., Berwald, L. G., Zomera, C. D. de Gooijerb, G. C. D., Wietena, G., Beuverya, E. C. (1996). Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography*, V(724), 159-167.

Ebrahim, A. H. ve Ebrahimi, S. (2015). Evaluation of the Effects of Charged Amino Acids on Uncontrolled Seizures. *Neurology Research International*, Article Clinical Study.

European Pharmacopoeia 8th Edition. 2016. EDQM, Strasbourg.

Forster, C. D., Marsden, Ch. A. . *Amino Acid Analysis Protocols, The Analysis of Amino Acids Using Precolumn Derivatization, HPLC, and Electrochemical Detection*. Part of the *Methods in Molecular Biology™* book series, MIMB, V(159), 55-62.

Goetz, T., Arslan, A., Wisden, W., Wulff, P. (2007). GABAA receptors structure and function in the basal ganglia. *Progress in Brain Research*, (160), 21-41, 21-41.

Hanczk, R., Perl, I. M. (2003). Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol reagent, 103-113.

International Conference on Harmonisation Expert Working Group, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2(R1). In: *ICH Harmonised Tripartite*

Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (2005).

Jonas, P., Monyer, H. (1999). Handbook Ionotropic Glutamate receptors in the CNS. Springer , 3-98.

Kapalka, G.M. (2010). Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents Chapter 6 – Depression. Therapies for Children and Adolescents ,A Handbook for Mental Health Clinicians, Practical Resources for the Mental Health Professional, 141-187.

Khuhawar, M.Y., Rajper, A. D. (2003). Liquid chromatographic determination of gamma aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent, J. Chromatogr, B, (788), 413-418.

Kotani, A., Kitamura, K., Kusu, F., Yamamoto, K., Hakamata, H. (2018). Voltammetric Determination of Amino Acids Based on the Measurement of Reduction Prepeak of Quinone Caused by Surplus Acid after Neutralization . Electroanalysis Electroanalysis.

Kühnreich, R. (2016) . Development and Validation of Methods for Impurity Profiling of Amino Acids. Doctor Dissertation, Julius Maximilians University of Würzburg, 170, Würzburg.

Madsen, K., Schousboe, A., Beyaz, H. S. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control . Neurochemistry International, V (61), 546-558.

Mahmoud, T. A., AbdelTawab, M. A. (1999). Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Glutamate Levels in the CSF of Epileptic Children . Alexandria Journal of Pediatrics, V (13), 2.

McDonald, J. W., Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. Brain Resea Reviews, 41-70.

Meldrum, B. (1993). Amino acids as dietary excitotoxins: A contribution to understanding neurodegenerative disorders .Biology Medicine. Brain Research Reviews, Res18:293-314.

Michaeli, S., Fromm, H. (2015). Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined?. Frontiers in Plant Science ,v(6).

Mine, E., Kaya, Ö., Korkmaz, O.T., Uğur, D.Y., Şener, E., Tunçel, N., Tunçel, M. (2019). Determination of Ochratoxin-A in the brain microdialysates and plasma of awake, freely moving rats using ultra high performance liquid chromatography fluorescence detection method. Journal of Chromatography B, V(1125).

Moss, S.J., McDonald, B., Gorrie, G.H., Krishek, B.K., Smart, T.G. (1996). GABA Receptors, Transporters and Metabolism . 173 – 184.

Ogawa, F., Hasegawa, D., Mizoguchi, S.H., Yonezawa, T., Matsuki, N. (2019). Excitatory and Inhibitory Amino Acids in Cerebrospinal Fluid of Familial Spontaneous Epileptic Cats., Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis, Research Article, J Vet Sci Med Diagn, V(8).

Panrod, K., Tansirikongkol, A., Panapisal, V. (2016). Comparison of validated highperformance liquid chromatography methods using two derivatizing agents for gamma-aminobutyric acid quantification .Thai Journal of Pharmaceutical Sciences ,V(40).

Patri, M. (2019). Synaptic Transmission and Amino Acid Neurotransmitters .

Piepponen, T.P., Skujins, A. (2001). Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and γ -aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography–fluorescence detection with o-phthalaldehyde–mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. Journal of Chromatography

Pilzer, L.I. (1963). "The Pathway and Control of Serine Biosynthesis in *Escherichia coli*". *Biomedical Sciences and Applications*,V (757), 277-283.

Qiab, X, Wanga, W. F, Wang, J., Yang, J. L., Shi, Y.P. (2018). Highly selective colorimetric detection of putrescine in fish products using o-phthalaldehyde derivatization reaction. Food Chemistry, V (259), 245-250.

Rahman, A. U., FRS, (2002). Gama Bütirik Acid.Studies in Natural Products Chemistry , 247 – 267.

Sanger, G. J, Munonyara, M. L., Dass, N., Prosser, H., Pangalos, M. N., ve Parsons, M. E. (2002). GABA(B) receptor function in the ileum and urinary bladder of wildtype and GABA(B1) subunit null mice. *Auton. Autacoid. Pharmacol*, (22), 147–154.

Sherwin, A. L. (1999). Neuroactive Amino Acids in Focally Epileptic Human Brain: A Review .*Neurochemical Research*, V (24), 1387-1395.

Silva, D. M. F, Ferraz, V. P., Ribeiro, A. M. (2009). Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain . *Journal of Neuroscience Methods*,V(177), 289-293.

Soto,O. R., Méndez, A. E., Galán,V., Aguilar,V. J. E., Sierra, M. G. (1994). Quantitative analysis of neuroactive amino acids in brain tissue by liquid chromatography using fluorescent pre-column labelling with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine.

Stein, V., Nicoll, RA. (2003). GABA generates excitement. *Neuron*, 375-3786, 375-378.

Vannier, C., Triller, A. (1997). Biology of the postsynaptic receptor. *International Review of Cytolog.* 201-244.

Wang, W.W., Wu, G. Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans. Implications for nutrition and health.

Willetts, J., Balster, R. L., Leander, J. D. (1990). The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends Pharmacol*, 11:423-428 .

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Lazarow, A., Luhovyy, B., Wehrli, S. I. N. (2005). Response of brain amino acid metabolism to ketosis . *NeurochemistryInternational*,V (47), , 119-128.

Zacharis, C. K., Theodoridis, G. A., Voulgaropoulos, A. N. (2004). On-line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of γ -aminobutyric acid in human biological fluids, *J. Chromatogr.* (808), 169-175.

Zanan, R., John, S., Khandagale, K., Nadaf , A., Rashmi, D. (2018). γ -Aminobutyric Acid (GABA): Biosynthesis, Role, Commercial Production, and Applications. Studies in Natural Products Chemistry, (13) ,413-4522018, 413-452 .

Zandy, Sh. L., Doherty, J. M., Wibisono, N. D., Gonzales, R.A. (2017). High sensitivity HPLC method for analysis of in vivo extracellular GABA using optimized fluorescence parameters for o-phthalaldehyde (OPA)/sulfite derivatives. Journal of Chromatography B, V (1055–1056), 1-715.

http-1:<http://bilsenbesergil.blogspot.com> (Erişim tarihi: 02.11.2020)

http-2: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Serin> (Erişim tarihi: 22.05.2020)

http-3: <https://ar.wikipedia.org/wiki>(Erişim tarihi: 22.05.2020)

http-4: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Glisin>(Erişim tarihi: 22.05.2020)

http-5:https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric_acid(Erişim tarihi: 05.02.2021)