



УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ
АКАДЕМИЈЕ

Марко Антуновић

ПРЕТКЛИНИЧКИ И КЛИНИЧКИ АСПЕКТИ ТОКСИЧНОСТИ
ПРЕГАБАЛИНА СА АНАЛИТИЧКОМ ПОТВРДОМ

Докторска дисертација

Београд, 2023. године



UNIVERSITY OF DEFENSE
MEDICAL FACULTY OF THE MILITARY MEDICAL ACADEMY

Marko Antunović

PRECLINICAL AND CLINICAL ASPECTS
OF PREGABALIN TOXICITY WITH ANALYTICAL
CONFIRMATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Име и презиме: Марко Антуновић
Наслов: Претклинички и клинички аспекти токсичности прегабалина са аналитичком потврдом
Установа где је рад израђен: Војномедицинска академија, Београд
Ментор: ВС проф. др Снежана Ђорђевић, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, редовни професор, ужа научна област: медицинска хемија
Комисија за оцену теме и тезе: <ol style="list-style-type: none">1. ВС проф. др Весна Килибарда, редовни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: токсикологија и медицинска хемија, председник2. ВС проф. др Славица Вучинић, редовни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: фармакологија и токсикологија, члан3. ВС проф. др Снежана Ђорђевић, редовни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: медицинска хемија, члан4. ВС проф. др Звездана Стојановић, ванредни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: психијатрија, члан5. Проф. др Маријана Ђурчић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, ужа научна област: токсикологија, члан
Комисија за оцену готове докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. ВС проф. др Весна Килибарда, редовни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: токсикологија и медицинска хемија, председник2. ВС проф. др Славица Вучинић, редовни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: фармакологија и токсикологија, члан3. ВС проф. др Звездана Стојановић, ванредни професор, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: психијатрија, члан4. ВС проф. др Наташа Перковић Вукчевић, доцент, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране, ужа научна област: фармакологија и токсикологија, члан5. Проф. др Маријана Ђурчић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, ужа научна област: токсикологија, члан

Acta non verba

САЖЕТАК

Прегабалин је психоактивни лек из групе габепентиноида који традиционално није коришћен у циљу злоупотребе. Међутим, последњих година све је више доказа који говоре у прилог наглог пораста терапијске употребе, акутних тровања и злоупотребе овог лека. Као резултат, прегабалин је у многим земљама класификован као контролисана психоактивна супстанца. Ипак, досадашњи подаци, у којима је анализирана токсичност прегабалина, су ограничени.

Циљеви овог рада су били испитивање учесталости акутних тровања и (зло)употребе прегабалина као и утврђивање главних социо-демографских карактеристика и клиничких манифестација тровања код испитиване популације пацијената лечених у Центру за контролу тровања Војномедицинске академије (ЦКТ ВМА). У експерименталном делу истраживања су испитиване интеракције прегабалина и клоназема, комбинације лекова која је била најчешћа у акутним тровањима, посебно у случајевима злоупотребе.

Ретроспективном анализом података ЦКТ ВМА, у периоду између 2012. и 2022. године је забележено 357 (95,5%) случајева тровања прегабалином и 17 (4,5%) случајева тровања габепентином. У високом проценту детектована је злоупотреба прегабалина (27,8%), најчешће код пацијената мушког пола, млађе животне доби који из мигрантске популације.

Иzolована тровања прегабалином су у највећем броју случајева била лаког степена (86,6%), док је коингестија психоактивних лекова и супстанци у око 37% доводила до тровања средње тешког и тешког степена. Иако су утврђене интериндивидуалне варијације код пацијената са различитим степеном тежине тровања, статистичком анализом података добијен је висок степен корелације ингестиране дозе и концентрације прегабалина са степеном тежине тровања и дужином трајања хоспитализације.

Применом теста спонтане локомоторне активности и ротарод теста, утврђено је да прегабалин у значајној мери потенцира седативне и атаксичне ефекте клоназема код пацова. Применом аналитичких метода за одређивање концентрације прегабалина и клоназема у плазми и хомогенатима ткива мозга пацова, нису утврђене фармакокинетичке интеракције ова два лека.

У циљу смањења ризика од злоупотребе прегабалина потребна је боља едукација здравствених радника и пацијената, строжији надзор прописивања и издавања прегабалина, нарочито пацијентима код којих постоји ризик од злоупотребе.

Кључне речи: габепентиноиди, акутна тровања, злоупотреба, клоназепам, психоактивне супстанце

ABSTRACT

Pregabalin is a psychoactive drug that has not traditionally been abused. There is a growing body of literature that support a sharp increase in the therapeutic use, acute poisonings, and abuse of this drug. As a result, pregabalin is classified as a controlled psychoactive substance in many countries. However, literature data analyzing the pregabalin toxicity are limited.

The aim of this work was to investigate the frequency of acute poisoning and (ab)use cases of pregabalin and to determine the main sociodemographic characteristics and clinical manifestations of poisoning in the studied population of patients treated at the National Poison Control Center of Serbia (NPCC). In the experimental part of the study interactions between pregabalin and clonazepam, the drug combination most frequently encountered in acute poisonings, were investigated.

A retrospective analysis of data from NPCC, between 2012 and 2022, showed there was 357 (95.5%) and 17 (4.5%) cases of pregabalin and gabapentin poisoning, respectively. Pregabalin abuse was detected in a high percentage (27.8%), most frequently in male patients of younger age who were from socially vulnerable groups (migrants).

Isolated pregabalin poisonings were mild in the majority of cases (86.6%), while co-ingestion of psychoactive drugs and substances resulted in moderate and severe poisonings in about 37%. Statistical analysis of the data showed a strong correlation of the ingested dose and concentration of pregabalin with the severity of poisoning and the duration of hospitalization.

In the experimental part, pregabalin was found to significantly potentiate the sedative and ataxic effects of clonazepam in rats. The analytical methods used to determine pregabalin and clonazepam in plasma and rat brain tissue showed that there were no pharmacokinetic interactions between these two drugs.

To reduce the risk of pregabalin abuse, better education and monitoring of pregabalin prescribing and dispensing are paramount, especially in patients at risk of abuse.

Keywords: gabapentinoids, acute poisoning, abuse, clonazepam, psychoactive substances

САДРЖАЈ

УВОД	1
ПРЕГАБАЛИН	3
ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ПРЕГАБАЛИНА.....	3
ФАРМАКОКИНЕТИКА ПРЕГАБАЛИНА	5
Ресорпција и дистрибуција	7
Метаболизам и излучивање	8
Фармацеутско-технолошке формулације	8
Фармакокинетичке интеракције	8
ФАРМАКОДИНАМИКА ПРЕГАБАЛИНА.....	9
Фармакодинамске интеракције.....	9
Механизам деловања прегабалина	10
НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА И ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ	12
АКУТНА ТРОВАЊА ПРЕГАБАЛИНОМ	13
(ЗЛО)УПОТРЕБА ПРЕГАБАЛИНА И ПРАВНИ СТАТУС ЛЕКА	14
КЛОНАЗЕПАМ	16
ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	18
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	19
РЕТРОСПЕКТИВНА ОПСЕРВАЦИОНА СТУДИЈА ПРЕСЕКА.....	19
Извори података и популација која се истражује	19
Терминологија и дефиниције	20
Анализиране варијабле у студији	20
Статистичка анализа и обрада података	23
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	24
Експерименталне животиње.....	24
Експерименталне супстанце	25
Фармакодинамска испитивања	26
Фармакокинетичка испитивања	28
Валидација биоаналитичких метода	29
Статистичка анализа и обрада података	33

РЕЗУЛТАТИ	34
РЕТРОСПЕКТИВНА ОПСЕРВАЦИОНА СТУДИЈА.....	34
Потрошња габапентиноида.....	34
Инциденца акутних тровања габапентиноидима	34
Злоупотреба габапентиноида	36
Главне карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином	37
Клиничке карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином.....	44
Корелација ингестиране дозе прегабалина и фактора тровања у случајевима изолованог тровања прегабалином	48
Корелација ингестиране дозе прегабалина и фактора тровања у случајевима тровања са коингестијом других лекова и супстанци.....	50
Корелација концентрације прегабалина у плазми и фактора тровања у случајевима тровања са коингестијом других лекова и супстанци	52
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	54
Спонтана локомоторна активност	54
Ротарод тест.....	59
Резултати валидационих параметара аналитичке методе за одређивање прегабалина у узорцима плазме и хомогената ткива мозга пацова	64
Резултати валидационих параметара аналитичке методе за одређивање клоназепама у узорцима плазме и хомогената ткива мозга пацова	70
Фармакокинетика клоназепама након појединачне и комбиноване примене са прегабалином	76
Фармакокинетика прегабалина након појединачне и комбиноване примене са клоназепамом	77
ДИСКУСИЈА	78
Потрошња, инциденца акутних тровања и случајева злоупотребе и правни статус габапентиноида у Републици Србији	79
Главне карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином	81
Клиничке карактеристике пацијената са тровањем прегабалином.....	83
Предности и ограничења ретроспективне опсервационе студије	86
Експериментално испитивање интеракција прегабалина и клоназепама	87
ЗАКЉУЧЦИ	89
ЛИТЕРАТУРА	91

УВОД

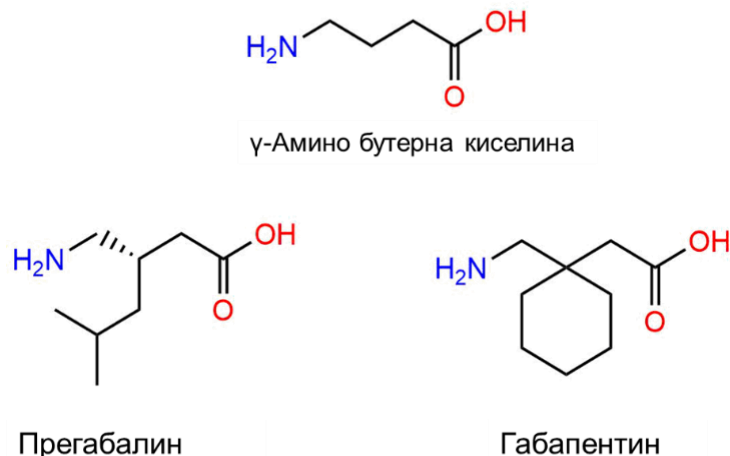
Габапентиноиди, психоактивни лекови који припадају групи антиепилептика, представљају структурне аналоге γ -аминобутерне киселине (енгл. *Gamma-aminobutyric acid* - *GABA*), главног инхибиторног неуротрансмitera у централном нервном систему (ЦНС) човека. Овој групи лекова припадају прегабалин, габапентин и мирогабалин. Иако слични по структури (Слика 1), не везују се за *GABA* рецепторе, нити директно утичу на њен метаболизам, али су ефекти габапентиноида слични ефектима *GABA* у мозгу (1,2).

Габапентин, по структури 3-циклохексил-*GABA*, пронађен је раних седамдесетих година прошлог века у циљу открића лекова за лечење неуролошких поремећаја. Познато је да је *GABA* кључни инхибиторни неуротрансмитер и у њену структуру је додата липофилна група ради повећања биорасположивости. Овако измењена структура *GABA*, требало је да омогући пролаз кроз крвно-моздану баријеру. Међутим, промена структуре довела је до открића габапентина као снажног антиконвулзивног агенса због чега је уведен као антиепилептик, а касније и за лечење неуропатског бола код пост-херпетичне неуралгије и дијабетичне периферне неуропатије (1).

До открића прегабалина дошло је приликом испитивања утицаја 3-алкил-4-аминобутерних киселина на ензим декарбоксилазу глутаминске киселине, који је неопходан за синтезу *GABA*. Тако је синтетисан *S*-(+)-енантиомер 3-изобутил *GABA* – данас познат као прегабалин и откривено да је ефикасан као антиконвулзив (1).

Америчка агенција за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration* - *FDA*) је 2004. године одобрила прегабалин (*Lyrica*[®]) за лечење периферног неуропатског бола (дијабетична неуропатија и пост-херпетичка неуралгија) и као адјувантну терапију парцијалних конвулзија код одраслих са или без секундарне генерализације и 2007. године као први лек за лечење фибромијалгије. Европска агенција за лекове (енгл. *European Medicines Agency* - *EMA*) је је 2004. године одобрила прегабалин (*Lyrica*[®]) за лечење периферног неуропатског бола и као адјувантну терапију парцијалних конвулзија код одраслих са или без секундарне генерализације и 2006. године за лечење генерализованог анксиозног поремећаја код одраслих. И *FDA* и *EMA* су 2012. године дале одобрење за терапијску употребу прегабалина у лечењу централног неуропатског бола узрокованог повредом кичмене мождине (3,4).

Према смерницама Центра за контролу и превенцију болести (енгл. *CDC – Centers for Disease Control and Prevention*) габапентиноиди се препоручују као „прва линија“ за лечење неуропатског бола и фибромијалгије (5,6).



Слика 1. Хемијска структура *GABA*, габапентина и прегабалина¹

У Републици Србији габапентиноиди, габапентин и прегабалин, регистровани су за лечење периферног и централног неуропатског бола код одраслих и као адјувантна терапија у лечењу парцијалних конвулзија са или без секундарне генерализације код одраслих, док је прегабалин додатно регистрован за лечење генерализованог анксиозног поремећаја (7).

Последњих година, у многим земљама света па и код нас, прописивање и употреба габапентиноида значајно су повећани, те је у великој мери превазиђена њихова потрошња у индикацијама за које су регистровани. Велики удео у тренду повећане потрошње габапентиноида свакако има учестала примена ван одобреног индикацијског подручја (*off-label*), када се користе у терапији неких менталних поремећаја, инсомније, синдрома немирних ногу и често као алтернативни аналгетици у терапији различитих болних стања. У многим земљама се *off-label* прописивање вишеструко повећало, највероватније због сталне потраге за безбеднијим алтернативним лековима опиоидима од стране лекара, али и од стране пацијената за лечење различитих стања праћених болом. Као последица, већ неколико година након првог одобрења за терапијску употребу, објављени су и први извештаји о акутним тровањима, погрешној употреби и злоупотреби у рекреативне сврхе као и извештаји о намерним предозирањима у циљу суицида (1).

Према досадашњим сазнањима, злоупотреба прегабалина је чешћа од злоупотребе габапентина, што се може објаснити различитим фармакокинетичким особинама ова два лека. Наиме, након оралне примене, у поређењу са габапентином, прегабалин се брзо и комплетно ресорбује, брже постиже максималну концентрацију у плазми, има већу биорасположивост независно од унете дозе и чак шест пута већи афинитет везивања за рецепторе на месту деловања (1,8,9).

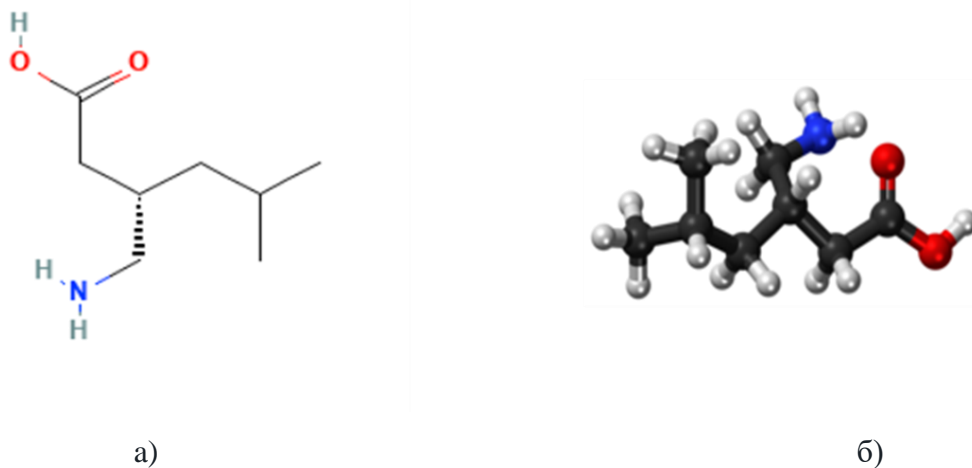
¹ Преузето и прилагођено према: Chincholkar M. Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice. Br J Pain. 2020 May;14(2):104-114.

ПРЕГАБАЛИН

Прегабалин је структурни аналог γ -аминобутерне киселине. Приликом истраживања у вези са синтезом *GABA*, откривено је антиконвулзивно деловање овог лека. Касније су утврђена аналгетска и анксиолитичка својства, због чега се прегабалин у терапији примењује као антиепилептик, у лечењу периферног и централног неуропатског бола код одраслих и у терапији генерализованог анксиозног поремећаја код одраслих, а глобално је веома учестала примена прегабалина ван одобреног индикацијског подручја (*off-label*). Механизам деловања заснива се на везивању за $\alpha_2\text{-}\delta$ субјединице у пресинаптичким волтажно-зависним Ca^{2+} каналима, чиме се инхибира инфлукс калцијума у ћелије и последично супримира ослобађање ексцитаторних неуротрансмитера: глутамата, норадреналина, серотонина, допамина и супстанце *P* из пресинаптичких нервних завршетака хиперексцитираних неурона. На тај начин је инхибирана синаптичка трансмисија и смањена ексцитабилност неурона. Без обзира на чињеницу да је структурни аналог *GABA*, прегабалин се не везује за рецепторе *GABA*, нити ремети метаболизам и транспорт овог неуротрансмитера (1,10-12).

ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ПРЕГАБАЛИНА

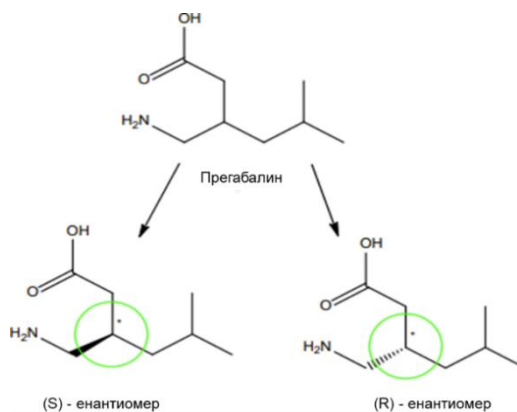
Прегабалин је *S*-енантиомер 3-аминометил-5-метилхексаноичне киселине, односно [*S*-(+)-3-изобутил-ГАБА], молекулске формуле $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_2$ и молекулске масе 159,23 g/mol, (Слика 2) (12-14).



Слика 2. Структурна формула прегабалина: а) 2D структура б) 3D конформација²

² Преузето и прилагођено према: PubChem. Pregabalin [Internet]. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 2023 Apr 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pregabalin>

Доступан је у енантиомерној (*R*) и (*S*) форми, где је (*S*)-енантиомер 10 пута активнији од (*R*)-оптичког изомера (Слика 3) (12,15).



Слика 3. Структура прегабалина са (*S*)- и (*R*)-енантиомерима³

Растворљив је у води (32,1 mg/ml) и делимично растворан у неполарним растварачима (етанол, диметилсулфоксид), термички је стабилан. Главне физичко-хемијске карактеристике прегабалина и разлике у односу на габепентин су приказане у Табели 1 (12-14,16,17).

Табела 1. Физичко-хемијске особине габепентина и прегабалина⁴

Особине	Габепентин	Прегабалин
Молекулска маса (g/mol)	171,24	159,22
pKa	3,7	4,2
pKb	10,7	10,6
Растворљивост у води (mg/mL)	>100	32,1
Log P ^a	-1,25	-1,35

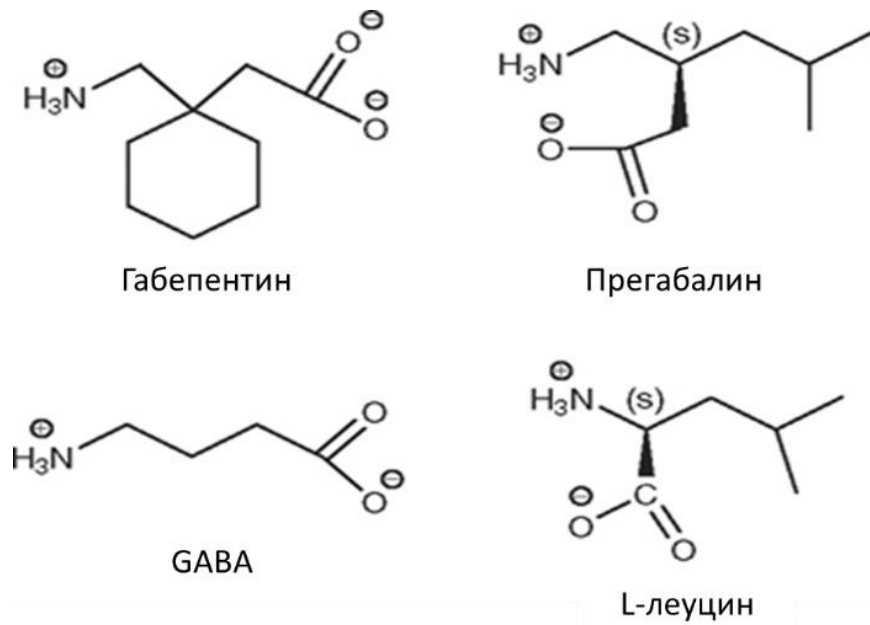
^apH 7,4 (фосфатни пуфер); pKa (-log константе дисоцијације киселине); pKb (-log константе дисоцијације базе)

³ Преузето и прилагођено према: Nagar A, Jain P, Bodkhe S, Agrawal K, Salunke U. Active Enantiomeric Form of Pregabalin Based on Sole and Coupled Chromatography Methods. Pharm Methods. 2022 Feb 18;13(1):14–27.

⁴ Преузето и прилагођено према: Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. Clinical Pharmacokinetics. 2010 Oct;49(10):661–9.

ФАРМАКОКИНЕТИКА ПРЕГАБАЛИНА

Место деловања прегабалина и габапентина је интрацелуларно, за шта је потребан активни транспорт. Наиме, упркос ниској липофилности, габапентиноиди пролазе крвно-моздану баријеру помоћу специфичног носача – транспортера *L* аминокиселина (енгл. *L-type amino acid transporters-LAT*) и тако остварују фармаколошку активност у ЦНС-у. Транспортери *LAT1* и *LAT2* служе за транспорт великих неутралних аминокиселина као што су *L*-леуцин, *L*-фенилаланин, *L*-хистидин и *L*-триптофан, као и хормона штитасте жлезде. Транспортери *LAT1* препознају и неке лекове као што су *L-DOPA* и габапентиноиди, на основу њихове конформационе сличности, Слика 4 (1,11,17-19).



Слика 4. Хемијска структура габапентина, прегабалина, *GABA* и *L*-леуцина⁵

⁵ Преузето и прилагођено према: Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. *Clinical Pharmacokinetics*. 2010 Oct;49(10):661–9.

Габапентиноиди имају сличан механизам деловања, али се знатно разликују по фармакокинетичким и фармакодинамским особинама, Табела 2 (1,10,17).

Табела 2. Фармакокинетички (ФК) и фармакодинамски (ФД) профил прегабалина и габапентина⁶

ФК/ФД параметар	Габапентин	Прегабалин
T_{max} (h)	2 - 3	1
$t_{1/2}$ (h)	5-7	5,5-6,7
V_d (L/kg)	0,8	0,5
Cl_r (ml/min)	125	70
Биорасположивост	27-60%	>90%
Фармакокинетика	Нелинеарна	Линеарна
Интестинални транспорт	Систем транспортера <i>L</i> -амино киселина у танком цреву	Систем транспортера <i>L</i> -амино киселина у танком цреву и проксималном колону
Везивање за протеине плазме	<3%	-
Афинитет за везивање за $\alpha_2\delta$ -1 субјединице	+	+++++
Метаболизам	-	<i>N</i> -метил дериват (0,9%)
Излучивање преко бубрега	100% непромењен	92-99% непромењен
Дозе/дозирање	900-3600 mg/дан 3-4 пута/дан	150-600 mg/дан 2-3 пута/дан

T_{max} : време за постизање максималне концентрације (C_{max}); $t_{1/2}$: полувреме елиминације; V_d : волумен дистрибуције.

⁶ Преузето и прилагођено према: Chincholkar M. Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice. Br J Pain. 2020 May;14(2):104-114.

Ресорпција и дистрибуција

Након оралне примене прегабалина и габапентина, ослобађања из фармацеутског облика и растварања, долази до ресорпције у танком цреву и преласка у системску циркулацију. Прегабалин се брзо и комплетно ресорбује у поређењу са габапентином. Време за постизање максималне концентрације (C_{max}) у плазми након оралне примене (T_{max}) за прегабалин износи један сат, а три сата за габапентин (18).

Биорасположивост тј. удео примењене дозе лека који доспева у системску циркулацију за прегабалин је већи од 90%, а за габапентин износи 30 до 60%. Ове разлике могуће је објаснити механизмом ресорпције. Наиме, оба габапентиноида ресорбују се у танком цреву, али прегабалин се додатно ресорбује и у проксималном делу колона (1,17). Габапентин се ресорбује поступком активног транспорта, искључиво уз помоћ великог неутралног транспортера аминокиселина *LATI*, а како је овај транспортер подложен засићењу, тако је и фармакокинетика габапентина нелинеарна. Како се доза габапентина повећава тако се површина испод криве (енгл. *area under the curve* - *AUC*), концентрација-време не повећава пропорционално. То значи да се биорасположивост габапентина, због сатурационе кинетике смањује са повећањем дозе. Апсолутна биорасположивост габапентина опада са 60 на 33% при повећању дозе са 900 на 3600 mg/дан (1,11,17). Насупрот овом моделу, прегабалин се вероватно поред *LATI* транспортера ресорбује и преко носача који нису подложни сатурацији, са линеарним фармакикинетичким профилем и са мање варијабилности у биолошкој расположивости. Овај параметар остаје преко 90%, независно од унете дозе прегабалина. Такође, за прегабалин вредности за C_{max} и *AUC* су пропорционалне дози (11,17). После поновљене примене, стање равнотеже за прегабалин постиже се у року од 24 до 48 сати (16,19).

Разлике у ресорпцији постоје, али су без клиничког значаја за фармакокинетику. У случају прегабалина храна може знатно да одложи ресорпцију (смањује C_{max} за 25 до 30% и одлаже T_{max} за око 2,5 сата), али без утицаја на обим ресорпције и биорасположивост, те није потребно прилагођавање дозе у односу на врсту и време узимања obroka (1,16,20).

На основу резултата добијених радиографским студијама на експерименталним животињама утврђено је да је дистрибуција прегабалина и габапентина врло слична. Код људи, концентрација оба лека у плазми слична је концентрацији у пуној крви, што указује да улазе у еритроците. Значајан је податак да се габапентиноиди минимално везују за протеине плазме. Вредности за волумен дистрибуције износе 0,8 L/kg за габапентин и 0,5 L/kg за прегабалин. Ово је сагласно доброј растворљивости габапентиноида у води, ниској липофилности, као и изостанку везивања за протеине (1,17,30).

Време потребно за постизање максималне концентрације прегабалина у цереброспиналној течности (ЦСТ) значајно је дуже него у плазми, и износи око 8 сати (1,16). Према литературним подацима концентрација прегабалина у ЦСТ је 1-30% примењене дозе (17).

Прегабалин и габапентин су мали молекули, не везују се за протеине и излучују се преко млека. На основу ограничених резултата, који указују да су количине прегабалина у млеку ниске, не захтева се прекидање дојења старије одојчади. Међутим, код новорођених и превремено рођених беба, препоручује се замена прегабалина алтернативним леком (1,16,19).

Метаболизам и излучивање

Метаболизам прегабалина и габапентина је сличан и занемарљив је. Прегабалин се метаболише до одговарајућег *N*-метил деривата, који је детектован у урину у минималном проценту, свега 0,9% унете дозе лека. Код људи, габапентиноиди се не метаболишу у јетри и не утичу на активност цитохром *P450* ензимског система. У претклиничким студијама није било знакова рацемизације *S*-енантиомера у *R*-енантиомер прегабалина (1,12,16,17).

Екскреција прегабалина и габапентина путем бубрега је једини пут за системско излучивање ових лекова и пропорционална је клиренсу креатинина. Како је ренални клиренс габапентина већи од клиренса креатинина (125 ml/min), лек се излучује урином гломеруларном филтрацијом и активном тубуларном секрецијом. У случају прегабалина ренални клиренс је нижи од клиренса креатинина (70 ml/min), што значи да лек подлеже тубуларној реапсорпцији (17,20). Код пацијената са нормалном бубрежном функцијом, полувреме елиминације за прегабалин је 6,3 сати, а за габапентин 5 до 7 сати. Смањена бубрежна функција може довести до акумулације лекова, па се оба лека дозирају према степену бубрежне инсуфицијенције. У пракси се користе таблице са израчунатим дозама прегабалина и габапентина у односу на клиренс креатинина. Важно је нагласити да се прегабалин ефикасно уклања из плазме хемодијализом и већ након 4 сата хемодијализе, концентрација прегабалина у плазми смањује се за 50% (10,17).

Фармацеутско-технолошке формулације

На светском фармацеутском тржишту габапентин и прегабалин су присутни као чврсти облици (тврде капсуле, таблете са тренутним ослобађањем и таблете са одложеним ослобађањем лековите супстанце) и у облику раствора за оралну употребу. Габапентин је присутан на америчком тржишту као чврсти облик са тренутним ослобађањем лековите супстанце и као чврсти облик са одложеним ослобађањем, као *prodrug* гастрорезистентни облик - *enacarbil* (примењује се код херпетичних неуралгија) (1).

У Републици Србији габапентин је регистрован у облику тврдих капсула од 100 и 300 mg (Neurontin[®], Gabagamma[®] i Katena[®]). Прегабалин је регистрован у облику тврдих капсула у дозама од 25, 50, 75, 150, 225 и 300 mg (Elumela[®], Epica[®], Gabapreg[®], Pregabalin[®], Lyrica[®], Pragiola[®], Pregabalin[®] и Pregalix[®]) (21).

Фармакокинетичке интеракције

Интеракције габапентиноида и других лекова могу бити фармакокинетичке, када се односе на промену у ресорпцији, дистрибуцији и елиминацији, као и фармакодинамске, које подразумевају потенцирање или антагонизам ефеката лека. Прегабалин има предвидив, линеарни фармакокинетички профил, не везује се за протеине плазме, не метаболише се у јетри и не ремети активност цитохром *P450* система ензима, па су и лек-лек интеракције узроковане инхибицијом или индукцијом метаболизма лека, мало вероватне (22).

На основу резултата истраживања потенцијалних интеракција приликом истовремене примене прегабалина у комбинацији са другим антиепилептицима (карбамазепин, фенитоин, ламотригин и валпроат), потврђен је изостанак лек-лек интеракција и закључено да је овакав приступ у лечењу епилепсије ефикасан и безбедан за пацијенте (20,22,23).

Такође, испитивана је комбинована терапија прегабалина и трамадола, значајна за лечење хроничног неуропатског бола. На основу резултата испитивања, закључено је да су сви фармакокинетички параметри за прегабалин, осим минималних промена које се односе на ресорпцију и елиминацију, у границама оних вредности познатих при монотерапији овим леком. Ове промене у кинетици прегабалина доводе се у везу са јаким инхибиторним ефектом трамадола на мотилитет црева, што пролонгира задржавање прегабалина на месту ресорпције, повећавајући његову биорасположивост. Међутим, повећање вредности за биорасположивост је минимално с обзиром на податак да је за прегабалин ова вредност већа од 90%. Фармакокинетички профил трамадола је остао у границама вредности као за монотерапију овим леком. Закључено је да не постоји клинички значајна интеракција између прегабалина и трамадола (24). У експерименталним студијама на пацовима, испитиване су фармакокинетичке интеракције прегабалина са амитриптилином и силденафилом. Наведени лекови су значајно утицали на фармакокинетичку прегабалина, међутим у овим студијама нису утврђени механизми интеракција (25,26).

Стабилнија и повољнија фармакокинетика прегабалина обезбеђује низ предности значајних за терапијску примену, али је вероватно и разлог чешће злоупотребе у односу на габапентин: већи афинитет везивања за $\alpha 2$ - δ субјединице у пресинаптичким волтажно зависним Ca^{2+} каналима, након оралне примене прегабалин се брзо и комплетно ресорбује линеарном кинетиком, максимална концентрација у плазми се постиже након једног сата што је у директној вези са бржим деловањем, биорасположивост је већа од 90% и независна од дозе, стање динамичке равнотеже се постиже 24 до 48 сати након поновљене примене, а фармакокинетичке интеракције прегабалина и других лекова су мало вероватне (17,20,23).

ФАРМАКОДИНАМИКА ПРЕГАБАЛИНА

Примена прегабалина у лечењу периферног и централног неуропатског бола, епилепсије и генерализованог анксиозног поремећаја, у дневној дози креће се у распону од 150 до 600 mg, подељено у две до три дозе. Габапентин се примењује у лечењу епилепсије и периферног неуропатског бола. Ефективни дозни распон креће се од 900 до 3600 mg/дан, титрацијом дозе према узрасту и стању пацијента (27).

Најзначајнија фармакодинамска разлика између прегабалина и габапентина односи се на ефикасност. Резултати неколико студија показују да је у терапији епилепсије прегабалин показао 2,4 пута већу ефикасност од габапентина. Такође, код постхерпетичних неуралгија, прегабалин је 2,8 пута ефикаснији. Код габапентина плато за аналгезију је на 3600 mg/дан, док код прегабалина расте до 450 mg/дан (1).

Фармакодинамске интеракције

Бројне су студије, како експерименталне на животињама тако и клиничке на пацијентима, у којима је показано да прегабалин потенцира дејство других лекова са којима не дели исти механизам дејства. Познавање фармакодинамских интеракција је веома важно имајући у виду да је терапијска примена прегабалина најчешће део политерапије тј. користи се у терапији заједно са другим лековима. Додатно, карактеристике намерних предозирања су такве да се чешће користи са другим лековима и супстанцама, посебно са оним које имају депресивни ефекат на ЦНС као што су бензодиазепини, опиоиди, етанол итд.

Оксикодон је један од опиоидних аналетика који се најчешће (зло)употребљава сам или у комбинацији са другим лековима и узрочник је честих смртних исхода, пре свега због депресије дисања. У многим истраживањима доказано је да прегабалин потенцира ефекте оксикодона или бензодиазепина на моторичке и когнитивне особине, ако се примењује због удруженог аналетског односно анксиолитичког деловања. Због наведеног, веома је значајно подешавање доза код пацијената са компромитованом функцијом респираторног система, код старијих људи, оболелих од неуролошких обољења, а нарочито код истовремене примене депресора ЦНС-а и код пацијената за које постоје сазнања о злоупотреби лекова или употреби недозвољених супстанци (16,17).

Такође, испитиване су синергистичке интеракције прегабалина и синтетског канабиноида WIN 55,212-2 – месилата, примењених у комбинацији и у односу 1:1 на мишевима, помоћу *hot-plate* теста. Експериментом је потврђено да прегабалин блокира P/Q типове волтажнo-зависних Ca²⁺ канала и на тај начин редукује инфлукс калцијума у пресинаптички простор, инхибира ослобађање неуротрансмитера и смањује постсинаптичку екситабилност. WIN изазива претходно описани ефекат, уз инхибицију и N типа волтажнo-зависних Ca²⁺ канала, делујући преко канабиноидних CB1 рецептора. Сумарно, сличним механизмом деловања, синергистичком интеракцијом, ова комбинација инхибира ноцицептивну трансмисију до централног и периферног нервног система (28).

Механизам деловања прегабалина

Као што је већ наведено, габапентиноиди се не везују за рецепторе GABA упркос структурној сличности. Механизам деловања габапентиноида примарно се везује за блокаду волтажнo-зависних Ca²⁺ канала. Волтажнo-зависни канали, пропустљиви за неорганске јоне натријума, калијума, хлоридне и калцијумове јоне, веома су значајни за електрофизиолошку активност екситабилних ћелија као што су неурони. За разлику од натријумовог, калијумовог и хлоридног јона, калцијумов јон има и улогу секундарног гласника. Инфлукс јона калцијума кроз високо-волтажнo активирани калцијумове канале представља окидач за широк спектар одговора ћелија и ткива, као што је трансакрипција гена, ослобађање неуротрансмитера, секреција ендокриних ћелија, активација ензима зависних од калцијума итд. (29).

Волтажнo-зависни Ca²⁺ канали имају важну улогу у функцији неурона која је регулисана концентрацијом јона калцијума, укључујући екситабилност мембране и ослобађање неуротрансмитера из пресинаптичког неурона у синаптички простор (29,30). Електрофизиолошким студијама неурона откривено је више типова волтажнo зависних калцијумових канала: високо волтажнo активирани типови (L, N, P/Q и R) и ниско волтажнo активирани T тип (31). Волтажнo-зависни Ca²⁺ канали L типа се састоје од неколико субјединица (трансмембранска α_1 одговорна за формирање пора, интрацелуларна β , трансмембранска γ , трансмембранска δ и екстрацелуларна α_2 везана за δ субјединицу - $\alpha_2\delta$), а разликују се по електрофизиолошким и фармаколошким карактеристикама, Слика 5 (30-32). Субјединица α_1 , која омогућава улазак калцијумовог јона у ћелију, има четири домена, сваки са шест трансмембранских. Екстрацелуларна α_2 субјединица дисулфидном везом је повезана са δ субјединицом, док је β субјединица потпуно интрацелуларна. Изоформа $\alpha_2\delta$ -1 (α_2 - δ субјединица - *Alpha 2-delta subunit*), која посредује у деловању габапентиноида, присутна је у мозгу, скелетним, срчаним и глатким мишићима (29, 32-35).



Слика 5. Структура волтажно-зависних Ca²⁺ канала и механизам деловања прегабалина⁷

Тачни механизми деловања габапентиноида у ублажавању неуропатског бола нису још увек разјашњени. Механизам аналгетског деловања прегабалина првенствено је заснован на директном везивању за пресинаптичке неуроне и то за α₂δ-1 субјединице у пресинаптичким волтажно-зависним калцијумовим каналима. Овим процесом инхибира се дифузија јона калцијума кроз поре ћелијске мембране неурона, смањује се екситабилност неурона и касније ослобађање ексцитаторних трансмитера који се нормално ослобађају у ЦНС-у након повреде нерава или ткива, чиме се постиже антиконвулзивно и аналгетско деловање (11,32,36). Редукција прилива калцијума у пресинаптички простор повезана је са смањењем ослобађања различитих ексцитаторних неуротрансмитера, као што су глутамат, норадреналин, супатнаца *P* (29,37). Ово смањење ослобађања неуротрансмитера редукује абнормалну екситабилност мреже неурона, што доводи до превенције конвулзивних напада и доприноси аналгетским и анксиолитичким ефектима (17,38). У прилог томе, резултати студија на експерименталним животињама указују да аналгетско, антиинфламаторно и анксиолитичко деловање може бити резултат смањеног отпуштања сензорног неуропептида суптанце *P*, као и серотонина, што је уочено након примене прегабалина код неких стања инфламације спиналног ткива (39). У многим студијама је доказано да габапентиноиди смањују отпуштање различитих неуротрансмитера из синапси у неуронска ткива (33,40). Такође, могуће је да прегабалин инхибира синаптогенезу ексцитираних неурона формираних као одговор на хронични стрес или анксиозност, али највероватније инхибирају проток кроз волтажно-зависне Ca²⁺ канале и редукују синаптичку трансмисију (41-43).

⁷ Преузето и прилагођено према: Ninomiya W, Mizobuchi K, Hayashi T, Okude S, Katagiri S, Kubo A, et al. Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report. Documenta Ophthalmologica. 2020 Jan 3;140(3):279–87.

НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА И ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ

Упркос тежњи да се развије безбедан лек, нежељени ефекти при терапијској примени су неизбежни. Нежељене реакције су присутне код примене габапентиноида, али су најчешће благе и умереног интензитета, доводећи до прекида терапије код око 11% пацијената, док су озбиљни нежељени догађаји врло ретки, дозно су зависни и појављују се унутар две недеље од почетка терапије (1,19). Неке од најчешћих нежељених реакција на нивоу поремећаја ЦНС-а су вртоглавица и поспаност и често су разлог за прекидање терапије, а затим главобоља и поремећај координације покрета. Због наведених нежељених дејстава, габапентиноиди могу да имају минималан до умерен утицај на способност управљања возилом и руковање машинама, што је посебно изражено на почетку терапије или након повећања дозе (1).

Као честе нежељене реакције на примену прегабалина, код око 7% пацијената, пријављени су замућен вид и/или диплопија. Остали чешћи поремећаји на нивоу ЦНС-а укључују и поремећај концентрације, губитак памћења, конфузију, промене расположења, поремећај равнотеже, вртоглавица, тешкоће у говору и проблеме са спавањем. Већина нежељених реакција на нивоу ЦНС-а повезана је са применом виших доза прегабалина. Међутим, нежељене реакције на оку као што су замагљен вид и амблиопија појавиле су се при нижим примењеним дозама прегабалина. Од повремених нежељених дејстава могу се јавити губитак телесне масе, поремећај перцепције сопствене личности, промене вида, сувоћа очију, бол у оку, отоци и иритација ока, поремећаји срчаног ритма, отежано дисање, појачано лучење пљувачке, бол и грчење мишића, промене у резултатима лабораторијских анализа крви (39,44).

Од осталих честих нежељених дејстава могу се јавити: повећен апетит, констипација или дијареја, сува уста или мучнина, повраћање, повећање телесне масе, еуфорија, конфузија, дезоријентација, поремећај пажње, поремећај/губитак памћења, отоци на телу и екстремитетима, грчеви мишића, болови у мишићима, леђима, екстремитетима и зглобовима. Такође, јављају се и ретка нежељена дејства на одређеним ткивима и органима, као што су губитак вида, отицање језика, отежано гутање, конвулзије, промене на електрокардиограму, неприлагођено понашање, алергијске реакције, поремећај менструалног циклуса, повећано накупљање течности у трбуху, течност у плућима, конвулзије, поремећаји функције бубрега (45,46).

Нека нежељена дејства могу бити озбиљнија, када се истовремено са прегабалином узимају одређени лекови, када се могу потенцирати нежељена деловања тих лекова, као што је депресија дисања и кома (46).

Токсичност габапентиноида може се испољити и приликом примене тераписјких доза код пацијената са хроничном болешћу бубрега. Ризик од токсичности је већи код пацијената на хемодијализи, па се препоручује корекција дозе према клиренсу креатинина. Такође, пацијентима који су на хемодијализи потребне су додатне дозе габапентиноида након хемодијализе, јер се дијализом уклања око 35% габапентина и 50-60% прегабалина (1).

У студијама токсичности на експерименталним животињама регистрована су деловања на ЦНС, у форми хипер-/хипоактивности. Такође, приликом дуготрајне примене вишеструко већих доза прегабалина примећена је атрофија ретине код старијих албино пацова. Прегабалин није показао тератогено деловање код мишева, пацова и кунића, док је фетална токсичност регистрована само при примени доза већих од максималних које би се примениле на људима. У експериментима је доказано да прегабалин није генотоксичан (1,2).

Након прекида терапијске примене или злоупотребе прегабалина, могу се јавити тзв. симптоми обуставе примене лека (енгл. *withdrawal symptoms*), који указују на физичку зависност, а слични онима које изазива прекид конзумирања алкохола или употребе бензодиазепина. Може се јавити несаница, главобоља, знојење, тремор, депресија, поновна појава бола или анксиозности, мучнина, дијареја (7).

АКУТНА ТРОВАЊА ПРЕГАБАЛИНОМ

Анализом података Мреже Америчких Центара за Контролу Тровања (*AAPCC -American Association of Poison Control Centers*) показано је да се габапентиноиди генерално добро подносе када се примењују у дозама нижим од прописане максималне дозе, која је за прегабалин 600 mg/дан и 3600 mg/дан за габапентин. У случајевима акутног предозирања постоји значајна интер-индивидуална варијабилност у односу на унете дозе лека и степен тежине тровања. Утврђено је да се код већине пацијената који су користили само габапентиноиде у дозама које су изнад дефинисаних максималних доза, нису појавили знаци депресије респираторног система или леталног предозирања. Регистровани су случајеви у којима су пацијенти преживели након узимања екстремно високих доза прегабалина (9000 mg) и габапентина (96 000 mg), и свега неколико случајева где се смртни исход повезује директно са употребом само габапентиноида. Међутим, иако је профил њихових нежељених дејстава безопасан а предозирања у случајевима изоловане употребе резултују релативно лакшим тровањима, када се користе заједно са опиоидима и бензодиазепинима, габапентиноиди могу потенцирати опиоидима индуковану респираторну депресију која води до тежих клиничких ефеката и могућег леталног исхода (48).

Пораст инциденце акутних тровања прегабалином и габапентином се пријављује у свим деловима света. У Ирској је удео намерних тровања прегабалином порастао десет пута у периоду од 2007. до 2015. године (49). У студији која је спроведена у Финској између 2011. и 2013. године, наводи се да је 396 случајева предозирања са леталним исходом било везано за употребу прегабалина, док је 65 случајева било последица употребе габапентина (50). Са друге стране студија из САД наводи да је од 347 случајева тровања новијим антиконвулзивним лековима 33% било последица употребе габапентина и 7% у вези са прегабалином (51).

Изолована тровања прегабалином ретко узрокују тешка тровања, али су пријављени случајеви коме и конвулзивних напада (52,53). Ингестија доза које не прелазе 20 mg/kg телесне масе ретко доводи до озбиљнијих знакова и симптома тровања (46).

Тешка тровања су најчешће повезана са комбинованом употребом прегабалина и других лекова и супстанци, а степен тежине тровања углавном зависи од врсте и количине коингестираног агенса. Специфични антидот за тровање габапентиноидима не постоји, и терапија акутног тровања подразумева опште мере спречавања даље ресорпције унетог лека, симптоматску и супортивну терапију у циљу корекције ацидобазног статуса и електролитног дисбаланса, примену кардиолошке терапије итд. У случајевима тешких тровања мере лечења подразумевају заштиту дисајних путева и примену интубације и механичке вентилације (54).

(ЗЛО)УПОТРЕБА ПРЕГАБАЛИНА И ПРАВНИ СТАТУС ЛЕКА

Упркос ограниченом индикацијском подручју габапентиноида, последњих година уочена је учестала *off-label* примена у различитим стањима као што су: биполарни поремећаји, комплексни регионални болни синдром, поремећај пажње, синдром немирних ногу, поремећаји сна, главобоље, хронични бол у леђима, висцерални бол и акутни пост-оперативни бол. У Енглеској се број *off-label* прескрипција утростучио у периоду од 2007. до 2010. године. Међутим, ово повећање у прописивању у *off-label* индикацијама, није у корелацији са евиденцијом ефикасности у клиничкој пракси. Из тог разлога, истраживачи упозоравају да су докази за *off-label* примену габапентиноида, у већини болних клиничких стања, врло ограничени (55, 56).

Паралелно са великим порастом прописивања и клиничке примене габапентиноида, значајно се повећала и њихова злоупотреба, која се дефинише као свака намерна, немедицинска употреба лека у циљу постизања жељених психофизичких ефеката. Важно је напоменути да су карактеристике случајева злоупотребе прегабалина такве да је чешћа комбинована употреба са другим психоактивним супстанцама (највише алкохолом, опиоидима и бензодиазепинима, често се наводи и истовремена употреба кокаина, марихуане, енергетских пића итд). У литератури се могу пронаћи подаци о искуствима пацијената где се описују ефекти и разлози коришћења одређених комбинација прегабалина и других супстанци (57, 58).

У случајевима злоупотребе треба имати у виду и специфичности начина уноса односно пута примене прегабалина. Једини одобрени начин примене прегабалина је орални унос, док су у случајевима злоупотребе присутни и други као што су: интравенски, пушење, ушмркавање, ректална примена (*plugging*) или гутање спрашене таблете или садржаја капсуле у папирној кесици (*parachuting*) како би се избегао непријатан укус лека (59).

Један од првих извештаја о злоупотреби прегабалина објављен је 2010. године од стране Шведског центра за фармаковигиланцу (60). Након тога, објављене су бројне публикације везане за злоупотребу прегабалина из земаља целог света. У Француској је регистрован пораст злоупотребе прегабалина у популацији адолесцената, а међу њима значајан број случајева је детектован у социјално угроженим категоријама (61).

Код значајног броја пацијената, који су били на терапији прегабалином, као нежељени ефекат, регистрована је еуфорија. Резултат тога је био да је прегабалин у САД 2005. године, недуго након појаве на тржишту, класификован на Листу 5 (*Schedule V Controlled Substances*), која се односи на лекове са најмањим потенцијалом за злоупотребу (62). У Великој Британији су 2019. године, прегабалин и габапентин рекласификовани на листу Ц која контролише и ограничава прописивање лекова са потенцијалом за злоупотребу (63). Финска је 2009. године, као чланица Европске агенције за контролу дрога и болести зависности (*EMCDDA- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) путем система раног упозоравања, класификовала прегабалин као нову психоактивну супстанцу на националној листи. Међутим, прегабалин се још увек не налази на заједничкој листи *EMCDDA*-а, али се прати заједно са другим новим психоактивним супстанцама које се злоупотребљавају (64). Прегабалин се не налази ни на једној листи која се односи на контролисане психоактивне супстанце у Републици Србији (65).

КЛОНАЗЕПАМ

Клоназепам припада групи бензодиазепина и има антиконвулзивно, седативно, миорелаксантно и анксиолитичко деловање. Хемијско име клоназепама је 5-(о-хлорофенил)-1,3-дихидро-7-нитро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он, молекулска формула $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$ и молекулска маса 315,711 Da (66).

Клоназепам се користи најчешће у политерапији за лечење већине облика епилепсије и у случајевима рефракторних епилепсија. Међутим, овај лек се прописује и у индикацијама за које није регистрован, као што су поремећаји везани за спавање, одвикавање од других бензодиазепина, у терапији бола, за лечење и контролу анксиозних стања и депресије, у терапији „немирних“ ногу и тинитуса (67).

Тачни механизми деловања клоназепама до сада нису у потпуности познати, али је установљено да су примарни механизам дејства и фармаколошка својства резултат потенцирања дејства *GABA*-е, на основу снажног афинитета за α_1 и α_2 субјединице *GABA_A* рецептора (67). Након оралне примене, клоназепам се брзо и комплетно ресорбује, максималну концентрацију постиже за један до четири сата и дужином трајања ефеката од 6 до 12 сати. Апсолутна биорасположивост је око 90%, са великим индивидуалним разликама. Циљне антиконвулзивне концентрације су у опсегу од 20 до 70 ng/mL, док се озбиљнији токсични ефекти, укључујући повећану учесталост епилептичних напада, појављују при концентрацијама у стању динамичке равнотеже у плазми изнад 100 ng/mL. Клоназепам се у високом проценту везује за протеине плазме (око 85%). Средњи волумен дистрибуције износи 3 L/kg (67). Клоназепам пролази плаценталну баријеру па се у трудноћи може примењивати само ако је то јасно индиковано. Детектован је у млеку дојиља, те уколико је терапија клоназепамом неопходна, потребно је прекинути дојење (66).

У експерименталним студијама је показано да клоназепам највероватније пасивном дифузијом прелази из плазме у мозак, те да је однос концентрација у плазми и мозгу константан (66). Биотрансформација се одвија под утицајем система изоензима *CYP* 450, посебно *CYP3A4*, обухвата редукцију 7-нитро групе у јетри а затим оксидативну хидроксилацију, уз стварање 7-амино или 7-ацетамино једињења, и у траговима 3-хидрокси деривата, који немају важну фармаколошку активност. Потребно је нагласити да су само нитро једињења физиолошки активна, а аминокиселине нису. Полувреме елиминације износи 20 до 60 сати (у просеку 30 до 40 сати), и то 50 до 70% урином, 10 до 30% фецесом, скоро у потпуности у облику слободних или коњугованих метаболита и врло мало неизмењеног клоназепама се може наћи у урину (66-68).

Познато је да се код примене лекова из групе бензодиазепина, посебно приликом дуготрајне примене или примене високих доза, може развити и физичка и психичка зависност. Одговор организма на дуготрајну примену лека или употребу у високим дозама је физиолошка адаптација или физичка зависност, а манифестује се реверзибилним поремећајима као што су појава отежаног говора, смањена координација покрета и поремећај хода, нистагмус и диплопија. У случају клоназепама код неких пацијената зависност се може развити већ четири недеље од почетка лечења.

Нагло прекидање или значајно смањење дозе манифестују се различитим симптомима као што су тремор, агитација, поремећаји спавања и анксиозност, болови у мишићима, главобоља и узнемиреност, промене расположења, конфузија, а у тежим случајевима деперсонализација, халуцинације и епилептични напади који могу бити опасни по живот. Овакве нагле прекиде у терапији треба избегавати, већ је неопходно приступити постепеном смањењу дневне дозе клоназепама (67,69,70).

Као што је већ наведено, клоназепам већ у терапијском опсегу доза (0,25-2 mg) код неких пацијената изазива еуфорију, док повећање дозе (на 8-12 mg) резултира интензивирањем ефеката и побољшањем расположења, што је почев од 1990.-их година довело до популаризације употребе клоназепама у немедицинске сврхе. Висока потентност и дуго трајања деловања, релативно лака доступност и широка употреба у индикацијама за које није одобрен, чини клоназепам атрактивним за злоупотребу. Како су ефекти изазвани клоназепамом слични онима које изазивају опиоиди, то га чини још привлачнијом заменом. За разлику од осталих бензодиазепина, клоназепам има серотонинергичка својства што додатно доприноси његовом психотропном ефекту и рекреативној употреби (67, 71).

Предозирања клоназепамом ретко доводе до леталног исхода, али треба имати у виду да се клоназепам ретко злоупотребљава сам, већ у комбинацији са другим лековима, опиоидима, алкохолом и недозвољеним психоактивним супстанцама. Ово се доводи у везу са фармакодимаским интеракцијама. Клоназепам као депресор ЦНС-а, може потенцирати нежељене и токсичне ефекте, ако се истовремено примењује са алкохолом, опиоидима, барбитуратима, неким антипсихотицима, инхибиторима моноамино оксидазе, трицикличним антидепресивима као и другим антиконвулзивима. Ако је потребна истовремена примена клоназепама и неких лекова у циљу терапије, неопходно је ради оптималног деловања кориговати дозу сваког лека појединачно (67,71,72).

Из наведених разлога, клоназепам се мора примењивати са изузетним опрезом, поготово код пацијената за које се зна да су претходно злоупотребљавали алкохол и психоактивне супстанце. Релативно лака доступност клоназепама, као и изазивање ефеката опуштања, еуфорије, седације, који су пожељни, разлог је његове честе злоупотребе. Злоупотреба најчешће укључује примену у дозама већим од максимално препоручене уз истовремену употребу других лекова и супстанци. Све ово повезано је са повећаном учесталашћу озбиљних нежељених ефеката, као што су делиријум, параноја, суицидалне идеје, кома, отежано дисање као последице депресије респираторног система, па и смртни исход (67).

Клоназепам је у САД класификован као контролисана супстанца на Листи 4 (*Schedule IV Controlled Substances*), која се односи на лекове са ниским потенцијалом за злоупотребу (73,74). У Републици Србији, клоназепам је класификован као контролисана психоактивна супстанца на Листи 7 која се односи на психоактивне супстанце које се користе у терапијске и научноистраживачке сврхе, у складу са Листом 4 Конвенције о психотропним супстанцама (65).

ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу досадашњих истраживања и података из литературе постављене су следеће радне хипотезе:

1. Предозирања и акутна тровања прегабалином не доводе до тешких тровања, док коингестија лекова из групе седатива/хипнотика и психоактивних супстанци са депресивним деловањем (посебно коингестија бензодиазепина и опиоида) доводе до тежих тровања и већег степена токсичности акутно отрованих пацијената.
2. Истовремена примена прегабалина и клоназепам доводе до израженијих знакова токсичности код експерименталних животиња у односу на њихову појединачну примену, што је вероватно резултат фармакодинамске интеракције ова два лека.

За проверу радних хипотеза постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Одредити учесталост акутних тровања и предозирања прегабалином и проценити да ли је у анализираном периоду дошло до повећања инциденце злоупотребе.
2. Помоћу дефинисаних фактора тровања упоредити тежину клиничке слике пацијената са изолованим и комбинованим тровањем прегабалином са другим лековима и психоактивним супстанцама.
3. Коришћењем теста спонтане локомоторне активности и ротарод теста, проценити какав је ефекат истовремене примене прегабалина и клоназепам на степен седације и степен атаксије код експерименталних животиња.
4. Валидовати аналитичку методу за одређивање прегабалина и клоназепам у плазми и хомогенатима ткива мозга, помоћу којих ће се одредити концентрације ова два лека код експерименталних животиња и утврдити да ли постоје фармакокинетичке интеракције приликом њихове истовремене примене.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Први део ове дисертације спроведен је као ретроспективна опсервациона студија пресека, док су у другом делу експериментално испитиване интеракције прегабалина и клоназема на моделу пацова.

РЕТРОСПЕКТИВНА ОПСЕРВАЦИОНА СТУДИЈА ПРЕСЕКА

Први део истраживања је спроведен као ретроспективна опсервациона студија пресека у Центру за контролу тровања Војномедицинске академије (ЦКТ ВМА). Наведена студија је спроведена уз сагласност Етичког одбора Војномедицинске академије (број решења 25/2022) у складу са принципима Хелсиншке декларације.

Извори података и популација која се истражује

Испитивана је популација пацијената лечених у ЦКТ ВМА, код којих су лекови из групе габапентиноида (прегабалин и габапентин) били главни или један од узрочника тровања који су допринели клиничком стању пацијента. Претрагом базе података, у којој су архивирана отпусна писма свих пацијената лечених у ЦКТ ВМА, у току посматраног периода (јануар 2012 - октобар 2022. године) забележено је 374 случаја тровања лековима из групе габапентиноида. Прегабалин је био главни или један од узрочника тровања у 354 случајева, док је код 17 пацијената регистровано тровање габапентином.

Пораст укупне потрошње и доступност лекова који поседују потенцијал за злоупотребу може послужити као један од могућих знакова њихове погрешне употребе или злоупотребе у оквиру одређене популације (75, 76). У овом истраживању приказана је и анализирана годишња национална потрошња прегабалина и габапентина у току десетогодишњег периода за који су били доступни комплетни подаци (2012-2021. година). Подаци су преузети из јавно доступних извештаја Агенције за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) о промету и потрошњи готових лекова за хуману употребу (77).

Терминологија и дефиниције

Утврђивање намере тровања, а нарочито учесталости злоупотребе, у популацији испитиваних пацијената је један од циљева овог истраживања. Терминологија која се односи на неадекватну употребу лекова још увек није стандардизована те се у доступној литератури могу наћи иста објашњења која се односе на сродне али различите појмове као што су злоупотреба (енгл. *Abuse*) или погрешна употреба (енгл. *Misuse*) лекова. У овом истраживању су коришћени критеријуми који су усвојени од стране *ACCTION (Analgesic, Anesthetic, and Addiction Clinical Trials, Translations, Innovations, Opportunities, and Networks)* групе према којима су предложене следеће дефиниције (78):

- Злоупотреба лекова - свака намерна нетерапијска употреба лека, чак и једнократно, у циљу постизања жељених психофизичких ефеката.
- Погрешна употреба лекова - свака намерна употреба лека у терапијске сврхе на неогдговарајући начин тј. на начин који се разликује од прописане терапије од стране лекара.
- Догађај повезан са суицидом - самоповређивање или понашање које је повезано са барем неком намером да се умре или које је довело до смрти. Докази да је особа намеравала да се убије могу бити експлицитни или изведени из понашања или околности. Покушај суицида може и не мора резултирати стварном повредом.

Анализиране варијабле у студији

Број случајева тровања је изражен апсолутним бројевима, као проценат од укупног броја пацијената лечених у ЦКТ ВМА или број пацијената на 100 000 становника (79). Промена инциденце акутних тровања прегабалином и габапентином је приказана за десетогодишњи период (2012-2021. година).

Анализа годишње потрошње габапентиноида у Србији урађена је према методологији препорученој од стране Светске здравствене организације (СЗО), при чему је годишња потрошња лекова приказана као број утрошених дефинисаних дневних доза на 1000 становника по дану (ДДД/1000 становника/дан) (80). Овај параметар омогућава увид у број становника (од 1000 становника) који је користио наведени лек и био изложен његовом деловању у току једног дана, независно од величине паковања, дозе, заштићеног имена и произвођача лека. Подаци изражени на овакав начин дају слику фармакотерапијске праксе у одређеној средини за дефинисани период и упоредиви су са подацима других средина које користе исту методологију праћења.

У истраживању је анализирана корелација података о броју случајева тровања габапентиноидима у ЦКТ ВМА са подацима о степену потрошње ових лекова у Републици Србији током десетогодишњег периода за који су били доступни комплетни подаци за сваку годину (2012-2021. година).

Према намери тровања сви случајеви тровања из испитиване популације су подељени у три групе:

1. Случајеви у којима је регистрована злоупотреба лека
2. Случајеви у којима је регистрована погрешна употреба лека
3. Случајеви у којима је регистрована суицидална намера

У зависности од броја узрочника тровања, пацијенти су подељени у две групе:

1. Пацијенти са изолованим тровањем прегабалином
2. Пацијенти код којих утврђена коингестија других лекова и супстанци

Како би се утврдиле карактеристике испитиване популације и проценио степен тежине тровања код групе пацијената са изолованим тровањем прегабалином у односу на групу пацијента код којих је забележена коингестија других лекова и супстанци, изабрани су и анализирани фактори тровања који су екстраховани из медицинске документације за сваког пацијента.

У наведене сврхе коришћене су следеће варијабле:

1. Демографске карактеристике пацијента - пол, године живота, припадност одређеној социјалној категорији.
2. Амбулатно лечење или хоспитализација у Клинику ЦКТ ВМА
3. Датум и време пријема
4. Број поновљених пријема
5. Пут уноса лека
6. Ингестирана доза прегабалина - подаци су добијени из анамнестичких или хетероанамнестичких података забележених у медицинској документацији пацијената.
7. Број и врста коингестираних лекова и супстанци
8. Време протекло од ингестије - време протекло од ингестије до процене клиничких параметара односно до пријема пацијента на лечење у ЦКТ ВМА утврђивано је на основу анамнестичких или хетероанамнестичких података забележених у медицинској документацији пацијената.
9. Намера тровања - злоупотреба, погрешна употреба, догађај повезан са суицидом.
10. Историја проблематичне употребе лекова/супстанци - претходна проблематична употреба лекова и супстанци је била утврђена код пацијената који су већ били лечени због акутног тровања у ЦКТ ВМА или на основу података из медицинске документације (претходно или актуелно лечење од зависности или на основу анамнестичких/хетероанамнестичких података).

11. Концентрација прегабалина - за одређивање концентрације прегабалина у узорцима плазме акутно отрованих пацијената коришћена је метода течне хроматографије са тандем масено-спектрометријским детектором (LC-MS/MS - *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*). Концентрација прегабалина у случајевима тровања је рађена на захтев лекара-токсиколога, а измерене вредности су забележене у медицинској документацији пацијената.
12. Клинички ефекти тровања - хипотензија, брадикардија, стање свести, конвулзије.
Хипотензија је дефинисана измереним вредностима систолног крвног притиска који је био нижи од 90 mm живиног стуба односно вредности ниже од 60 mm живиног стуба за дијастолни крвни притисак. Брадикардија је дефинисана вредностима срчане фреквенције нижим од 60 откуцаја у минути. У односу на стање свести на пријему пацијенти су подељени у две групе: пацијенти у коматозном стању и пацијенти са лакшим степеном поремећаја свести.
13. Степен тежине тровања - ПСС скор (енгл. *Poison severity score - PSS*) представља један од начина рангирања тежине тровања на основу клиничког тока тровања, независно од унете дозе, концентрације, врсте и броја узрочника тровања (81). Овај систем користи скалу према којој се тежина тровања може изразити у пет нивоа:
 - ПСС 0 – без симптома и знакова тровања
 - ПСС 1 – тровање лаког степена (благи симптоми и знакови тровања)
 - ПСС 2 – средње тешко тровање (изражени или продужени симптоми и знакови тровања)
 - ПСС 3 – тровање тешког степена (озбиљни и животно-угрожавајући симптоми и знакови тровања)
 - ПСС 4 – летални исход
14. Примењене терапијске процедуре - симптоматска терапија, примена вазопресорних лекова, интубација, механичка вентилација.
15. Компликације током лечења - пнеумонија, рабдомиолиза.
16. Трајање лечења - дужина лечења се односи на период лечења у ЦКТ ВМА

Статистичка анализа и обрада података

За статистичку анализу и обраду података коришћени су софтвери *IBM SPSS Statistics 20* и *Microsoft Excel 2016*. Испитивање нормалности дистрибуције континуираних података је вршено *Kolmogorov–Smirnov* и *Shapiro–Wilk* тестовима у зависности од величине узорка. Континуирани подаци који су следили нормалну расподелу представљени су као аритметичке средње вредности, стандардне девијације и интервал свих вредности. Континуирани подаци који нису имали нормалну расподелу вредности, приказани су као медијане, интерквartilне вредности (25 - 75. перцентил, $Q_1 - Q_3$) и распон свих вредности.

Како већина података није имала нормалну дистрибуцију, за утврђивање статистичке значајности између група коришћени су *Krusal-Wallis* и *Mann–Whitney U* тест. За утврђивање корелације између испитиваних варијабли коришћена је Спирманова непараметарска анализа.

Категорички подаци су приказани као апсолутни и релативни бројеви појединих категорија, а разлика између њих је утврђена χ^2 тестом.

Разлике су сматране статистички значајним ако је р-вредност (снага поређења) мања или једнака, $p < 0,05$ (*), високо значајним ако је $p < 0,01$ (**), веома високо статистички значајним ако је $p < 0,001$ (***)).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

У овом делу истраживања, експериментално су испитиване фармакодинамске и фармакокинетичке интеракције прегабалина и клоназема приликом акутне примене супстанци у пацова. Наведени лекови изабрани су на основу литературних података и резултата из првог дела истраживања, где је утврђено да је управо ова комбинација лекова била најчешћа у свим случајевима тровања прегабалином, а нарочито у подгрупи пацијената код којих је детектована злоупотреба лекова и супстанци.

Све експерименталне процедуре су одобрене од стране Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (број 323-07-07930/2022-05/2 од 25.07.2022. године) уз позитивно мишљење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (Одлука број 11/2022 од 04.07.2022. године).

Експерименталне животиње

Експериментална испитивања су спроведена на мужјацима албино пацова соја *Wistar* старости 6-8 недеља и телесне масе 180-220 грама. Животиње су узгајане на фарми Војномедицинске академије у Београду и биле су смештене у кавезима од плексигласа (42 cm × 26,5 cm × 18 cm) у групама од 4 до 6 животиња по кавезу, под стандардним лабораторијским условима: амбијентална температура од 20-25 °С, релативна влажност ваздуха око 60%, са трајањем дневних/ноћних циклуса од 12 сати. Храна (брикети за исхрану експерименталних животиња, Ветеринарски завод „Суботица” А.Д., Србија) и вода су животињама били доступни *ad libitum*, сем током трајања експерименталних процедура. Како би се избегле циркадијалне варијације у бихејвиоралним испитивањима, сви експерименти су извођени у исто доба дана (у периоду од 8 до 16 h).

За сваки бихејвиорални тест постојала је одговарајућа контролна група која је у истој запремини добијала вехикулум за суспендовање испитиваних супстанци, а животиња је после третмана подвргнута истој експерименталној процедури. Након завршетка експеримената у којима су вршена фармакодинамска испитивања животиње су жртвоване излагањем растућим концентрацијама угљен-диоксида. Неке животиње су имале период одмора од 7 дана, након чега су коришћене за фармакокинетичка испитивања. Животиње које су коришћене за фармакокинетичка испитивања су анестезиране севофлураном, након чега се приступало узорковању крви срчаном пункцијом што истовремено подразумева еутаназирање експерименталних животиња искрвављењем.

Експерименталне супстанце

У свим експериментима на животињама коришћене су следеће супстанце:

- Прегабалин (капсуле: *Lyrica*[®], *Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH*, Немачка)
- Клоназепам (таблетна смеша: *Klonazepam Remedica*[®], *Remedica LTD*, Кипар)
- Флумазенил (чиста супстанца, *Roche*, Француска)

Прегабалин и клоназепам примењени су перорално (*p.o.*) употребом интрагастричне сонде за пацове. За *p.o.* примену припремане су суспензије у одговарајућем вехикулуму - дестилована вода уз додатак пар капи Tween 80 као средства за квашење и постизања боље хомогености суспензије. Суспензије супстанци су апликоване у коначној запремини од 2 mL/kg телесне масе животиње. Флумазенил је суспендован у физиолошком раствору и примењиван је интраперитонеално (*i.p.*) у запремини од 2 mL/kg.

Фармакодинамска испитивања

У циљу испитивања фармакодинамских интеракција приликом акутне примене прегабалина и клоназепама на експерименталним животињама коришћени су тест спонтане локомоторне активности (СЛА; за испитивање седативних ефеката лекова или њихове комбинације) и ротарод тест (за испитивање степена моторне онеспособљености животиња након примене лекова или њихове комбинације). Процењен је утицај појединачне и комбиноване примене наведених лекова на степен седације и степен моторне онеспособљености (атаксије) експерименталних животиња, који су два препозната токсична ефекта код примене габапентиноида и бензодиазепина. Додатно, испитивана је антидотска ефикасност флумазенила у групама животиња које су биле третиране само клоназепамом или његовом комбинацијом са прегабалином.

Тест спонтане локомоторне активности (СЛА)

Испитивање локомоторне активности је један од основних тестова који се користи у бихевиоралним тестовима. Термин „спонтанa локомоторна активност“ подразумева коришћење неусловљених тестова у којима се прате параметри попут (брзине) кретања, дужина пређеног пута, пропињање, тимарење, грицање и друго. Смањење активности експерименталних животиња (попут дужине пређеног пута) може бити узроковано седативним ефектом који се јавља након примене психотропних супстанци, нпр. бензодиазепина или габапентиноида.

У експериментима је испитивана локомоторна активност експерименталних животиња након појединачне примене растућих доза клоназепама и прегабалина. Како би се утврдио интензитет седативних ефеката истовремене примене ова два лека, испитиван је и утицај комбиноване примене фиксне неефикасне дозе прегабалина (добијене из испитивања појединачно примењених растућих доза) са растућим дозама клоназепама.

Додатно, испитивана је антидотска ефикасност две различите дозе флумазенила у групама животиња које су биле третиране само клоназепамом (највиша примењена доза приликом појединачне примене) и његовом комбинацијом са неефикасном дозом прегабалина (добијена из испитивања утицаја појединачне примене растућих доза прегабалина на СЛА).

Након примене одговарајућег третмана експерименталне животиње су постављене у центар полу-прозирног кавеза од плексигласа величине 40 cm × 25 cm × 35 cm, смештеног у просторију са пригушеним црвеним светлом (20 lx). Помоћу камере постављене изнад кавеза испитивани су седативни ефекти примењеног третмана током 60 минута, коришћењем следећих параметара: укупни пређени пут током 60 минута и пређени пут у 10-минутним интервалима. За процену ових параметара коришћен је AnyMaze софтвер (Stoelting Co., САД).

Ротарод тест

Ротарод тест је стандардни тест који се користи за процену атаксичног дејства психотропних супстанци тј. за процену утицаја примењеног третмана на моторну спретност експерименталних животиња.

Овај тест је коришћен за процену моторне спретности пацова након акутне примене појединачних растућих доза прегабалина и клоназепама или њихових комбинација (комбинована је фиксна неефикасна доза прегабалина добијена из испитивања појединачно примењених доза са растућим дозама клоназепама).

Додатно, испитивана је антидотска ефикасност две различите дозе флумазенила у групама животиња које су биле третиране само клоназепамом (највиша примењена доза приликом појединачне примене) и његовом комбинацијом са неефикасном дозом прегабалина (добијена из испитивања утицаја појединачне примене различитих доза на моторну спретност животиња).

Експеримент је урађен употребом ротарод апарата за пацове (*Treadmill for rats 47700, Ugo Basile*, Милано, Италија). Животиње су постављане на апаратуру која поседује цилиндар који ротира брзином од 15 обртаја/мин. Пре испитивања утицаја третмана, животиње су биле трениране током 2 узастопна дана, тако да буду способне да проведу 180 секунди на ротирајућем цилиндру. Трећег дана, испитиван је утицај лекови или њихове комбинације на моторну спретност експерименталних животиња, праћењем дужине времена које су способне да проведу на ротирајућем цилиндру (са *cut-off* временом од 180 секунди). Ефекти третмана су процењивани у шест временских тачака: 30, 60, 90, 120, 180 и 240 минута након примене третмана. Додатно, за сваку животињу су одређене вредности површина испод криве (ПИК) током целокупног периода праћења од 240 минута.

Фармакокинетичка испитивања

Фармакокинетика прегабалина и клоназепам испитивана је након појединачне или комбиноване примене наведених супстанци, према протоколу који је приказан у Табели 3.

Табела 3. Протокол фармакокинетичких експеримената

Експерименталне групе	Третман
Контрола	Вехикулум; <i>p.o.</i>
Прегабалин	Прегабалин - 20 mg/kg тм; <i>p.o.</i>
Клоназепам	Клоназепам - 4 mg/kg тм; <i>p.o.</i>
Прегабалин + Клоназепам	Прегабалин - 20 mg/kg тм; <i>p.o.</i> + Клоназепам - 4 mg/kg тм; <i>p.o.</i>

Узорковање крви и ткива мозга било је извршено у шест временских тачака: 15, 30, 60, 120, 240 и 360 минута након примењеног третмана. У свакој временској тачки било је по 3 експерименталне животиње у групи. Непосредно пре жртвовања, срчане пункције и декапитације, пацови су били анестезирани севофлураном (100%, пара за инхалацију, течност, *Sevofluran Baxter; Baxter*, Илионоис, САД).

Крв је узоркована хепаринизираним шприцевима и иглама у епендорф епрувете које су претходно обложене хепарином, након чега су узорци центрифугирани 5 минута при брзини од 3000 обртаја/мин (*MiniSpin® plus centrifuge, Eppendorf*, Немачка). Ткиво мозга пацова је било узорковано у претходно тариране пластичне тубе. Након мерења масе, додато је 5 mL метанола и узорци су хомогенизовани, а потом центрифугирани 20 минута на 12000 обрт/мин. После центрифугирања узорака крви и хомогената ткива мозга, добијени супернатанти (плазма и хомогенати ткива мозга) су одвајани и чувани на - 20°C до припреме узорака за одређивање концентрације лекова. Резултати за концентрацију прегабалина и клоназепам у плазми експерименталних животиња су добијени директно из регресионе једначине која описује зависност површине испод ПИК-а од концентрације лека у узорку, док су резултати за концентрацију лекова у ткиву мозга прерачунати према одмереној маси узорка и изражени као милиграм лека по граму ткива мозга (mg/g). Употребом софтверског алата *PK solver*, програмског додатака *Microsoft Excel* програма који се користи за фармакокинетичку анализу (82), из добијених резултата израчунати су следећи параметри: максимална концентрација (C_{max}), време постизања максималне концентрације (T_{max}), површина испод криве концентрација-време од нултог времена до последње временске тачке (AUC_{0-t}).

Валидација биоаналитичких метода

За потребе фармакокинетичких испитивања валидоване су методе за одређивање концентрације прегабалина и клоназепаме у плазми и ткиву мозга третираних животиња.

Валидација аналитичких метода урађена је према смерницама које препоручује водич Европске агенције за лекове за валидацију биоаналитичких метода (83). У склопу процеса валидације испитивани су следећи параметри: селективност, линеарност, тачност, прецизност, лимит квантификације, утицај претходно инјективног узорка, утицај матрикса, стабилност узорака и раствора.

Селективност - овај параметар је тестиран анализирањем хроматограма пет „празних“ узорака плазме (енг. *Blank*). Интерференције су сматране значајним уколико је одговор детектора на ретенционим временима био већи од 20% за аналит од интереса и већи од 5 % за интерни стандард, у поређењу са сигналом добијеним анализирањем узорка за лимит квантификације (LOQ - *Limit of quantification*).

Линеарност, тачност и прецизност - параметри испитивани коришћењем шест калибрационих узорака (C) и два узорка контроле квалитета (*Quality control samples* (QC): ниска контрола (QC_{low}) и висока контрола (QC_{high})). Линеарност методе је испитивана израчунавањем регресионе криве методом најмањих квадрата и изражава се преко коефицијента корелације (r^2), одсечка и нагиба криве. Једначина калибрационе криве има форму: $y = ax + b$, при чему x представља концентрацију испитиваног једињења, док y одговара односу површина испод криве испитиваног једињења и интерног стандарда (ИС). Калибрационе криве су прихватљиве уколико је коефицијент корелације био већи од 0,99 ($r^2 > 0,99$), док су критеријуми за тачност и прецизност израчунати унутар и између аналитичких секвенци били такви да израчунати коефицијент варијације (RSD %) за QC узорке буде мањи од $\pm 15\%$.

Лимит квантификације методе (LOQ) - најнижа концентрација аналита која се може са поузданости квантификовати коришћењем валидоване аналитичке методе. За лимит квантификација је изабрана најнижа тачка калибрационе криве која испуњава критеријум да израчуната вредност за RSD (%) буде мања од $\pm 20\%$.

Утицај претходно инјективног узорка (*carry over effect*) - овај параметар је добијен анализирањем *Blank* узорка након калибрационог узорка највише концентрације при чему су одговори детектора на ретенционим временима аналита и ИС сматрани прихватљивим уколико је одговор детектора био мањи од 20% за аналит од интереса и мањи од 5 % за ИС, у поређењу са одговорима детектора добијеним анализирањем LOQ узорка.

Утицај матрикса - процењено анализирањем два нивоа узорака контроле квалитета у присуству и одсуству матрикса. Утицаја матрикса није значајан уколико је коефицијент варијације (%) био мањи од 15% користећи ИС нормализовани матрикс фактор.

Стабилност раствора и анализираних узорака – испитивана је краткорочна стабилност, стабилност у аутосемплеру, стабилност током три циклуса замрзавање-одмрзавање и дугорочна стабилност узорака (месец дана на $-20\text{ }^\circ\text{C}$). Узорци су сматрани стабилним под дефинисаним условима уколико је опсег концентрација добијених анализирањем QC узорака био унутар интервала 85-115% од номиналне концентрације. Стабилност раствора супстанци је испитивана након два месеца чувања раствора на температури од $4-8\text{ }^\circ\text{C}$.

Валидација аналитичке методе за одређивање концентрације прегабалина у узорцима плазме и хомогенату ткива мозга пацова

За одређивање концентрације прегабалина у узорцима плазме и хомогената ткива пацова валидована је LC-MS/MS метода, развијена модификацијом методе која се користи у Одељењу за токсиколошку хемију ЦКТ за одређивање концентрације прегабалина у узорцима плазме пацијената.

За припрему стандардних раствора, C и Qc узорака коришћен је аналитички стандард прегабалина (*Mylan Laboratories Ltd*, Индија), а као ИС коришћен је аналитички стандард габапентина (*Belupo Pharmaceuticals & Cosmetics Inc*, Хрватска). Све коришћене хемикалије (метанол, вода, ацетонитрил, сирћетна киселина) су биле LC/MS степена чистоће (*Merck*, Немачка). Одређивање концентрације прегабалина је извршено коришћењем течног хроматографа *ACQUITY UPLC H-Class System* са тандем масеним спектрометром *XEVO TQD triple quadrupole mass spectrometer* (*Waters Corp., Milford*, САД). Хроматографско раздвајање је постигнуто на C18 колони, димензија 1,7 μm , 2,1 x 100 mm (*Waters Acquity UPLC[®] BEH*). Температура колоне је одржавана на 50 °C. Елуирање је извршено под изократским условима при констатном протоку мобилне фазе од 0,4 mL/min, при чему је мобилну фазу А чинио раствор 0,5% сирћетне киселине у води, а мобилну фазу Б раствор 0,1% сирћетне киселине у ацетонитрилу (А:Б = 65:35 v/v). Масени спектрометар је радио у позитивном јонизационом моду (ES+), а оптимизација детекције јонских маса и њихових фрагмената је извршена инјектовањем метанолних раствора прегабалина и габапентина (1 mg/L) директно у масени спектрометар помоћу *IntelliStart* програма у *Mass Lynx[®]* софтверском пакету. Детекција и квантификација су извршени коришћењем мулти реакционог мониторинг мода (*MRM-multiple reaction monitoring*) при чему су коришћене 3 транзиције за детекцију прегабалина и две транзиције за детекцију габапентина. Услови масеног спектрометра приказани су у Табели 4.

Табела 4. Услови масеног спектрометра за одређивање прегабалина

Једињење	Јонска транзиција (MRM)	Прекурсор јон (m/z)	Напон на конусу (V)	Продукт јон (m/z)	Колизиона енергија (V)
Прегабалин	MRM 1	160,09	28	54,96	22
	MRM 2 (јон за квантификацију)	160,09	28	97,02	14
	MRM 3	160,09	24	142,00	10
Габапентин (ИС)	MRM 1 (јон за квантификацију)	172,09	34	136,95	14
	MRM 2	172,09	26	54,95	22

Припремљена су два основна раствора прегабалина (1 mg/mL) и један основни раствор габапентина (1 mg/mL) растварањем 10 mg супстанце у 10 mL метанола. Први основни раствор прегабалина је коришћен за припрему радних стандардних раствора коришћених за припрему С узорака, а други за припрему радних стандардних раствора коришћених за припрему QC узорака. За конструисање калибрационе криве припремљено је по шест концентрационих нивоа узорака оптерећене плазме (C_{p-p} : 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L и 25 mg/L) и оптерећених хомогената ткива мозга (C_{b-p} : 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L и 2,5 mg/L). Узорци за контролу квалитета припремљени су у два концентрациона нивоа - за узорке плазме: ниска контрола ($QC_{low(p-p)}$ - 2 mg/L) и висока контрола ($QC_{high(p-p)}$ - 20 mg/L); за узорке хомогената ткива мозга: ниска контрола ($QC_{low(b-p)}$ - 0,20 mg/L) и висока контрола ($QC_{high(b-p)}$ - 2 mg/L). За припрему *Blank* ($Blank_{p-p}$ и $Blank_{b-p}$) и *pool* узорака плазме и хомогената ткива мозга искоришћени су узорци пацова из контролне групе који нису били третирани испитиваним супстанцама.

Припрема узорака плазме и хомогената ткива мозга за одређивање прегабалина извршена је методом преципитације протеина према следећој процедури: 200 μ L узорка, 40 μ L интерног стандарда (метанолни раствор габапентина, 25 mg/L) и 800 μ L охлађеног ацетонитрила је измешано у епрувети на вортекс мешалици током 30 секунди. Након 10 минута центрифугирања на 8935 обротаја/min, добијени супернатанти припремљених узорака плазме раблаживани су раствором моблине фазе А у односу 1:5, док су супернатанти добијени центрифугирањем припремљених хомогената ткива мозга раблаживани у односу 1:1. Крајњи добијени раствори су филтрирани и инјектовани у LC-MS/MS систем за анализу. Инјекциона запремина је износила 1 μ L, а укупно време трајања анализе је износило 2,5 минута.

Валидација аналитичке методе за одређивање концентрације клоназепам у узорцима плазме и хомогенату ткива мозга пацова

За одређивање концентрације клоназепам у узорцима плазме и хомогената ткива пацова развијена је и валидована LC-MS/MS метода.

За припрему стандардних раствора, Cs и Qc узорака коришћен је аналитички стандард клоназепам (*European Pharmacopoeia reference standards (CRS) & (BRP) C2385000*), а као ИС коришћен је аналитички стандард диазепам (*European Pharmacopoeia reference standards (CRS) & (BRP) D0940000*). За развој и валидацију методе за одређивање концентрације клоназепам коришћене су исте хемикалије, прибор и апарати и постављени су исти услови хроматографског раздвајања наведени у претходно описаној методи.

Масени спектрометар је радио у позитивном јонизационом моду (ES+), а оптимизација је извршена инјектовањем метанолних раствора клоназепам и диазепам (1 mg/L) директно у масени спектрометар, уз помоћ *IntelliStart* програма у *Mass Lynx*[®] софтверском пакету. Детекција и квантификација су извршени коришћењем MRM мода, при чему су коришћене 2 транзиције јона за детекцију клоназепам и 2 транзиције за детекцију ИС. Услови масеног спектрометра приказани су у Табели 5.

Табела 5. Услови масеног спектрометра за одређивање клоназепам

Једињење	Јонска транзиција (MRM)	Прекурсор јон (m/z)	Напон на конусу (V)	Продукт јон (m/z)	Колизиона енергија (V)
Клоназепам	MRM 1	315,94	54	213,92	38
	MRM 2 (јон за квантификацију)	315,94	54	241,04	34
Диазепам (ИС)	MRM 1	284,98	54	193,03	26
	MRM 2 (јон за квантификацију)	284,98	34	153,95	30

Припремљена су два основна раствора клоназепам (1 mg/mL) и један основни раствор диазепам (1 mg/mL) растварањем 10 mg супстанце у 10 mL метанола. Први основни раствор клоназепам је коришћен за припрему радних стандардних раствора коришћених за припрему С узорака, а други за припрему радних стандардних раствора коришћених за припрему Qc узорака. За конструисање калибрационе криве припремљено је по шест концентрационих нивоа узорака плазме (C_{p-k}: 0,005 mg/L, 0,01 mg/L, 0,025 mg/L, 0,05 mg/L, 0,10 mg/L и 0,25 mg/L) и хомогената ткива мозга (C_{b-k}: 0,001 mg/L, 0,0025 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L, 0,05 mg/L и 0,10 mg/L).

Узорци за контролу квалитета припремљени су у два концентрациона нивоа - за узорке плазме: ниска контрола ($QC_{low(p-k)} - 0,02 \text{ mg/L}$) и висока контрола ($QC_{high(p-k)} - 0,20 \text{ mg/L}$); за узорке хомогената ткива мозга: ($QC_{low(b-k)} - 0,002 \text{ mg/L}$) и висока контрола ($QC_{high(b-k)} - 0,02 \text{ mg/L}$). За припрему *pool* плазме и *Blank* (*Blank_{p-k}* и *Blank_{b-k}*) узорака искоришћени су узорци пацова који нису били третирани испитиваним супстанцама.

Припрема узорака плазме и хомогената ткива мозга за одређивање клоназепама је ивршена методом чврсто-фазне екстракције (SPE – Solid phase extraction) уз помоћ HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*) кертрица према следећој процедури: уравнотежавање и кондиционирање кертрица је извршено са 1 mL метанола и 1 mL воде. Након тога се на кертриц наносио 1 mL узорка са 40 μL ИС (метанолни раствор диазепама концентрације 5 mg/L). Испирање кертрица и елиминација интерференција је извршено са 1 mL 5% раствора метанола, а елуирање анализата са кертрица са 1 mL метанола. Припремљени метанолни екстракти су филитрирани и инјектовани у LC-MS/MS систем за анализу. Инјекциона запремина је износила 5 μL , а укупно време трајања анализе је износило 5 минута.

Статистичка анализа и обрада података

Статистичка анализа и обрада података урађена је применом софтвера *SigmaPlot 11*, *Microsoft Excel 2016* и *PK solver* програмског додатка. При статистичкој обради резултата коришћени се следећи статистички тестови: Студентов *t*-тест, једнофакторска ANOVA (*Tukey post-hoc* тест) и двофакторска ANOVA са поновљеним мерењима (*Tukey post-hoc* тест) (у зависности од броја група и броја/врсте фактора). Разлике су сматране статистички значајним ако је *p*-вредност (снага поређења) мања или једнака, $p < 0,05$ (*), високо значајним ако је $p < 0,01$ (**), веома високо статистички значајним ако је $p < 0,001$ (***)).

РЕЗУЛТАТИ

РЕТРОСПЕКТИВНА ОПСЕРВАЦИОНА СТУДИЈА

Потрошња габапентиноида

Према подацима Агенције за лекове и медицинска средства Србије између 2012. и 2021. године дошло је до значајног повећања укупне потрошње лекова из групе габапентиноида у Републици Србији. У току посматраног периода потрошња прегабалина порасла је преко 200 пута - у 2012. години укупна потрошња износила је 0,02 ДДД/1000 становника/дан, док је у 2021. години (последња година за коју су нам били доступни подаци) овај параметар износио 4,58 ДДД/1000 становника/дан.

У истом периоду није било значајне промене и чак је примећен благи пад у потрошњи габапентина у нашој земљи - 0,15 ДДД/1000 становника/дан у 2012 и 0,11 ДДД/1000 становника/дан у 2021. години.

Динамика потрошње прегабалина и габапентина у Србији за десетогодишњи период (2012-2021) приказана је на Слици 6.

Инциденца акутних тровања габапентиноидима

У току периода на који се односила ова студија (јануар 2012- октобар 2022), било је укупно 374 случајева тровања лековима из групе габапентиноида код 302 пацијента лечених у ЦКТ ВМА. Код 51 пацијента забележен је поновљени пријем на лечење током различитих временских периода (медијана: 1 поновљени пријем, интервал: 1-5 поновљених пријема). Прегабалин је био главни или један од узрочника тровања у већини случајева (95,5% - 357/374), док је значајно мањи број случајева подразумевао тровање габапентином (4,5% - 17/374).

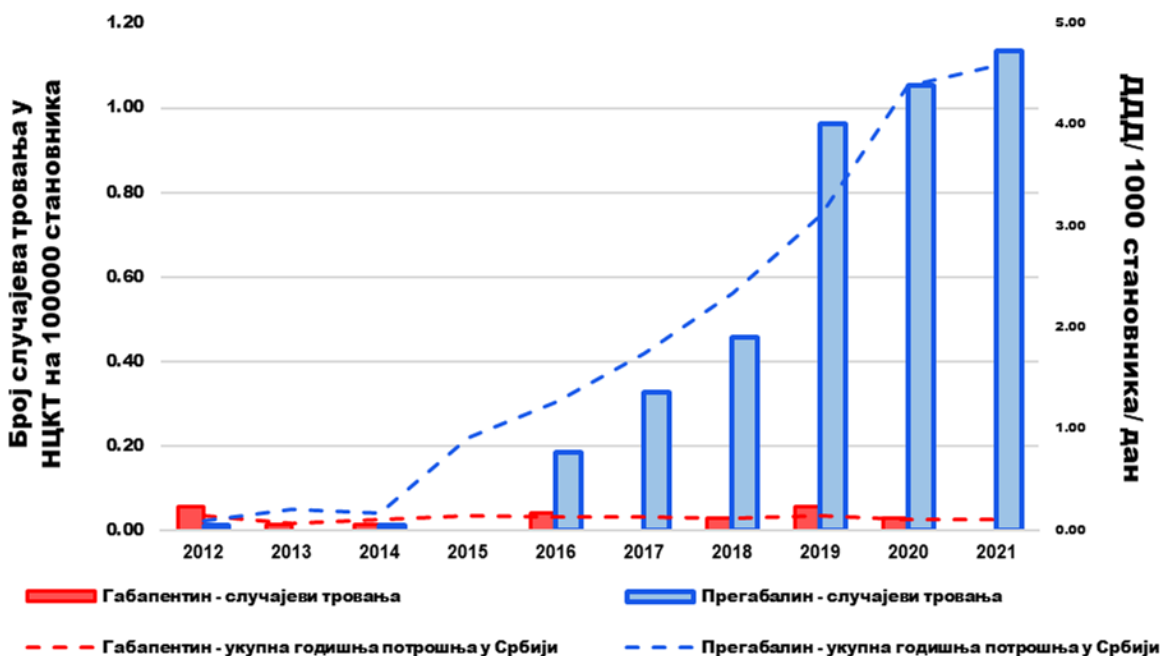
Током десетогодишњег периода за који су приказани комплетни подаци за сваку годину (2012-2021), стопа случајева тровања прегабалином код пацијената прегледаних и лечених у ЦКТ ВМА порасла је преко 100 пута - у 2012. години било је 0,01 случајева тровања/100 000 становника (један случај), док је у 2021. години забележено 1,13 случајева тровања/100 000 становника (укупно 78 случајева тровања).

У истом периоду било је 17 случајева тровања габапентином, а највећи број тровања забележен је у 2012. и 2019. години (4 случаја у свакој години).

Коришћењем Сприманове корелационе анализе добијена је јака позитивна корелација растућег тренда укупне потрошње прегабалина у десетогодишњем периоду (2012 – 2021.) са повећањем инциденце акутних тровања ($r = 0,900$; $p < 0,001$) и злоупотребе овог лека ($r = 0,957$; $p < 0,001$).

Истовремено, није било значајне корелације нити промене у потрошњи и случајева тровања или злоупотребе габапентина.

Однос динамике потрошње и инциденце акутних тровања габапентиноидима у Србији за посматрани период приказан је на Слици 6.



Слика 6. Укупна потрошња и случајеви тровања прегабалином и габапентином у Србији (2012 - 2021. година)

Злоупотреба габапентиноида

Злоупотреба лека детектована је код 27,8% (84/302) пацијената који су користили прегабалин и 0,7% (2/302) пацијената који су користили габапентин. Први случај злоупотребе прегабалина детектован је у 2016. години (једини случај те године или 0,01 случајева злоупотребе/100 000 становника), док је највећи број пацијената који су злоупотребљавали прегабалин био забележен током 2020. године (30 случајева или 0,43 случајева злоупотребе/100 000 становника). Удео случајева злоупотребе у свим случајевима тровања прегабалином приказан је на Слици 7.

Злоупотреба габапентина детектована је у три случаја тровања у 2012. години (сви случајеви се односе на једног пацијента који је лечен у ЦКТ ВМА више пута) и код само једног пацијента у 2019. години.



Слика 7. Удео случајева злоупотребе у свим случајевима тровања прегабалином

Када је у питању намера злоупотребе коју су пријавили пацијенти, већина је користила прегабалин и габапентин у циљу постизања психоактивног ефекта или због потенцирања ефекта коингестираних лекова и супстанци. Два пацијента су пријавила употребу габапентиноида у циљу постизања узбуђења и побољшања сексуалног живота. Један од ова два пацијента био је лечен у ЦКТ ВМА три пута у току периода на који се односи ова студија и злоупотребљавао је габапентин након што је на интернету пронашао информацију да се овај лек може употребити у наведену сврху. Други пацијент је са истим циљем злоупотребљавао прегабалин, након личног искуства које је имао са употребом овог лека.

Због очигледне, значајно веће укупне потрошње прегабалина у Србији, и значајно већег броја случајева тровања овим леком у ЦКТ ВМА у поређењу са габапентином, у даљем тексту дисертације биће разматрани само подаци који се односе на случајеве тровања прегабалином.

Главне карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином

Како би се уочиле главне социо-демографске разлике између пацијента као и обрасце и намеру употребе прегабалина у испитиваној популацији, сви случајеви тровања су подељени у три групе, како је приказано у Табели 6. Највећи удео чинили су случајеви повезани са суицидом (146/357 - 40,9%), док је погрешна употреба лека била забележена у 30,2% (108/357) случајева тровања прегабалином. Злоупотреба лека је детектована у скоро трећини од свих случајева тровања (103/357 - 28,9%).

Главни пут уноса је био ингестија, а код једног пацијента који је злоупотребљавао прегабалин забележена је интраназална употреба прегабалина.

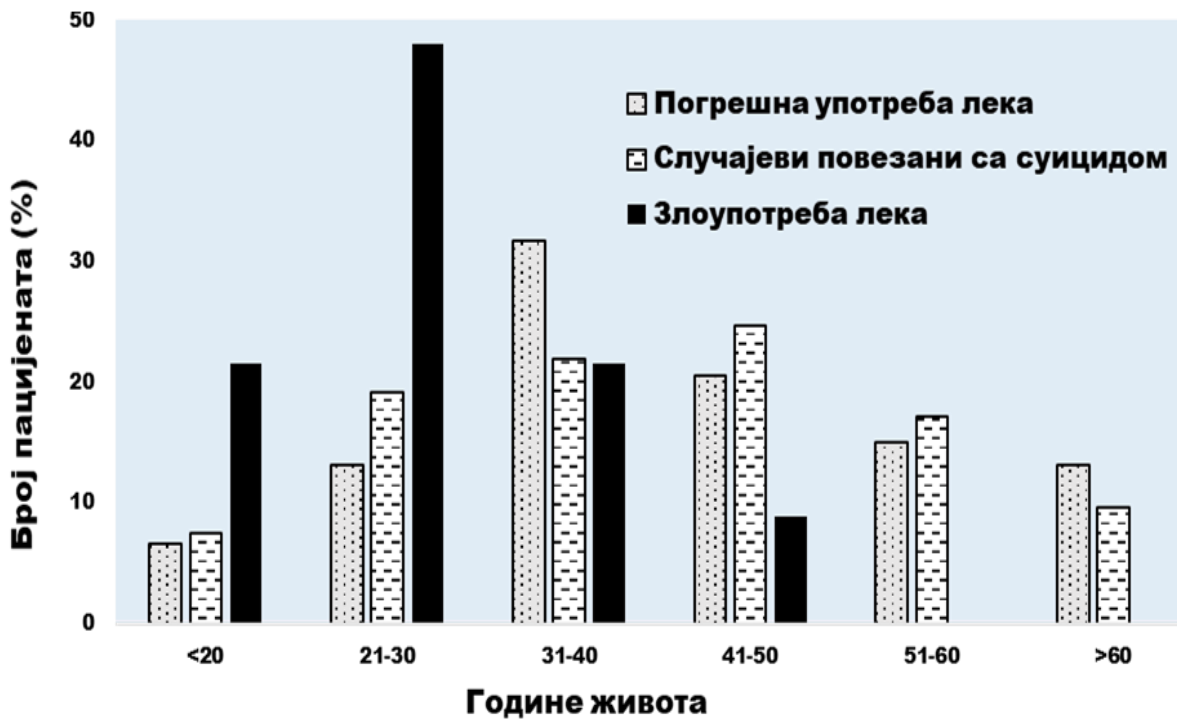
Добијени резултати указују да значајан део испитиване популације чине пацијенти са претходном историјом проблематичне употребе лекова и супстанци (117/287 – 40,8%) као и пацијенти који припадају мигрантској популацији (55/287 – 19,2%). У подгрупи пацијената из мигрантске популације, већина је користила прегабалин у циљу злоупотребе (48/55 - 87,3%), а просечна старост пацијената (медијана година живота) је била 25 година.

Табела 6. Социо-демографске карактеристике пацијената са тровањем прегабалином

	Сви случајеви	Погрешна употреба лека	Случајеви повезани са суицидом	Злоупотреба лека	р
Број случајева (n)	357	108 (30,2%)	146 (40,9%)	103 (28,9%)	-
Број пацијената (n)	287	91 (31,7%)	112 (39,0%)	84 (29,3%)	-
Пол (n)					
Мушко	148 (51,6%)	44 (48,3%)	33 (29,5%)	71 (84,5%)	< 0,001
Женско	139 (48,4%)	47 (51,7%)	79 (70,5%)	13 (15,5%)	
Старост (године)					
Медијана	37	42 ^{bbb}	41 ^{aaa}	26	< 0,001
Q ₁ - Q ₃	26-46	35-54	33-52	23-32	
Интервал	13-87	13-87	16-84	15-45	
Историја проблематичне употребе супстанци (n)	117 (40,8%)	28 (30,8%)	58 (51,8%)	31 (36,9%)	ns
Мигрантска популација (n)	55 (19,2%)	7 (7,7%)	-	48 (57,1%)	< 0,001

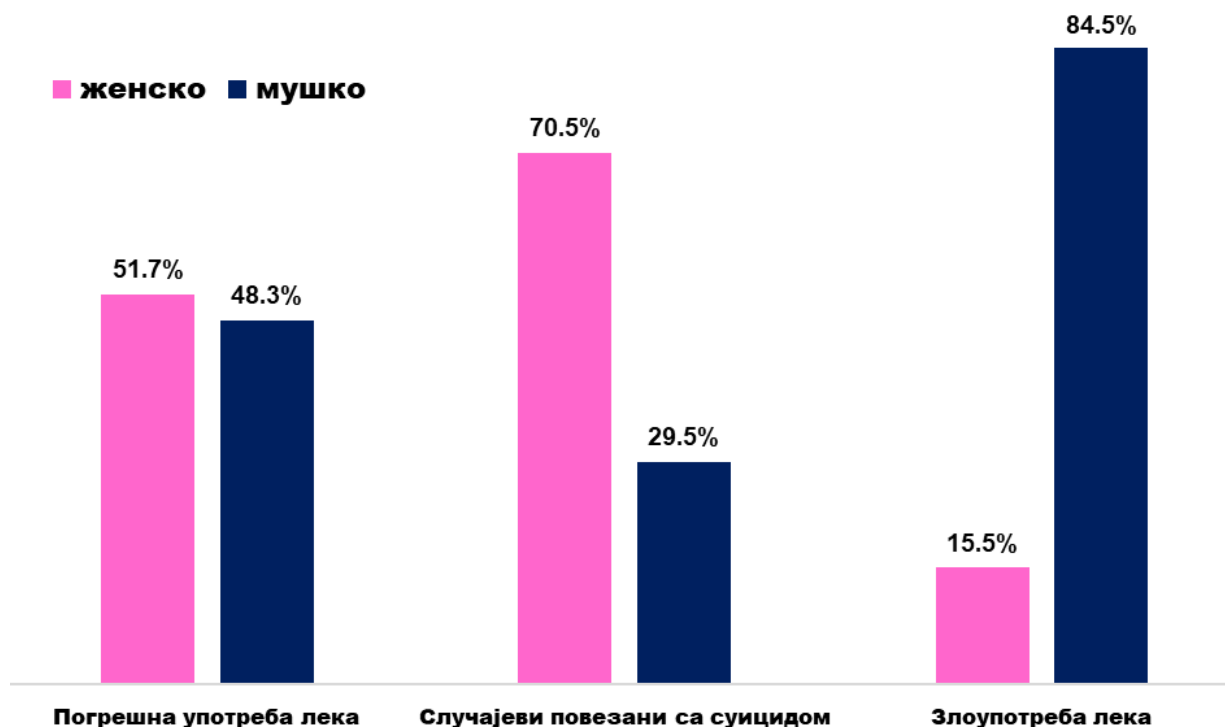
За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁ - Q₃), а статистичка значајност је утврђена *Kruskal-Wallis* тестом и *Mann-Whitney U* тестом поређењем група: злоупотреба лека и догађаји повезани са суицидом (aaa = p < 0,001); злоупотреба лека и погрешна употреба лека (bbb = p < 0,001). Поређење категоријских варијабли је вршено χ^2 тестом. ns – без статистичке значајности

Најизраженија разлика у старосној дистрибуцији је примећена у групи пацијената који су злоупотребљавали прегабалин (медијана: 26 година) у поређењу са групом пацијената код којих је забележена погрешна употреба лека (медијана: 42 година) и случајеви тровања повезани са суицидом (медијана: 41 година) ($p < 0,001$) (Слика 8).



Слика 8. Дистрибуција по годинама живота према намери тровања

Разлика у дистрибуцији пацијената по полу била је најизраженија у случајевима тровања у којима је детектована злоупотреба прегабалина (мушкарци: 71/84 – 84,5%) док су у групи пацијената са случајевима тровања повезаним са суицидом жене чиниле већину (79/112 – 70,5%) ($p < 0,001$) (Слика 9).



Слика 9. Дистрибуција пацијената по полу према намери тровања

Ингестирана доза лека је била пријављена у 59,7% (213/357) од свих случајева тровања прегабалином. Из добијених резултата се види да су статистички значајно више дозе прегабалина биле коришћене у случајевима злоупотребе и у случајевима повезаним са суицидом у односу на групу пацијената код којих је регистрована погрешна употреба лека.

Коингестија других лекова и супстанци била је статистички значајно заступљенија од изолованог тровања прегабалином, а бензодиазепини су били најчешће коингестирана група психоактивних супстанци у свим групама. Пацијенти код којих је регистрована злоупотреба прегабалина су поред бензодиазепина најчешће злоупотребљавали опиоиде и алкохол.

Подаци о ингестираним дозама прегабалина, броју и врсти коингестираних лекова и супстанци приказани су у Табели 7.

Табела 7. Ингестиране дозе прегабалина и учесталост коингестије других лекова и супстанци

		Сви случајеви (n=357)	Погрешна употреба лека (n=108)	Случајеви повезани са суицидом (n=146)	Злоупотреба лека (n=103)	p
Ингестирана доза (mg)		59,7% (n=213)	70,3% (n =76)	63,0% (n=92)	43,7% (n=45)	-
Медијана		500	237	600 ^{aaa}	600 ^{bbb}	< 0,001
Q ₁ – Q ₃		250-900	150-475	350-1300	450-1000	
Интервал		25-6900	50-6900	25-4700	150-4200	
Иzolовано тровање прегабалином (n)		38 (10,6%)	6 (5,6%)	12 (8,2%)	20 (19,4%)	< 0,001
Коингестирани лекови и супстанце (n)		319 (89,4%)	102 (94,4%)	134 (91,8 %)	83 (80,6%)	
Број коингестираних лекова и супстанци (n)	Медијана	2	2	3	2 ^{bbb, ccc}	< 0,001
	Q ₁ – Q ₃	1-3	1-3	2-4	1-2	
	Интервал	1-7	1-7	1-7	1-7	
Најчешће коингестиране групе психоактивних лекова и супстанци (n)			<u>Бензодиазепини</u> 84 (77,8%)	<u>Бензодиазепини</u> 118 (80,8%)	<u>Бензодиазепини</u> 70 (68,0%)	
			<u>Антиконвулзиви</u> 37 (34,3%)	<u>Антидепресиви</u> 48 (32,9%)	<u>Етанол</u> 21 (20,4%)	
			<u>Антидепресиви</u> 25 (23,1%)	<u>Антипсихотици</u> 40 (27,4%)	<u>Опиоиди</u> 16 (15,5%)	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁-Q₃), а статистичка значајност је утврђена *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney U* тестом поређењем група: погрешна употреба лека и догађај повезан са суицидом (aaa = p < 0,001); погрешна употреба и злоупотреба лека (bbb = p < 0,001); догађај повезан са суицидом и злоупотреба лека (ccc = p < 0,001). Поређење категоријских варијабли је вршено χ^2 тестом.

Анализом учесталости коингестије појединачних лекова и супстанци утврђено је да је истовремена употреба прегабалина и клоназепама била најзаступљенија у свим случајевима тровања. Ова комбинација је била веома учестала у случајевима у којима је детектована злоупотреба прегабалина (53/83 - 63,8%), а најучесталија у подгрупи коју су чинили пацијенти из мигрантске популације. Истовремена ингестија прегабалина и клоназепама забележена је у чак 85,4% (47/55) случајева тровања пацијената из мигрантске популације.

У релативно малом броју случајева тровања забележена је истовремена употреба прегабалина и контролираних психоактивних супстанци као што су хероин, амфетамини, марихуана итд.

Детаљан приказ учесталости коингестије појединачних лекова и супстанци у свим случајевима тровања прегабалином као и по групама пацијената приказан је у Табели 8.

Табела 8. Учесталост коингестије психоактивних супстанци и лекова у случајевима тровања прегабилином

Случајеви коингестије других лекова и супстанци	Сви случајеви (n=357)	Погрешна употреба лека (n=108)	Случајеви повезани са суицидом (n=146)	Злоупотреба лека (n=103)
	89,4% (n=319)	94,4% (n=102)	91,8% (n=134)	80,6% (n=83)
Етанол	54 (16,9%)	22 (21,6%)	11 (8,2%)	21 (25,3%)
Бензодиазепини				
Клоназепам	113 (35,4%)	21 (20,6%)	39 (29,1%)	53 (63,8%)
Диазепам	112 (35,1%)	42 (41,2%)	48 (35,8%)	22 (26,5%)
Бромазепам	68 (21,3%)	22 (21,6%)	38 (28,4%)	8 (9,6%)
Лоразепам	39 (12,2%)	17 (16,7%)	19 (14,2%)	3 (3,6%)
Алпразолам	24 (7,5%)	8 (7,8%)	11 (8,2%)	5 (6,0%)
Мидазолам	6 (1,9%)	2 (2,0%)	3 (2,2%)	1 (1,2%)
Нитразепам	2 (0,6%)	-	2 (1,5%)	-
Опиоиди				
Метадон	11 (3,4%)	7 (6,9%)	1 (0,7%)	3 (3,6%)
Хероин	10 (3,1%)	3 (2,9%)	1 (0,7%)	6 (7,2%)
Грамадол	7 (2,2%)	2 (2,0%)	3 (2,2%)	2 (2,4%)
Бупренорфин	9 (2,8%)	1 (1,0%)	2 (1,5%)	6 (7,2%)
Морфин	3 (0,9%)	1 (1,0%)	2 (1,5%)	-
Кодсин	2 (0,6%)	1 (1,0%)	-	1 (1,2%)
Хидроморфон	1 (0,3%)	1 (1,0%)	-	-
Фентанил	2 (0,6%)	1 (1,0%)	1 (0,8%)	-
Антиконвулзиви				
Карбамазепин	27 (8,5%)	16 (15,7%)	8 (6,0%)	3 (3,6%)
Валпроинска киселина	21 (6,6%)	11 (10,8%)	8 (6,0%)	2 (2,4%)
Ламотригин	21 (6,6%)	14 (13,7%)	6 (4,5%)	1 (1,2%)
Фенобарбитон	4 (1,2%)	2 (2,0%)	2 (1,5%)	-

Табела 8. Учесталост коингестије психоактивних супстанци и лекова у случајевима тровања прегабалином (наставак)

Случајеви коингестије других лекова и супстанци	Сви случајеви (n=357)	Погрешна употреба лека (n=108)	Случајеви повезани са суицидом (n=146)	Злоупотреба лека (n=103)
	89,4% (n=319)	94,4% (n=102)	91,8% (n=134)	80,6% (n=83)
Антидепресиви				
Сертралин	19 (6,0%)	6 (5,9%)	11 (8,2%)	2 (2,4%)
Миртазапин	18 (5,6%)	5 (4,9%)	11 (8,2%)	2 (2,4%)
Циталопрам	16 (5,0%)	3 (2,9%)	11 (8,2%)	2 (2,4%)
Тразодон	14 (4,4%)	3 (2,9%)	7 (5,2%)	3 (3,6%)
Венлафаксин	10 (3,1%)	2 (2,0%)	8 (6,0%)	-
Дулоксетин	7 (2,2%)	1 (1,0%)	5 (3,7%)	1 (1,2%)
Флуоксетин	7 (2,2%)	3 (2,9%)	4 (3,0%)	-
Амитриптилин	4 (1,2%)	1 (1,0%)	3 (2,2%)	-
Пароксетин	3 (0,9%)	2 (2,0%)	1 (0,8%)	-
Миансерин	3 (0,9%)	1 (1,0%)	2 (1,5%)	-
Антипсихотици				
Кветиапин	17 (5,3%)	6 (5,9%)	11 (8,2%)	-
Клозапин	13 (4,1%)	3 (2,9%)	8 (6,0%)	2 (2,4%)
Оланзапин	11 (3,5%)	3 (2,9%)	8 (6,0%)	-
Рисперидон	6 (1,9%)	1 (1,0%)	5 (3,7%)	-
Хлорпромазин	4 (1,2%)	1 (1,0%)	3 (2,2%)	-
Арипипразол	4 (1,2%)	-	4 (3,0%)	-
Халоперидол	2 (0,6%)	1 (1,0%)	1 (0,8%)	-
Остали				
Бипериден	3 (0,9%)	2 (0,9%)	-	-
Канабис	11 (3,5%)	5 (2,1%)	-	2 (2,4%)
Кокаин	1 (0,3%)	-	-	-
Амфетамин	9 (2,8%)	5 (2,1%)	-	-
Золпидем	13 (4,1%)	3 (2,9%)	9 (6,7%)	1 (1,2%)

Клиничке карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином

Како би се утврдио степен токсичности прегабалина, сви случајеви из испитиване популације су подељени у две групе. Било је укупно 38 (10,6%) случајева тровања у групи пацијената са поједначним тј. изолованим тровањем прегабалином и 319 случајева (89,4%) комбинованог тровања тј. коингестије других лекова и супстанци. Главне клиничке карактеристике и манифестације тровања у свим случајевима и разлике између група приказане су у Табели 9.

У већини свих случајева, пацијенти су отпуштени из ЦКТ ВМА након амбулантног лечења (213/357 - 64,4%), док су у око трећини случајева (127/357 – 35,6%) пацијенти били хоспитализовани у Клиници за ургентну и клиничку токсикологију ради даљег лечења. Добијени резултати показују да су пацијенти код којих је потврђена коингестија других лекова и супстанци, били чешће хоспитализовани у односу на групу пацијената са изолованим тровањем прегабалином.

Конвулзије током хоспитализације забележене су код два пацијента са комбинованим тровањем. Један од њих је у историји болести имао епилепсију, док су се код другог пацијента конвулзије догодиле 18-ог дана хоспитализације, након чега је уследио леталан исход.

Код само једног пацијента (старост: 31 година), без историје кардиоваскуларних обољења и коингестије других лекова и супстанци, регистрована је синусна брадикардија након ингестије 750 mg прегабалина. Пацијент је имао прегабалин у терапији, али је на дан пријема узео дозу вишу од прописане. На пријему, стање свести пацијента је било нивоа сомноленције, са срчаном фреквенцом од 38 откуцаја/мин која се касније побољшала на 42 откуцаја/мин. Након примењених терапијских мера у амбуланти, пацијент је токсиколошки излечен и упућен код кардиолога на преглед.

Тежак поремећај свести (кома), у тренутку пријема на лечење у ЦКТ ВМА, забележен је у 25,5% од свих случајева тровања. Добијени резултати показују да, када су пацијенти подељени у групе, само 4 пацијента са изолованим тровањем прегабалином је имало поремећај свести нивоа коме, док су пацијенти из групе са коингестијом других лекова и супстанци били статистички значајно више заступљени (87 пацијената).

Пнеумонија је забележена у 40 случајева, али код само једног пацијента у групи са изолованим тровањем прегабалином.

Већина пацијената била је лечена симптоматски, применом инфузионих раствора и неспецифичном детоксикационом терапијом. Агресивније мере лечења, у смислу интубације, примене вазопресорних лекова и механичке вентилације биле су забележене само код пацијената код којих је поред прегабалина утврђена коингестија других лекова и супстанци. Трајање лечења пацијената код којих је потврђена коингестија других лекова и супстанци је било статистички значајно дуже у односу на групу пацијената са изолованим тровањем прегабалином.

Табела 9. Клиничке карактеристике пацијената са тровањем прегабалином

	Сви случајеви (n=357)	Изоловано тровање прегабалином (n=38)	Коингестија других лекова и супстанци (n=319)	p
Лечење (n)				
Амбулатно лечење	230 (64,4%)	30 (78,9%)	200 (62,7%)	< 0,05
Пријем у клинику	127 (35,6%)	8 (21,1%)	119 (37,3%)	
Клинички ефекти тровања				
Кома	91 (25,5%)	4 (10,5%)	87 (27,3%)	< 0,05
Хипотензија	27 (7,6%)	0	27 (8,5%)	-
Брадикардија	9 (2,5%)	1 (2,6%)	8 (2,5%)	-
Конвулзије	2 (0,6%)	0	2 (0,6%)	-
Компликације током лечења				
Пнеумонија	40 (11,2%)	1 (2,6%)	39 (12,3%)	ns
Рабдомиолиза	21 (5,9%)	0	21 (6,6%)	-
Примењене мере лечења				
Интубација	25 (7,0%)	0	25 (7,8%)	-
Вазопресорни лекови	11 (3,1%)	0	11(3,4%)	-
Механичка вентилација	8 (2,2%)	0	8 (2,5%)	-

Поређење категоричких варијабли је вршено χ^2 тестом.

ns – без статистичке значајности

Табела 9. Клиничке карактеристике пацијената са тровањем прегабалином (наставак)

	Сви случајеви (n=357)	Иzolовано тровање прегабалином (n=38)	Коингестија других лекова и супстанци (n=319)	p
Ингестирана доза (mg)	59,7% (n=213)	68,4% (n=26)	58,6% (n=187)	-
Медијана	500	600	500	< 0,05
Q ₁ – Q ₃	250-900	450-1050	225-900	
Интервал	25-6900	100-3750	25-6900	
Време протекло од ингестије (h)	71,4% (n=255)	55,3% (n=21)	73,3% (n=234)	-
Медијана	6	6	6	ns
Q ₁ – Q ₃	3-8	2-8	4-8	
Интервал	1-64	2-45	1-64	
Концентрација прегабалина (mg/L)	29,1% (n=104)	18,4% (n=7)	30,4% (n=97)	-
Медијана	6,23	14,30	6,13	ns
Q ₁ – Q ₃	1,79-12,59	7,26-18,98	1,78-11,70	
Интервал	0,10-76,16	1,67-28,3	0,1-76,16	
ПСС скор (n)				
ПСС 0/1	231 (64,7%)	33 (86,8%)	199 (62,4%)	< 0,05
ПСС 2/3	122 (34,1%)	5 (13,2%)	116 (36,3%)	
ПСС 4	4 (1,1%)	0	4 (1,3%)	-
Трајање лечења (h)				
Медијана	6	4	6	< 0,001
Q ₁ – Q ₃	4-24	3-6	4-30	
Интервал	1-624	1-84	1-624	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁-Q₃), а статистичка разлика између група са изолованим тровањем и коингестијом других лекова и супстанци је утврђена *Mann-Whitney U* тестом. Поређење категоријских варијабли је вршено χ^2 тестом. ns – без статистичке значајности.

Подаци о ингестираној дози лека, добијени из анамнестичких или хетероанамнестичких података, забележени су у 59,7 % случајева тровања. Резултати указују да су статистички значајно веће дозе прегабалина биле коришћене у случајевима са изолованим тровањем прегабалином.

Није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији прегабалина у плазми између пацијената из ове две групе, иако су добијене вредности за средње вредности концентрације код пацијената са изолованим тровањем биле више у односу на пацијенте са комбинованим тровањем. Разлог је вероватно мали број пацијената, код којих је измерена концентрација лека у плазми (n=7), у групи са изолованим тровањем прегабалином.

Степен тежине тровања, изражен као ПСС скор, одређен је код свих пацијената из студије на основу клиничког тока, независно од доступности података о унетој дози или концентрацији прегабалина или евентуално коингестираних лекова и супстанци.

Из приказаних резултата се види да је већина пацијената који су користили само прегабалин имала тровање лаког степена (ПСС 1) или уопште није било манифестације симптома и знакова тровања (ПСС 0). Само шест пацијената са изолованим тровањем прегабалином је имало средње тешко тровање (ПСС 2), док је у групи са коингестијом других лекова и супстанци више од једне трећине пацијената (36,3%) имало изражене и животно угрожавајуће симптоме и знакове тровања (ПСС 2 и 3).

Летални исход (ПСС 4) забележен је код 4 пацијента и код свих је поред прегабалина утврђена коингестија других лекова и супстанци. У два случаја, потврђена је употреба опиоида (метадона и бупренорфина), док је у два случаја леталан исход уследио након акутне интоксикације лековима из групе бензодиазепина, антипсихотика и антиконвулзива. У 2 случаја са леталним исходом доказане су концентрације прегабалина, које су биле у опсегу терапијских вредности.

Највиша концентрација прегабалина на пријему измерена је код пацијенткиње старости 45 година, са клиничком сликом тровања тешког степена (ПСС 3). Пацијенткиња је примљена на лечење у ЦКТ ВМА због сумње на акутну интоксикацију лековима и алкохолом. Из хетероанамнестичких података добијена је информација да је пацијенткиња у претходном периоду злоупотребљавала таблете *Caffetin*[®] и да је на дан пријема вероватно конзумирала алкохол и већу количину прегабалина који није имала у редовној терапији (тачни подаци о ингестираној дози лека нису били познати). На пријему (3 сата након ингестије), доказана концентрација прегабалина у плазми износила је 76,16 mg/L, а токсиколошким скринингом утврђена је ниска концентрација етанола (0,1%) и коингестија неколико лекова (диазепам, золпидем, циталопрам, миртазапин, парацетамол и пропиофеназон) који су били у опсегу терапијских вредности концентрација. Концентрације прегабалина 12 и 36 сати након пријема износиле су 28,26 mg/L и < 1 mg/L, респективно. Лечење је компликовано развојем обостране бронхопнеумоније и респираторном инсуфицијенцијом, што је захтевало примену интубације и механичке вентилације. Забележена је и рабдомиолиза лаког степена без реперкусија на бубрежну функцију. Након побољшања менталног статуса и респираторне функције, пацијенткиња је екстубирана трећег дана хоспитализације. После шест дана лечења пацијенткиња је потпуно опоравила стање свести, токсиколошки излечена, отпуштена из ЦКТ ВМА и упућена код психијатра ради даље евалуације и лечења.

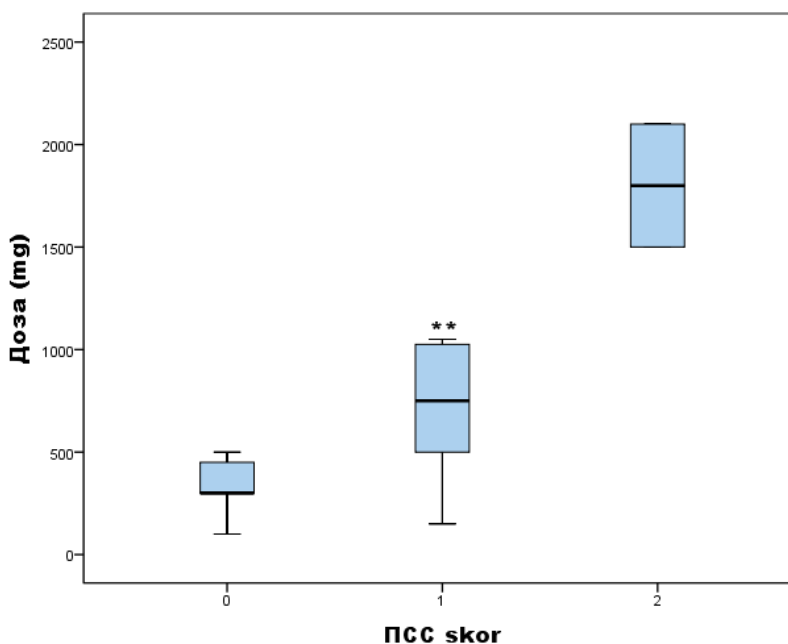
Корелација ингестиране дозе прегабалина и фактора тровања у случајевима изолованог тровања прегабалином

Податак о ингестираној дози у изолованим тровањима прегабалином био је познат у 26 случајева. Статистички значајно више дозе су пријављене у групи пацијената са изолованим тровањем прегабалином који су хоспитализовани у клиници (медијана: 3000 mg, n=21) у односу на пацијенте који су отпуштени након лечења у амбуланти (медијана: 500 mg, n=5), $p < 0,01$. Поређење доза у односу на вредност ПСС скорa приказано је у Табели 10 и на Слици 10.

Табела 10. Поређење ингестираних доза прегабалина према ПСС скору у групи пацијената са изолованим тровањем.

Ингестирана доза прегабалина (mg)	ПСС 0 (n=5)	ПСС 1 (n=19)	ПСС 2 (n=2)	p
Медијана	300	750 ^{aa}	1800	< 0,05
Q ₁ – Q ₃	200-450	500-1025	1500-2100	
Интервал	100-500	150-3750	1500-2100	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁-Q₃), а статистичка значајност је утврђена *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney U* тестом поређењем група ПСС 0 и ПСС 1 (aa = $p < 0,01$).



Слика 10. Поређење ингестираних доза прегабалина према ПСС скору у групи пацијената са изолованим тровањем. $p < 0,01$ (**)

Спирмановом корелационом анализом утврђена је статистички значајна позитивна корелација ингестиране дозе лека са токсичношћу прегабалина израженом као ПСС скор и са дужином трајања лечења пацијената са изолованим тровањем прегабалином. Резултати су приказани у Табели 11.

Табела 11. Корелација ингестиране дозе са ПСС скором и дужином трајања лечења у групи пацијената са изолованим тровањем прегабалином

	Доза (mg)	ПСС скор	Трајање лечења (h)
Доза (mg)	-	0,578**	0,574**

За утврђивање корелације између испитиваних варијабли коришћена је Спирманова корелациона анализа.

** корелација је значајна за вредност $p < 0,01$

Како је концентрација лека измерена у само 7 случајева изолованог тровања прегабалином, у овој групи пацијената није урађена статистичка анализа повезаности концентрације прегабалина са осталим факторима тровања.

Корелација ингестиране дозе прегабалина и фактора тровања у случајевима тровања са коингестијом других лекова и супстанци

Из резултата приказаних у Табели 12 се види да су ингестиране дозе биле статистички значајно веће код пацијента који су у тренутку пријема на лечење били у коматозном стању, хипотензивни или брадикардични. Такође, статистичка значајност за ингестирану дозу прегабалина утврђена је код пацијената чије се лечење компликовало развојем пнеумоније. Код пацијената чије је лечење подразумевало агресивније мере лечења у смислу примене вазопресорних лекова и интубације добијене су статистички значајно више вредности ингестиране дозе.

Табела 12. Корелација ингестиране дозе прегабалина са клиничким карактеристикама пацијената у групи са коингестијом других лекова и супстанци

	Случајеви са податком о ингестираној дози (n)		Доза (mg) Медијана (Q ₁ – Q ₃)	р
Лечење (n)				
Амбулатно лечење	123		300 (150-562)	< 0,001
Пријем у клинику	64		1025 (587-2000)	
Клинички ефекти тровања				
Кома	Не	158	425 (150-600)	< 0,001
	Да	29	1500 (750-2800)	
Хипотензија	Не	173	500 (225-750)	< 0,05
	Да	14	950 (600-2000)	
Брадикардија	Не	180	500 (250-812)	< 0,01
	Да	7	1500 (675-2100)	
Конвулзије	Не	185	500 (225-900)	ns
	Да	2	1063 (1000-1125)	
Компликације током лечења				
Пнеумонија	Не	172	450 (162-750)	< 0,001
	Да	15	2100 (1162-2900)	
Рабдомиолиза	Не	179	500 (225-887)	ns
	Да	8	875 (550-2662)	
Примењене мере лечења				
Интубација	Не	177	500 (225-750)	< 0,05
	Да	10	1312(700-2100)	
Вазопресорни лекови	Не	182	500 (225-900)	< 0,05
	Да	5	1125 (600-2000)	
Механичка вентилација	Не	184	500 (250-900)	ns
	Да	3	1125 (862-1962)	

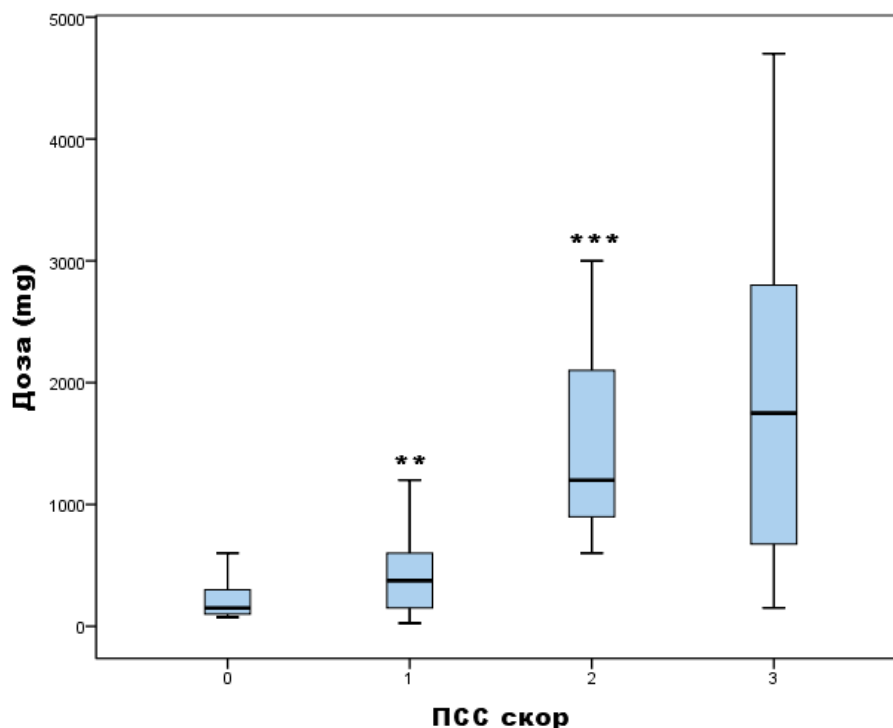
За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁-Q₃), а статистичка разлика између група је утврђена *Mann-Whitney U* тестом.
ns – без статистичке значајности

Поређењем ингестираних доза прегабалина и ПСС скора пацијената у групи са комбинованим тровањем (Табела 13, Слика 11), утврђена је статистички значајна разлика између свих ПСС група, осим између група са ПСС скором 2 и 3. У случајевима тровања са леталним исходом (ПСС 4), податак о ингестираној дози био је познат у само једном случају, те је ова група искључена из поређења.

Табела 13. Поређење ингестираних доза прегабалина према ПСС скору у групи пацијената са комбинованим тровањем

Ингестирана доза прегабалина (mg)	ПСС 0 (n=17)	ПСС 1 (n=126)	ПСС 2 (n=27)	ПСС 3 (n=16)	Р
Медијана	100	375 ^{aa}	1200 ^{bbb}	1750	< 0,001
Q ₁ – Q ₃	150-300	150-600	900-2100	675-2800	
Интервал	75-750	25-3000	600-6900	150-4700	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁-Q₃), а статистичка значајност је утврђена *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney U* тестом поређењем група: ПСС 0 и ПСС 1 (aa = p < 0,01); ПСС 1 и ПСС 2 (bbb = p < 0,001).



Слика 11. Поређење ингестираних доза прегабалина према ПСС скору у групи пацијената са комбинованим тровањем. p < 0,01 (**); p < 0,001 (***)

Корелација концентрације прегабалина у плазми и фактора тровања у случајевима тровања са коингестијом других лекова и супстанци

Статистички значајно више концентрације утврђене су код пацијената који су хоспитализовани у клиници, у односу на групу пацијената која је отпуштена из ЦКТ ВМА након амбулантног лечења. Од свих фактора тровања, статистичка значајност за разлику у измереној вредности концентрације прегабалина добијена је у групи пацијената чије је лечење захтевало примену интубације и механичке вентилације. За остале факторе тровања није показана статистичка значајност разлику у измереној концентрацији лека (Табела 14).

Табела 14. Корелација концентрације прегабалина са клиничким карактеристикама пацијената у групи коингестијом других лекова и супстанци

	Случајеви са потврђеном концентрацијом прегабалина (n)		Концентрација (mg/L) Медијана (Q ₁ – Q ₃)	P
Лечење (n)				
Амбулатно лечење	54		3,43 (1,10-6,93)	< 0,001
Пријем у клинику	43		10,34 (4,28-15,45)	
Клинички ефекти тровања				
Кома	Не	68	5,68 (1,44-10,04)	ns
	Да	29	7,90 (2,28-15,67)	
Хипотензија	Не	88	5,95 (1,74-11,90)	ns
	Да	9	8,16 (3,77-11,70)	
Брадикардија	Не	94	5,95 (1,71-11,60)	ns
	Да	3	11,70 (6,99-13,69)	
Конвулзије	Не	97	1,78 (6,13-11,70)	-
	Да	-	-	
Компликације током лечења				
Пнеумонија	Не	80	5,47 (1,56-10,87)	ns
	Да	17	9,51 (3,77-15,20)	
Рабдомиолиза	Не	87	5,57 (1,74-10,83)	ns
	Да	10	11,55 (7,90-15,67)	
Примењене мере лечења				
Интубација	Не	88	5,47 (1,56-10,83)	< 0,05
	Да	9	12,24 (8,64-15,67)	
Вазопресорни лекови	Не	93	5,77 (1,78-12,20)	ns
	Да	4	7,38 (3,65-10,17)	
Механичка вентилација	Не	92	5,85 (1,56-11,50)	< 0,05
	Да	5	11,70 (8,64-15,67)	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁ - Q₃), а статистичка разлика између група је утврђена *Mann-Whitney U* тестом. ns – без статистичке значајности

Вредности концентрација прегабалина код пацијената који су груписани према ПСС скору нису се статистички значајно разликовале (Табела 15). Концентрација лека није била измерена ни код једног пацијента чије је лечење протекло без манифестације симптома знакова и тровања (ПСС 0).

Табела 15. Поређење концентрације прегабалина према ПСС скору у групи пацијената са комбинованим тровањем

Концентрација прегабалина (mg)	ПСС 1 (n=58)	ПСС 2 (n=23)	ПСС 3 (n=16)	Р
Медијана	5,60	6,96	11,97	0.058
Q ₁ – Q ₃	1,80-10,08	1,25-12,20	2,75-22,39	
Интервал	0,10-22,05	1,18-28,44	1,23-29,84	

За континуиране варијабле који не следе нормалну расподелу подаци су приказани као медијана и 25-75. перцентил (Q₁ - Q₃), а статистичка разлика између група је утврђена *Mann–Whitney U тестом*.

Спирмановом корелационом анализом утврђена је статистички значајна позитивна корелација ингестиране дозе и измерене концентрације лека са токсичношћу прегабалина израженом као ПСС скор и са дужином трајања лечења пацијената. Резултати су приказани у Табели 16.

Испитивањем корелације времена протеклог од ингестије и концентрације лека добијена је негативна корелација без статистичке значајности ($r = - 0,177$; $p < 0,158$)

Табела 16. Корелација ингестиране дозе и концентрације прегабалина са ПСС скором и дужином трајања лечења у групи пацијената са коингестијом других лекова и супстанци

	Доза (mg)	Концентрација (mg/L)	ПСС скор	Трајање лечења (h)
Доза (mg)	-	0,561**	0,601**	0,563**
Концентрација (mg/L)	0,561**	-	0,215*	0,471**

За утврђивање корелације између испитиваних варијабли коришћена је Спирманова корелациона анализа.

* корелација је значајна за вредност $p < 0,05$

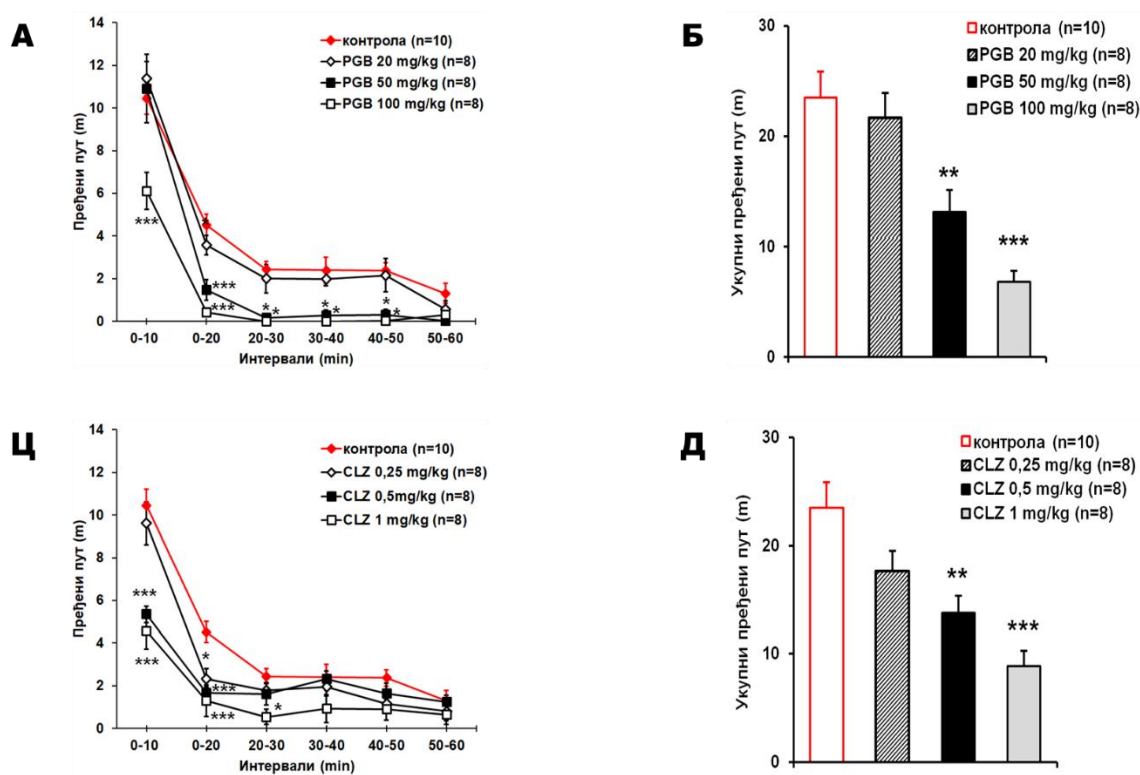
** корелација је значајна за вредност $p < 0,01$

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Спонтана локомоторна активност

Ефекти појединачне примене прегабалина и клоназепама у тесту спонтане локомоторне активности

У тесту спонтане локомоторне активности оба лека, прегабалин (20-100 mg/kg; *p.o.*) и клоназепам (0,25-1 mg/kg; *p.o.*), довела су до статистички значајног и дозно-зависног смањења укупног пређеног пута током 60 минута праћења експерименталних животиња (Слика 12, Табела 17).



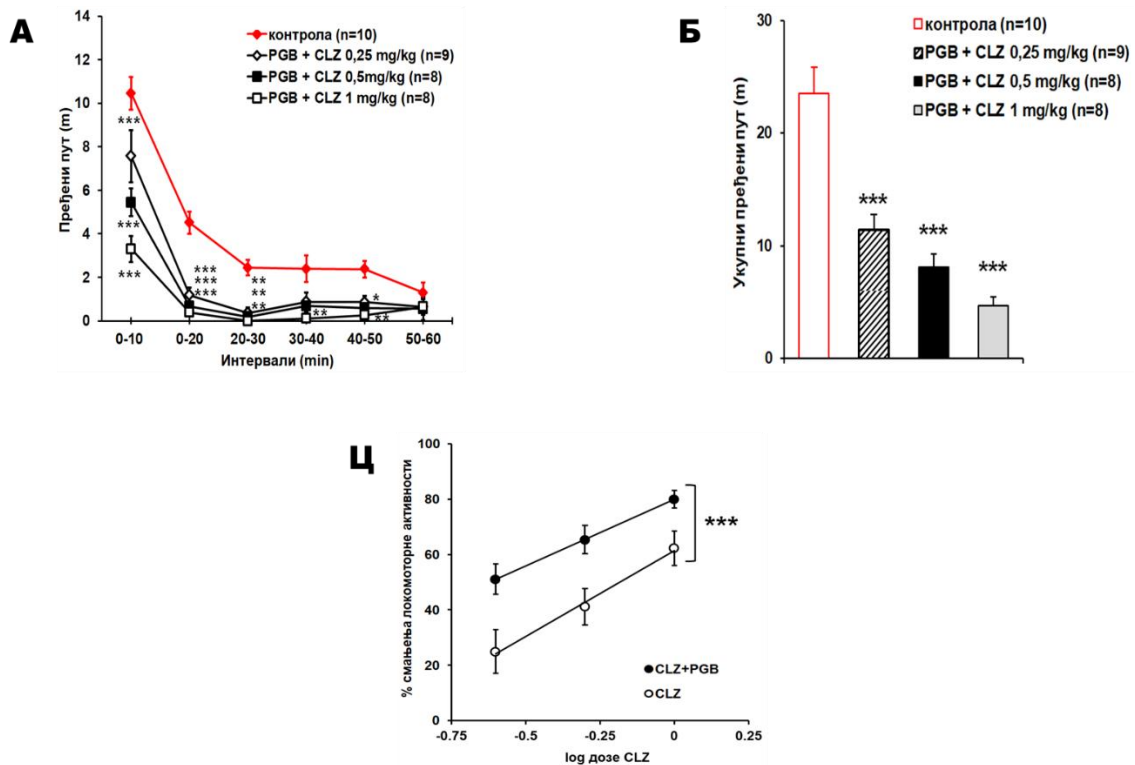
Слика 12. Ефекти прегабалина (PGB) (А и Б) и клоназепама (CLZ) (Ц и Д) након појединачне примене у тесту спонтане локомоторне активности (СЛА). Резултати су приказани као пређени пут (у метрима) у 10-минутним интервалима (панели А и Ц) и као укупни пређени пут током 60 min праћења (панели Б и Д). Прегабалин и клоназепам примењени су орално у појединачној дози, 60 min пре стављања животиња у коморе за праћење СЛА. Статистичка значајност је одређена у односу на контролну групу, применом двофакторске ANOVA са поновљеним мерењима (пређени пут у 10-минутним интервалима) или једнофакторске ANOVA (укупни пређени пут) са *post-hoc Tukey* тестом (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Табела 17. Ефекат појединачне примене прегабалина и клоназепама изражен као проценат смањења укупног пређеног пута у односу на укупни пређени пут контролне групе

Третман		Ефекат (%)
Прегабалин	20 mg/kg	7,8
	50 mg/kg	44,1
	100 mg/kg	71,0
Клоназепам	0,25 mg/kg	25,0
	0,50 mg/kg	41,2
	1 mg/kg	62,3

Ефекти комбиноване примене прегабалина и клоназепама у тесту спонтане локомоторне активности

Испитивањем ефеката комбиноване примене фиксне дозе прегабалина (20 mg/kg, *p.o.*) и растућих доза клоназепама (0,25-1 mg/kg, *p.o.*) показано је да прегабалин значајно појачава ефекат клоназепама у СЛА тесту (Слика 13, Табела 18).



Слика 13. Ефекти прегабалина (PGB) и клоназепама (CLZ) након комбиноване примене у СЛА тесту (А и Б). Резултати су приказани као пређени пут (у метрима) у 10-мин интервалима (панел А) и као укупни пређени пут током 60 min праћења (панел Б). Прегабалин и клоназепам су заједно примењени орално у појединачној дози, 60 min пре стављања животиња у коморе за праћење СЛА. Прегабалин је у свим групама примењен у фиксној дози од 20 mg/kg, а клоназепам је примењен у три различите дозе (0,25-1 mg/kg). Статистичка значајност је одређена у односу на контролну групу, применом двофакторске ANOVA са поновљеним мерењима (пређени пут у 10-минутним интервалима) или једнофакторске ANOVA (укупни пређени пут) са *post-hoc Tukey* тестом (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Ц) Ефекти клоназепама након појединачне примене и комбиноване примене са фиксном дозом прегабалина. Ефекти су изражени као проценат смањења укупног пређеног пута у односу на укупни пређени пут контролне групе. Статистичка значајност је одређена поређењем клоназепам група (клоназепам након појединачне примене) и клоназепам+прегабалин група (комбинована примена клоназепама и прегабалина) применом двофакторске ANOVA (*** $p < 0,001$).

Табела 18. Поређење ефеката (процент смањења укупног пређеног пута у односу на укупни пређени пут контролне групе) клоназепам након појединачне примене и комбиноване примене са прегабалином

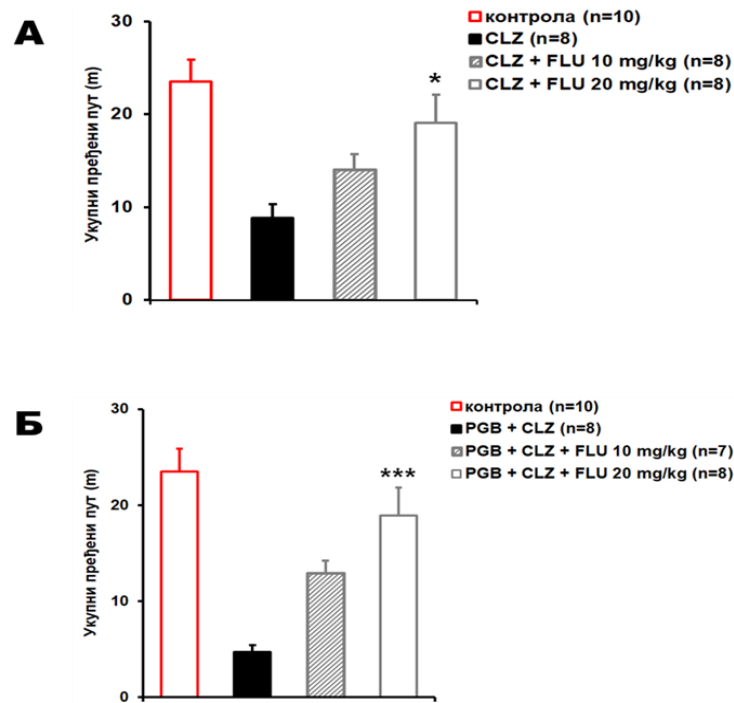
Третман		Ефекат (%)	р
Клоназепам		-	< 0,001
0,25 mg/kg		25,0	
0,50 mg/kg		41,2	
1,00 mg/kg		62,3	
Прегабалин + Клоназепам		-	
20 mg/kg	0,25 mg/kg	51,2	
20 mg/kg	0,50 mg/kg	65,4	
20 mg/kg	1,00 mg/kg	80,3	

Статистичка значајност је одређена применом двофакторске ANOVA, поређењем група које су третиране растућим дозама клоназепам и група које су третиране растућим дозама клоназепам у комбинацији са фиксном дозом прегабалина.

Утицај примене флумазенила на ефекте клоназепама након појединачне и комбиноване примене са прегабалином у тесту спонтане локомоторне активности

Како би се утврдило да ли постоји разлика у потенцијалу флумазенила да анатагонизује ефекте клоназепама након појединачне и комбиноване примене са прегабалином, клоназепам и прегабалин су примењени орално 60 минута пре постављања животиња у комору за праћење СЛА, док је флумазенил примењен интраперитонеално 15 минута пре постављања животиње у комору за СЛА (45 минута после примене клоназепама, са или без прегабалина). У експериментима су коришћене највеће испитане дозе клоназепама у СЛА тесту (1 mg/kg), а прегабалин је примењен у дози од 20 mg/kg.

Овим експериментима показано је да прегабалин не нарушава ефикасност флумазенила у антагонизовању ефеката клоназепама (Слика 14).

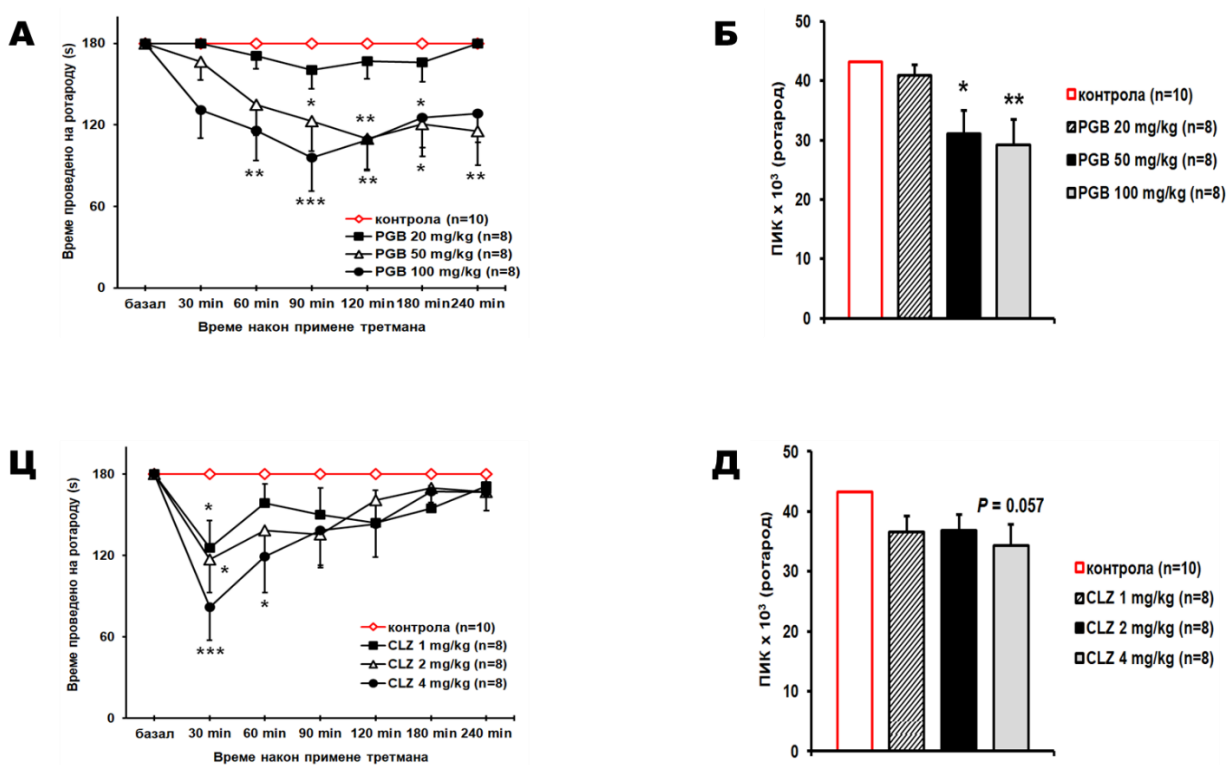


Слика 14. Утицај флумазенила (FLU) на ефекте клоназепама (CLZ) након појединачне примене (А) и комбиноване примене са прегабалином (PGB + CLZ) (Б) у СЛА тесту. Резултати су приказани као укупни пређени пут (у метрима) током 60 min праћења. Клоназепам је примењен орално у појединачној дози (1 mg/kg), са или без прегабалина (20 mg/kg, *p.o.*), 60 min пре стављања животиња у коморе за праћење СЛА. Флумазенил је примењен интраперитонеално, 15 min пре стављања животиња у коморе за праћење СЛА. Статистичка значајност је одређена у односу на клоназепам или прегабалин+клоназепам групу, применом једнофакторске ANOVA са *post-hoc Tukey* тестом (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Ротарод тест

Ефекти појединачне примене прегабалина и клоназепама у ротарод тесту

У ротарод тесту, примена растућих доза прегабалина (20-100 mg/kg, *p.o.*) довела је до значајног и дозно-зависног смањења времена проведеног на ротароду, као и ПИК вредности експерименталних животиња. У случају клоназепама (1-4 mg/kg; *p.o.*), дошло је до статистички значајног и дозно-зависног смањења укупног времена проведеног на ротароду у 30 и 60. минути експеримента, док је смањење ПИК вредности било на граници статистичког значаја (Слика 15, Табела 19).



Слика 15. Ефекти прегабалина (PGB) (А и Б) и клоназепама (CLZ) (Ц и Д) након појединачне примене у ротарод тесту. Резултати су приказани као време проведено на ротароду (у секундама) током 240 min (панели А и Ц) и као површине испод крива (ПИК) које су прорачунате из података за временски ток (панели Б и Д). Прегабалин и клоназепам су примењени орално у појединачној дози, а ефекти у ротарод тесту су праћени током 240 min након оралне примене. Статистичка значајност је одређена у односу на контролну групу, применом двофакторске ANOVA са поновљеним мерењима (време проведено на ротароду) или једнофакторске ANOVA (ПИК вредности) са *post-hoc Tukey* тестом (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

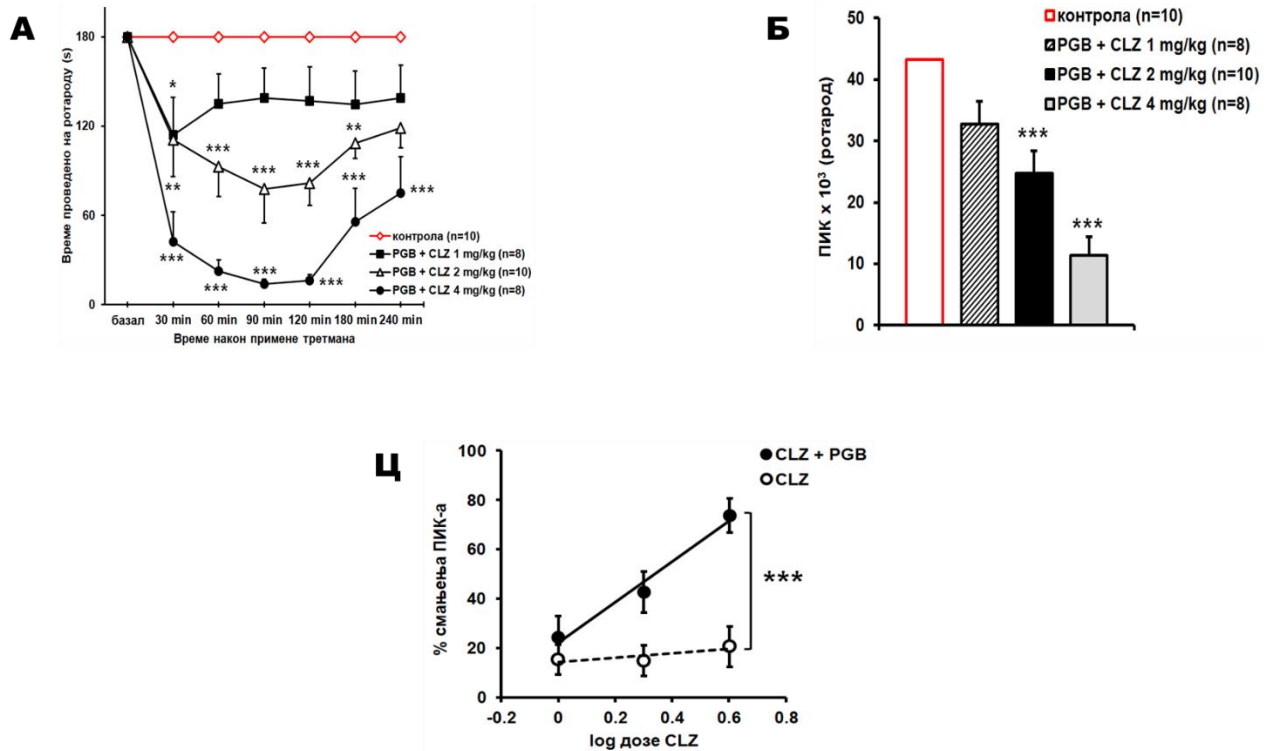
Напомена: за групу која је третирана клоназепамом у дози од 4 mg/kg смањење ПИК вредности било је на граници статистичког значаја.

Табела 19. Ефекат појединачне примене прегабалина и клоназепама изражен као проценат смањења ПИК вредности групе

Третман		Ефекат (%)
Прегабалин	20 mg/kg	5,3
	50 mg/kg	28,1
	100 mg/kg	32,4
Клоназепам	1 mg/kg	15,3
	2 mg/kg	14,8
	4 mg/kg	20,6

Ефекти комбиноване примене прегабалина и клоназепам у ротарод тесту

У ротарод тесту, ефекти комбиноване примене растућих доза клоназепам (1-4 mg/kg; *p.o.*) са фиксном дозом прегабалина (20 mg/kg) значајно су већи од ефеката истих доза клоназепам након појединачне примене (Слика 16, Табела 20).



Слика 16. (А и Б) Ефекти прегабалина (PGB) и клоназепам (CLZ) након комбиноване примене у ротарод тесту. Резултати су приказани као време проведено на ротароду (у секундама) током 240 min (панел А) и као површине испод крива (ПИК) које су прорачунате из података за временски ток (панел Б). Прегабалин и клоназепам су заједно примењени орално у појединачној дози, а ефекти у ротарод тесту су праћени током 240 минута након оралне примене. Прегабалин је у свим групама примењен у фиксној дози од 20 mg/kg, а клоназепам је примењен у три различите дозе (1-4 mg/kg). Статистичка значајност је одређена у односу на контролну групу, применом двофакторске ANOVA са поновљеним мерењима (време проведено на ротароду) или једнофакторске ANOVA (ПИК вредности) са *post-hoc Tukey* тестом (**p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001). (Ц) Ефекти клоназепам, након појединачне примене и комбиноване примене са фиксном дозом прегабалина у ротарод тесту. Ефекти су изражени као проценат смањења ПИК вредности у односу на ПИК вредност контролне групе. Статистичка значајност је одређена поређењем клоназепам група (клоназепам након појединачне примене) и клоназепам + прегабалин група (комбинована примена клоназепам и прегабалина) применом двофакторске ANOVA (****p* < 0,001).

Табела 20. Поређење ефеката (процент смањења ПИК вредности у односу на ПИК вредност контролне групе) клоназепама након појединачне примене и комбиноване примене са прегабалином

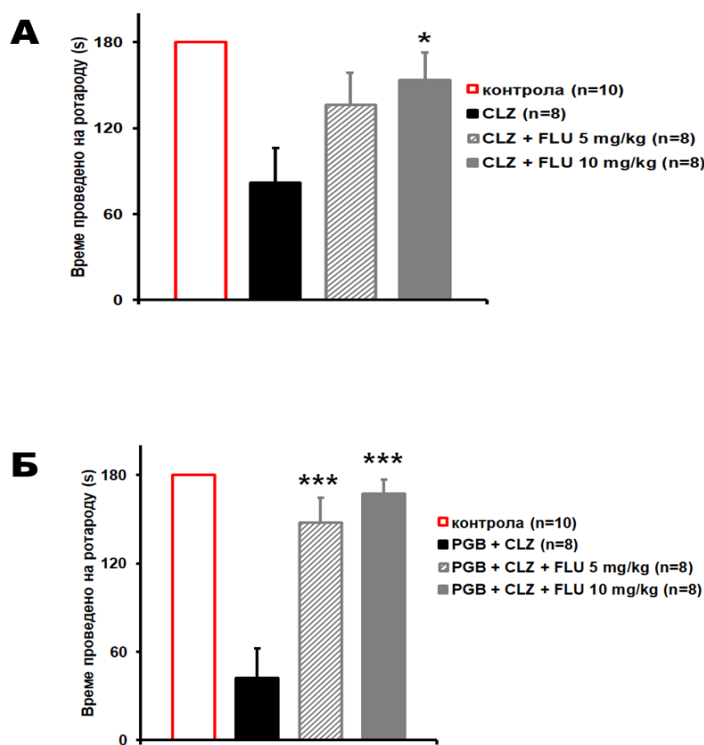
Третман		Ефекат (%)	р
Клоназепам		-	< 0,001
1 mg/kg		15,3	
2 mg/kg		14,8	
4 mg/kg		20,6	
Прегабалин + Клоназепам		-	
20 mg/kg	1 mg/kg	24,3	
20 mg/kg	2 mg/kg	42,6	
20 mg/kg	4 mg/kg	73,6	

Статистичка значајност је одређена применом двофакторске ANOVA, поређењем група које су третиране растућим дозама клоназепама и група које су третиране растућим дозама клоназепама у комбинацији са фиксном дозом прегабалина.

Утицај примене флумазенила на ефекте клоназепам након појединачне и комбиноване примене са прегабалином у ротарод тесту

У овим екпериментима, клоназепам и прегабалин примењени су орално 30 минута пре постављања животиња на ротород, док је флумазенил примењен интраперитонеално 15 минута пре постављања животиње на ротор (15 минута након примене клоназепам, са или без прегабалина). У експериментима су коришћене највеће испитане дозе клоназепам у ротарод тесту (1 mg/kg), а прегабалин је примењен у дози од 20 mg/kg. Приказани су резултати за временску тачку 30 минута након примене клоназепам и прегабалина, јер у каснијим тачкама флумазенил није имао ефекта.

Приказани резултати указују да прегабалин не нарушава ефикасност флумазенила у антагонизовању ефеката клоназепам (Слика 17).

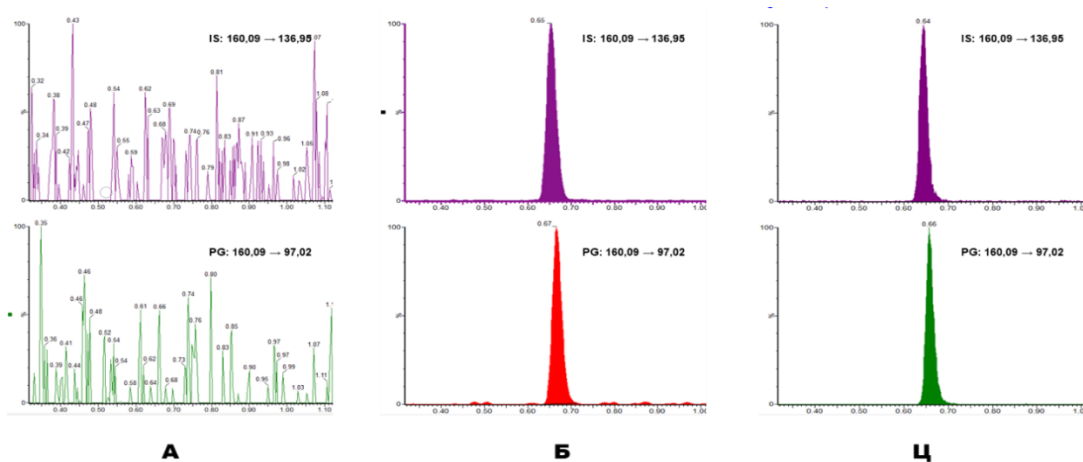


Слика 17. Утицај флумазенила (FLU) на ефекте клоназепам (CLZ) након појединачне примене (А) и комбиноване примене са прегабалином (PGB + CLZ) (Б) у ротарод тесту. Резултати су приказани као време проведено на ротароду (у секундама). Клоназепам је примењен орално у појединачној дози (4 mg/kg), са или без прегабалина (20 mg/kg, орално), 30 min пре постављања животиња на ротарод апаратуру. Флумазенил је примењен интраперитонеално, 15 min пре постављања животиња на ротарод. Статистичка значајност је одређена у односу на клоназепам или прегабалин + клоназепам групу, применом једнофакторске ANOVA са *post-hoc Tukey* тестом (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

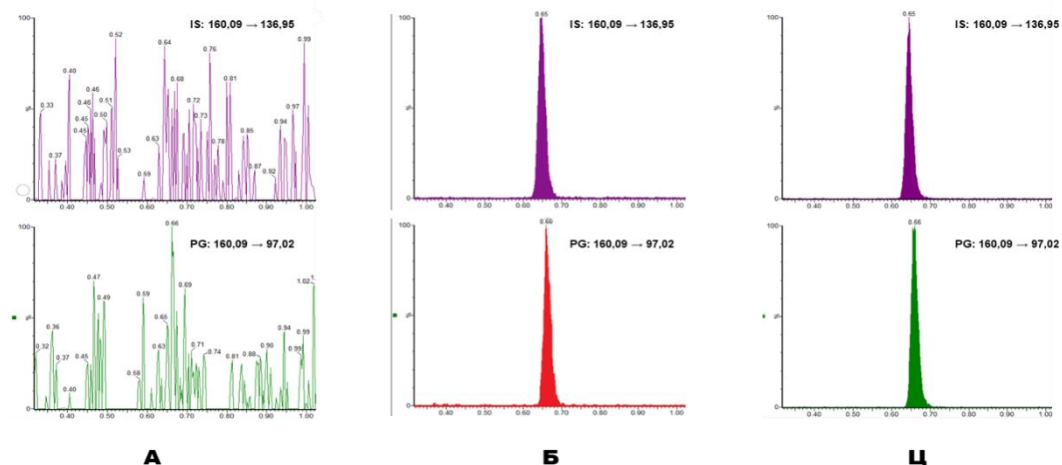
Резултати валидационих параметара аналитичке методе за одређивање прегабалина у узорцима плазме и хомогената ткива мозга пацова

Селективност, линеарност и лимит квантификације

Репрезентативни хроматограми *blank*, *LOQ* и узорака плазме и хомогената ткива мозга приказани су на Сликама 18 и 19. Ретенциона времена добијена анализирањем раствора аналитичких стандарда супстанци и узорака износила су 0,67 минута за прегабалин и 0,65 минута за ИС. Анализирањем *Blank* узорака плазме и хомогената ткива мозга није утврђено присуство интерференција на ретенционим временима прегабалина и ИС.



Слика 18. Хроматограми добијени анализирањем узорака плазме експерименталних животиња: *Blank* (А), лимит квантификације (LOQ) (Б), узорак плазме пацова третираног прегабалином (Ц)



Слика 19. Хроматограми добијени анализирањем узорака хомогената ткива мозга експерименталних животиња : *Blank* (А), лимит квантификације (LOQ) (Б), узорак плазме пацова третираног прегабалином (Ц)

Анализирањем калибрационих узорака метода је показала линеарност у тестираном распону концентрација, а добијене једначине калибрационих кривих и коефицијенти корелације приказани су у Табели 21 и 22.

Табела 21. Параметри калибрационе криве за одређивање концентрације прегабалина у плазми пацова

Опсег мерења	Једначина калибрационе криве	Коефицијент корелације
0,5-25 mg/L	$y = 0,0584x + 0,0478$	0,997

Табела 22. Параметри калибрационе криве за одређивање концентрације прегабалина у хомогенату ткива мозга пацова

Опсег мерења	Једначина калибрационе криве	Коефицијент корелације
0,05-2,5 mg/L	$y = 0,398x + 0,0084$	0,994

Тестирањем оптерећених узорака за лимите квантификације методе за одређивање концентрације прегабалина у плазми и хомогенатима ткива мозга задовољени су критеријуми валидације предвиђени водичем. Лимит квантификације за одређивање прегабалина у плазми (LOQ_{p-p}) износио је 0,5 mg/L, а лимит квантификације за одређивање концентрације прегабалина у хомогенатима ткива мозга (LOQ_{b-p}) износио је 0,05 mg/L.

Тачност и прецизност

Параметри тачности и прецизности методе, добијени анализирањем QC узорака, задовољили су све валидационе критеријуме а резултати приказани су у Табели 23 и 24.

Табела 23. Тачност и прецизност унутар и између аналитичких секвенци методе за одређивање прегабалина у плазми пацова

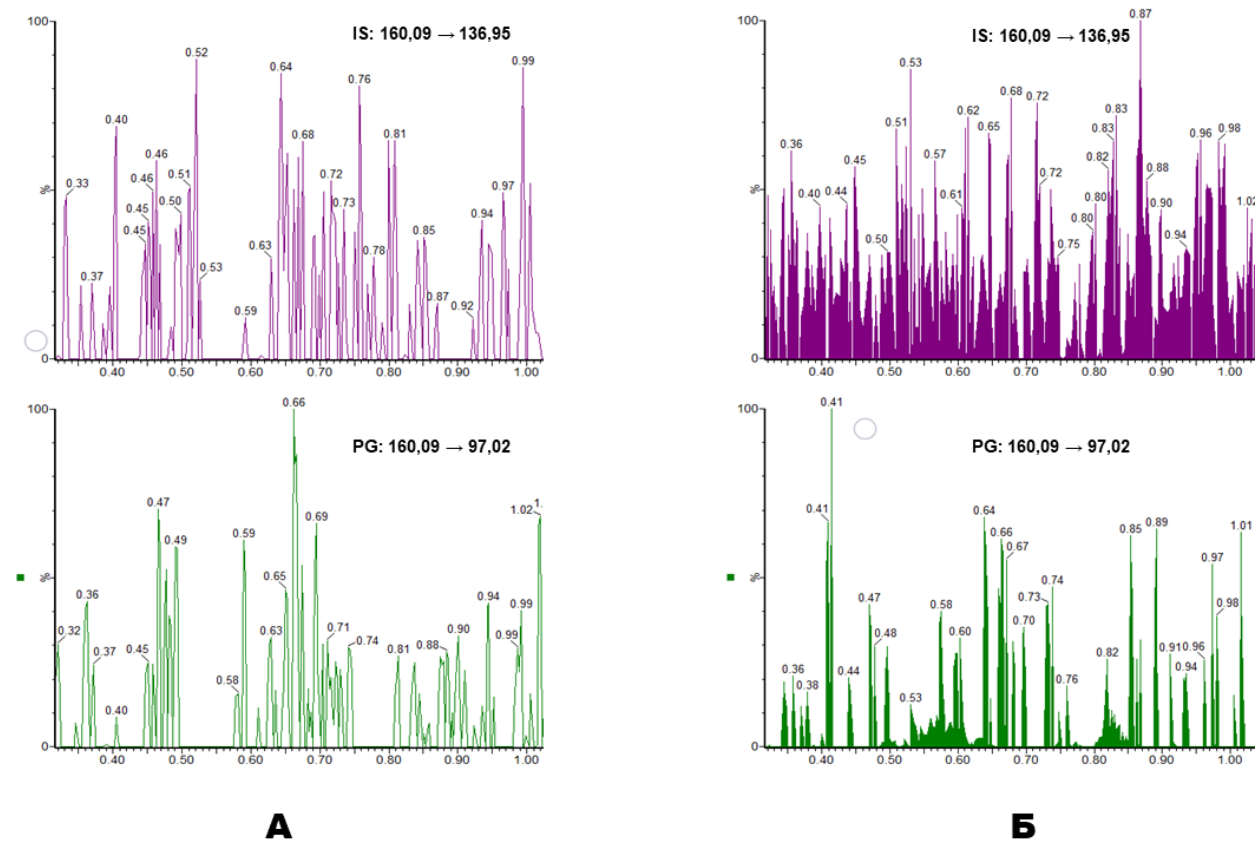
QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)		Прецизност (% RSD)	
	Унутар секвенце	Између секвенци	Унутар секвенце	Између секвенци
-				
LOQ _{p-p} (0,5 mg/L)	106,9	106,3	9,5	10,8
QC _{low(p-p)} (2 mg/L)	101,7	100,8	4,8	5,1
QC _{high(p-p)} (20 mg/L)	98,5	97,7	1,3	1,4

Табела 24. Тачност и прецизност унутар и између аналитичких секвенци методе за одређивање прегабалина у хомогенату ткива мозга пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)		Прецизност (% RSD)	
	Унутар секвенце	Између секвенци	Унутар секвенце	Између секвенци
-				
LOQ _{b-p} (0,05 mg/L)	114,8	115,2	12,6	13,1
QC _{low(b-p)} (0,20 mg/L)	105,4	104,9	6,9	8,3
QC _{high(b-p)} (2 mg/L)	102,4	101,7	2,1	2,4

Утицај претходно инјектованог узорка (*carry over*)

Анализирањем *Blank* узорка плазме и хомогената ткива мозга, након калибрационих узорка са највишом концентрацијом прегабалина показано је да није било значајног *carry over* ефеката на ретенционим временима прегабалина и ИС (Слика 20).



Слика 20. Хроматограми добијени анализирањем *Blank* узорка инјектованих након узорка плазме (А) и хомогената ткива мозга (Б) са највишом концентрацијом прегабалина

Испитивање утицаја матрикса

Анализирањем QC узорака плазме и хомогената ткива мозга показано је да није било значајног утицаја матрикса на јонизацију анализата под дефинисаним условима методе (Табеле 25 и 26).

Табела 25. Параметри испитивања утицаја матрикса у методи за одређивање прегабалина у плазми пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)	
	X_{sr}	% RSD
QC _{low(p-p)} (2 mg/L)	89,6	2,4
QC _{high(p-p)} (20 mg/L)	88,2	0,9

Табела 26. Параметри испитивања утицаја матрикса у методи за одређивање прегабалина у хомогенату ткива мозга пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)	
	X_{sr}	% RSD
QC _{low(b-p)} (0,20 mg/L)	86,8	3,1
QC _{high(b-p)} (2 mg/L)	85,7	1,2

Стабилност раствора и узорака

Резултати добијени испитивањем стабилности узорака (краткорочна, дугорочна, аутосемплер, циклуси замрзавање-одмрзавање) показали су да су узорци плазме и хомогената ткива мозга, у којима се одређује концентрација прегабалина, стабилни под дефинисаним условима методе и погодни за анализу уколико се чувају на -20 °C у периоду од месец дана (Табеле 27 и 28).

Табела 27. Стабилност узорака плазме за одређивање концентрације прегабалина

	Краткорочна стабилност	Стабилност у аутосемплеру	Стабилност замрзавање/одмрзавање	Дугорочна стабилност
Разлика добијене од номиналне концентрације (%)	1,9 %	1,4	1,6 %	2,4 %

Табела 28. Стабилност узорака хомогената ткива мозга за одређивање концентрације прегабалина

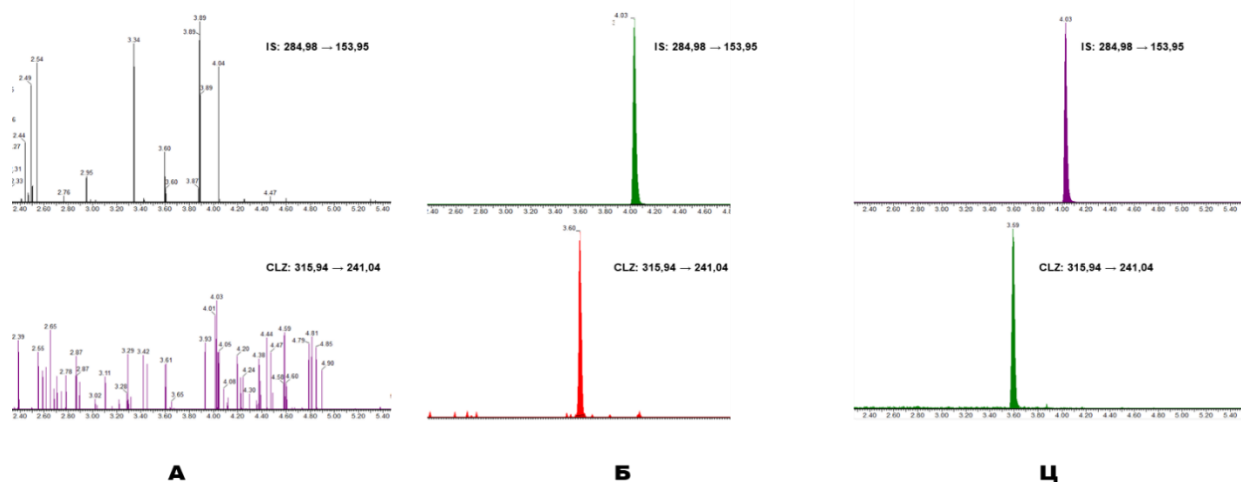
	Краткорочна стабилност	Стабилност у аутосемплеру	Стабилност замрзавање/одмрзавање	Дугорочна стабилност
Разлика добијене од номиналне концентрације (%)	1,2 %	0,9	1,8 %	2,7 %

Основни и радни раствори прегабалина и габапентина су стабилни најмање два месеца ако се чувају у фрижидеру на температури 4-8 °C.

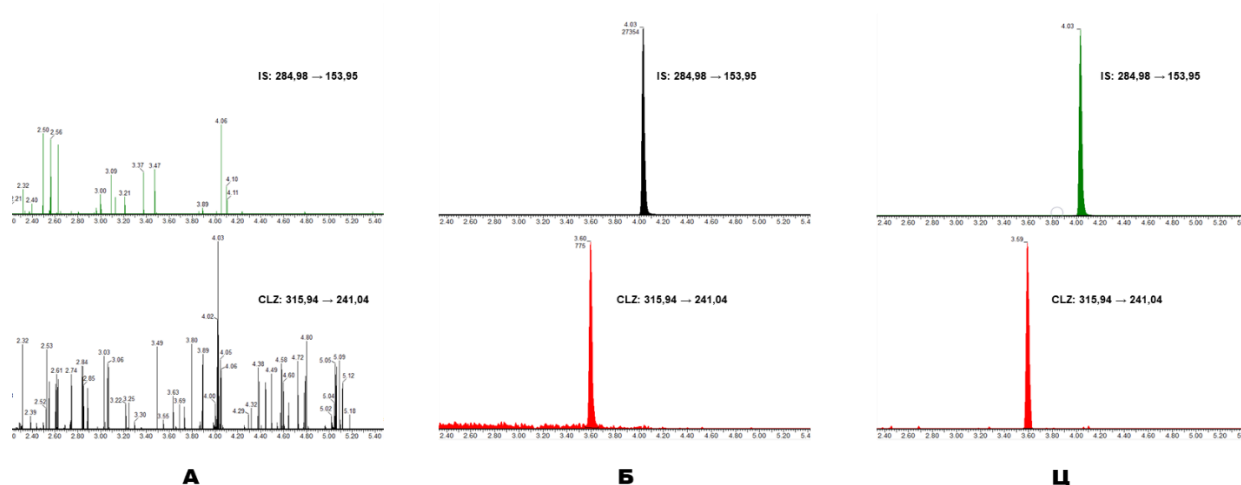
Резултати валидационих параметара аналитичке методе за одређивање клоназепама у узорцима плазме и хомогената ткива мозга пацова

Селективност, линеарност и лимит квантификације

Репрезентативни хроматограми *Blank*, LOQ и узорака плазме и хомогената ткива мозга приказани су на Сликама 21 и 22. Ретенциона времена добијена анализирањем раствора аналитичких стандарда супстанци и узорака износила су 3,60 минута за клоназепам и 4,03 минута за ИС. Анализирањем *Blank* узорака плазме и хомогената ткива мозга није утврђено присуство интерференција на ретенционим временима клоназепама и ИС.



Слика 21. Хроматограми добијени анализирањем плазме експерименталних животиња: *Blank* (А), лимит квантификације (LOQ) (Б), плазма пацова третираног клоназепамом (Ц)



Слика 22. Хроматограми добијени анализирањем хомогената ткива експерименталних животиња: *Blank* (А), лимит квантификације (LOQ) (Б), плазма пацова третираног клоназепамом (Ц)

Анализирањем калибрационих узорака метода је показала линеарност у тестираном распону концентрација, а добијене једначине калибрационих кривих и коефицијенти корелације приказани су у Табелама 29 и 30.

Табела 29. Параметри калибрационе криве за одређивање концентрације клоназепама у плазми пацова

Опсег мерења	Једначина калибрационе криве	Коефицијент корелације
0,005-0,25 mg/L	$y = 1,2122x + 0,0006$	0,999

Табела 30. Параметри калибрационе криве за одређивање концентрације клоназепама у хомогенату ткива мозга пацова

Опсег мерења	Једначина калибрационе криве	Коефицијент корелације
0,001-0,10 mg/L	$y = 1,0204x - 0,0038$	0,999

Тестирањем оптерећених узорака за лимите квантификације методе за одређивање концентрације клоназепама у плазми и хомогенатима ткива мозга задовољени су критеријуми валидације предвиђени водичем. Лимит квантификације за одређивање клоназепама у плазми (LOQ_{p-k}) износио је 0,005 mg/L, а лимит квантификације за одређивање концентрације клоназепама у хомогенатима ткива мозга (LOQ_{b-k}) износио је 0,001 mg/L.

Тачност и прецизност

Параметри тачности и прецизности методе, добијени анализирањем QC узорака, задовољили су све валидационе критеријуме а резултати приказани су у Табелама 31 и 32.

Табела 31. Тачност и прецизност унутар и између аналитичких секвенци методе за одређивање клоназепама у плазми пацова

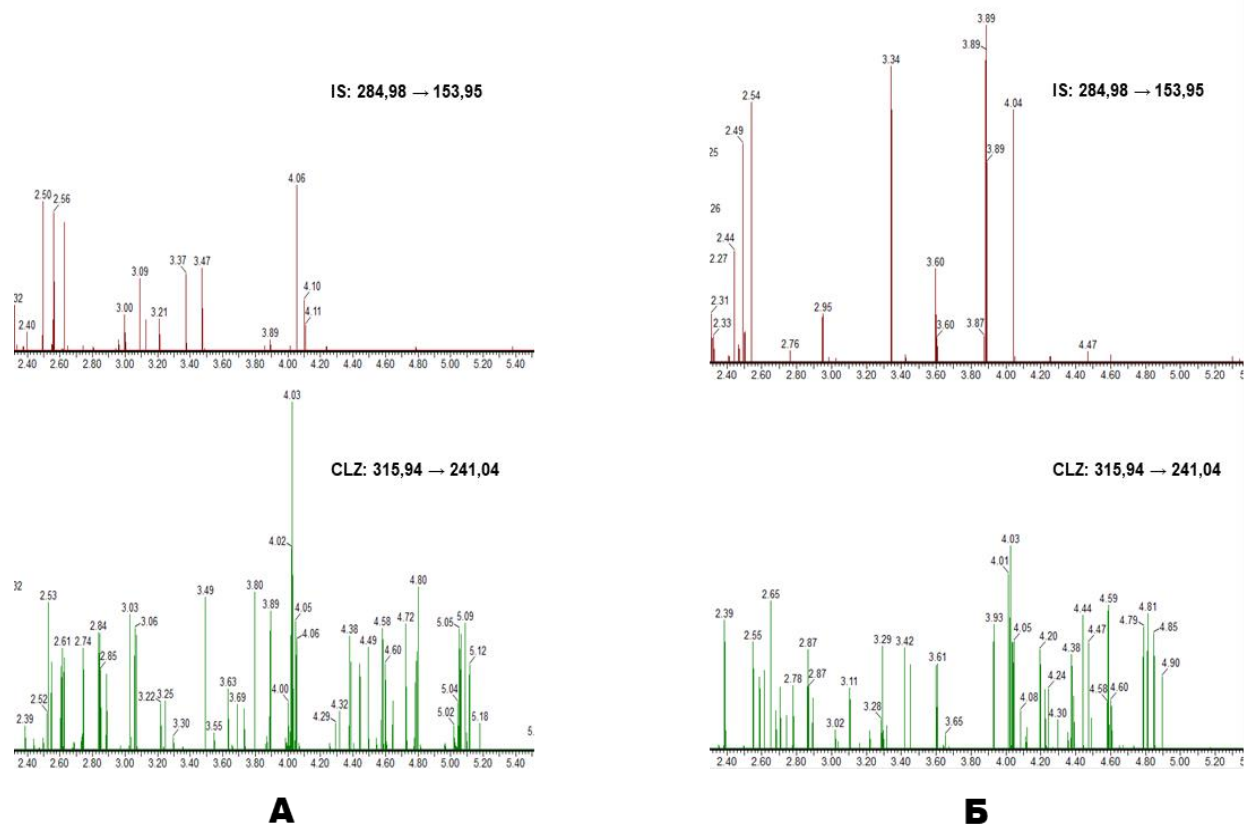
QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)		Прецизност (% RSD)	
	Унутар секвенце	Између секвенци	Унутар секвенце	Између секвенци
-				
LOQ _{p-k} (0,005 mg/L)	107,3	106,1	11,4	12,1
QC _{low(p-k)} (0,02 mg/L)	105,3	106,9	8,8	9,2
QC _{high(p-k)} (0,20 mg/L)	99,8	101,57	3,2	3,7

Табела 32. Тачност и прецизност унутар и између аналитичких секвенци методе за одређивање клоназепама у хомогенату ткива мозга пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)		Прецизност (% RSD)	
	Унутар секвенце	Између секвенци	Унутар секвенце	Између секвенци
-				
LOQ _{b-k} (0,001 mg/L)	111,3	112,1	14,8	13,9
QC _{low(b-k)} (0,002 mg/L)	109,4	110,2	10,7	9,9
QC _{high(b-k)} (0,02 mg/L)	104,8	106,1	6,6	7,1

Утицај претходно инјектованог узорка (*carry over*)

Анализирањем *Blank* узорка плазме и хомогената ткива мозга, након калибрационих узорака са највишом концентрацијом клоназепама показано је да није било значајног *carry over* ефеката на ретенционим временима клоназепама и ИС (Слика 23).



Слика 23. Хроматограми добијени анализирањем *Blank* узорака инјектованих након узорака плазме (А) и хомогената ткива мозга (Б) са највишом концентрацијом клоназепама

Испитивање утицаја матрикса

Анализирањем QC узорака плазме и хомогената ткива мозга показано је да није било значајног утицаја матрикса на јонизацију анализата под дефинисаним условима методе (Табеле 33 и 34).

Табела 33. Параметри испитивања утицаја матрикса у методи за одређивање клоназепаме у плазми пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)	
	X _{sr}	% RSD
QC _{low(p-k)} (0,02 mg/L)	87,5	3,8
QC _{high(p-k)} (0,20 mg/L)	86,4	1,2

Табела 34. Параметри испитивања утицаја матрикса у методи за одређивање клоназепаме у хомогенату ткива мозга пацова

QC узорак (mg/L)	Тачност (Recovery %)	
	X _{sr}	% RSD
QC _{low(b-k)} (0,002 mg/L)	89,6	4,5
QC _{high(b-k)} (0,02 mg/L)	86,8	1,4

Стабилност раствора и узорака

Резултати добијени испитивањем стабилности узорака (краткорочна, дугорочна, аутосемплер, циклуси замрзавање-одмрзавање) показали су да су узорци плазме и хомогената ткива мозга, у којима се одређује концентрација клоназепам, стабилни под наведеним условима и погодни за анализу ако се чувају на -20 °C у периоду од месец дана (Табеле 35 и 36).

Табела 35. Стабилност узорака плазме за одређивање концентрације клоназепам

	Краткорочна стабилност	Стабилност у аутосемплеру	Стабилност замрзавање/одмрзавање	Дугорочна стабилност
Разлика добијене од номиналне концентрације (%)	2,0 %	1,4	1,7 %	3,1 %

Табела 36. Стабилност узорака хомогената ткива мозга за одређивање концентрације клоназепам

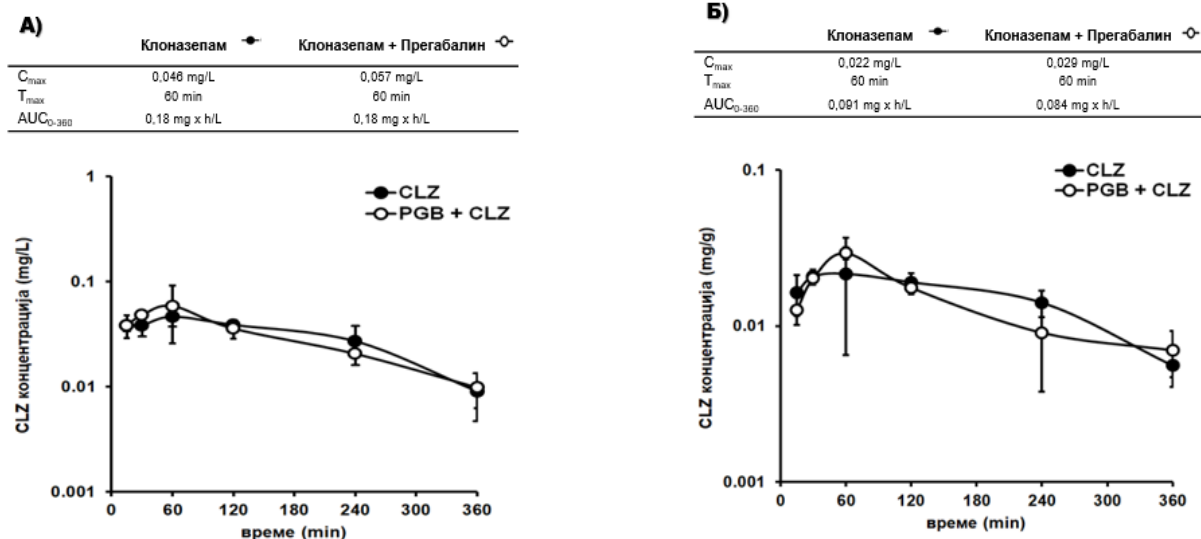
	Краткорочна стабилност	Стабилност у аутосемплеру	Стабилност замрзавање/одмрзавање	Дугорочна стабилност
Разлика добијене од номиналне концентрације (%)	1,8 %	1,2	1,4 %	2,9 %

Основни и радни раствори клоназепам и диазепам су стабилни најмање два месеца ако се чувају у фрижидеру на температури 4-8 °C.

У циљу испитивања постојања фармакокинетичких интеракција прегабалина и клоназепам, валидоване аналитичке методе су примењене за одређивање концентрације наведених лекова у плазми и ткиву мозга пацова након појединачне и комбиноване примене на експерименталним животињама.

Фармакокинетика клоназепама након појединачне и комбиноване примене са прегабалином

На Слици 24 приказани су фармакокинетички профили клоназепама у плазми и ткиву мозга пацова након пероралне, појединачне и комбиноване, примене са прегабалином. Клоназепам је примењен у дози од 4 mg/kg у обе групе, а прегабалин је примењен у дози од 20 mg/kg.

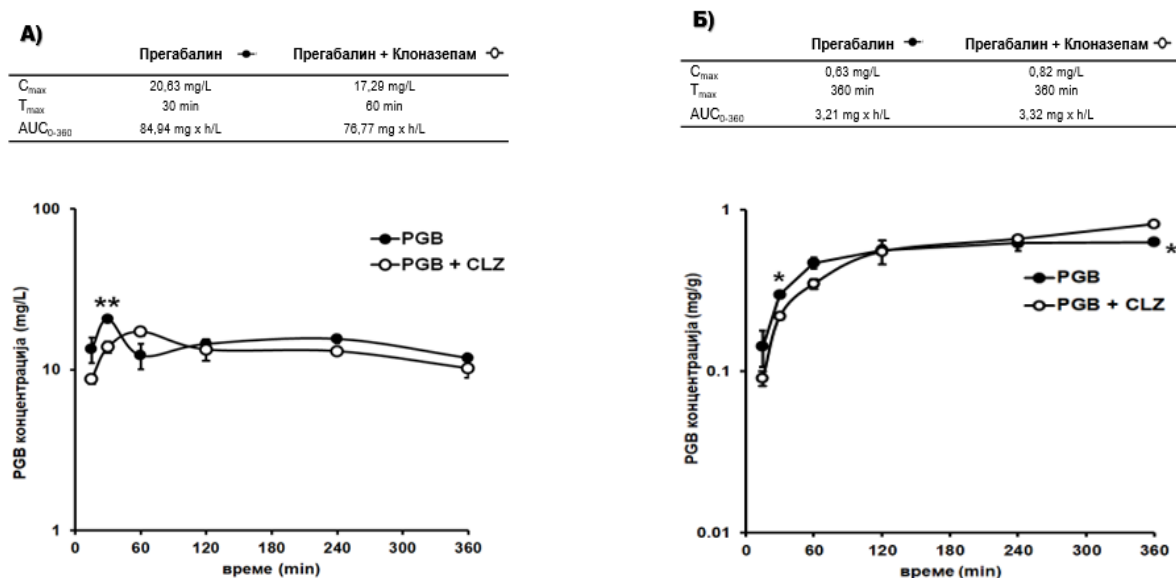


Слика 24. Фармакокинетички профили клоназепама (перорална примена) у плазми (А) и мозгу (Б) пацова након појединачне и комбиноване примене са прегабалином. C_{\max} - максимална концентрација лека у плазми или мозгу; T_{\max} - време постизања максималне концентрације лека у плазми или мозгу; AUC_{0-360} – површина испод криве концентрација-време од нултог времена до последње временске тачке.

Вредности концентрације клоназепама у плазми и мозгу се нису значајно разликовале ни у једној временској тачки након појединачне и комбиноване примене (све $p \geq 0,082$ у плазми и све $p \geq 0,067$ у мозгу). Добијени резултати указују да се фармакокинетички профили клоназепама, у плазми и мозгу пацова, нису разликовали приликом појединачне и комбиноване примене лекова и да комбинована примена са прегабалином није имала утицаја на фармакокинетичку клоназепама.

Фармакокинетика прегабалина након појединачне и комбиноване примене са клоназепамом

На Слици 25 приказани су фармакокинетички профили прегабалина у плазми и ткиву мозга пацова након пероралне, појединачне и комбиноване, примене са клоназепамом. Прегабалин је примењен у дози од 20 mg/kg у обе групе, а клоназепам је примењен у дози од 4 mg/kg.



Слика 25. Фармакокинетички профили прегабалина (перорална примена) у плазми (А) и мозгу (Б) пацова након појединачне и комбиноване примене са клоназепамом. C_{\max} - максимална концентрација лека у плазми или мозгу; T_{\max} - време постизања максималне концентрације лека у плазми или мозгу; AUC_{0-360} – површина испод криве концентрација-време од нултог времена до последње временске тачке. Статистичка значајност је утврђена употребом Студентовог t -теста (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Статистичка значајност у разлици концентрација је добијена у другој временској тачки фармакокинетичког профила прегабалина у плазми (30 min, $p = 0,009$) као и у другој (30 min, $p = 0,011$) и последњој временској тачки фармакокинетичког профила у мозгу пацова (360 min, $p = 0,013$). Анализирањем добијених фармакокинетичких параметара показано је да је истовремена примена клоназепамом одложила време потребно за постизање максималне концентрације прегабалина (након појединачне примене прегабалина $T_{\max} = 30$ min; након комбиноване примене $T_{\max} = 60$ min), без израженијег утицаја на параметар који описује укупну изложеност леку као што је AUC_{0-360} .

ДИСКУСИЈА

Неадекватна употреба лекова и акутна тровања лековима и супстанцама представљају значајан здравствено-социјални проблем и оптерећење за здравствени систем. Методологије за процену учесталости злоупотребе илегалних супстанци, које се најчешће користе у циљу уживања (нпр. хероин, кокаин, амфетамини и др) су добро установљене, а механизми и законски оквири који регулишу њихово поседовање, производњу и употребу су веома јасни. Са друге стране, неадекватна (проблематична или немедицинска) употреба лекова, чија је примена веома заступљена у фармакотерапијској пракси, представља проблем који је много теже дефинисати. До данас, још увек нису стандардизоване методологије којим би се квантификовала присутност неадекватне употребе лекова у одређеној популацији. Терминологија која се користи да опише различите категорије неадекватне употребе лекова није конзистентна и у доступној литератури се често могу наћи иста објашњења за сродне, али суштински различите појмове као што су злоупотреба (енгл. *Abuse*) и погрешна употреба лекова (енгл. *Misuse*). Такође, законска регулатива која се односи на механизме контроле, употребу, режим издавања и прописивања лекова који поседују потенцијал за злоупотребу, варира између различитих земаља.

У овој дисертацији, анализирани су претклинички и клинички аспекти токсичности прегабалина, психоактивног лека који са габапентином и мирогабалином чини групу лекова који се називају габапентиноиди. У иницијалном периоду терапијске употребе габапентиноида нису постојали јасни докази о њиховој злоупотреби. Међутим, последњих година је све више извештаја о неадекватној употреби и акутним тровањима прегабалином и габапентином, и овај феномен постаје глобални проблем (84,85). У Републици Србији, дозволу за употребу у фармакотерапијској пракси имају прегабалин и габапентин, као лекови који се издају на рецепт.

У првом делу истраживања, које је споредено као ретроспективна опсервациона студија пресека, анализирана је учесталост акутних тровања габапентиноидима у Републици Србији. Анализирана је и динамика потрошње прегабалина и габапентина у десетогодишњем периоду (2012-2021. година) за који су били доступни комплетни подаци Агенције за лекове и медицинска средства Србије. Центар за контролу тровања ВМА је референтна установа у Републици Србији у којој се спроводе мере дијагностике и лечења пацијената са акутним тровањем лековима и супстанцама. У свакодневном раду, примећен је нагли пораст броја пацијената у ЦКТ ВМА код којих је прегабалин био главни или један од узрочника тровања. Ретроспективном анализом података ЦКТ ВМА установљено је да је у периоду између јануара 2012. и октобра 2022. године, било укупно 374 случајева тровања лековима из групе габапентиноида, при чему је у највећем проценту разлог пријема на лечење у ЦКТ ВМА био у вези са употребом прегабалина. У спроведеном истраживању, утврђене су главне социо-демографске карактеристике популације пацијената и анализирани су намере и начини употребе прегабалина у свим случајевима тровања. Прегабалин је релативно нови лек који је уведен у клиничку праксу пре око 20 година, те су литературни подаци у којима је анализирана његова токсичност ограничени. Како је један од постављених циљева истраживања утврђивање степена тежине тровања прегабалином, анализирани су главне клиничке манифестације тровања пацијената са изолованим тровањем овим леком и код пацијената са коингестијом других лекова и супстанци.

Други део истраживања спроведен је као експериментална студија, у циљу испитивања потенцијалних интеракција прегабалина и клоназемама приликом акутне пероралне примене у пацова. Ова два лека изабрана су на основу резултата из првог дела истраживања, којима је утврђено да је управо ова комбинација била најзаступљенија у свим случајевима тровања, посебно у случајевима у којима је дететкована злоупотреба.

Потрошња, инциденца акутних тровања и случајева злоупотребе и правни статус габапентиноида у Републици Србији

Један од најзначајнијих резултата овог истраживања јесте детекција значајног пораста акутних тровања и злоупотребе прегабалина у Републици Србији. У последњој деценији, све је више публикација које наводе да постоји растући тренд употребе, злоупотребе и предозирања лековима из групе габапентиноида (49,56,84-88). Како би описали забринутост и размере проблема, неки аутори користе термине као што су “нова епидемија” или “нова опиоидна криза” (89,90). Као најчешће објашњење за нагли пораст потрошње и терапијске употребе габапентиноида наводи се њихова *off-label* примена у лечењу различитих болних стања, што је вероватно резултат тежње клиничара да смање употребу опиоидних аналгетика (5).

Резултати добијени анализом годишњих извештаја АЛИМС-а указују да се прегабалин користи значајно више од габапентина у фармакотерапијској пракси у Републици Србији. Између 2012. и 2021. године дошло је до значајног пораста његове потрошње (преко 200 пута), док није било значајних промена у потрошњи габапентина.

Истовремено, у ЦКТ ВМА је дошло до значајног пораста случајева акутних тровања прегабалином. Из резултата који су приказани, види се да је стопа случајева тровања у наведеном десетогодишњем периоду порасла преко 100 пута (са 0,01 случајева тровања / 100 000 становника у 2012. години на 1,14 случајева тровања у 2021. години), док је број случајева злоупотребе детектованих код пацијената лечених у ЦКТ ВМА порастао скоро 40 пута (са 0,01 случајева злоупотребе / 100 000 становника у 2016. години на 0,39 случајева злоупотребе у 2021. години).

Резултати ове студије су у складу са истраживањима из других земаља у којима се наводи јака позитивна корелација растућег тренда потрошње и пораста погрешне употребе, злоупотребе и случајева тровања габапентиноидима. У петогодишњој студији која је спроведена у Аустралији, наводи се да је паралелно са повећањем прописивања прегабалина значајно порастао и број пацијената лечених због погрешне употребе овог лека (са 0,28 случајева/100 000 становника у 2012. години на 3,32 случаја у 2017. години) (91). У још једној аустралијској студији, која се односи на каснији период (2014 - 2019. година), аутори су закључили да су намерна тровања прегабалином у овој земљи у порасту, а да је у значајном проценту детектована злоупотреба прегабалина (88). У бројним студијама спроведеним у другим државама (Ирска, Француска, Финска, Велика Британија, САД, Египат итд), добијени су слични резултати, где је утврђено вишеструко повећање случајева предозирања и злоупотребе лекова из групе габапентиноида (47,84,92,93).

У доступној литератури се феномен злоупотребе чешће везује за употребу прегабалина у односу на габапентин, што је вероватно резултат разлике у фармаколошким карактеристикама ова два лека. Апсорпција прегабалина је скоро комплетна и независна од ингестиране дозе. Додатно, прегабалин има шест пута потентнији и бржи ефекат након оралне примене, што га чини много привлачнијим за злоупотребу у поређењу са габапентином (87).

Ипак, када је у питању инциденца злоупотребе ова два лека постоје одређене географске разлике. Као што је већ наведено, у овом истраживању, највећи удео у случајевима тровања габапентиноидима чинили су случајеви тровања прегабалином (95,5% - 357/374), док је било значајно мање случајева тровања габапентином (4,5% - 17/374). Такође, злоупотреба прегабалина је детектована код 27,8% пацијената из испитиване популације (84/302), док је само 0,7% пацијената злоупотребљавало габапентин (2/302). Литературни подаци указују да је терапијска употреба и злоупотреба прегабалина далеко заступљенија у Европи, док је у САД габапентин једнако, а у неким савезним државама и више коришћен лек (86, 94). Као могуће објашњење наводи се чешће прописивање и већа доступност габапентина као и другачији правни статус од прегабалина у савезним државама САД (95).

Упркос чињеници да је до данас потенцијал за злоупотребу габапентиноида добро препознат, још увек постоје разлике када је у питању правни статус ових лекова у различитим државама. Како је злоупотреба ових лекова постала глобални проблем, велики број држава је законски уредио прописивање и употребу прегабалина од 2015. године, док су неке државе исте мере примениле и за габапентин (96). Прегабалин је у САД на федералном нивоу још 2005. године класификован као контролисана супстанца на Листи 5 (*Schedule V Controlled Substances* - лекови са најмањим потенцијалом за злоупотребу), док габапентин има исти статус само у неким савезним државама и још увек се води дискусија да ли треба увести такве мере на целој територији САД (95). Европској агенцији за праћење дрога и зависности од дрога (*EMCDDA- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) прегабалин је 2009. године први пут пријављен, од стране Финске као чланице ове организације, као нова психоактивна супстанца која се злоупотребљава (НПС). Међутим, прегабалин још није стављен на заједничку листу *EMCDDA*-а, али се прати заједно са другим НПС (64). У Великој Британији, прегабалин и габапентин су рекласификовани као контролисане супстанце у 2019. години и налазе се на листи Ц контролисаних супстанци (енгл. *Schedule C* - најмање штетна група контролисаних лекова) (97). Студија из Саудијске Арабије је показала да је увођење мера ограничења прописивања резултирало смањењем растућег тренда потрошње прегабалина, а аутори наводе да би ефекат оваквих мера могао бити смањење ризика од његове злоупотребе (98).

У Републици Србији, прегабалин и габапентин су лекови који се прописују и издају на лекарски рецепт и не налазе се ни на једној листи која се односи на контролисане психоактивне супстанце (65). Резултати овог истраживања и досадашња сазнања из литературе би могли да послуже регулаторним телима у нашој земљи да размотре тренутну законску регулативу за прописивање и употребу прегабалина.

Главне карактеристике популације пацијената са тровањем прегабалином

Како би се уочиле главне социо-демографске карактеристике испитиване популације пацијената као и разлике у намерама и начину употребе прегабалина, сви случајеви тровања сврстани су у три групе.

Највећи број тровања прегабалином у овој студији чинили су случајеви повезани са суицидом (40,9% - 146/357), при чему су у овој групи жене (70,5%) биле статистички значајно заступљеније од мушкараца (29,5%). Литературни подаци о повезаности употребе антиконвулзивних лекова и повећаним ризиком од суицида су контрадикторни и ова тема је још увек предмет дискусије (99,100). Неки аутори наводе да се терапијска употреба габапентиноидних лекова може довести у везу са повећањем ризика од суицида (101), међутим у нашем истраживању није било довољно података да би се детаљније истражила ова веза.

У посматраном периоду, случајеви злоупотребе чинили су скоро једну трећину од свих случајева тровања прегабалином (28,9% - 103/357). Спроведено истраживање је потврдило резултате претходних студија, у којима се наводи да су мушкарци у млађем узрасту најосетљивија популација у ризику од злоупотребе прегабалина (102,88). Из приказаних резултата закључује се да је разлика у дистрибуцији по полу била најизраженија у случајевима злоупотребе прегабалина, где је чак 84,5% пацијента било мушког пола (Слика 9). Када се упореди дистрибуција пацијената по годинама живота у свим групама пацијената, види се да су пацијенти који су злоупотребљавали прегабалин били значајно млађи (медијана: 26 година) у односу на пацијенте у другим групама, чија је просечна старост била преко 40 година живота (Слика 8).

Главни пут уноса приликом злоупотребе прегабалина је ингестија, мада се у литератури наводе и други начини, као што су ушмркавање, интравенско уношење, ректално итд. (59,103). У свим случајевима тровања из ове студије пацијенти су уносили прегабалин оралним путем, док је интраназална употреба забележена код само једног пацијента (узраст: 28 година), који је ушмркао садржај 20 капсула прегабалина од 50 mg, у циљу постизања узбуђења и побољшања сексуалног живота. У досадашњој литератури може се наћи свега неколико приказа случајева у којима се описује употреба прегабалина у наведене сврхе (104-106). Занимљиво је да терапијска примена оба лека из групе габапентиноида као нежељени ефекат може имати смањење либида и сексуалне функције (107,108). Међутим, еуфорични ефекат који се постиже ингестијом већих доза лека вероватно је разлог злоупотребе прегабалина у наведеним случајевима.

Карактеристике акутних тровања и злоупотребе прегабалина су такве, да су чешћа комбинована тровања, када се прегабалин углавном користи у супратерапијским дозама са другим психоактивним супстанцама (најчешће опиоидима, бензодиазепинима и етанолом) у циљу потенцирања њиховог ефекта (84,88,91). У овом истраживању смо добили исте резултате, иако је истовремена употреба нелегалних супстанци као што су хероин, амфетамини, канабис и друге, потврђена у релативно малом броју случајева (Табела 8).

Ово се може објаснити чињеницом да се аналитичка потврда прегабалина у ЦКТ ВМА ради на захтев лекара-токсиколога, када процени да је податак о концентрацији лека клинички значајан. Иако је овакав начин рада оправдан, имајући у виду значајне материјалне ресурсе који би захтевали укључивање анализе прегабалина у токсиколошки скрининг, постоји ризик од потцењивања учесталости акутних тровања и злоупотребе прегабалина. Резултати истраживања аутора из Енглеске показали су да би број смртних случајева, у којима је доказано присуство прегабалина у биолошким узорцима преминулих, био потцењен за око 50% када прегабалин није био укључен у процедуру токсиколошког скрининга (109). Слични резултати добијени су у лабораторији из Кентакија (САД), и показали су да је број случајева смрти повезаних са габапентином порастао, са 2,9% у 2013. години на 17% у 2014. години, када је габапентин постао део рутинске процедуре скрининга (110).

Поређењем ингестираних доза међу групама, показано је да су у испитиваној популацији коришћене статистички значајно више дозе у случајевима повезаним са суицидом и случајевима злоупотребе прегабалина. У свим случајевима тровања, коингестија других лекова и супстанци била је учесталија од изолованог тровања прегабалином (Табела 7). Бензодиазепини су најчешћа група лекова која је ингестирана заједно са прегабалином, али су постојале разлике у учесталости одређених лекова из ове групе. Најчешће коингестирани лек је био клоназепам у свим случајевима, мада је његова комбинација са прегабалином била најфреквентнија у случајевима злоупотребе (Табела 8). Један од могућих разлога за овако честу комбинацију ова два лека су сличне карактеристике клоназепамима и прегабалина које их чине атрактивним за злоупотребу. Клоназепам је лек који, као и прегабалин, изазива еуфоричне ефекте већ при терапијским дозама, који се интензивирају при узимању већих доза лека. Клоназепам одликују висока потентност и дуже трајање ефеката у односу на неке друге бензодиазепине. Додатно, клоназепам се поред бројних одобрених индикација, као и прегабалин, све више користи у лечењу различитих поремећаја за које није инцијално одобрен (терапија различитих болних стања, поремећаја спавања, лечење симптома обуставе примене других бензодиазепина) (67).

Имајући у виду да је прегабалин у Републици Србији одобрен у терапији епилепсије, хроничног бола и генерализованих аксиозних поремећаја, логични су резултати који су добијени анализирањем учесталости коингестираних лекова код групе пацијената са погрешном употребом лека. Најчешће коингестиране групе лекова након бензодиазепина су били антиконвулзиви и антидепресиви, док је средња доза прегабалина коришћена у овој групи пацијената (медијана: 237 mg) била статистички значајно нижа у односу на остале групе (медијана: 600 mg). У групи случајева повезаних са суицидом, антипсихотици и антидепресиви били су најчешће коингестиране групе лекова, након бензодиазепина (Табела 7).

У свим случајевима тровања забележен је забрињавајуће висок проценат претходне историје проблематичне употребе лекова и супстанци (40,8%) (Табела 6). Бројне су публикације које наводе да је неопходан опрез при прописивању прегабалина у терапији ових пацијената, због већег ризика од злоупотребе и уопште неадекватне употребе лекова и супстанци (56,111,112).

У већини случајева злоупотребе, у отпускним листама нису наведени извори из којих су пацијенти набављали лек. У свега неколико случајева пацијенти су пријавили да су купили прегабалин на илегалном тзв. црном тржишту, што је у складу са подацима из литературе и потврђује да је ова појава присутна и у Републици Србији (59,113).

Важно је напоменути да је у студији, која се односи на државе Средњег истока и Северне Африке (*MENA-Middle East and North African countries*) већина случајева злоупотребе габапентиноида била повезана са употребом прегабалина (114). Скоро 20% пацијената у нашем истраживању је припадало мигрантској популацији (Табела 6), који су углавном долазили из *MENA* региона и код свих је забележена употреба прегабалина. У овој подгрупи пацијената код 87,8% (48/55) детектована је злоупотреба, док се код 12,7% (7/55) пацијената радило о погрешној употреби лека. Просечна старост пацијената из мигрантске популације износила је 25 година живота. Коингестија других лекова у мигрантској популацији била је присутна у веома високом проценту, а најчешће коингестиран лек био је клоназепам. Као што је наведено, ова комбинација је била најзаступљенија у свим случајевима тровања у овом истраживању, посебно у случајевима злоупотребе, али је коингестија клоназепам била најфреквентнија код миграната који су злоупотребљавали прегабалин. Интересантно, у истраживању француских аутора су добијени идентични резултати. У овом истраживању већину пацијената, који су злоупотребљавали прегабалин, чинили су адолесценти (просечна старост: 15 година) који су живели у мигрантским смештајима (81%). Код две трећине пацијената (66%) из ове студије радило се о комбинованом тровању, при чему су са прегабалином најчешће коингестирани бензодиазепини, а најчешће коришћени лек из ове групе био је клоназепам (61).

Клиничке карактеристике пацијената са тровањем прегабалином

Како би се утврдио степен тежине тровања тј. у којој мери је прегабалин утицао на клиничко стање пацијената са акутним тровањем, сви случајеви приказани у овом истраживању сврстани су у две групе: група пацијената са изолованим тровањем прегабалином и група пацијената са комбинованим тровањем тј. коингестијом других лекова и супстанци.

Посматрајући све случајеве тровања, лечење пацијената је у већини завршено након збрињавања у амбуланти (64,4% - 230/357), док су у око трећини случајева (35,6% - 127/357) пацијенти хоспитализовани у Клиници за ургентну и клиничку токсикологију ЦКТ ВМА на даље лечење. Из приказаних резултата је утврђено да су пацијенти са коингестијом других лекова и супстанци, били хоспитализовани у клиници чешће у односу на пацијенте са изолованим тровањем прегабалином (Табела 9).

На пријему у ЦКТ ВМА, стање свести нивоа коме забележено је у 25,5 % свих случајева тровања, али у само четири случаја са изолованим тровањем прегабалином. У сажетку карактеристика лека, брадикардија се наводи као могућа али ретка нежељена реакција терапијске примене прегабалина. Такође, у литератури су описани случајеви тровања у којима су регистровани и други кардиолошки поремећаји као резултат предозирања овим леком (115-117).

У спроведеном истраживању, брадикардија је забележена у 9 случајева тровања, али је код већине пацијената потврђена коингестија лекова који су могли допринети смањењу срчане фреквенце (нпр. бета блокатори, опиоиди, високе дозе антидепресеива). У једном случају, код пацијента (старост: 31 година) без историје кардиоваскуларних обољења, забележена је синусна брадикардија након ингестије 750 mg прегабалина. Пацијент је у прописаној терапији имао прегабалин, али је на дан пријема узео дозу која је виша од оне коју је прописао лекар.

У доступној литератури, у којој је анализирана токсичност прегабалина, могу се пронаћи подаци да су конвулзивни напади приликом акутног тровања овим леком ретки, али могући (53, 88). Иако је у овој студији појава конвулзија забележена у два случаја тровања, ни у једном од њих нису могле бити повезане са токсичним ефектима прегабалина, због придружених болести и стања пацијената. Генерално гледајући, изолована ингестија прегабалина није узроковала тешка тровања. Анализом ингестиране дозе у случајевима са изолованим тровањем прегабалином утврђено је да су хоспитализовани пацијенти, пријавили статистички значајно веће дозе лека (медијана: 3000 mg) у односу на пацијенте чије је лечење завршено у амбуланти ЦКТ ВМА (медијана: 500 mg). Прегледом досадашње литературе, у само једној публикацији је испитивана корелација ингестиране дозе и ПСС скором при изолованој употреби прегабалина, а резултати који су наведени су у складу са резултатима који су добијени у приказаном истраживању (46). Иако је поређењем средњих вредности ингестираних доза код пацијената са различитим ПСС скором примећена интер-индивидуална варијабилност, добијена је статистички значајна разлика унете количине лека у различитим ПСС групама ($p < 0,05$) (Табела 10). Спирмановом корелационом анализом потврђена је статистички значајна позитивна корелација ингестиране дозе лека са ПСС скором ($r = 0,578$, $p < 0,01$) и дужином трајања хоспитализације ($r = 0,574$, $p < 0,01$) (Табела 11).

Из добијених резултата се види да је коингестија других лекова и супстанци била забележена чешће код пацијената са тежом клиничком сликом тровања. У случајевима комбинованих тровања, утврђене су статистички значајно веће дозе прегабалина код пацијената који су на пријему у ЦКТ ВМА били у коматозном стању као и код пацијената код којих је на пријему забележена брадикардија и хипотензија. Додатно, статистички значајно веће дозе пријављиване су код пацијената код којих је дошло до развоја пнеумоније током лечења, као и код пацијената који су захтевали агресивније методе лечења у смислу примене вазопресора, интубације и механичке вентилације (Табела 12). И у овој групи пацијената је примећена значајна интер-индивидуална варијабилност ингестираних доза прегабалина у различитим ПСС групама. Ипак, поређењем средњих вредности пријављених доза лека у свим ПСС групама, добијена је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 13). Коришћењем Спирмановог теста добијена је јака позитивна корелација ингестиране дозе прегабалина са ПСС скором ($r = 0,601$, $p < 0,01$) и дужином трајања хоспитализације ($r = 0,563$, $p < 0,01$) (Табела 16). На први поглед, могло би се закључити да и у случајевима тровања са коингестијом других лекова и супстанци постоји дозно-зависни ефекат прегабалина, међутим за овакву тврдњу су потребни строжији методолошки критеријуми.

Терапијски опсег концентрација код пацијената на терапији прегабалином износи 2-8 mg/L, док су вредности нешто више (14,2 mg/L) код пацијената који узимају максималну дневну дозу прегабалина (600 mg) (118). До сада је објављено неколико приказа случајева пацијената са акутним тровањем прегабалином, где су пријављене високе концентрације лека које су се кретале максимално до 66,5 mg/L (53, 54, 119). Према досадашњој објављеној литератури, у спроведеном истраживању доказана је највиша концентрација прегабалина (76,16 mg/L) измерена на пријему, код пацијенткиње која је ингестирала непознату дозу прегабалина. У случајевима ингестије екстремно високих доза и високих концентрација прегабалина, у неколико приказа случајева наведено је да се за лечење пацијената могу размотрити екстракорпоралне мере елиминације лека, због повољних фармакокинетичких особина прегабалина за ову врсту лечења. Међутим, према смерницама радне групе за употребу екстракорпоралних мера у акутним тровањима (енгл. *EXtracorporeal TReatments In Poisoning workgroup - EXTRIP*), у случајевима интоксикације прегабалином и габапентином, овај вид лечења се не препоручује (120). У претходно описаном случају тровања из ове студије, пацијенткиња се потпуно опоравила само применом супортивне терапије и након шест дана је отпуштена из ЦКТ ВМА на даље лечење код психијатра. У већини случајева тровања из спроведене студије, пацијенти су лечени неспецифичном детоксикационом терапијом инфузионим растворима уз примену осталих мера симптоматског лечења (терапија антибиотицима, антикоагулансима, инхибиторима протонске пумпе итд). Код свих пацијената чије је лечење захтевало примену интубације и механичке вентилације је поред прегабалина забележена коингестија лекова и супстанци из групе бензодиазепина и/или опиоида. У 2019. години, Америчка агенција за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration - FDA*) издала је упозорење да употреба габапениноидних лекова, нарочито у комбинацији са депресорима ЦНС-а или код пацијената са нарушеном функцијом плућа, може узроковати тешке респираторне поремећаје чак и у случајевима примене терапијских доза (121).

Лабораторијско одређивање концентрације узрочника тровања је корисно у постављању дијагнозе када подаци о врсти и количини унетог лека/супстанце нису познати. У досадашњим литературним подацима може се пронаћи неколико приказа случајева у којима је анализирана концентрација прегабалина, али до сада још нису објављена истраживања са већим бројем пацијената. У овој студији ингестија прегабалина је аналитички потврђена у 104 случаја тровања. Међутим, податак о концентрацији лека познат је у само 7 случајева са изолованим тровањем прегабалином, због чега у овој групи пацијената није урађена статистичка анализа повезаности концентрације са осталим факторима тровања. Поређењем средњих вредности концентрација у односу на различите факторе тровања у комбинованим тровањима, статистички значајно више концентрације су добијене код хоспитализованих пацијената и код оних чије је лечење захтевало примену интубације и механичке вентилације (Табела 14). Разлика у концентрацијама прегабалина, добијена поређењем средњих вредности у различитим ПСС групама, била је на граници статистичког значаја ($p= 0,058$) (Табела 15). Коришћењем Спирмановог теста добијена је слаба, али статистички значајна корелација концентрације прегабалина и ПСС скорa ($r= 0,215$, $p< 0,05$) (Табела 16).

Испитивањем повезаности времена које је протекло од ингестије и концентрације прегабалина нису добијене статистички значајне вредности али је корелација била негативна. Претходно наведени резултати указују да би при интерпретацији концентрације прегабалина код акутно отрованих пацијената, требало узети у обзир време протекло од ингестије као и релативно кратко полувреме елиминације прегабалина, које просечно износи око 6 сати.

И коначно, иако је информација о ингестираној дози лека релативно непоуздан податак који се добија из анамнестичких и хетероанамнестичких података, у овом истраживању је ингестирана доза показала већи степен корелације са различитим факторима тровања у односу на концентрацију прегабалина која је одређена на пријему на лечење. Као што је наведено, овакав резултат би се могао објаснити на неколико начина: релативно кратко полувреме елиминације прегабалина, различито време које је протекло од ингестије до тренутка пријема на лечење у ЦКТ ВМА, интер-индивидуална варијабилност у смислу великог распона доза и концентрација код пацијената са различитим степеном тежине тровања.

Предности и ограничења ретроспективне опсервационе студије

Коришћење два извора података (подаци Агенције за лекове и медицинска средства Србије и подаци Центра за контролу тровања ВМА) је значајно допринело квалитету спроведене студије и закључцима који су проистекли из добијених резултата. Резултатима ове студије приказана је заступљеност прегабалина и габапентина у фармакотерапијској пракси у Републици Србији, али нам подаци о индикацијама у којима су ови лекови били коришћени нису били доступни. У овој студији детаљније је испитана улога прегабалина у случајевима акутног тровања у Републици Србији.

Постоји неколико ограничења, а главно је ретроспективни дизајн студије који сам по себи носи потенцијал за грешке приликом уношења и обраде података. Међутим, податке које смо анализирали су, и пре почетка студије, документовали лекари – токсиколози са дугогодишњим искуством. За потребе овог истраживања, сви подаци везани за случајеве тровања габапентиноидним лековима су поново прегледани од стране лекара специјалисте клиничке токсикологије.

Као што је већ наведено, постоји могућност да је реалан број случајева тровања и злоупотребе прегабалина у овом истраживању потцењен из више разлога. Аналитичка потврда тровања је урађена у око 30% случајева из ове студије. Пацијенти са акутним тровањем се лече и у другим здравственим центрима, али треба имати у виду да је ЦКТ ВМА референтна установа у Републици Србији у којој се лечи највећи број пацијената са акутним тровањем лековима и супстанцама и добијени резултати могу да прикажу реалну слику стања. До сада је публикован само један рад из Србије, који се односи на одређивање концентрација прегабалина у коме су приказана два случаја тровања са леталним исходом (122). Подаци о учесталости прегабалина у смртним случајевима за Републику Србију још увек нису познати.

Експериментално испитивање интеракција прегабалина и клоназепам

Интеракције су најчешћи узрок нежељених дејстава лекова који се примењују као део политерапије, али у случајевима када су оне познате могу се искористити и довести до потпуно супротног ефекта - редуковање нежељених дејстава и повећање клиничке ефикасности лекова (1). Како акутна тровања најчешће подразумевају употребу више од једног лека/супстанце, што је потврђено и резултатима из првог дела овог истраживања, интеракције су у овим случајевима могуће и очекиване. Главни нежељени ефекат примене габапентиноида је последица депресивног деловања на ЦНС, а истовремена употреба других лекова и супстанци, са сличним дејством, води потенцирању ових ефеката. До сада је у литератури испитивано неколико случајева интеракција прегабалина, како у клиничким тако и у експерименталним студијама на животињама. Описани су ефекти истовремене примене прегабалина са морфином, оксикодоном, лоразепамом, етанолом, и другим депресорима ЦНС-а (17,124-126).

У експерименталном делу ове дисертације испитиване су потенцијалне фармакодинамске и фармакокинетичке интеракције прегабалина и клоназепам приликом акутне примене наведених лекова на пацовима. У бихејвиоралним тестовима је испитиван утицај појединачне и комбиноване примене прегабалина и клоназепам на интензитет седативних и атаксичних ефеката код пацова, коришћењем СЛА и ротарод теста. Из добијених резултата је показано да појединачна примена растућих доза клоназепам и прегабалина доводи до статистички значајног, дозно-зависног седативног ефекта код експерименталних животиња у СЛА тесту (Слика 12). Слични резултати су добијени и у ротарод тесту, у којем је коришћен исти распон доза као и у испитивању СЛА, и утврђено је да прегабалин има статистички значајно већи атаксични ефекат при повећању дозе лека. Утицај повећања дозе клоназепам на укупно време проведено на ротароду је био мање изражен, али је свакако уочен дозно зависни ефекат примењеног третмана (Слика 15). Из резултата ротарод и СЛА тестова у којима је испитивана комбинована примена фиксне неефикасне дозе прегабалина са растућим дозама клоназепам, које су коришћене и при појединачној примени, показано је да прегабалин у значајној мери доводи до потенцирања седативних и атаксичних ефеката клоназепам (Слике 13 и 16). Додатно, у овим експериментима је испитиван и антидотски потенцијал флумазенила приликом појединачне примене клоназепам и његове комбинације са прегабалином. Имајући у виду механизме антидотског деловања флумазенила добијени су очекивани резултати (127). Примена неефикасне дозе прегабалина, која је потенцирала ефекте клоназепам како је претходно описано, није довела до смањења антидотске ефикасности флумазенила у ротарод и СЛА тесту (Слике 14 и 17). Резултати добијени у бихејвиоралним експериментима су клинички значајни из аспекта акутних тровања. Прегабалин и клоназепам су лекови, као што је до сада наведено, који су веома заступљени у случајевима злоупотребе и предозирања, како појединачно тако и у комбинацији. Добитим резултатима је показано да минимална доза прегабалина у значајној мери потенцира токсичне ефекте клоназепам. Наведени ефекти су ефикасно анатагонизовани истим дозама флумазенила како при појединачној примени клоназепам тако и у комбинованој примени са прегабалином.

У истраживању су испитиване и фармакокинетичке интеракције ова два лека, применом доза које су коришћене у бихејвиоралним испитивањима. Фармакикинетичке интеракције са другим лековима се не очекују с обзиром да прегабалин минимално подлеже метаболизму. У досадашњој литератури наведено је свега неколико интеракција прегабалина са другим лековима, које се односе на промену у фармакокинезици приликом истовремене примене, а које у већини случајева нису имале клинички значај. У једном од експерименталних испитивања на пацовима, утврђено је да истовремена примена силденафила за 30,2% смањила клиренс прегабалина. Аутори наводе да је овакав ефекат неочекиван и да је вероватно био последица утицаја силденафила на реналне транспортере. Међутим, иако је клиренс прегабалина смањен у значајној мери, није било већег утицаја на концентрације прегабалина у односу на групу код које је примењена појединачна доза лека (25). У клиничкој студији спроведеној на здравим добровољцима, утврђено је да постоје фармакокинетичке интеракције прегабалина и трамадола у фази ресорпције, које су вероватно резултат инхибиторног деловања трамадола на мотилитет црева. У овој студији је наведено да се време ресорпције и постизања максималне концентрације прегабалина, при истовременој примени са трамадолом, може значајно продужити, али су остали фармакокинетички параметри показали да није било значајног утицаја на укупну ресорпцију прегабалина и да наведена интеракција није клинички значајна (24).

У експериментима који су спроведени у циљу испитивања фармакокинетичких интеракција добијени су слични резултати. При истовременој примени клоназепаме и прегабалина, време постизања максималне концентрације клоназепаме остало је исто, док је у случају прегабалина дошло до повећања овог параметра (са 30 минута при појединачној примени на 60 минута при комбинованој примени лекова). Међутим, ни у случају прегабалина нити клоназепаме, није било израженог утицаја на фармакокинетичке параметре који дефинишу биорасположивост примењене дозе лека, као што су максимална концентрација и површина испод криве концентрација-време (Слике 24 и 26).

За одређивање концентрације наведених лекова у узорцима плазме и хомогенатима ткива мозга пацова валидоване су и коришћене методе са брзим и једноставним начином припреме узорка које су задовољиле све критеријуме предвиђене водичем за валидацију биоаналитичких метода. Наведене методе се могу користити и за одређивање концентрације прегабалина и клоназепаме и у хуманим узорцима, што има вишеструки значај. Из аспекта терапијског мониторинга лекова, који се најчешће примењује код пацијената који се лече од епилепсије, концентрација лека представља важан податак. Наведене методе се могу користити и за аналитичку потврду наведених лекова како у случајевима акутних тровања тако и у случајевима предозирања са леталним исходом што се, између осталог и овим истраживањем, показало као значајна помоћ лекарима у постављању дијагнозе и користан алат за утврђивање учесталости појављивања лекова у случајевима тровања.

ЗАКЉУЧЦИ

1. Инциденца акутних тровања прегабалином у ЦКТ ВМА је значајно порасла у току периода студије, а злоупотреба је детектована у значајном проценту свих случајева.
2. У већини случајева тровања у којима је детектована злоупотреба прегабалина, пацијенти су били мушког пола и млађег животног доба, а значајан број пацијената припадао је мигрантској популацији.
3. Бензодиазепини су били најчешће коингестирана група лекова, а из ове групе клоназепам је био највише коришћен лек. Анализом намере тровања, примећено је да је истовремена употреба прегабалина и клоназепамом веома честа у случајевима злоупотребе, најчешће код пацијената из мигрантске популације.
4. Изолована тровања прегабалином су у највећем броју случајева лаког степена (86,6%), док је коингестија психоактивних лекова и супстанци у око 37% доводила до тровања средње тешког и тешког степена.
5. Иако су поређењем средњих доза прегабалина код пацијената са различитим степеном тежине тровања детектоване значајне интер-индивидуалне варијације у изолованим и комбинованим тровањима, унета количина прегабалина је показала дозно зависни ефекат и висок степен корелације са степеном тежине тровања и дужином трајања хоспитализације.
6. Концентрација прегабалина је била статистички значајно виша код хоспитализованих пацијената са тровањем тешког степена, чије је лечење захтевало интубацију и примену механичке вентилације. У групи пацијената са коингестијом других лекова и супстанци, поређењем средњих вредности примећен је пораст концентрација са већим ПСС скором, и умерена корелација са дужином трајања хоспитализације.
7. Развијене и валидоване аналитичке методе за одређивање прегабалина и клоназепамом у плазми и хомогенатима ткива експерименталних животиња задовољиле су све критеријуме предвећене водичем за валидацију биоаналитичких метода.
8. У бихејвиоралним експериментима је показано да прегабалин у значајној мери потенцира седативне и атаксичне ефекте клоназепамом. Приликом комбиноване примене ова два лека није дошло до смањења антидотског потенцијала флумазенила у антагонизовању токсичних ефеката клоназепамом.

9. У фармакокинетичким испитивањима нису добијене разлике фармакокинетичких параметара при појединачној и комбинованој примени прегабалина и клоназемама. Закључено је да нису утврђене клинички значајне фармакокинетичке интеракције ова два лека.

10. Са циљем смањења ризика од злоупотребе прегабалина потребно је спровести строжију контролу, бољи надзор прописивања и издавања прегабалина, нарочито код пацијената код којих постоји ризик од злоупотребе. Неопходна је и боља едукација како здравствених радника тако и пацијената. Иако током посматраног периода није било значајног пораста употребе и случајева тровања габапентином, требало би применити сличне мере превенције.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chincholkar M. Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice. *Br J Pain*. 2020;14(2):104-114.
2. PubChem. Pregabalin [Internet]. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pregabalin>
3. Pfizer Statement on Regulatory Status of Lyrica [Internet]. Drugs.com. [cited 2023 April 8]. Available from: https://www.drugs.com/nda/lyrica_040902.html
4. EMA. Lyrica - European Medicines Agency [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2023 April 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lyrica#overview-section>
5. Goodman CW, Brett AS. Gabapentin and Pregabalin for Pain - Is Increased Prescribing a Cause for Concern? *N Engl J Med*. 2017;377(5):411-414.
6. Dowell D. CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain — United States, 2022. *MMWR Recommendations and Reports* [Internet]. 2022;71(3). Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/71/rr/rr7103a1.htm?s_cid=rr7103a1_w
7. SAŽETAK KARAKTERISTIKA LEKA [Internet]. [cited 2023 April 2]. Available from: https://www.alims.gov.rs/doc_file/lekovi/smpc/515-01-00601-21-001.pdf
8. Goins A, Patel K, Alles SRA. The gabapentinoid drugs and their abuse potential. *Pharmacol Ther*. 2021;227: 107926.
9. Evoy KE, Peckham AM, Covvey JR, Tidgewell KJ. Gabapentinoid Pharmacology in the Context of Emerging Misuse Liability. *J. Clin. Pharmacol*. 2021;61(S2).
10. Gajraj NM. Pregabalin: Its pharmacology and use in pain management. *Acute Pain*. 2008;10(1):51-52.
11. Takahashi Y, Nishimura T, Higuchi K, Noguchi S, Tega Y, Kurosawa T, Deguchi Y, Tomi M. Transport of Pregabalin Via L-Type Amino Acid Transporter 1 (SLC7A5) in Human Brain Capillary Endothelial Cell Line. *Pharm Res*. 2018;35(12):246.
12. Nagar A, Jain P, Bodkhe S, Agrawal K, Salunke U. Active Enantiomeric Form of Pregabalin Based on Sole and Coupled Chromatography Methods. *Pharm Methods*. 2022;13(1):14–27.
13. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH APPLICATION NUMBER: 22-488 CHEMISTRY REVIEW(S) [Internet]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022488s000chemr.pdf

14. Pregabalin | 148553-50-8 [Internet]. ChemicalBook. [cited 2023 April 14]. Available from: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2251105.htm
15. Chennuru L, Choppari T, Nandula R, Zhang T, Franco P. Direct Separation of Pregabalin Enantiomers Using a Zwitterionic Chiral Selector by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Ultraviolet Detection. *Molecules*. 2016;21(11):1578.
16. Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. *Clin. Pharmacokinet*. 2010;49(10):661-669.
17. Calandre EP, Rico-Villademoros F, Slim M. Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Expert Rev. Neurother*. 2016;16(11):1263-1277.
18. Su T-Z, Lunney E, Campbell G, Oxender DL. Transport of Gabapentin, a γ -Amino Acid Drug, by System L α -Amino Acid Transporters: A Comparative Study in Astrocytes, Synaptosomes, and CHO Cells. *J. Neurochem*. 2002;64(5):2125-2131.
19. Cross AL, Viswanath O, Sherman AI. Pregabalin. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470341/>
20. Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia*. 2004;45 Suppl 6:13–8.
21. N03 - Antiepileptici - Mediatelly Baza lekova [Internet]. Mediatelly. [cited 2023 May 8]. Available from: <https://mediately.co/rs/atcs/N03/Antiepileptici?q=pregabalin>
22. Zaccara G, Perucca E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs. *Epileptic Disord*. 2014;16(4):409-431.
23. Brodie MJ, Wilson EA, Wesche DL, Alvey CW, Randinitis EJ, Posvar EL, et al. Pregabalin Drug Interaction Studies: Lack of Effect on the Pharmacokinetics of Carbamazepine, Phenytoin, Lamotrigine, and Valproate in Patients with Partial Epilepsy. *Epilepsia*. 2005;46(9):1407-1413.
24. Lee, Soyoung, et al. A pharmacokinetic drug-drug interaction study between pregabalin and tramadol in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2018;(74):1605-1613.

25. Bender G, Gosset J, Florian J, Tan K, Field M, Marshall S, et al. Population Pharmacokinetic Model of the Pregabalin-Sildenafil Interaction in Rats: Application of Simulation to Preclinical PK-PD Study Design. *Pharm. Res.* 2009;26(10):2259-2269.
26. Rodrigues RF, Kawano T, Placido RV, Costa LH, Podesta MHMC, Santos RS, Galdino G, Barros CM, Boralli VB. Investigation of the Combination of Pregabalin with Duloxetine or Amitriptyline on the Pharmacokinetics and Antiallodynic Effect During Neuropathic Pain in Rats. *Pain Physician.* 2021;24(4): E511-E520.
27. Gabapentin Monograph for Professionals [Internet]. Drugs.com. [cited 2023 April 21]. Available from: <https://www.drugs.com/monograph/gabapentin.html>
28. Łuszczki JJ, Florek-Łuszczki M. Synergistic interaction of pregabalin with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 mesylate in the hot-plate test in mice: an isobolographic analysis. *Pharmacol. Rep.* 2012;64(3):723-732.
29. Chincholkar M. Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: a narrative review. *Br J Anaesth.* 2018;120(6):1315-1334.
30. Ninomiya W, Mizobuchi K, Hayashi T, Okude S, Katagiri S, Kubo A, et al. Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report. *Doc Ophthalmol.* 2020;140(3):279-287.
31. Catterall WA. Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium.* 1998;24(5-6):307-323.
32. Van Rensburg R, Reuter H. An overview of analgesics - anticonvulsants, antidepressants, and other medications (Part 3). *South African Family Practice.* 2019;61(3):59–63.
33. Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol.* 1993;123(4):949-962.
34. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(15):5478-5482.
35. SHIM, Jae Hang. Clinical application of $\alpha 2$ - δ ligand. *Hanyang Med. Rev.* 2011, 31.2: 55-62.
36. Uchitel OD, Di Guilmi MN, Urbano FJ, Gonzalez-Inchauspe C. Acute modulation of calcium currents and synaptic transmission by gabapentinoids. *Channels.* 2010;4(6):490-496.
37. Patel R, Dickenson AH. Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha 2 \delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect.* 2016;4(2):e00205.

38. Buvanendran A, Kroin JS, Kari M, Tuman KJ. Can a Single Dose of 300 mg of Pregabalin Reach Acute Antihyperalgesic Levels in the Central Nervous System? *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2010;35(6):535-538.
39. Zaccara G, Gangemi P, Perucca P, Specchio L. The adverse event profile of pregabalin: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Epilepsia*. 2011;52(4):826-836.
40. Chiechio S, Zammataro M, Caraci F, Rampello L, Copani A, Sabato AF, et al. Pregabalin in the Treatment of Chronic Pain. *Clin. Drug Investig*. 2009;29(3):203-213.
41. Micó J-A, Prieto R. Elucidating the Mechanism of Action of Pregabalin. *CNS Drugs*. 2012 Aug;26(8):637-648.
42. Alles SRA, Cain SM, Snutch TP. Pregabalin as a Pain Therapeutic: Beyond Calcium Channels. *Front. Cell*. 2020; 14:83.
43. Tassone DM, Boyce E, Guyer J, Nuzum D. Pregabalin: A novel γ -aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders *Clin. Ther*. 2007;29(1):26–48.
44. Jokinen V, Lilius TO, Laitila J, Niemi M, Rauhala PV, Kalso EA. Pregabalin enhances the antinociceptive effect of oxycodone and morphine in thermal models of nociception in the rat without any pharmacokinetic interactions. *European Journal of Pain*. 2015;20(2):297–306.
45. Forty-first ECDD documents [Internet]. [www.who.int](https://www.who.int/groups/who-expert-committee-on-drug-dependence/forty-first-ecdd-documents). [cited 2023 Apr 4]. Available from: <https://www.who.int/groups/who-expert-committee-on-drug-dependence/forty-first-ecdd-documents>
46. Rietjens SJ, Sikma MA, Hunault CC, Lange DW, Hondebrink L. Pregabalin poisoning: Evaluation of dose-toxicity relationship. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2021;88(3):1288-1297.
47. Fonseca F, Lenahan W, Dart RC, Papaseit E, Dargan PI, Wood DM, et al. Non-medical Use of Prescription Gabapentinoids (Gabapentin and Pregabalin) in Five European Countries. *Front. Psychiatry*. 2021; 12:676224.
48. Kibaly C, Alderete JA, Liu SH, Nasef HS, Law PY, Evans CJ, et al. Oxycodone in the Opioid Epidemic: High “Liking”, “Wanting”, and Abuse Liability. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2021; 41:899-926.
49. Daly C, Griffin E, Ashcroft DM, Webb RT, Perry IJ, Arensman E. Intentional Drug Overdose Involving Pregabalin and Gabapentin: Findings from the National Self-Harm Registry Ireland, 2007-2015. *Clin Drug Investig*. 2018;38(4):373-380.
50. Häkkinen M, Vuori E, Kalso E, Gergov M, Ojanperä I. Profiles of pregabalin and gabapentin abuse by postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int*. 2014; 241:1–6.

51. Wills B, Reynolds P, Chu E, Murphy C, Cumpston K, Stromberg P, et al. Clinical Outcomes in Newer Anticonvulsant Overdose: A Poison Center Observational Study. *Journal of Medical Toxicology*. 2014;10(3):254-260.
52. Lasheen D, Sherif N, El-Taftazani E, Atalla S, Abdellkader S. Study of Acute Pregabalin Intoxication in Patients Admitted to Poison Control Center Ain Shams University Hospitals and its Pathological Effect on Rat Brain: Clinical and Experimental Study. *Ain-Shams J. Forensic Med. Clin. Toxicol*. 2023;40(1):85-98.
53. Slocum GW, Schult RF, Gorodetsky RM, Wiegand TJ, Kamali M, Acquisto NM. Pregabalin and paradoxical reaction of seizures in a large overdose. *Toxicol. Commun*. 2018;2(1):19–20.
54. Wood DM, Berry DJ, Glover G, Eastwood J, Dargan PI. Significant Pregabalin Toxicity Managed with Supportive Care Alone. *J Med Toxicol*. 2010;6(4):435-437.
55. Alan BE, Kızılkın MP, Akgül S. Pregabalin abuse in adolescence: a case series. *Turk. J. Pediatr*. 2022;64(2):357.
56. Evoy KE, Morrison MD, Saklad SR. Abuse and Misuse of Pregabalin and Gabapentin. *Drugs*. 2017;77(4):403-426.
57. Al-Husseini A, Wazaify M, Van Hout MC. Pregabalin Misuse and Abuse in Jordan: a Qualitative Study of User Experiences. *Int J Ment Health Addict*. 2018;16(3):642-654.
58. Snellgrove BJ, Steinert T, Jaeger S. Pregabalin Use Among Users of Illicit Drugs: A Cross-Sectional Survey in Southern Germany. *CNS Drugs*. 2017;31(10):891-898.
59. Schifano F, D’Offizi S, Piccione M, Corazza O, Deluca P, Davey Z, et al. Is there a recreational misuse potential for pregabalin? Analysis of anecdotal online reports in comparison with related gabapentin and clonazepam data. *Psychother Psychosom*. 2011;80(2):118-122.
60. Schwan S, Sundström A, Stjernberg E, Hallberg E, Hallberg P. A signal for an abuse liability for pregabalin—results from the Swedish spontaneous adverse drug reaction reporting system. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2010;66(9):947-953.
61. Dufayet L, Care W, Deheul S, Laborde-Casterot H, Nisse P; French PCC Research Group, Langrand J, Vodovar D. Increase in pregabalin recreational use in adolescents in France. *Clin Toxicol (Phila)*. 2021;59(11):1027-1030.
62. Drug Enforcement Administration, Department of Justice. Schedules of controlled substances: placement of pregabalin into schedule V. Final rule. *Fed Regist*. 2005;70(144):43633-5.
63. Pregabalin and gabapentin to be controlled as class C drugs [Internet]. GOV.UK. Available from: <https://www.gov.uk/government/news/pregabalin-and-gabapentin-to-be-controlled-as-class-c-drugs>

64. EMCDDA–Europol 2009 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA | www.emcdda.europa.eu [Internet]. Emcdda.europa.eu. 2022 [cited 5 April 2022]. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index132910EN.html_en
65. Pravilnik o utvrđivanju Spiska psihoaktivnih kontrolisanih supstanci: 73/2022-8 [Internet]. www.pravno-informacioni-sistem.rs. [cited 2023 April 3]. Available from: <http://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SIGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/ministarstva/pravilnik/2022/73/1>
66. Pinder RM, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Clonazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs*. 1976;12(5):321-361.
67. Dokkedal-Silva V, Berro LF, Galduróz JCF, Tufik S, Andersen ML. Clonazepam. *Harv. Rev. Psychiatry*. 2019;27(5):279-289.
68. Berlin A, Dahlström H. Pharmacokinetics of the anticonvulsant drug clonazepam evaluated from single oral and intravenous doses and by repeated oral administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1975;9(2-3):155-159
69. Greenblatt DJ, Miller LG, Shader RI. Clonazepam pharmacokinetics, brain uptake, and receptor interactions. *J Clin Psychiatry*. 1987;48:4-11.
70. Kacirova I, Grundmann M, Silhan P, Brozmanova H. A Case Report of Clonazepam Dependence: Utilization of Therapeutic Drug Monitoring During Withdrawal Period. *Medicine*. 2016;95(9):e2881.
71. Hernandez SH, Nelson LS. Prescription Drug Abuse: Insight Into the Epidemic. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2010;88(3):307-317.
72. Clonazepam/pregabalin abuse. *React. Wkly*. 2020;1816(1):108-118.
73. Drug Enforcement Administration. Drug Scheduling [Internet]. www.dea.gov. 2018. Available from: <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling>
74. Frauger E, Pauly V, Pradel V, Rouby F, Arditti J, Thirion X, et al. Evidence of clonazepam abuse liability: results of the tools developed by the French Centers for Evaluation and Information on Pharmacodependence (CEIP) network. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;25(5):633-641.
75. Samardžić J, Zeković J, Stevanović A, Jančić J, Dimitrijević I. (Zlo)upotreba i adiktivni potencijal benzodiazepina - analiza potrošnje u Srbiji u periodu 2014-2016. *Engrami*. 2018;40(2):73-85.
76. Jakovljevic M (Michael), Lazarevic M, Jurisevic M, Jovanovic MR. When cure becomes an illness—abuse of addictive prescription medicines. *Front. Pharmacol*. 2015; 6:193.

77. Home Page. ALIMIS. <https://www.alims.gov.rs/english/>. Published July 6, 2022. Accessed December 19, 2022.
78. Smith SM, Dart RC, Katz NP, et al. Classification and definition of misuse, abuse, and related events in clinical trials: ACTION systematic review and recommendations. *Pain*. 2013;154(11):2287-2296.
79. Home | Statistical Office of the Republic of Serbia. www.stat.gov.rs. <https://www.stat.gov.rs/en-US/> Accessed March 8, 2023.
80. The ATC/DDD methodology [Internet]. Who.int. [cited 2023 Apr 21]. Available from: <https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/methodology>
81. Persson HE, Sjöberg GK, Haines JA, de Garbino JP. Poisoning Severity Score. Grading of Acute Poisoning. *Clin. Toxicol*. 1998;36(3):205-213
82. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;99(3):306-314
83. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. 2011. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
84. Hägg S, Jönsson AK, Ahlner J. Current Evidence on Abuse and Misuse of Gabapentinoids. *Drug Saf*. 2020;43(12):1235–1254
85. Smith RV, Havens JR, Walsh SL. Gabapentin misuse, abuse and diversion: a systematic review. *Addict*. 2016;111(7):1160-1174.
86. Chiappini S, Schifano F. A Decade of Gabapentinoid Misuse: An Analysis of the European Medicines Agency's 'Suspected Adverse Drug Reactions' Database. *CNS Drugs*. 2016;30(7):647-654.
87. Schifano F. Misuse and abuse of pregabalin and gabapentin: cause for concern?. *CNS Drugs*. 2014;28(6):491-496
88. Isoardi KZ, Polkinghorne G, Harris K, Isbister GK. Pregabalin poisoning and rising recreational use: a retrospective observational series. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(12):2435-2440.
89. Hofmann M, and Besson M. Gabapentinoids: The rise of a new misuse epidemics? *Psychiatry Res*. 2021; 305: 114193.

90. Crawford W. Gabapentinoids: The Next Opioid Epidemic? [Internet]. [cited 2023 Apr 29]. Available from: <https://painrelieffoundation.org.uk/wp-content/uploads/2020/01/25-Gabapentinoids-The-Next-Opioid-Epidemic.pdf>
91. Crossin R, Scott D, Arunogiri S, Smith K, Dietze PM, Lubman DI. Pregabalin misuse-related ambulance attendances in Victoria, 2012-2017: characteristics of patients and attendances. *Med J Aust.* 2019;210(2):75-79.
92. Kalk NJ, Chiu CT, Sadoughi R, Baho H, Williams BD, Taylor D, et al. Fatalities associated with gabapentinoids in England (2004-2020). *British Journal of Clinical Pharmacology* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2022 Dec 19];88(8):3911–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35435281/>
93. Abdelhamid, W.G., Wahdan, M.M. & Zaafar, D. Acute toxic exposures in Egypt population: analysis of a five-year registry from 2015 to 2019. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 14, 235–244 (2022).
94. Johansen ME. Gabapentinoid Use in the United States 2002 Through 2015. *JAMA Internal Medicine.* 2018 Feb 1;178(2):292.
95. M Peckham A, Ananickal M, Sclar D. Gabapentin use, abuse, and the US opioid epidemic: the case for reclassification as a controlled substance and the need for pharmacovigilance. *Risk Manag Healthc.* 2018; 11:109-116.
96. Tambon M, Ponté C, Jouanjus E, Fouilhé N, Micallef J, Lapeyre-Mestre M. Gabapentinoid Abuse in France: Evidence on Health Consequences and New Points of Vigilance. *Front. Psychiatry.* 2021; 12:639780.
97. Torjesen I. Pregabalin and gabapentin: what impact will reclassification have on doctors and patients? *BMJ.* 2019;364.
98. Althunian TA, Alomran MI, Alsagri GM, Alrasheed MM, Alshammari TM. The impact of regulatory restrictions on pregabalin use in Saudi Arabia: An interrupted time series analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2022;31(5):577-582.
99. Mula M. Suicidality and antiepileptic drugs in people with epilepsy: an update. *Expert Rev. Neurother.* 2022;22(5):405-410.
100. Paterno E. Anticonvulsant Medications and the Risk of Suicide, Attempted Suicide, or Violent Death. *JAMA.* 2010;303(14):1401.
101. Molero Y, Larsson H, D'Onofrio BM, Sharp DJ, Fazel S. Associations between gabapentinoids and suicidal behaviour, unintentional overdoses, injuries, road traffic incidents, and violent crime: population based cohort study in Sweden. *BMJ.* 2019;365.

102. Evoy KE, Covvey JR, Peckham AM, Ochs L, Hultgren KE. Reports of gabapentin and pregabalin abuse, misuse, dependence, or overdose: An analysis of the Food And Drug Administration Adverse Events Reporting System (FAERS). *Res Social Adm Pharm.* 2019;15(8):953-958.
103. Elsayed M, Zeiss R, Gahr M, Connemann BJ, Schönfeldt-Lecuona C. Intranasal Pregabalin Administration: A Review of the Literature and the Worldwide Spontaneous Reporting System of Adverse Drug Reactions. *Brain Sci.* 2019;9(11):322.
104. Osman M, Casey P. Pregabalin abuse for enhancing sexual performance: case discussion and literature review. *Ir J Psychol Med.* 2014;31(4):281-286.
105. Murphy R, McGuinness D, Hallahan B. Pregabalin-induced sexual disinhibition. *Ir. J. Psychol. Med.* 2017;37(1):55-58.
106. Bucur M. Pregabalin and Libido- Case Reports. *The Open Neuropsychopharmacology Journal.* 2011;5(1):8-9.
107. Hamed SA. Sexual Dysfunctions Induced by Pregabalin. *Clin. Neuropharmacol.* 2018;41(4):116-122.
108. Kaufman KR, Struck PJ. Gabapentin-induced sexual dysfunction. *Epilepsy Behav.* 2011;21(3):324-326.
109. Nahar LK, Murphy KG, Paterson S. Misuse and Mortality Related to Gabapentin and Pregabalin are Being Under-Estimated: A Two-Year Post-Mortem Population Study. *J Anal Toxicol.* 2019;43(7):564-570.
110. Correction: Establishment of a comprehensive drug overdose fatality surveillance system in Kentucky to inform drug overdose prevention policies, interventions and best practices. *Inj. Prev.* 2018;24(4):320.
111. Spence D. Bad medicine: gabapentin and pregabalin. *BMJ.* 2013 Nov 8;347.
112. Montastruc F, Loo SY, Renoux C. Trends in First Gabapentin and Pregabalin Prescriptions in Primary Care in the United Kingdom, 1993-2017. *JAMA.* 2018;320(20):2149-2151.
113. Lancia M, Gambelunghe A, Gili A, Bacci M, Aroni K, Gambelunghe C. Pregabalin abuse in combination with other drugs: monitoring among methadone patients. *Front. Psychiatry.* 2020; 10:1022.
114. Alsheikh MY, Alshahrani AM, Almutairi RD, Althobaiti, HA, Fathelrahman AI Seoane-Vazquez E. et al. Analysis of gabapentinoids abuse-reports in the Middle East and North Africa region utilizing the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Pharmacology, Toxicology and Biomedical Reports.* 2021;7(1):5-8.

115. Aksakal E, Bakirci EM, Emet M, Uzkeser M. Complete atrioventricular block due to overdose of pregabalin. *Am J Emerg Med.* 2012;30(9):2101. e1-4.
116. Schiavo A, Stagnaro FM, Salzano A, et al. Pregabalin-induced first degree atrioventricular block in a young patient treated for pain from extrapulmonary tuberculosis. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2017;87(3):838.
117. Rajesh K, Jathinder K, Ihtisham M, Gordon P. Pregabalin overdose causing sinus bradycardia – a rare complication. *J Cardiovasc Med.* 2021:007-009.
118. Patsalos PN, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. *Ther Drug Monit.* 2018;40(5):526-548.
119. Kriikku P, Wilhelm L, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J, Ojanperä I. Pregabalin serum levels in apprehended drivers. *Forensic Sci. Int.* 2014; 243:112-116.
120. Bouchard J, Yates C, Calello DP, Gosselin S, Roberts DM, Lavergne V, et al. Extracorporeal treatment for gabapentin and pregabalin poisoning: systematic review and recommendations from the EXTRIP workgroup. *Am. J. Kidney Dis.* 2022;79(1):88-104.
121. Aschenbrenner DS. New Warning for Gabapentinoids. *Am. J. Nurs. Sci.* 2020 ;120(4):22.
122. Vujović M, Kostić E, Pančić D, Milosavljević B, Stojanović I, Karadžić R, et al. Pregabalin determination in postmortem samples and toxicological significance in forensic cases. *Acta med. Median.* 2021;60(3):5-10.
123. Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci.* 2013;18(7):601-610.
124. Ellis JJ, Sadosky AB, Ten Eyck LL, Mudumby P, Cappelleri JC, Ndehi L, Suehs BT, Parsons B. A retrospective, matched cohort study of potential drug-drug interaction prevalence and opioid utilization in a diabetic peripheral neuropathy population initiated on pregabalin or duloxetine. *BMC Health Serv Res.* 2015;15(1):1-11.
125. Hill R, Dewey WL, Kelly E, Henderson G. Oxycodone-induced tolerance to respiratory depression: reversal by ethanol, pregabalin and protein kinase C inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 2018;175(12):2492-2503.
126. Vashchinkina E, Piippo O, Vekovischeva O, Krupitsky E, Ilyuk R, Neznanov N, et al. Addiction-related interactions of pregabalin with morphine in mice and humans: reinforcing and inhibiting effects. *Addict. Biol.* 2017;23(3):945-958.
127. Hoffman EJ, Warren EW. Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. *Clin Pharm.* 1993;12(9):641-656;

Биографски подаци

Марко Антуновић рођен је 22. јула 1987. године у Београду. Дипломирао је на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду 2012. године, на смеру магистар фармације-медицински биохемичар са просечном оценом 8,62. После завршеног приправничког стажа и полагања стручног испита, 2013. године запошљава се у Одељењу за токсиколошку хемију Националног центра за контролу тровања Војномедицинске академије. Специјализацију из токсиколошке хемије завршио је на Фармацеутском факултету 2019. године са просечном оценом 10. Наслов одбрањеног специјалистичког рада је "Развој и валидација LC/MS методе за одређивање валпроинске киселине у плазми".

У Одељењу за токсиколошку хемију обавља послове специјалисте токсиколошке хемије, а члан је и Мобилне токсиколошке хемијске екипе где обавља функцију заменика руководиоца екипе. У оквиру активности мобилне токсиколошко хемијске екипе учествовао је на показним вежбама у организацији ВМА чија је тема збрињавање страдалих и угрожених лица у условима ванредних ситуација. На показној вежби "Балкански одговор" у АБХО центру у Крушевцу био је активан као учесник и предавач из области војне токсикологије. У 2017. години био је на усавршавању у Великој Британији (*Defence CBRN School, Winterbourne Gunner, Salisbury, UK*) где је успешно савладао курс из области војне токсикологије. У Великој Британији био је и 2023. године као учесник курса из области заштите од хемијских акцидентата (*York, North Yorkshire, UK*).

Области интересовања Марка Антуновића су аналитичка токсикологија, акутна тровања, болести зависности, злоупотреба психоактивних супстанци и војна токсикологија. Посебно интересовање и активност показао је у едукацији млађих колега и студената. Учествовао је као предавач на неколико студентских конгреса и трибина у организацији Националне асоцијације студената фармације (НАПСЕР), а са Тимом медицинских биохемичара организовао је радионицу у оквиру пројекта "HPLC и GC као савремене дијагностичке методе".

На Медицинском факултету ВМА запослен је од 2015. године, прво као сарадник у настави а затим као асистент на предмету Медицинска хемија. Учествовао је као члан на два научноистраживачка пројекта Медицинског факултета ВМА: Претклинички и клинички аспекти токсичности нових психоактивних супстанци и њихових комбинација са постојећим средствима злоупотребе (МФ ВМА 06/22-24); Комплексне аналитичке методе за одређивање група токсиколошки значајних лекова и супстанци злоупотребе у биолошком материјалу (МФ ВМА 06-08/В.26). До сада је као аутор или коаутор публикувао преко 20 радова у домаћим и међународним часописима (11 на SCI листи) и преко 50 саопштења на конгресима. Аутор је поглавља у уџбенику за студенте медицинских наука "Здравствена економија са фармакоекономијом".

Члан је Коморе медицинских биохемичара, Удружења токсиколога Србије и Европског удружења токсиколога.

Списак публикација из докторске дисертације:

1. **Antunovic M**, Dzudovic J, Kilibarda V, Vucinic S, Djordjevic S. Validation of the rapid and simple LC-MS/MS method for the quantification of pregabalin in plasma of acutely poisoned patients. *Acta Chromatographica*. 2023 Feb 8; <https://doi.org/10.1556/1326.2023.01104>; IF= 2,011
2. **Antunovic M**, Vucinic S, Kotur-Stevuljevic J, Krstic K, Jovic-Stosic J, Kilibarda V, Perkovic-Vukcevic N, Djordjevic S. Rise of Pregabalin Poisoning and Abuse Cases in Serbia: A Ten-Year Retrospective Study. *Int J Gen Med*. 2023;16:1239-1250. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S405616>; M23, IF= 2,145