

**ATLARDA İKİ FARKLI YOLLA UYGULANAN
METAMİZOL'ÜN FARMAKOKİNETİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

**Zeynep MARAŞ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Selim ERDOĞAN
2. Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi İsmet YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi- 2019

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**ATLARDA İKİ FARKLI YOLLA UYGULANAN METAMİZOL' ÜN
FARMAKOKİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Zeynep MARAŞ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Selim ERDOĞAN
2. Tez Danışmanı
Dr. Öğretim Üyesi İsmet YILMAZ**


Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
TYL/ 2018-1044 Proje numarası ile desteklenmiştir.


**MALATYA
2019**

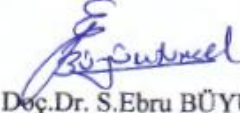
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Zeynep MARAŞ'ın "Atlarda İki Farklı Yolla Uygulanan Metamizol'ün Farmakokinetiğinin Belirlenmesi "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2019


Prof. Dr. Selim ERDOĞAN
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Halim AVCI
Kilis 7 Aralık Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Non Steroid Antienflamatuvar İlaçlar.....	2
2.1.1. Metamizol Sodyumun (Dipiron) Farmakolojik Özellikleri	3
2.1.2. Metamizol Sodyumun Metabolitleri	4
2.2. Farmakokinetik Kavramı	5
2.2.1. Farmakokinetikte Olası Süreçler	5
2.2.1.1. Emilim	5
2.2.1.2. Dağılım	6
2.2.1.3. Eliminasyon ve metabolizması	7
2.2.2. Farmakokinetikte Kinetik Kavramlar	8
2.2.2.1. Eğri altı alan, (E.A.A).....	8
2.2.2.2. Plazma doruk derişimi (C _{doruk}).....	10
2.2.2.3. Plazma doruk süresi (t _{doruk}).....	11
2.2.2.4. Ortalama kalış zamanı (OKZ).....	11
2.2.2.5. Biyolojik yarı ömür, (t _{1/2})	11
2.3. Metamizol Sodyumun Farmakolojik Özellikleri.....	11
2.3.1. Farmakodinamik Özellikler	11
2.3.2. Farmakokinetik Özellikler	12
2.3.3. Klinik Öncesi Güvenlik Verileri.....	13
2.4. İlaç Analizleri ile İlgili Yapılan Literatür Çalışmaları.....	14
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Deneme Hayvanı.....	22
3.1.2 Kullanılan Araç Gereçler ve Kimyasallar.....	22
3.1.3. Kimyasal Madde ve Solventler	23

3.2. Metot.....	23
3.2.1. Atların gruplandırılması ve deneysel dizayn	23
3.2.2. Damar içi uygulama.....	24
3.2.3. Kas içi uygulama	24
3.3. Plazma Metamizol ve Metabolitlerinin tayin edilmesi	25
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.3.2. Kalibrasyon standartları ve kalibrasyon örneklerinin hazırlanması	25
3.3.3. Örneklerin hazırlanması.....	26
3.3.3.1. Katı Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Hazırlanması	26
3.3.3.2. Plazma ekstraksiyonun optimizasyonu	26
3.4. Analiz.....	29
3.4.1. HPLC Sisteminin Özellikleri	29
3.4.2. LC-MS/MS Sisteminin Özellikleri	30
3.5. Metodun validasyonu.....	31
3.5.1. Geri Kazanım Çalışması	31
3.5.2. Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Validasyon Bulguları	33
4.1.1. Özgünlük.....	33
4.1.2. Doğrusallık.....	34
4.1.3. Geri kazanım.....	36
4.1.4. Metot Validasyonu Çalışmaları	38
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR	59
EKLER.....	63
EK.1. Özgeçmiş	63
EK.2. Etik Kurul	64

TEŐEKKÜR

Bu tez çalıőmasının her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen danıőman hocam Sayın Prof. Dr. Selim ERDOğAN'a, 2. Danıőman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmet YILMAZ'a, çalıőmamın deneysel ve teknik aőamalarındaki yardımlarından dolayı Sayın Yılmaz UğUR'a, maddi desteklerinden dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teőekkür ederim.

Ayrıca bu güne kadar olduğu gibi Yüksek Lisans yaptığım süre boyunca yanımda olan kıymetli eőime, anneme ve babama ve tüm aileme teőekkür eder, yapmış olduğum bu çalışmanın ülkemize faydalı olmasını dilerim.

Zeynep MARAŞ

ÖZET

Atlarda İki Farklı Yolla Uygulanan Metamizolün Farmakokinetiğinin Belirlenmesi

Amaç: Bu araştırma projesinin amacı; Ülke ekonomisinde önemli bir kaynak olan Saf kan Arap atlarına (*Equus ferus caballus*) kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlardan Metamizol Sodyumun (MS) kas içi ve damar içi yolla uygulanmasını takiben farmakokinetiğinin değişimini cinsiyet ve uygulama yollarına göre belirlemektir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada; ortalama canlı ağırlıkları 380-450 kg olan 14 adet (7 dişi, 7 erkek) Safkan Arap atı kullanıldı. 25 mg/kg dozunda damar içi (i.v.) ve kas içi (i.m.) uygulamada, uygulama öncesi 0. dakika ve uygulama sonrası 15., 30., 45., 60., 90.dakikalar ile 2., 3., 4., 6., 8. ve 12. saatlerde alınan kan plazmalarındaki analitler optimize edilen bir SPE ekstraksiyonu sonrası HPLC ve LC-MS/MS’de tayin edildi. Her üç metabolitin her iki cinsiyet ve her iki uygulama yoluna ait önemli farmakokinetik parametreleri (EAA, C_{doruk} , t_{doruk} , OKZ, $t_{1/2\lambda z}$ gibi) belirlendi.

Bulgular: Çalışma süresince ilaç uygulanan hayvanlarda herhangi bir yan etki gözlenmedi. Kullanılan metod valide edildi, tüm metabolitler için kalibrasyonun eğrisi; 0,01-100 µg/mL arasında lineer olduğu ($r^2 \geq 0,999$); geri kazanım %82,7-98,5; en düşük tespit edilebilir limitinin 1,43-4,08 ve tayin edilebilir limitinin ise 4,11-13,61 µg/mL arasında değiştiği belirlendi.

MAA için en yüksek C_{doruk} değeri erkeklerde i.v. 114,40 ve EAA_{0-12} 374,11 µg/mL olarak, en düşük dişilerde i.m. C_{doruk} 56,65 ve EAA_{0-12} 156,45 µg/mL ölçülmüştür. AA için en yüksek erkeklerde i.v. 17,57; EAA_{0-12} i.m. 58,81 µg/mL, en düşük C_{doruk} dişilerde i.m. 14,85 ve EAA_{0-12} 56,71 µg/mL ölçülmüştür. AAA için dişilerde i.v. 0,68, en düşük değer erkeklerde i.m. 0,33 olarak ölçülmüştür. MAA için t_{doruk} değeri en erken olarak dişilerde i.v. 0,25 h, en uzun erkeklerde i.m. 0,70 h olarak hesaplanmıştır. AA için en küçük olarak erkeklerde i.v. 0,75 h, en büyük her iki cinsiyette de i.m. uygulama sonrası 1,50 h olarak hesaplanmıştır. AAA için en küçük değeri i.v. uygulama sonrası erkeklerde 1,00 h olarak ölçülmüştür. AAA için en yüksek EAA_{0-12} dişilerde i.v. 2,47 µg/mL en düşük değer erkeklerde i.m. 1,73 olarak ölçülmüştür.

Sonuç: Bu çalışmada atlara yaygın olarak kullanılan NSAİİ’lerden MS’nin tavsiye edilen dozlarda i.v. ve i.m. yolla uygulanmasını takiben farmakokinetik parametreleri karşılaştırıldı ve etkin metaboliti olan MAA’nın diğerlerinden daha erken ve fazla miktarda plazmada yoğunluğuna ulaştığı sonucuna varıldı. Geliştirdiğimiz bu yöntem, çok düşük limitlerde metamizol metabolitlerinin kısa sürede analizlerine imkân sağlamıştır. Analiz sonucunda tüm metabolitlerin kan düzeyi ve hesaplanan parametrelerin atların hem cinsiyet ve hem de uygulama yollarına göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: At, Metamizol, Metabolit, Farmakokinetik, SPE Ekstraksiyon, HPLC, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Determination of the Pharmacokinetics of Metamizole Applied in Two Different Ways

Aim: The aim of this research project; The main source of the economy of the pure blood Arab horses (*Equus ferus caballus*) used in nonsteroidal antiinflammatory drugs Metamizol Sodium (MS) following intravenous and intravenous administration of the change of pharmacokinetics according to gender and routes of administration is to determine.

Materials and Methods: In this study; 14 (7 female, 7 male) pure horse with an average live weight of 380-450 kg were used. Intravenous (i.v.) and intramuscular (i.m.) administration at a dose of 25 mg / kg, 0 minutes before administration and 15, 30, 45, 60, 90 minutes after administration at 2, 3, 4, 6, 8 and 12 hours. The analytes from the blood plasma were determined by HPLC and LC-MS/MS after an optimized SPE extraction. Significant pharmacokinetic parameters (EAA , C_{max} , t_{max} , OKZ , $t_{1/2\lambda z}$) of each of the three metabolites were determined.

Results: No side effects were observed in the animals treated during the study. The method used was validated, the curve of the calibration for all metabolites; It is linear between 0.01-100 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 \geq 0.999$); recovery 82.7-98.5%; the lowest detectable limit was found to be between 1.43-4.08 and the determinable limit of 4,11-13,61 $\mu\text{g/mL}$.

The highest C_{max} value for MAA is i.v. 114,40 and EAA_{0-12} in 374,11 $\mu\text{g/mL}$, the lowest in females i.m. C_{max} 56,65 and EAA_{0-12} 156,45 $\mu\text{g/mL}$ were measured. AA for men in the highest i.v. 17.57; EAA_{0-12} i.m. 58.81 $\mu\text{g/mL}$, the lowest C_{max} females i.m. 14.85 and EAA_{0-12} 56.71 $\mu\text{g/mL}$. AAA for females i.v. 0.68, the lowest value in men i.m. 0.33. The t_{max} value for MAA is the earliest as i.v. 0.25 h, the longest men i.m. 0.70 h. AA is the smallest for men i.v. 0,75 h, i.m. 1.50 h after the application. The smallest value for AAA is i.v. After the application, it was measured as 1,00 h in men. The highest EAA_{0-12} females for AAA i.v. The lowest value of 2,47 $\mu\text{g/mL}$ in men i.m. 1.73.

Conclusion: In this study, we compared the pharmacokinetic parameters following i.v. and i.m. administration of MS in the recommended doses of NSAIDs commonly used in horses and MAA, which has an active metabolite, has reached an earlier and greater concentration in plasma than others. This method has allowed us to analyze the metamizole metabolites at very low limits in a short time. As a result of the analysis, it was determined that the blood level of all metabolites and the calculated parameters varied according to both the sex and the routes of application of the horses.

Keywords: Horse, Metamizole, Metabolite, Pharmacokinetics, SPE Extraction, HPLC, LC-MS/MS.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
4-AA	: 4-Aminoantipirine
4-AAA	: 4-Asetilaminoantipirine
4-FAA	: 4-Formilaminoantipirin
4-MAA	: 4-metilaminoantipirin
ACN	: Asetonitril
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
AUC	: Yaşlılarda ilaca maruz kalma
AUMC	: Derişim-zaman profilinde 0. dk' dan sonsuza moment eğrisi altında kalan alan
BOS	: Beyin- Omurilik Sıvısı
C_{doruk}	: Plazma doruk derişimi
CL/F	: Klirens
COX	: Siklooksijenaz
DCM	: Diklorometan
DCM	: Diklorometan
DIP	: Dipiron
dk	: Dakika

DMSO	: Dimetil sülfoksit
EAA	: Eğri Altı Alan
F	: Biyoyararlanım
FK	: Farmakokinetik
GSH	: Glutasyon
h(sa)	: Saat
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
i.m.	: Kas içi
i.v.	: Damar içi
KBE	: Kan – Beyin Engeli
KC	: Karaciğer
LC-MS/MS	: Likit Kromatografisi/ Kütle Spektroskopisi
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
MDA	: Malondialdehit
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MS	: Metamizol Sodyum
nm	: Nanometre
NSAİİ	: Non Steroid Antienflamatuar İlaçlar

OKZ	: Ortalama kalış zamanı
PG	: Prostaglandin
ppb	: Milyarda 1(bir) kısım
PPB	: Plazma Proteinine Bağlanma
ppm	: Milyonda 1(bir) kısım
t_{1/2}	: Biyolojik yarı ömür
t_{1/2λz}	: Terminal yarılanma ömrü
t_{doruk}	: Plazma doruk süresi
UPLC	: Çok Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
vd	: Ve diğerleri
V_{ss}	: Kararlı durumda görünen dağılım hacmi
V_z	: Terminal aşamasında görünür dağılım hacmi
WADA	: Dünya Anti-Doping Ajansı
α	: Dağılım fızı
β	: Eliminasyon fızı
λz	: Terminal faz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 2.1. Metamizolün açık formülü	3
Şekil 2.2. Metamizolün insanda ve sığıçanda yapısı ve biyotransformasyonu. MS: metamizol; MAA: 4-metilaminoantipirin; AA: 4-aminoantipirin; FAA: 4- formilaminoantipirin; AAA: 4-asetilaminoantipirin.	5
Şekil 2.3. i.v. yoldan verilen bir ilacın 11 kan örneği alınarak çizilen plazma derişimi – zaman eğrisi ve lineer yamuk yöntemi ile EAA hesaplanması.....	9
Şekil 2.4. Hatalı tasarlanmış deneysel noktalar	10
Şekil 3.1. Otomatik kolonları şartlandırma ve analitlerin ekstraksiyon sistemi (SPE sistem)	26
Şekil 3.2. HPLC Cihazı ve ekipmanları	30
Şekil 3.3 LC-MS/MS Cihazı ve ekipmanları.....	30
Şekil 4.1. Atlara MS uygulanmadan hemen önce ve sonra alınan ($t_{0.dk}$ - $t_{15.dk}$) kan plazma ekstraktı örneğine ait HPLC kromatogramları	33
Şekil 4.2. Metil Aminoantipirin (MAA) standart kalibrasyon grafiği.....	34
Şekil 4.3. Amino antipirin (AA) standart kalibrasyon grafiği	35
Şekil 4.4. Asetil amino antipirin (AAA) standart kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 4.5. Formil amino antipirin (FAA) standart kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 4.6. Diş atlara i.v. 25 mg/kg dozunda MS uygulamasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.	42
Şekil 4.7. Diş atlara i.m. 25 mg/kg dozunda MS uygulamasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.	42
Şekil 4.8. Erkek atlara i.v. 25 mg/kg dozunda MS uygulamasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.	43
Şekil 4.9. Erkek atlara 25 mg/kg dozunda i.m. MS uygulamasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.	43
Şekil 4.10. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 15.dakikada ($t_{15.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	44
Şekil 4.11. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 30.dakikada ($t_{30.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	44
Şekil 4.12. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 60.dakikada ($t_{60.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	45

Şekil 4.13. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 6.saat ($t_{6.sa}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	45
Şekil 4.14. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 15.dakikada ($t_{15.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	46
Şekil 4.15. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 30.dakikada ($t_{30.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	46
Şekil 4.16. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 60.dakikada ($t_{60.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	47
Şekil 4.17. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 6.saat ($t_{6.sa}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	47
Şekil 4.18. Metamizol ve metabolitleri için oluşan LC-MS/MS pikleri	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 3.1. Optimizasyon çalışmalarında yapılan ekstraksiyon basamakları	28
Tablo 3.2. LC-MS/MS Cihazı Çalışma Koşulları.....	30
Tablo 4.1. Metamizol metaboliti olan MAA, AA, AAA ve FAA için geri kazanım sonuçları.....	37
Tablo 4.2. Tayin limiti ve ölçüm limiti sonuçları(µg/mL).....	38
Tablo 4.3. Metamizol sodyumun dişi ve erkek atlara damar içi ve kas içi (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki MAA için ortalama plazma derişimleri	39
Tablo 4.4. Metamizol sodyumun dişi ve erkek atlara damar içi ve kas içi (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki AAA için ortalama plazma derişimleri	40
Tablo 4.5. Metamizol sodyumun dişi ve erkek atlara damar içi ve kas içi (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki AA için ortalama plazma derişimleri.....	41
Tablo 4.6. Metamizol sodyumun (MS) atlarda 25 mg/kg dozunda damar içi uygulama sonrası metabolitler MAA, AA ve AAA için ölçülen farmakokinetik parametreler (n=7)	49
Tablo 4.7. Metamizol sodyumun (MS) atlara 25 mg/kg dozunda kas içi uygulama sonrası metabolitler MAA, AA ve AAA için ölçülen farmakokinetik parametreler (n=7)	50

1. GİRİŞ

Yarış atlarının antreman sırasında veya aniden gelişen durumlar neticesinde öldüğü bilinmekte olup, özellikle iskelet gelişimini tamamlamayan atlar yarışlarda koşturulmakta ve ciddi yaralanmalar yaşamaktadırlar. Bu yaralanmalar neticesinde yüksek oranda narkotik analjezikler ya da kolaylıkla satın alınabilen, temini kontrole tabi reçetelere bağlı olmayan non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler) kullanılmaktadır. WADA'nın (Dünya Anti-Doping Ajansı) belirlemiş olduğu güncel listelerde, narkotik ilaçlar yasaklı ilaç grubuna girerken, NSAİİ'lerin bu listede yer almaması bu ilaçların kötüye kullanılmasına neden olmaktadır (1,2). Atlarda kronik ağrıların tedavisinde NSAİİ'm tercih edilen ilk ilaç grubu arasında Metamizol Sodyum (MS, Dipiron) olduğu bildirilmektedir (3).

Atlardan alınan örneklerde ilaçların biyoizlenmesi ve doping kontrolü gibi amaçların dışında, atın çiftlik hayvanı olarak yetiştirildiği bazı ülkelerde de at serumunda ve plazmasında NSAİİ kalıntılarının tespiti için HPLC, LC-MS ve LC-MS/MS gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerin yaygınlaşması ile eski önemini yitirmiş özellikle de çok yüksek performanslı sıvı kromatografi (UPLC) cihazlarının kütle spektrometrisiyle (LC-MS/MS) birlikte kullanımı analiz süresini fazlasıyla kısaltmıştır. Ayrıca analiz maliyetini düşürmesi ve daha hassas analiz sonuçları vermesi nedeniyle oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir (4,5). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, birçok farklı canlının idrar ve plazma örneklerinden NSAİİ tespiti için örnekler alınmış ve analiz edilmiştir. Bu çalışmalarda özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi-kütle detektöründen oluşan kromatografi sistemlerinin kullanıldığı yöntemler ön plana çıkmıştır.

Bu çalışmada; literatürden farklı olarak, ülke ekonomisi için de çok önemli bir kaynak olan Saf kan Arap atlarına (*Equus ferus caballus*) uygulanan MS'un metabolitlerinin farmakokinetiğinin cinsiyet ve uygulama yollarına (damar içi (i.v.) ve kas içi (i.m.) göre nasıl değiştiğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. MS'un, erkek ve dişi atlarda uygulandıktan sonra alınan kan örneklerinden elde edilen plazma örneklerindeki tüm metabolitlerin konsantrasyonlarını belirlemektir. Ölçülen metabolitlere ait EAA, C_{doruk} , t_{doruk} , EAA₀₋₁₂, EAA_{0-∞}, EAAM, OKZ, $t_{1/2λz}$, V_{ssobs} , Cl, $λz$, $C_{lastobs}/C_{doruk}$, C_0 , V_z gibi farmakokinetik parametreler üzerinden cinsiyet ve uygulama yoluna göre değişimi irdelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non Steroid Antienflamatuvar İlaçlar

Non Steroid Antienflamatuvar İlaçlar (NSAİİ) yapısal olarak genellikle heterojen olmalarına rağmen benzer terapötik etki / yan etki gösteren ve birçok asit yapısında bulunan bir ilaç grubudur (6). NSAİİ'ler genellikle antipiretik, analjezik ve de antienflamatuvar etkileri nedeniyle kullanılmaktadırlar. Bu sebeple akut ağrılı, ateşli ve inflamasyonlu durumların yanında kronik ağrılı durumlarda da analjezik ve antienflamatuvar özelliklerinden faydalanılır (7). NSAİİ'lerden bazıları daha çok analjezik özellik gösterirken bazıları antienflamatuvar, bazıları da hem analjezik hem de antienflamatuvar özellikler gösterir (8).

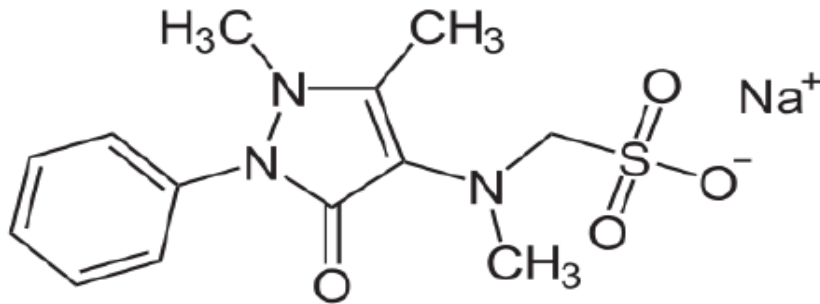
Enflamasyonda COX (Siklooksijenaz) ve lipoksijenaz enzim yolları aktive olmaktadır. COX enzim aktivitesi ile membran fosfolipitlerinden PG (Prostaglandin) sentezine giden yol kontrol edilmekte olup bu enzimin NSAİİ ile inhibisyonu yoluyla PG sentezi inhibe edilmektedir. Enflamasyonun inhibisyonunda klasik NSAİİ'lerin baskıladığı başlıca yol COX inhibisyonudur (9). COX enziminin yapısal (COX-1) ve indüklenebilir (COX-2) izoformları olmak üzere iki izoformu vardır. Yakın zamandaki araştırmalarda bir COX-3 izoformundan da bahsedilmektedir. Yapısal siklooksijenaz COX-1 damar endoteli, gastrik mukoza, trombositler ve renal tubulusler gibi birçok hücrede hücre sel homeostazda önemli fonksiyonu olan primer enzim formu olarak bulunmaktadır. Fizyolojik koşullarda COX-1 aktif durumdadır ve vasküler homeostazis, gastrik fonksiyonlar, trombosit aktivitesi ve renal fonksiyonlar gibi fizyolojik yanıtları düzenleyen PG'lerin üretimini sağlar. İndüklenebilir siklooksijenaz COX-2 normal fizyolojik durumlarda dokularda belirlenmez, ancak herhangi bir enflamasyon durumunda dokularda indüklenir, enflamasyona cevap olarak ortaya çıkar. COX-2 enflamasyon, ağrı ve ateş oluşturan PG'lerin üretiminde rol oynar (8).

NSAİİ'ler etkilerini ve yan etkilerini bu enzimlerin inhibisyonu yoluyla gösterirler. NSAİİ'lerin çoğu çeşitli derecelerde hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe ederler, böylece hem istenen etkiler hem de yan etkiler farklı düzeylerde ortaya çıkar. Selektif COX-2 inhibitörleri, COX-2'yi COX-1'e göre daha fazla inhibe etmekte fakat yüksek dozlarda COX-1 inhibisyonu artmaktadır. COX-1 inhibisyonuna bağlı yan etkilerden kaçınabilmek için son yıllarda 15 spesifik COX-2 inhibitörleri geliştirilmiştir. COX-2 inhibitörlerinin geliştirilmesindeki amaç, ağrı ve hiperaljezi ile ilgili PG'lerin

oluşumunun engellenmesi ve böylelikle gastrointestinal sistem mukozası, böbrekler ve damarlardaki PG formasyonlarını etkilememek ve normal fonksiyonlarının korunmasını sağlamaktır. Fakat uzun süreli çalışmalarda gözlenen kardiyak problemler nedeniyle bazı preparatlar piyasadan çekilmiştir (8). NSAİİ'lerin büyükçe bir kısmının, S (+) ve R (-) adlı enantiomerleri (izomerleri) mevcuttur. Genellikle S (+) enantiomer, COX inhibe edici aktiviteye sahiptir. Yalnızca S (+) enantiomer içeren NSAİİ'lerin güvenilirlik profiline yüksek olduğu çalışmalarla ispatlanmıştır (10).

2.1.1. Metamizol Sodyumun (Dipiron) Farmakolojik Özellikleri

Metamizol, pirazolon türevi ilaç grubu içerisinde yer alır ve Aminopirin'in 4-metilaminometansülfonat sodyum türevidir. Molekül ağırlığı 335.36 g/mol' dür. metamizolün kimyasal adı sodyum [(1,5-dimetil-3-okso-2 fenil pirazol 4-yl) metilamino] metansülfonat⁺ dır. Bunun yanında metamizol'ün bilinen diğer isimleri ise dipiron, analgin ve noramidopirin metansülfonat sodyumdur (11). Metamizolün kapalı formülü C₁₃H₁₈N₃NaO₄S' dir. Açık formülü ise Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Metamizolün açık formülü

Metamizol, 1900'lerin başından beri birçok farklı alanda kullanılan bir ilaç olmasına rağmen farmakolojik özellikleri detaylı olarak ancak son zamanlarda incelenmeye başlanılmıştır (3). Siklooksijenaz inhibitörü etkinliği ve antiinflamatuvar etkinliği zayıf, fakat analjezik etkinliği oldukça güçlüdür. Antinosiseptif etkisi opioid antagonisti nalokson ile kısmen inhibe edilebilir. Yapılan çalışmalarda metamizolün aynı zamanda antioksidan özelliği de taşıdığı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca analjezik etkisinin santral bir komponentinin olduğu bulunmuştur (12).

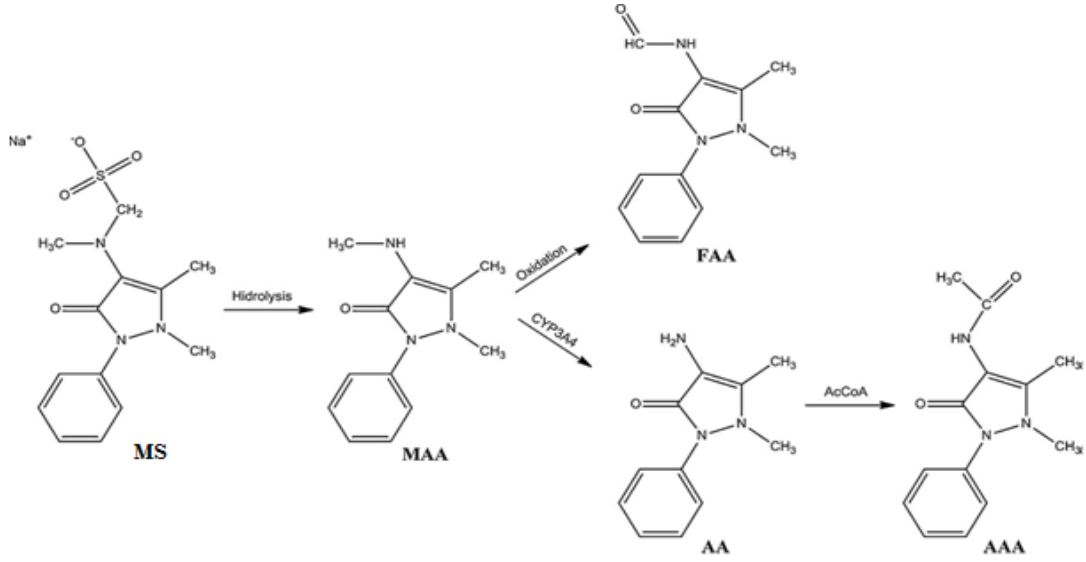
Metamizol uzun süre pirazol türevi olan analjeziklerden biri olarak NSAİİ grupta değerlendirilmiştir. Ancak yapılan farklı araştırmalar analjezik etkinin başka

sistemlerin aktivasyonu ile ilişkili olabileceği yönündedir (13). Metamizol, 6-14 yaş arasındaki çocuklarda günde 1-4 kez 250-375 mg iken 4 ay-5 yaş arası çocuklarda 1-4 kez 50-150 mg kullanılır. Yetişkinlerde kullanımı ise 0,5 gram ve günde 1-4 kez şeklindedir (11).

2.1.2. Metamizol Sodyumun Metabolitleri

MS suda kolayca çözünmesinden dolayı injeksiyonluk preparat yapılmaya oldukça elverişlidir. Ağızdan alındığında mide suyunda nonenzimatik olarak hızlıca aktif metaboliti olan 4-metilaminoantipirin (4-MAA)'e dönüşür. Sonrasında o şekilde mide-bağırsak kanalından emilir. Mide bağırsak kanalından emilim oranı % 85 civarındadır. İntravenöz verildiğinde kanda hemen 4-metilaminoantipirin (4-MAA)e dönüşür (14). 4-metilaminoantipirin karaciğerde 4-formilaminoantipirin ve 4-aminoantipirin'e dönüştürülür, son metaboliti ise N-asetilasyona uğrar. 4-MAA'nın eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 2.6-3.5 saat arasındadır. Metabolitlerin büyük kısmı böbreklerden atılır. Bazen böbrekte rubazon asidi metabolitlerinin oluşması sebebiyle idrarı kırmızıya boyar. Analjezik etkinliği ASA'ten yüksektir. Ayrıca antispazmodik etki potansiyeli de vardır (12).

Ağızdan tek seferde 500-1000 mg verilir, % 50'lik injeksiyonluk solüsyonları 1,2 ve 5 ml'lik ampuller halinde bulunur. 0.5- 2.5 gram dozunda intramüsküler şekilde injekte edilir, i.v. yoldan yavaş olarak injekte edilirse de bu yoldan kullanılması seyrek de olsa anafilaktoid şoka neden olduğu için pek tavsiye edilmez. Gerekirse i.v. yoldan 1 g'ı aşmayan dozda yavaş bir şekilde injekte edilerek verilebilir. Eğer uzun süre kullanılacaksa kan hücrelerinin sayısı periyodik olarak izlenmelidir. Metamizol şiddetli veya dirençli ağrı ve ateşin eşlik ettiği klinik tablolarda kullanılır (12). Metamizolun insanda ve sıçanda yapısı ve biyotransformasyonu Şekil 2.2' de gösterilmiştir (11).



Şekil 2.2. Metamizolün insanda ve sıçanda yapısı ve biyotransformasyonu. MS: metamizol; MAA: 4-metilaminoantipirin; AA: 4-aminoantipirin; FAA: 4-formilaminoantipirin; AAA: 4-asetilaminoantipirin.

2.2. Farmakokinetik Kavramı

Farmakokinetik, bir ilacın vücuda alınmasından vücut dışına atılmasına kadar olan tüm süreci içeren ve bunu etkileyen unsurların bütünü inceleyen bir bilim dalıdır. Aynı zamanda; Farmakokinetik etkin maddelerin saf veya dozaj şekilleri içinde organizmaya verilmişlerinden sonra, plazma, idrar, tükürük, lenf ve omurilik sıvısı gibi biyolojik sıvılarda oluşturduğu profilleri inceleyerek, bu profilleri matematiksel denklemlerle tanımlamaktadır (15). İlacın vücuda alınımından sonra emilim, dağılım, metabolize olma ve eliminasyon oranını tanımlar. Yani farmakokinetik kısaca vücudun ilaca ne yaptığıyla ilgilenmektedir (9,16).

2.2.1. Farmakokinetikte Olası Süreçler

2.2.1.1. Emilim

İlaç vücutta ilk olarak uygulanan yerden emilir yani emilime uğrar. Eğer ilaç oral yoldan kullanılıyorsa mide-bağırsak kanalından, dermal yoldan kullanılıyor ise epidermal tabakadan emilim söz konusudur, i.v. uygulamalarda ilaç doğrudan sistemik dolaşıma geçer bu yüzden emilim durumu gerçekleşmez (9,17).

Biyoyararlanım ile emilim oldukça sık karıştırılan terimlerdir. Biyoyararlanım, ilaçların emilim oranı ve derecesi olarak tanımlanırken nisbi biyoyararlanım, sistemik

dolaşıma geçen ilaç miktarının ağızdan alınan ilaç miktarına oranına denilmektedir. Sistemik biyoyararlanım "F" simgesi ile gösterilmektedir, biyoyararlanımın %100 olması durumunda, "F=1" olarak ifade edilmektedir (9,18).

Bir ilacın birim zamanda emilim hızı ve miktarı bireyler arası farklılıklar gösterir. Molekül yapısı büyük olan ilaçların emilimi daha yavaş gerçekleşmektedir, bu yüzden ilaçların emiliminde fizikokimyasal yapı oldukça önemlidir. Lipid/ su partiyon katsayısı ilacın hücre membranının lipid ortamında çözünme ölçüsü anlamına gelir. Bu katsayı ne kadar büyükse, ilacın emilimi de o kadar iyidir. Eğer ilaçlar iyonize halindedir ise bu ilaçlar lipidlerde fazla çözünmemektedir. Bu nedenle emilimleri oldukça zor olur. Bununla birlikte ilacın farmasötik şekli, kullanılan yardımcı maddeler, ilacın konsantrasyonu, farmakolojik özellikleri, uygulandığı yerdeki kan akım hızı ve ortam pH'sı ilacın emilimini etkileyen diğer önemli faktörlerdir (19). Örneğin; ortamın pH'sının azalması ile zayıf asitlerin iyonize olmayan oranları artmakta ve bu sayede emilimleri kolaylaşmaktadır. Zayıf bazik yapıda ilaçların ise, ortamın pH'sının azalması ile iyonize olmayan oranları azalmakta ve emilimleri güçlenmektedir (15,17).

İlacın lokal ve sistemik olmak üzere iki uygulama yolu bulunmaktadır. Bunlardan ilki olan lokal uygulamada epidermal (cilt üzerine), konjonktiva kesesi (göze), kolon, bukal (ağız içine), intranazal, bukal (ağız içine), rektal, intravajinal, dış kulak yoluna ilaç uygulamaları yapılır. Sistemik uygulamada ise, oral (ağızdan), parenteral (subkutan, intravenöz ve intramüsküler), inhalasyon, transdermal ve sistemik dolaşıma özgü nazal spreylere içermektedir. İlaç hangi bölgeye uygulanacaksa ona uygun olan farmasötik şekilde verilir. İlacın yağdaki ve sudaki çözünürlüğü, farmasötik şeklin katı veya sıvı oluşu, ilacın tuz halinde olması, kristal şekli, partikül büyüklüğü, solvasyon durumu, kompleks oluşumu, bağırsak motilitesi ve besin öğeleri emilimi etkileyen bir diğer unsurlardır. Tüm FK süreçlerinde ilacın membranlardan geçişi söz konusudur. Hücre membranlarından geçiş pasif difüzyon, pinositoz, fagositoz ve taşıyıcı araçlı transport şeklinde olabilmektedir. Bütün bu geçiş mekanizmalarındaki en önemli unsur ilacın çözünürlüğüdür. Bu sebeple öncelikle ayarlanması gereken şey ilacın çözünürlüğüdür (15).

2.2.1.2. Dağılım

İlaç, vücutta emilim sürecini tamandıktan sonra dağılım aşamasına geçer. Önce sistematik dolaşıma geçer sonrasında ise interstisyel (hücrelerarası) sıvıya dağılır.

İlaçların bazıları da hücre membranından organ ve dokulara geçerler. İlaçların bu şekilde yayılma sürecine farmakokinetikte dağılma fazı denilmektedir. Dağılma fazında pasif difüzyon ile hücre membranlarından geçiş söz konusudur. Bu geçiş kanın akış hızıyla doğru orantılı olarak artar. İlaç daha düşük oranda kanlanan yağ, kas ve cilt dokusu gibi yapılara yayılarak denge haline gelmektedir.

İlaçların beyin–omurilik sıvısı (BOS)’na geçişinde iki önemli unsur vardır. Bunlardan ilki lipofilitesi diğeri ise molekül büyüklüğüdür. Membranda bulunan taşıyıcı proteinler sadece belirli moleküllerin geçişine izin vermektedir. Bu nedenle bu bölgeye "Kan Beyin Engeli" (KBE) denilmektedir.

İlacın dağılım hızı, fizikokimyasal yapısı, kan akım hızı ve aynı zamanda plazmadaki proteinler gibi makromoleküllere bağlanmasıyla bağlantılı olarak değişir. Proteinlerin ilaç bağlanması geri dönüşümlü bir olaydır. Ancak bazı durumlarda proteine bağlanma noktası aynı olan ilaçlar bir arada kullanılırsa bağlanma için bir yarış söz konusu olur (16). Eğer proteine bağlanma noktası kısıtlı ise, bir süre sonra plazma proteinine bağlanma (PPB) doymuş hale gelmektedir. Bunun neticesinde ilacın sonraki doz uygulamasında plazmada serbest ilaç yüzdesi artış göstermektedir. İlaç düzeylerinin ölçümünde toplam ilaç düzeyi yani proteine bağlı ilaç ve serbest ilaç fraksiyonu birlikte ölçülmektedir. Ancak ilacın etki yöresindeki düzeyinin göstergesi ilacın serbest fraksiyonudur. Hipoalbuminemi gibi durumlarda ilacın toplam plazma düzeyine bakarak doz düzeyi incelenmesi istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir (15).

Bunlara ek olarak; ilacın dağılımı, ağırlık ve yaşa göre değişiklik göstermektedir. Bu sebeple organ hacimleri ve vücut sıvılarındaki farklılık ilacın dağılımı ile birlikte etki yerindeki düzeyinde de farklılıklara sebep olmaktadır (9,15).

2.2.1.3. Eliminasyon ve metabolizması

İlaçlar değişmemiş veya metabolitleri halinde vücuttan çeşitli yollarla atılırlar. Eliminasyon süreci; ilacın metabolitlerine ayrılması (biyotransformasyon) ve sonrasında ilacın kendisinin ve/veya metabolitlerinin vücuttan atılması (itrah) süreçlerini kapsamaktadır (15).

İlaç ve metabolitlerin atılmasında böbrekler, sindirim kanalı, akciğer ve deri gibi birçok organ görev alır. Gaz ve buharlar akciğer yoluyla atılırken, ilaçların bazıları süt, ter, tükürük, kıl, deri vb. yollarla da atılırlar. Ayrıca safrayla salgılananların çıkarılmasında dışkıda önemli bir atılma yoludur (17).

Biyotransformasyon: İlaçların vücutta enzimlerin etkisi ile kimyasal değişikliklere uğrayıp metabolize edilmesine biyotransformasyon denilir. Biyotransformasyon sonucu ilaç çeşitli bileşiklere ayrılır. Bu ayrılan ilaçların bileşiklerine metabolit denilir. İlacın vücuttan daha kolay uzaklaştırılabilmesi ve suda daha çözünebilir hale getirilmesi için ilacın metabolize olması önemlidir. Biyotransformasyon sonucu, ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline dönüştürülürken (biyoinaktivasyon olayı) bazı ilaçlar daha az etkili ve/veya daha toksik bileşiklere de dönüşürler (16).

Atılma: İlaç eliminasyonunun bir diğer ögesi de atılma olayıdır. İlaçların ve metabolitlerinin vücuttan atılmasında başlıca rol böbreklerdeki Glomerüler filtrasyon (GF) ve tübüler salgılanma (TS) ile böbreklerden atılım gerçekleşir. Ayrıca itrahi azaltan bir olay yani tübüler geri emilim mekanizması bulunmaktadır.

Safra ile atılımda karaciğerden salgılanan ilaç ve metabolitlerinin önce ince bağırsağa gönderilir oradan da feçes yoluyla atılımı gerçekleşir. Bazen safradan ince bağırsağa gelen bazı ilaç molekülleri karaciğer ve dolaşım sistemine geri dönebilirler, bunun sonucunda ilaç ya da metabolit(ler)i reabsorbedir (Entero-hepatik döngü). İlaçların karaciğerden safra içine salgılanması pasif difüzyon ve aktif transportla sağlanmaktadır. Aktif transport mekanizması pasif difüzyona göre daha iyi bir atılım sağlamaktadır. İlaçların safra ile atılması molekülün polaritesine, kimyasal yapısına ve molekül ağırlığına bağlıdır.

Bazı ilaçlar karaciğere taşındıktan sonra burada enzimler aracılığıyla inaktif veya aktif metabolitlerine dönüştürülmekte ve bu metabolitler safra kanalı aracılığıyla elimine edilerek sistemik dolaşıma katılmadan vücuttan atılmaktadır. Bu olaya “ilk geçiş etkisi” (presistemik eliminasyon) denilmektedir. Ancak bu durum az miktardaki ilaç için geçerlidir (9,15).

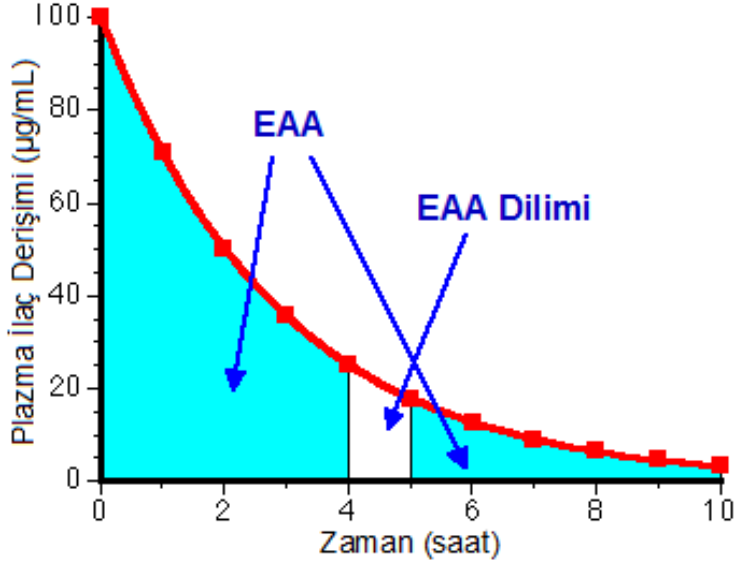
2.2.2. Farmakokinetikte Kinetik Kavramlar

2.2.2.1. Eğri altı alan, (E.A.A)

Organizmada bulunan ilacın global miktarı Eğri Altı Alan (EAA) olarak gösterilmektedir. Eğrinin altındaki alan “ilacın biyoyararlanımı”nın bir göstergesidir. EAA'nın hesaplanması için önceden belirlenen zamanlarda örnek alınmaktadır. İlacın kan düzeylerinin ölçümü yapıldıktan sonra zamana karşı plazma derişimi grafiği çizilmekte, derişim noktaları birleştirilerek eğri çizilmektedir. Modelsiz bir FK'de, EAA

hesaplama için "Lineer Yamuk (trapezoid) Kuralı" ve "Log–Lineer Yamuk Kuralı" olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır (15,20).

Şekil 2.3' de i.v. yoldan verilen bir ilacın 11 kan örneği alınarak çizilen plazma derişimi – zaman eğrisi ve lineer yamuk yöntemi ile EAA hesaplanması gösterilmektedir.



Şekil 2.3. i.v. yoldan verilen bir ilacın 11 kan örneği alınarak çizilen plazma derişimi – zaman eğrisi ve lineer yamuk yöntemi ile EAA hesaplanması

Şekilde görüldüğü gibi iki zaman noktasına $t_{(i-1)}$ ve t_i , iki derişime de sırasıyla $C_{(i-1)}$ ve C_i denilecek olursa EAA aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

- $EAA[t_{(i-1)} - t_i] = \frac{1}{2}[t_{(i-1)} - t_i][C_{(i-1)} + C_i]$ (Lineer yamuk kuralına göre EAA eşitliği)

Log–lineer yamuk kuralına göre ilaç düzeyinin üssel olarak azaldığı kabul edilmektedir. Aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

- $EAA[t_{(i-1)} - t_i] = \frac{1}{2}[t_{(i-1)} - t_i] \frac{C_{(i-1)} - C_i}{\ln(C_{(i-1)})/C_i}$ (Log–lineer kuralına göre EAA eşitliği.)

Tek kompartmanlı bir modelde EAA şu şekilde hesaplanmaktadır:

- $EAA = C_0 / k_{el}$ (Tek kompartmanlı modelde EAA eşitliği)

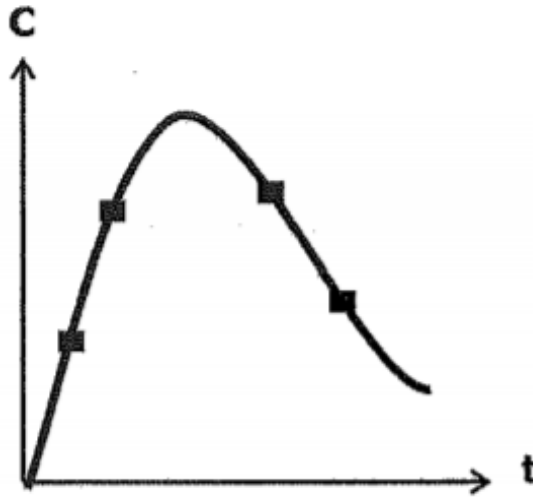
EAA hesaplamasında k_{el} 'de (eliminasyon sabiti) eliminasyon fazında yer alan son nokta ile tahmin edilebilir. Bu eşitlikte C_n , son örneğin plazma derişimidir (15).

- $EAA = C_0 / k_{el} = EAA + C_n / k_{el}$ (Sıfır zamanından t zamanına kadar elde edilen yamuklarla hesaplanan EAA eşitliği)

2.2.2.2. Plazma doruk derişimi (C_{doruk})

Plazma doruk derişimi; Plazmada izlenen en yüksek derişimi ifade eder. Ayrıca emilim hızının bir göstergesi olarak kabul edilir ve biyoyararlanımda da değerlendirilir. Bu nedenle oldukça önemli bir parametredir ve deneysel C_{doruk} ve kestirim C_{doruk} olmak üzere iki C_{doruk} 'tan söz konusudur:

Deneysel C_{doruk} : Deneysel verilerden elde edilen en yüksek değerdir. Araştırmalarda bu kabul edilir, fakat bu durumda farmakokinetik deneyin iyi tasarlanmış olmasını gerektirir. Deneysel noktalar arasında çok aralıklar varsa, gerçek C_{doruk} iki nokta arasında kalabilir. Şekil 2.4' te hatalı tasarlanmış deneysel noktalar grafiği verilmiştir.



Şekil 2.4. Hatalı tasarlanmış deneysel noktalar

Kestirim C_{doruk} : Farmakokinetik modelleme sonrasında elde edilen denklemden bulunan C_{doruk} 'dur. Kestirim C_{doruk} 'da daha tutarlı sonuç alınması beklenir. C_{doruk} , doğal olarak alınan dozun bir fonksiyonudur ve doğrusal farmakokinetiğe uyan ilaçlar için doza bağlı olarak değişir, bu nedenle doza bağımlı bir parametredir (20).

2.2.2.3. Plazma doruk süresi (t_{doruk})

Plazma doruk süresi (t_{doruk}); Plazma seviyesinin C_{doruk} ' a çıkabilmesi için gerekli olan süreyi gösterir ve kantitatif değil, kalitatif bir biyoyararlanım parametresidir. Bunun nedeni, t_{doruk} 'un kolay belirlenememesidir. Değeri, çoğu oral ilaç için 2-4 saat dolaylarında olmakla beraber, denekler arası değişimi yüksektir. Ayrıca, ilaçla beraber alınan besin miktarı ve türü bu değeri etkilemektedir, emilme hızıyla ters orantılı bir parametredir.

2.2.2.4. Ortalama kalış zamanı (OKZ)

Organizmaya verilen etkin madde moleküllerinin her biri organizmayı farklı zamanlarda terk eder. Bütün bu moleküllerin organizmada kaldıkları sürelerin ortalaması “Ortalama Kalış Zamanı”nı ifade eder (20).

2.2.2.5. Biyolojik yarı ömür, ($t_{1/2}$)

Biyolojik yarı ömür ($t_{1/2}$); ilacın kan düzeyinin yarıya düşmesi için gereken süreyi ifade eder. İlacın birikme zamanı, eliminasyon süresi ve doz aralığının belirlenmesini sağlamaktadır. İlacın dağılma fazı (α) ve hem eliminasyon fazı için iki ayrı yarılanma ömürleri vardır. Bu fazlar $t_{1/2\alpha}$ ve $t_{1/2\beta}$ ' dir. Sadece $t_{1/2}$ simgesi eliminasyon yarılanma ömrünü göstermektedir ve buna terminal yarılanma ömrü de denilmektedir. İlacın tekrar dağılması sonucu kandaki düzeyinin azalması durumu varsa; ilacın $t_{1/2\alpha}$ 'sı, eliminasyon yarılanma ömrüne göre daha ön plana çıkmaktadır (15).

2.3. Metamizol Sodyumun Farmakolojik Özellikleri

2.3.1. Farmakodinamik Özellikler

Metamizol'ün analjezik, antipiretik ve antispazmodik gibi vücuda birçok etkisi mevcuttur. Metamizol kombine bir santral ve periferik etki şekline sahip olduğu düşünülmektedir. Afferent lifler, omurilik ve periakvaduktal gri madde düzeyindeki santral etki mekanizmaları metamizolün analjezik etkisine katkıda bulunabilir (20).

2.3.2. Farmakokinetik Özellikler

Metamizol ve metabolitlerinin farmakokinetiği ilgili çalışmalar özellikle son yıllarda artmıştır. Metamizolün Emilimi, biyotransformasyonu, dağılımı ve eliminasyonu şu şekildedir.

Emilim: İlacın oral uygulanmasından sonra metamizol, tamamen aktif metaboliti olan 4-N-metilaminoantipirine (MAA) hidrolize olur. MAA'nın mutlak biyoyararlanımı ise yaklaşık olarak % 90'dır ve oral uygulama sonrası intravenöz uygulamaya oranla kısmen daha yüksektir. Metamizol eğer besinlerle birlikte alınırsa MAA'nın farmakokinetiğinde önemli bir değişiklik olmaz (20,21).

Biyotransformasyon: Klinik etkiyi temel olarak MAA ve bir dereceye kadar da 4-aminoantipirin (AA) sağlar. AA'nın yaşlılarda ilaca maruz kalma (EAA) değerleri MAA'nın EAA değerinin yaklaşık % 25'i kadardır. 4-N-asetilaminoantipirin (AAA) ve 4-N-formilaminoantipirin (FAA) gibi metabolitlerin ise klinik etkileri neredeyse yok gibi görünmektedir. Tüm metabolitler için lineer olmayan bir farmakokinetik gözlenir. Bu verinin klinik önemi hakkında bir yargıya varılabilmesi için bu alanda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Kısa süreli tedavide metabolitlerin birikiminin fazla bir klinik anlamı yoktur (19,21).

Dağılım: Dağılım aşamasında proteine bağlanma düzeylerine bakıldığı zaman, MAA için % 58, AA için % 48, FAA için % 18 ve AAA için % 14 kadardır. Bir intravenöz doz sonrası metamizolün plazma yarılanma ömrü ise ortalama 14 dakika dolaylarındadır.

Eliminasyon: Radyoaktif işaretli intravenöz dozun ortalama % 96'sı idrar, % 6'sı ise feçes yoluyla atılır. Tek bir oral dozdan sonra metabolitlerin % 85'i idrarla atılmış ve bunun % 3±% 1'i MAA, % 26±% 8'i AAA, % 6±% 3'ü AA, ve % 23±% 4'ü FAA'dan oluşmuştur. 1 g'lık tek bir oral metamizol dozundan sonra renal klerens MAA için 5 mL±2 mL/dk., AAA için 61 mL±8mL/dk., AA için 38 mL±13 mL/dk., ve FAA için 49 mL±5 mL/dk olmuştur. Aynı dozdan sonraki plazma yarılanma ömürleri ise MAA için 2.7±0.5 saat, AAA için 9.5±1.5 saat AA için 3.7 ±1.3 saat ve FAA için 11.2±1.5 saat kadardır.

Araştırmalar incelendiğinde; tüm metabolitler için doğrusal olmayan bir farmakokinetik gözlenir. Bu bulgunun klinik önemi hakkında bir yargıya varılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (21).

2.3.3. Klinik Öncesi Güvenlik Verileri

Akut toksisite: Metamizolün sıçan ve farelerdeki en düşük letal dozları; ağız yoluyla alımda yaklaşık 4000 mg/kg vücut ağırlığı iken intravenöz olarak yaklaşık 2300 mg metamizol/kg vücut ağırlığı veya 400 mg MAA/kg vücut ağırlığıdır. Ayrıca intoksikasyon belirtileri taşipne, sedasyon dur.

Kronik toksisite: Metamizolün, köpeklerde günlük 50 mg/kg, sıçanlarda ise günlük 150 mg/kg canlı ağırlık dozlarında 4 hafta boyunca uygulanması tolere edilmiştir. Farklı hayvan türlerinde subkronik ve kronik toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sıçanlarda 6 ay boyunca 100-900 mg/kg/gün canlı ağırlık dozunda metamizol uygulanmış, en yüksek dozda (900 mg/kg), 13. haftadan sonra retikülositlerde ve Heinz cisimciklerinde artış belirlenmiştir.

Köpeklerde ise 6 ay süresince 30-600 mg/kg/gün canlı ağırlık dozajında metamizol uygulanmış, 300 mg/kg/gün dozlarından itibaren, doza bağlı hemolitik anemi, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında bozulmalar gözlenmiştir. Her iki cinse daha yüksek doz verildiğinde, serum kimyasında değişikliğe, karaciğer ve dalakta hemosiderozise sebep olmuş; ayrıca kemik iliği toksisitesi ve anemi de belirlenmiştir. In vitro ve in vivo deneyler, aynı test sistemlerinde metamizol için güvenilirliği kesin olmayan sonuçlar vermiştir.

Karsinojenite: Sıçanlarda uzun süre gerçekleştirilen çalışmalarda her hangi bir karsinojenik potansiyel bulguya rastlanmamış olup uzun süreli gerçekleşen üç çalışmadan ikisinde yüksek dozlarda karaciğer hücreli adenomlarda artış bildirilmiştir.

Mutajenite: Literatürde pozitif ve negatif sonuçlar tanımlanmıştır. Ancak belirtilen Hoechst dereceli materyal ile yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalar mutajenik potansiyele ilişkin herhangi bir bulgu göstermemiştir.

Üreme toksisitesi: Tavşan ve sıçanlarda yapılan embriyotoksosite çalışmalarında teratojenik potansiyel gösterilmemiştir. Tavşanlarda, maternal toksisite göstermeyen 100 mg/kg/gün dozunda letal etkiler bildirilmiştir. Sıçanlarda fatal embriyotoksik etkiler, maternal toksisite gözlenen doz aralığında ortaya çıkmıştır. Sıçanlarda 100 mg/kg/gün'den fazla olan dozlar, gestasyon süresinde artışa ve doğum sürecinde bozulmayla beraber, yavrularda mortalite artışına sebep olmuştur. Fertilite testlerinde, 250 mg/kg/gün'den fazla olan dozlarda döl veren jenerasyonun gebelik oranında kısmen bir azalma gösterilmiştir. F1 jenerasyonun fertilitesinde etkilenmemiştir (21).

2.4. İlaç Analizleri ile İlgili Yapılan Literatür Çalışmaları

Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından hazırlanan ve güncellenen, yarışmalar sırasında ve serbest zamanlarda kullanımı yasaklı ilaç gruplarını ve analiz yöntemlerini içeren listelerde yer almayan, ancak atlarda kullanımı suistimal edilen bazı NSAİİ (naproksen, asetilsalisilik asit, benzidamin, bufeksamak, diklofenak sodyum, diflunisal, eltenak, etodolak, etorikoksib, felbinak, fenilbutazon, flufenamik asit, fluniksin, flurbiprofen, ibuprofen, indometazin, indoprofen, karprofen, ketoprofen, ketorolak, meklofenamik asit, mefenamik asit, meloksikam, mofebutazon, niplumik asit, nimesulid, oksifenbutazon, piroksikam, ramifenazon, selekoksib, sulindak, tenoksikam, tiaprofenik asit, tolfenamik asit, tolmetin, valdekoksib ve vedaprofen) atlara ait biyolojik örneklerden kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen nicel ve nitel analizleri ana hatları ile belirtilmiştir.

Atlarda gerek tedavi amacıyla gerekse doping olarak kullanılan etken maddelerinin biyoizlenmesinin yapıldığı laboratuvarlarda UV ve floresans detektörlü HPLC sistemlerinin kullanımı, HPLC-UV-PDA ve LC-MS/MS ile oluşan kromatografi sistemlerinin yaygınlaşması ile eski önemini yitirmiştir. Bu yöntemler, diğer kromatografik yöntemlerle hiç tespit edilemeyen veya zorlukla tespit edilen yasaklı ilaçların ölçülebilirliğini mümkün hale getirmiştir. Özellikle zaman alan, iş gücü gerektiren türevlendirme işlemlerini gereksiz kılmış, analizden önce hidrolizi gerçekleştirilen konjuge metabolitleri de hidrolize uğratmaksızın tayin edebilme kolaylığı sağlamıştır. Çok yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (UPLC) kütle spektrometrisiyle birlikte kullanımının; analiz süresini çok kısaltması, analiz maliyetini düşürmesi ve daha duyarlı analiz sonuçları vermesi nedeniyle çok çabuk benimsendiği belirlenmiştir. UV detektör ile kombine edilmiş kromatografik sistemlerle yapılan analizlerde tayin alt limitleri mg/mL düzeyinde belirlenirken kütle detektörün LC ya da GC ile birlikte kullanılması durumunda daha duyarlı analizler yapılabildiği ve tayin alt limitleri µg/mL düzeyinde ölçüldüğü bildirilmiştir.

Driessen ve ark.'a göre attaki ağrı yönetimi tedavisi çoğunlukla sistemik veya lokal/ bölgesel ilaç tedavisi ile giderilmektedir. NSAİİ'lar, opioidler, alfa-adrenoseptör agonistleri ve atların ağrı tedavisinde kullanılan başlıca ajanlar lokal anesteziplerdir. Bu incelemede kısaca şu anda kullanımda olan analjezik ilaç sınıflarının temel

farmakolojisini incelenmiştir. Uzun süreli ağrı kesici ilaçlar ile analjezi uygulandığında ağrıların önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (22).

Dirikolu ve ark. safkan atlarda yarışlar esnasında kas iskelet sisteminde birçok yaralanmaların olduğunu, yaralanmaların 84 ölümcül ve 126 ölümcül olmayan vaka halinde meydana geldiğini rapor etmektedirler. Bu çalışmada, yaralı atlarda NSAİİ konsantrasyonlarının kontrol atlarındaki konsantrasyonlara göre karşılaştırılması ile atların kas iskelet sistemi yaralanmalarında antiinflamatuvar ajanların olası rolü araştırılmıştır. Yarışma sonrası veteriner hekim tarafından her saf kan at için oluşan yaralanmalar kayıt altına alındığı belirtilmektedir. Yaralı atlardan alınan kan örnekleri heparinli tüplere alınmış ve NSAİİ'ler analiz edilinceye kadar uygun koşullarda saklanmıştır. HPLC'de analizi edilirken, hareketli faz olarak farklı çözen karışımları kullanıldı. Gradiyen faz uygulanarak; A çözeltisinden % 60 aseton A (Asetonitril) ve B çözeltisinden % 40 (% 12.5 metanol,% 43.75 1% asetik Asit ve % 43.75) ve 0.1 M amonyum asetatın oluşan çözelti karışımı kullanılmıştır. Yaralanan atların fenilbutazon ve flunixin plazma konsantrasyonlarının, kontrol atlarından göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Ancak naproksen ve metabolitleri tespit edilememiştir. Sonuç olarak, kas iskelet yaralanmalarında NSAİİ'lerinin atlarda risk oluşturup oluşturmadığını belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerektiği ifade edilmiştir (23).

Yapar ve ark. farelerde 20, 50 ve 100 mg/kg/günx7 gün dozlarında MS'un i.m. uygulama sonrası serum üre, kreatin, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalen fosfataz (ALP) enzim aktiviteleri ile karaciğer ve böbrek doku malondialdehit (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Serum üre ve kreatinin düzeyleri ile ALT, AST ve ALP aktiviteleri ile karaciğer ve böbrek dokusu MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar belirlenirken ($p<0.05$), en yüksek MS uygulanan grubun GSH düzeyinde kontrol ve diğer iki gruba göre düşüklük tespit etmişlerdir ($p<0.05$). Sonuç olarak kısa süreli de olsa yüksek doz (100 mg/kg) olarak verilen MS'un karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde hasara neden olabileceğini vurgulamaktadırlar (18).

Yıldırım ve ark. yaptıkları çalışmaya göre; Hayvanlara 25, 50 veya 100 mg/kg dozlarında 3 gün süre ile intraperitoneal nabumeton veya dipiron enjeksiyonu uygulanmış olduğu ifade edilmiştir. Nabumeton, doza bağımlı olarak

dietilditiyokarbamat- mukus sekresyonunu indüklediğini ve stres kaynaklı ülser indeksini özellikle düşük dozda inhibe ettiğini belirtmişlerdir (24).

Ramírez ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada, plazma numunelerinden (50-100 µL) katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak, 4-metilaminoantipirin (MAA), 4-Asetilaminoantipirin (AAA), 4- Aminoantipirin ve 4-formilaminoantipirin (FAA) olmak üzere dört metamizol metabolitini yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle analiz edilmesini incelenmişlerdir. Tüm metabolitler için standart kalibrasyon grafikleri: 1-100 µg/mL aralığında doğrusal olduğu ($r^2 \geq 0.99$) belirtilmiştir. Gün içi ölçüm doğruluk aralığının % 0.6-9.6 arasında değiştiği belirlenmiştir. SPE kartuşları 6 mL metanol ve 6 mL damıtılmış su ile şartlandırılmıştır. 50-100 µL örnek doğrudan kartuşa yüklenmiş ve sonrasında 1 mL / dk'lık bir akış hızında, 3 mL metanol ile analitlerin elüe edilmiştir. Eluatlar 45 °C' de bir su banyosu içinde kuruyana kadar buharlaştırılmış ve alta kalan kısmın üzerine 50-100 µL mobil faz eklenmiş ve ardından HPLC sistemi ile 25 °C ve 254 nm' de analiz edilmiştir. Sonuç olarak bu yöntemin sıçanlarda MS metabolitlerinin farmakokinetiğini belirlemek için uygun olduğu ifade edilmiştir (25).

Yılmaz ve Elmas enrofloksasin içeren ve ülkemizde % 10'luk enjektale şeklinde satışa sunulan ürünlerden ikisinin 6 adet sağlıklı (12-18 aylık/ 340-400 kg) İsviçre esmeri düvelerde tek doz çapraz dizayn esasına göre tek doz 2.5 mg/kg i.m. uygulama sonrası biyoeşdeğerliğini (BE) değerlendirmişlerdir. Uygulama öncesinde 0. dakika ve sonrasında 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalar ile 2, 3, 4, 6, 8, 12 ve 24. saatlerde kan örnekleri toplanmış, plazma enrofloksasin düzeyleri HPLC'de ölçülmüştür. Her hayvan için ayrı ayrı çizilen plazma konsantrasyonu-zaman grafiklerinin iki kompartmanlı dışa açık modele uygunluk gösterdiği, tüm farmakokinetik parametrelerin bu esasa göre hesaplandığını bildirmektedirler. Farklı firmalara ait ilaçların BE'lik değerlendirmesinde temel alınacak parametrelerden sadece $EAA_{(0-24)}$ ve $EAA_{(0-\infty)}$ birbirlerinden istatistiksel olarak farklı oldukları tespit edilmiştir. Verilerden t_{doruk} dışındakilerin hepsi logaritmik dönüşüm yapıldıktan sonra her iki ürünün değerleri birbirlerine oranlanarak $\mu B/\mu A$ % 90 güvenle BE'lik için gerekli olan 0.7-1.43 aralığında olduğu görülmüş, log dönüşüm yapılmayan t_{doruk} değerinin ise 0.8-1.25 sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, iki ürünün BE oldukları, endike oldukları alanlarda birbirlerinin yerine kullanılabilecekleri bildirilmektedir (18).

Yılmaz yaptığı çalışmada; veteriner ilaçlarında, biyoeşdeğerlik çalışmalarının gerektiği durumlar, çalışma tipleri, tasarımları gibi değerlendirme ölçütleri analiz edilerek yapılan çalışmalar özetlemiştir. Ayrıca çalışmada, veteriner ilaç piyasası açısından önemli olduğuna inanılan en değerli kalite kontrol testinin ülkemizdeki bilim insanları tarafından rahatlıkla gerçekleştirilebilirliğinin göstergesi olarak yapılan çalışma sonuçları sunulmuş ve yasal düzenlemelerin gecikmeden yapılması gerekliliği bir kez daha vurgulanmak istenmiştir. Biyoeşdeğerliği test etmek için kandaki etkin madde konsantrasyonunun zamana bağlı olarak çizilmesi tavsiye edilmiştir. Biyoeşdeğerlik denemeleri, birincisi klinik (uygulama) diğeri de gerekli analizlerin yapıldığı (biyoanalitik) olmak üzere iki dönem halinde yürütüldüğünü belirtmiştir. Bir veteriner ürününün biyoeşdeğerliği sistemik dolaşıma katılan etkin maddenin hız ve miktarıyla tarif edilmesi gerektiği, hız ve miktarı belirleyen en önemli parametrelerin ise eğrinin altındaki alan (EAA), doruk konsantrasyon (C_{dorum}) ve doruk konsantrasyon zamanı (t_{dorum}) olduğu belirtilmiştir. EAA aynı zamanda emilen ve dolayısıyla sistemik dolaşıma giren yani yararlanılabilir olan miktarın bir göstergesi olup emilme hızından bağımsız olduğu belirtilmiştir. Uygulama sonrasında ilacın kanda ilk tespit edildiği zaman noktasından (EAA_0) ilacın son ölçülebildiği zaman noktası (EAA_{∞}) arasındaki toplam alan ($EAA_{0-\infty}$) olarak tanımlanmakta olduğunu ve EAA'ın hesaplanmasında da lineer veya logaritmik metotlar kullanıldığı ifade edilmiştir. Eğer bir ürün için en uygun t_{dorum} biliniyorsa veya elde bir pilot çalışma varsa t_{dorum} 'a yakın noktalarda çoğaltılmış örnekleme sıklığıyla yapılan bir biyoeşdeğerlik çalışması, C_{dorum} ve t_{dorum} 'un önemini artırır. Plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi çoklu doruk sergiliyorsa veya eğri düz ve uzun biçimde ise C_{dorum} ve t_{dorum} 'u belirlemek zor olacağından, ilaç emilme hızıyla ilgili parametreleri belirlemek de zor olabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmaya göre; biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak hayvan sayılarının (en az, en fazla) yönetmeliklerle sabitleştirilmesi araştırmacıların deneysel tasarımlarının düzenlenmesinde, sonuçların hesaplanmasında ve kararların kesinliğinde yararlı olacağı belirtilmiştir (19).

Giorgi ve ark. yaptığı çalışmada MS'un birincil metaboliti olan MAA'nın hızla hidrolize edildiği, MAA'nın diğer küçük metabolitlere kıyasla çok daha büyük miktarlarda oluştuğunu belirtmektedirler. Koyunlarda 20 mg/kg MS i.v. ve i.m. uygulama sonrası MAA'nın farmakokinetik profilini incelemişler, 12 koyun, 2 x 2 çaprazlama çalışmasına göre iki eşit muamele grubuna rastgele ayrılmış, kan örnekleri

önceden belirlenen zaman dilimlerinde 36 saatte toplanmış ve plazma, HPLC- UV yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmalarda, MS'un uygulamasından sonraki plazma konsantrasyonları, tüm koyunlarda 5 dakika ila 8 saat arasında saptanabilmiştir. Gruplar arasında, maksimum konsantrasyon (C_{doruk}) ve maksimum konsantrasyona kadar olan zaman (t_{doruk}) ($P < 0.01$) arasında iki önemli farklı parametre olduğu belirtilmiştir. i.m. AUC / i.v. AUC oranının 1.12 olduğunu, i.m. ve i.v. MS uygulanmanın MAA'da klinik olarak anlamlı fark göstermediğini, koyunlarda MS'in güvenilirlik ve etkinlik profilini değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadırlar (26).

Tanyıldızı ve Bozkurt 75 ve 50 dozlarında asetilsalisilik asit ve 50 mg/kg metamizol uygulamasının koçlara semen kalitesi ve sperm hiyalüronidaz aktivitesi üzerine etkilerini test etmişler, asetilsalisilik asit ve metamizolün koçlarda sperma hiyalüronidaz aktivitelerini anlamlı olarak arttığını belirlemişlerdir. Ek olarak, her iki gruptaki sperm motilitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını, sırasıyla asetilsalisilik asit ve metamizolün koçların sperm konsantrasyonlarında ve sperm hacimlerinde belirgin azalma yaptığını vurgulamaktadırlar. Sonuç olarak, asetil salisilik asit ve metamizol kullanımının, sperm hiyalüronidaz aktivitesi ve sperm hareketlerinde artışa neden olsa da, bu ilaçların 6 gün süreyle kullanımının sperm konsantrasyonlarını ve sperm hacmini azalttığını, bu nedenle bu ilaçların koyunculukta sürüye koç katımı sırasında kullanılmasının uygun olmadığını tespit etmişlerdir (27).

Gökçimen ve ark.'a göre; MS bir ön ilaç olması dolayısıyla, yapılan in-vitro çalışmalarda siklooksijenaz enzimini etkilemediği belirtilmiştir. Bu çalışmada, kas içine verilen metamizolün sıçan karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, kontrol ve deney gruplarında 10'ar hayvan bulunmakta olduğu ve hayvanlara ise 5 gün boyunca metamizol verildiği belirtilmiştir. Birinci gün, bütün deney gruplarına 200 mg/kg dozunda kas içi MS uygulanmıştır. İkinci gün, birinci gruptaki iki hayvan eter anestezisi altında açılmış ve bunlara ait karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları alınarak, % 10' luk formol çözeltisi içinde tespit edilmiştir. Geriye kalan dört gruba ise, yine aynı dozda MS verilmiştir. Çalışmanın üçüncü gününde, ikinci gruptaki iki hayvan gibi eter anestezisi altında bu hayvanların dokuları daha öncekiler gibi alınarak tespit edildiği belirtilmiştir. Geriye kalan üç gruba, aynı dozda MS verilmeye devam edilmiştir. Dördüncü, beşinci ve altıncı günlerde, geriye kalan üç grup aynı işlemlerden geçirilerek, bunlara ait dokular alınmıştır. Kontrol

grubundaya, sadece kas içi serum fizyolojik enjekte edildiği ifade edilmiştir. Eter anestezisi altında, hayvanlardan alınan doku ve kan örnekleri histopatolojik inceleme yapılmış ancak, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Dolayısıyla, buradan metamizolün veya benzeri NSAİİ'lerin kısa vadede güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi sonucuna ulaşıldığı ifade edilmiştir (28).

Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada; keçilerin kas sistemi, yağ, karaciğer ve böbrek numunelerindeki dipiron (DIP) metabolitlerinin saptanması için yüksek hassasiyetli güvenilir bir yöntem olan LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Analitler, Oasis MAX SPE kartuşu kullanılarak saflaştırılmıştır. Metabolitlerden aminoantipirin (AA), 4-formilaminoantipirin (FAA) ve 4-asetilaminoantipiron (AAA) 0,40-6.00mg/kg arasında değişirken, Metilaminoantipiron (MAA) için 10.0-125,0 mg/kg arasında değiştiği ifade edilmiştir. Geliştirilen yöntemle, örnek grubu olarak kullanılan keçi dokularında DIP metabolitlerinin belirlenmesi başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir (29).

Jedziniak ve ark. yaptıkları çalışmada; anti-inflamatuvar ilaç kalıntılarını (16 NSAİİ, dört metamizol metaboliti ve beş kortikosteroid) belirlemek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Numune hazırlamanın ilk aşamasında, öğütülmüş kas örneklerine asetat tamponu ilave edilmiş ve 15 dakikalık ultrasonik banyoda bekletilerek enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Bu ekstrakt ayrıldıktan sonra numunelerdeki analitler iki kez asetonitril ile yeniden ekstrakte edildikten sonra ekstraktlar birleştirilmiş ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilmişlerdir. Analitler metanol / asetonitril (8: 2) ve 0.05 M amonyum format çözelti karışımı ve gradiyen bir akış kullanılarak LC-MS/MS ile tespit ve tayin edilmiştir. Kullanılan yöntem, 2002/657/EC Komisyon Kararında açıklanan yönetmeliğe göre doğrulanmış ve doğrusalık ve hassaslığı (tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi tekrarlanabilirlik) hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem, performans kriterlerini yerine getirmiş olduğunu ve hayvansal kökenli gıdalardaki veterinerlik ilaç kalıntılarının resmi kontrolünde kullanılabilmesi ifade edilmiştir (30).

Klaus ve ark. yaptıkları çalışmada; altı sağlıklı at ve bir midilli atı olmak üzere farklı yaş ve ırklara göre toplam yedi at üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmada dipiron metaboliti olan 4-MAA'nın serumdaki farmakokinetik davranışı, incelemiştir.

Biyolojik yarı ömür ($t_{1/2}$) 4.85 saat, ortalama dağılım hacminin (V_d) 1.85 L / kg ve toplamın medyan ortalamasının 4.0 mL/kg olduğu tespit edilmiştir (31).

Pamel ve Daeseleire yaptıkları çalışmada; sığır eti ve sütündeki 15 NSAİİ'lerin LC-MS/MS ile çoklu olarak eşzamanlı tespiti ve tayini gerçekleştirilmiştir. NSAİİ'ler (karprofen, diklofenak, flufenamik asit, fluniksin, 5- hidroksifluniksin, ketoprofen, mefenamik asit, meloksikam, metilaminoantipirin, naproksen, niflümik asit, fenilbutazon, ramifenazon, salisilik asit ve tolfenamik asit gibi analitler tayin edilmiştir. Analizlerde iç standartlar olarak; fluniksin-d3, diklofenak-d4, 4-aminoantipirin-d3 ve fenilbutazonlu-d10 kullanılmıştır. Geri kazanım yüzdeleri, sığır eti için % 81-114 arasında ve süt için ise % 79-118 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik yüzdelerinde ise et için % 1-12, süt için % 1-17 aralığında bulunmuştur. Sığır eti örneklerinde 0.5-579 µg/kg aralığında bulunurken, süt örnekleri için ise 0.14-61 µg/kg aralığında tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemler yeterli örnekleri için başarıyla uygulanmış ve analiz edilmiştir. Sonuç olarak bu gibi çok amaçlı yöntemler, insan sağlığına zarar verebilecek veteriner ilaç kalıntılarında maruz kalan et ve süt gibi ürünler tayin edilmesine katkıda bulunduğu ifade edilmiştir. Kullanılan bu yöntem hızlı, diğer bileşikler ve matrislere göre kullanımı kolay, hassas ve kolaylıkla farklı örneklere de uygulanabilecek bir yöntem olduğu belirtilmiştir (32).

Giorgi vd. yaptıkları çalışmaya göre; MS, insanlarda, atlarda, sığırlarda, domuzlarda ve köpeklerde kullanılan analjezik ve antipiretik bir ilaç olduğunu belirtmişlerdir. MS hızla aktif primer metaboliti olan 4-metilaminoantipirine (MAA) hidroliz olur. MAA, diğer küçük metabolitlere kıyasla çok daha büyük miktarlarda oluşur. Diğer sekonder metabolitler arasında, 4-aminoantipirin (AA) da nispeten aktiftir. Bu çalışmada, sağlıklı atlarda 25 mg/kg MS dozundan intravenöz (i.v.) ve intramüsküler (i.m.) yollarla uygulandıktan sonra MAA ve AA metabolitlerinin farmakokinetik profilleri değerlendirilmiştir. Atlara ilaç uygulamasını takiben belirlenmiş zamanlarda alınan kan plazmalarındaki metabolitler HPLC-UV sistemi ile analiz edilmiştir. MS uygulanmasından sonra MAA'nın plazma konsantrasyonları, tüm atlarda 5 dakika ile 10 saate arasında izlenmiş olup, AA'nın plazma konsantrasyonları ise aynı zaman aralığında ancak daha küçük derişimlerde olduğu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermiş olduğu ifade edilmiştir (26).

Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, MS'un sulu çözeltilerinin izo-ozmotik olduğu, %70 oranında metabolize edildiği, metabolitlerinin ilk 24 saatte idrarla atıldığı, $t_{1/2\beta}$ =3-10 saat olduğu bildirilmektedir (24). MS'un, farelerde 20 ve 50 mg/kg'a göre 100 mg/kg dozun daha toksik olduğu, böbrek ve karaciğerde hasara ve oksidatif strese neden olabileceği Yapar ve ark, tarafından (33), asetil salisilik asit ve MS'un koçlarda sperm motilitesi ve hyaluronidaz aktivitesinde artışa neden olduğu, sperm konsantrasyonu ve semen hacmini azalttığı Tanyıldızı ve Bozkurt tarafından bildirilmektedir (27). Gökçimen ve ark, ise sıçanlarda 200 mg/kg dozunda kas içi MS uygulamasının akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında her hangi bir hasara neden olmadığını rapor etmektedirler (28). İnsanlarda kısa süreli mutad dozlarda MS'un uygulamalarının agranülositozise neden olmadığı fakat uzun süreli yüksek dozların neden olabileceği ise Ibanez ve ark, tarafından belirtilmektedir (34). Ancak yaptığımız literatür taramalarında; saf kan arap atlarında, her iki cinsiyete ait farklı uygulama yollarıyla ilaç uygulaması sonrası elde edilen kan örneklerinde ilacın metabolitlerine ait verilere rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme Hayvanı

Araştırmanın birinci bölümünde; çalışmada kullanılacak atlar, özel bir at çiftliğinde bulunan saf kan arap atlarından 7 adet dişi, 7 adet erkek olacak şekilde toplam 14 Safkan Arap atı (*Equusferus caballus*) (ortalama 380–450 kg) seçildi. Denemelere başlamadan önce İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrasında tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin 07.12.2017 tarihli etik kurul oluru belgesi sonrası Etik Kurul Yönergelerine göre yapıldı (EK-2).

Araştırmanın ikinci bölümünde; atlardan damar içi (i.v.) ve kas içi (i.m.) yolla uygulamalardan sonra farklı sürelerde alınan kan örneklerinin ekstraksiyon işlemleri İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarında yapılarak HPLC ve LC-MS/MS cihazlarında analize hazır hale getirilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Araç Gereçler ve Kimyasallar

- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC)/(Shimadzu)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Kütle spektrometresi (LC-MS/MS, Agilent)
- Hassas Terazî, (Sartirus)
- Vortex, (IKA)
- Santifürüj, (80-2A YUDA)
- Vakumlu cam tüp (10 m EDTA' lı)
- Derin dondurucu
- pH metre, (HANİVA instruments, HI 931401).
- Analitik kolon (C18 hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü 5 µm olan, 250 x 4.6 mm boyutlarında, 150 Å, ODS-2 ters faz kolon (Kromasil-100-5).
- SPE kolonu (Supelco HLB 30 mg/mL SPE tube)
- SPE ekstraksiyon ünitesi (Şekil 3.1)
- NANO pure UV Saf Su Cihazı (Milli-Q, Millipore)

- Solvent Süzme Aparatı (Waters, Division of Millipore Milford, ABD)
- Membran filtre 47 mm, 0,45 µm por çapında
- Otomatik Pipetler (Brand)
- Numune Süzme Filtresi (PTFE, por büyüklüğü: 0,2 µm, çapı: 13 mm (Sigma-Aldrich)
- Eppendorf tüpü (1000, 1500 µl hacimlerinde)
- Cam (10 mL) ve poletilen tüpler (5 mL)

3.1.3. Kimyasal Madde ve Solventler

- Diklormetan (GPRTM BDH prod28096 6F)
- Asetonitril (J.T.Baker Inc.), disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄, Merck)
- Sodyum dihidrojen fosfat (nah₂po₄, Merck)
- Sodyum hidroksit (naoh, Merck), orthofosforik asit (H₃PO₄, Merck)
- Enrofloksasin (biochemika/Fluka, 17849), trietilamin (J.T.Baker Inc.)
- Su olarak ultra saf su 18.2 kullanıldı.
- Methanol, Asetonitril
- Amonyum Format
- Asetik Asit
- Metanol HPLC Grade (Merck, Almanya)
- Asetonitril HPLC Grade (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Asetik asit (BPH Limited Poole, İngiltere)
- Metamizol Sodyum(MS)
- 4-metilaminoantipirin (MAA)
- 4-formilaminoantipirin (FAA)
- 4-asetilaminoantipirine (AAA)
- 4-aminoantipirine (AA) (Sigma-Aldrich)

3.2. Metot

3.2.1. Atların gruplandırılması ve deneysel dizayn

Bu çalışmada; MS uygulaması için seçilen erkek ve dişi saf kan Arap atlarına hem damar içi (i.v.) ve hem de kas içi (i.m.) yolla uygulandı. Toplam olarak 14 (7 adet dişi, 7 adet erkek) safkan arap atı kullanıldı. Kullanılacak hayvanlar 15 gün öncesinde

erkekler ile dişiler ayrı ayrı bir arada olacak şekilde bir ortama alındı ve herhangi bir ilaç uygulanması yapılmayacak şekilde koruma altına alındı. Hayvanlar ilaç uygulamalarından bir gün önce doz ayarlamasının dikkatli olarak belirlenebilmesi için tartıldı. En az 2-2,5 yaş ve ortalama 380-450±kg olduğu tespit edildi. Yem olarak günde 3 defa silaj, su ad libitum(yiyebildiği kadar yemleme) olarak verildi. Atlara aşağıda belirtilen yollardan MS uygulandı ve sadece belirlenen 12 zaman noktalarında 10 mL kan alındı ve başka herhangi bir işlem yapılmadı.

3.2.2. Damar içi uygulama

Atlara normal yem ve su ad-libitum verildi, 25 mg/kg (500 mg/mL) MS V. jugularis' ten damar içi (i.v.) yolla enjekte edildi, uygulama öncesi, 0. dakika ve uygulama sonrası 15., 30., 45., 60., 90.dakikalar ile 2., 3., 4., 6., 8. ve 12. saatlerde toplam 12 farklı zaman noktasında her defasında 10 mL kadar kan kulak venasından (V. aurocularis) alındı ve kan örnekleri anında steril 10 mL'lik EDTA'lı vakumlu tüplere alındı, 5000 devirde 15 dakika süreyle santrifüje edilerek elde edilen plazma örnekleri saklama tüplerine aktarılarak, ekstraksiyon ve analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (–20 °C) saklandı.

Bu uygulamadan dolayı vücutta kalan ilacın temizlenmesi ve/veya enzim indüksiyonu/inhibisyonunun sonlanması için iki hafta süreyle beklenildi. İki haftalık temizlenme sresinden sonra aynı atlarda bu kez aşağıda belirtilen kas için uygulamaya geçildi.

3.2.3. Kas içi uygulama

Yukarıdaki grupta yer alan atlara normal yem ve su ad-libitum verildi, 25 mg/kg (500 mg/mL) MS m.semitendinosus ve m.semimembranosus arasından kas içi (i.m.) yolla enjekte edildi. Uygulama ncesi 0. dakika ve uygulama sonrası 15., 30., 45., 60., 90.dakikalar ile 2., 3., 4., 6., 8. ve 12. saatlerde toplam 12 farklı zaman noktasında her defasında 10 mL kadar kan kulak venasından (V. aurocularis) alındı ve kan örnekleri anında steril 10 mL' lik EDTA'lı vakumlu tüplere aktarıldı. 5000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüje edilerek elde edilen plazma örnekleri saklama tüplerine aktarılarak, ekstraksiyon ve analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (–20 °C) saklandı.

3.3. Plazma Metamizol ve Metabolitlerinin tayin edilmesi

3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik saflıktaki standart ve metabolitler olan; metamizol sodyum, 4-metilaminoantipirin (MAA), 4-formilaminoantipirin (FAA), 4-asetilaminoantipirin (AAA) ve 4-aminoantipirinden (AA) hassas terazide tartılıp metanol ile ana stok çözeltisi hazırlandı. MS ve metabolitlerinin at plazma kalibrasyon standartları ve kalite kontrol örneklerinin her birinin stok çözeltisi ilaçsız plazmaya eklenmesiyle hazırlandı. Günlük olarak hazırlanan bu standart çözeltilerin HPLC ve LC-MS/MS 'de tespit ve tayinleri yapıldı.

3.3.2. Kalibrasyon standartları ve kalibrasyon örneklerinin hazırlanması

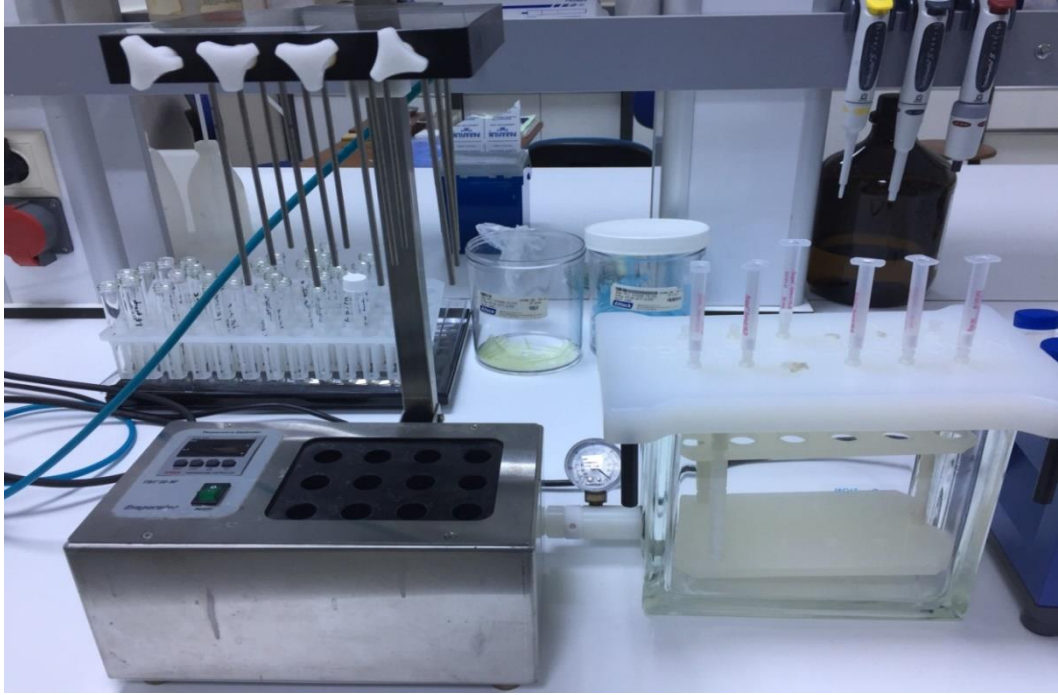
- 50 mg MS alınarak 50 mL' ye saf su ile seyreltilmiş ve 1000 ppm stok 1 çözeltisi hazırlandı.
- Stok 1 çözeltisinden (1000 ppm/ mg/mL) 1 mL alınarak saf su ile 100 mL' ye tamamlanarak 10 ppm stok 2 çözeltisi hazırlandı.
- Stok 2 çözeltisinden (10 ppm/ mg/mL) 10 mL alınarak saf su ile 100 mL' ye tamamlanarak 1000 ppb stok 3 çözeltisi hazırlandı.
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 5 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 500 ppb kalibrasyon çözeltisi,
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 2 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 200 ppb kalibrasyon çözeltisi,
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 1 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 100 ppb kalibrasyon çözeltisi,
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 0,5 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 50 pbb kalibrasyon çözeltisi,
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 0,1 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 10 pbb kalibrasyon çözeltisi,
- Stok 3 çözeltiden (1000 ppb/ µg/mL) 0,05 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 5 pbb kalibrasyon çözeltisi hazırlandı.

Metamizol sodyum için hazırlanan bu kalibrasyon çözeltileri, her bir metabolit (4-metilaminoantipirin (MAA), 4-formilaminoantipirin (FAA), 4-asetilaminoantipirin (AAA) ve 4-aminoantipirinden (AA) için de aynı şekilde seyreltme yapılarak hazırlandı.

3.3.3. Örneklerin hazırlanması

3.3.3.1. Katı Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Hazırlanması

SPE kolonları daha iyi bir ayrıştırmanın sağlanması için kolonun hazırlanması amacı ile şartlandırıldı. Şartlandırmak için önce kolonlardan 2 mL metanol ve daha sonra 2 mL deiyonize su geçirildi. Bu işlem için otomatik SPE ekstraksiyon sistemi kullanılarak bu şekilde vakum altında SPE kartuşları şartlandırıldı. Akış oranı 1-2 mL/dk olarak ayarlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Otomatik kolonları şartlandırma ve analitlerin ekstraksiyon sistemi (SPE sistem)

3.3.3.2. Plazma ekstraksiyonun optimizasyonu

Plazma örneklerinden analitlerin optimum ekstraksiyonu için farklı solvent ve solvent karışımları kullanıldı. Bu şekilde en uygun solvent karışımı ve akış şeması tespit edildi.

Ekstraksiyon işlemi için temel olarak Dominguez-Ramirez ve ark.(25) ile Mario Giorgi ve ark.(35) tarafından rat ve koyun plazmasından yapılan işlem temel alınır.

modifiye edilerek uygulandı. Örnek hazırlama basamağında C18 katı faz ekstraksiyon (SPE) kartüjleri kullanıldı. Daha sonra kalibrasyon standartları ve kalite kontrol numuneleri kartüjlerden geçirildi. Ardından analitler kartuşlardan elue edildi. Bu eluentler vakumlu döner evaporatörde kuruluğa kadar uçurulduktan sonra, kalıntı 100 µL hareketli fazda çözülerek HPLC ve LC-MS/MS sistemlerine enjekte edildi. Aşağıda gösterilen şemalarda ekstraksiyon basamakları gösterilmiştir(Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Optimizasyon çalışmalarında yapılan ekstraksiyon basamakları



Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda cihazlara enjeksiyon işlemi için 5 mL' lik eppendorf tüpü içerisine 2000 µL plazma konuldu, üzerine 100 µL 1 M NaOH eklendi ve sonra 5-6 saniye vortekslenerek homojen bir karışım elde edildi. Bu örnek karışımı önceden 3 mL metanol ve 1 mL su ile şartlandırılmış SPE ekstraksiyon kolonlarından(C18) geçirildi. Ana analit ve onun metabolitleri dışındaki tüm matriks bileşenleri atık olarak dışarı süzöldü. Böylece ölçmek istediğimiz analitler ekstraksiyon kolonunda tutulmuş oldu. Ekstraksiyon kolonunda tutulan analitler, kolondan 3 mL metanol ve 0.5 mL amonyum asetat + Asetonitril (%80:20) çözeltisinen geçirilerek reçinelerden tutulmuş olan analitler elüe edilerek SPE kartuşları altında bulunan cam deney tüplerinde biriktirildi. Daha sonra bu cam tüpler içindeki metanol:amonyumasetat:asetonitril, otomatik ısıtma sistemli azot tüpü bağılı inert ortamli solvent uzaklaştırma sisteminde 36 °C'de uçuruldu. Tüplerin altında solvent kalmayana kadar uçurma işlemine devam edildi. Alt kısmında analitler bulunduğı cam tüpler üzerine 1 mL hacminde metanol eklenerek 30 saniye vortekslendi ve bundan 40 µL alınarak HPLC ve LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

3.4. Analiz

3.4.1. HPLC Sisteminin Özellikleri

- Analitik Kolon: Phemenex _nertsil marka C18 5 µm partikül büyüklüğünde, 150 x 4,6 mm boyutlarında, 150 Å, ODS-2 ters faz (RP) kolon kullanıldı.
- Mobil Faz: 20 mM sodyum asetat+asetonitril (20:80, v/v) (pH: 5), izokratik çalışma.
- Akış hızı: 1 mL /dk.
- Enjeksiyon hacmi: 40 µL
- UV/DAD dedektör: 254 nm,
- Çalışma süresi: 20 dk.
- Kalibrasyon: Eksternal standartlar kullanılarak oluşturuldu.

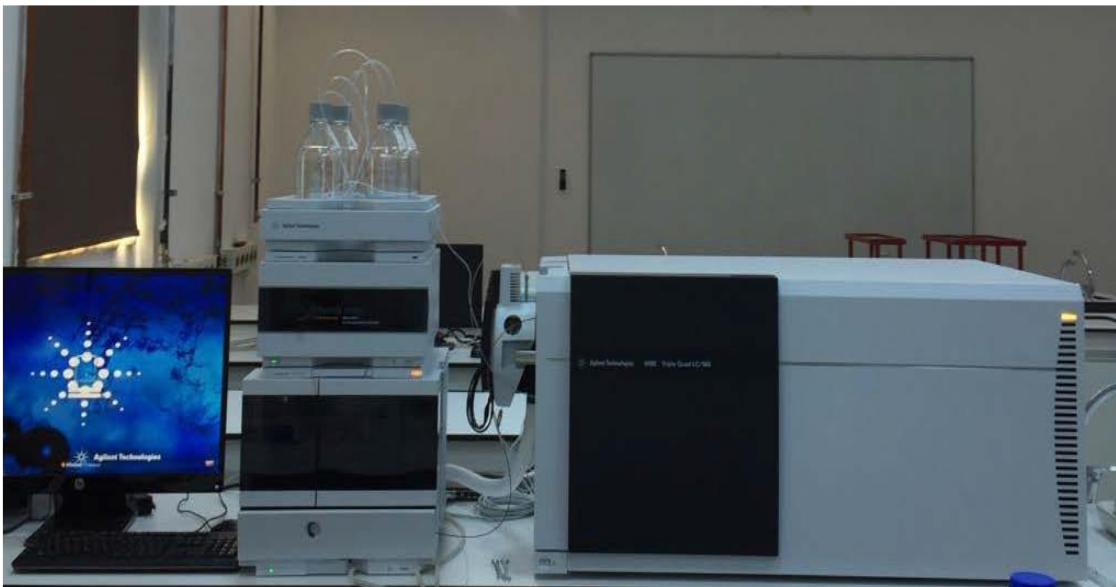


Şekil 3.2 HPLC Cihazı ve ekipmanları

3.4.2. LC-MS/MS Sisteminin Özellikleri

Tablo 3.2. LC-MS/MS Cihazı Çalışma Koşulları

Cihaz modeli	G6460C
Kromatogram tipi	TIC
İyon kaynağı	AJS ESI
Gaz sıcaklığı	350°C
Gaz akışı	8 L/dk
Sisleştirici	45 psi
Sheath gaz sıcaklığı	400°C
Sheath gaz akışı	9 L/ dk
Akış hızı	0,3 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL



Şekil 3.3 LC-MS/MS Cihazı ve ekipmanları

3.5. Metodun validasyonu

Metamizol metabolitlerinin tayininde HPLC-DAD ve LC-MS/MS kullanıldı. Farklı oranlarda Asetonitril:amonyum asetat(20mM) (20:80) kullanılarak analitlerin optimum şartlarda ayrılması sağlandı. Tayin HPLC de 254, 260, 263 nm dalgaboyunda ve LC-MS/MS'de gerçekleştirildi. Optimize edilen metodun sistem uygunluk parametreleri hesaplandı. Sistem uygunluk parametreleri, analiz esnasında sistemin doğru olarak çalıştığını göstermek için incelendi. HPLC yönteminin valide edilmesinde, özgünlük, doğrusal aralık, doğruluk, tayin sınırı (LOQ), teşhis sınırı (LOD) gibi validasyon parametreleri belirlendi.

3.5.1. Geri Kazanım Çalışması

Genel olarak kimyasal analizlerde, metod performansının değerlendirilmesi ve izlenmesine yönelik validasyon ve analitik kalite kontrol çalışmaları, geri kazanım çalışmaları üzerinden gerçekleştirilir. Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk için gerçek değer farklı yoldan elde edilebilir. Bunlardan biri de % Geri kazanım çalışması yapmaktır.

$\% \text{ Geri kazanım} = \text{Geri Kazanım Konsantrasyonu} / \text{Eklenen Konsantrasyonu} \times 100$

Geri kazanım çalışmasında, bilinen miktarda analit örneğe ilave edilerek (spike) örnek analiz edilir ve tespit edilen analit miktarı ile ilave edilen miktar oranlanır. Yapılan çalışmada ise üzerine bilinen miktarda Metamizol ve metabolitleri ilave edilmiş boş plazmalardan geri alımlar, direkt standart solüsyonlarının injeksiyonlarını tekiben oluşan piklerin alanları ile karşılaştırılarak hesaplandı. İlaç yoğunluğu bilinmeyen örnekler, analiz boyunca bilinen miktarda ilaç ilave edilmiş plazma örnekleri referans alınarak hesaplandı.

3.5.2. Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti için ayrı ayrı blank numunelerinin içine; MS için 10 µg/mL, 4-metilaminoantipirin (MAA) için 10 µg/mL, 4-formilaminoantipirin (FAA) için 20 µg/mL, 4-asetilaminoantipirine (AAA) için 10 µg/mL, 4-aminoantipirine (AA) için 20 µg/mL olacak şekilde standartlar eklendi. Ekstraksiyon işlemi örneklere uygulanan metodun aynı işlem basamakları uygulanarak yapıldı. Eklenmiş blank ile 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Tayin limiti aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Tayin Limiti = $3s_d$, Ölçüm Limiti = $10s_d$ (C = Standart konsantrasyonu, S_d = Standart sapma)

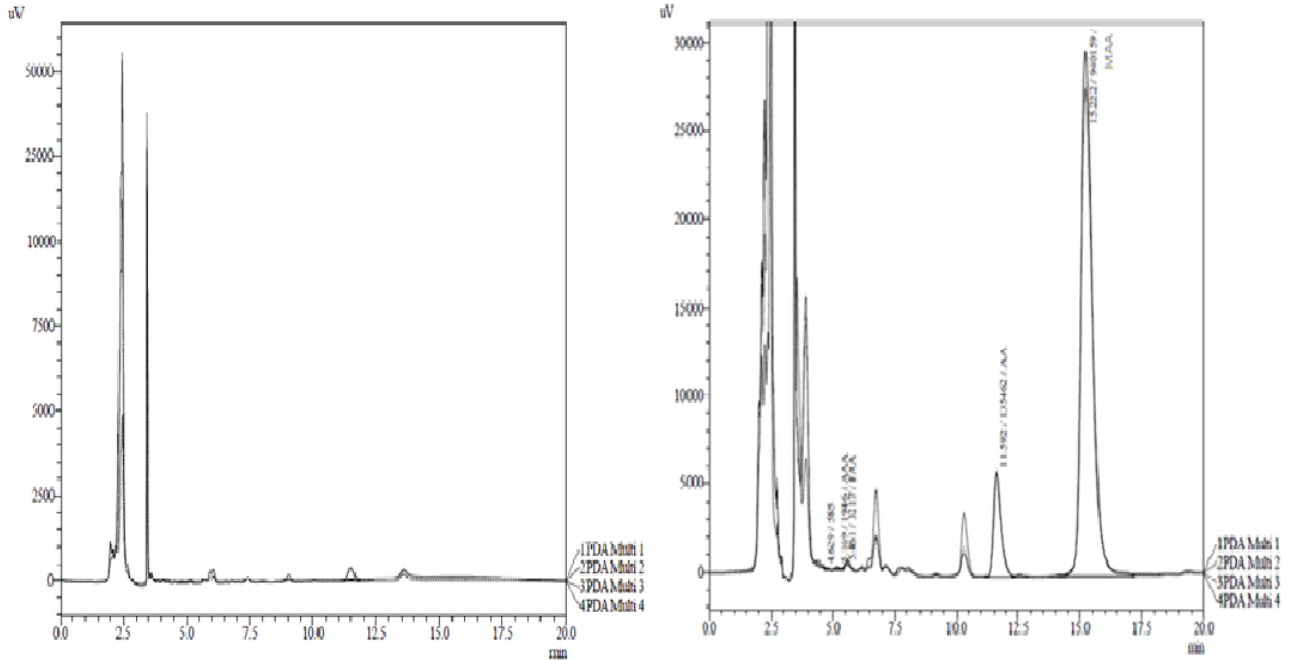
4. BULGULAR

Ülkemizin de önemli bir ekonomik gelir kaynağı olan saf kan Arap atlarında, Metamizol Sodyumun iki farklı damar içi ve kas içi uygulama sonrası çalışma süresince ilaç uygulanan hayvanlarda herhangi bir yan etki gözlenmedi. Metamizol Sodyum; damar içi ve kas içi yollarla uygulanmasını takiben ilaçlar plazmada 15. dakika ile 12. saat arasında, Metamizol Sodyum'un metabolitleri 4-metilaminoantipirin (MAA), 4-asetilaminoantipirine (AAA) ve 4-aminoantipirine (AA) metabolitleri tespit edilebildi. 4-formilaminoantipirin (FAA) metaboliti ise tayin limitinin altında kaldığından tayin edilemedi.

4.1. Validasyon Bulguları

4.1.1. Özgünlük

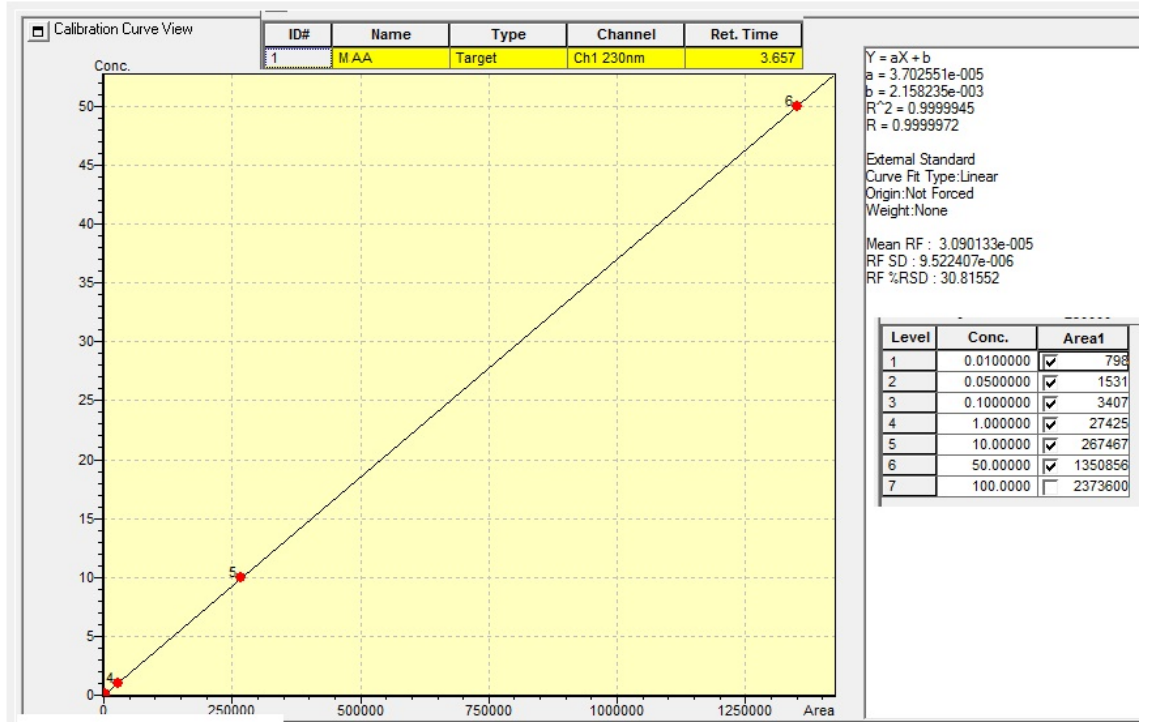
Etken maddesi içermeyen plazmaların (şahit plazma) HPLC-DAD sistemine uygulandıktan sonra, Metamizol Sodyum(MS), 4-asetilaminoantipirine (AAA), 4-formilaminoantipirin (FAA), 4-aminoantipirine (AA) ve 4-metilaminoantipirin (MAA), alıkonma zamanları olan sırasıyla; 4.72, 5.07, 5.37, 10.93 ve 14.38 sürelerde kromatogram üzerinde, plazma ve farklı kirlilik kaynaklı pikler gözlenmedi (Şekil 4.1).



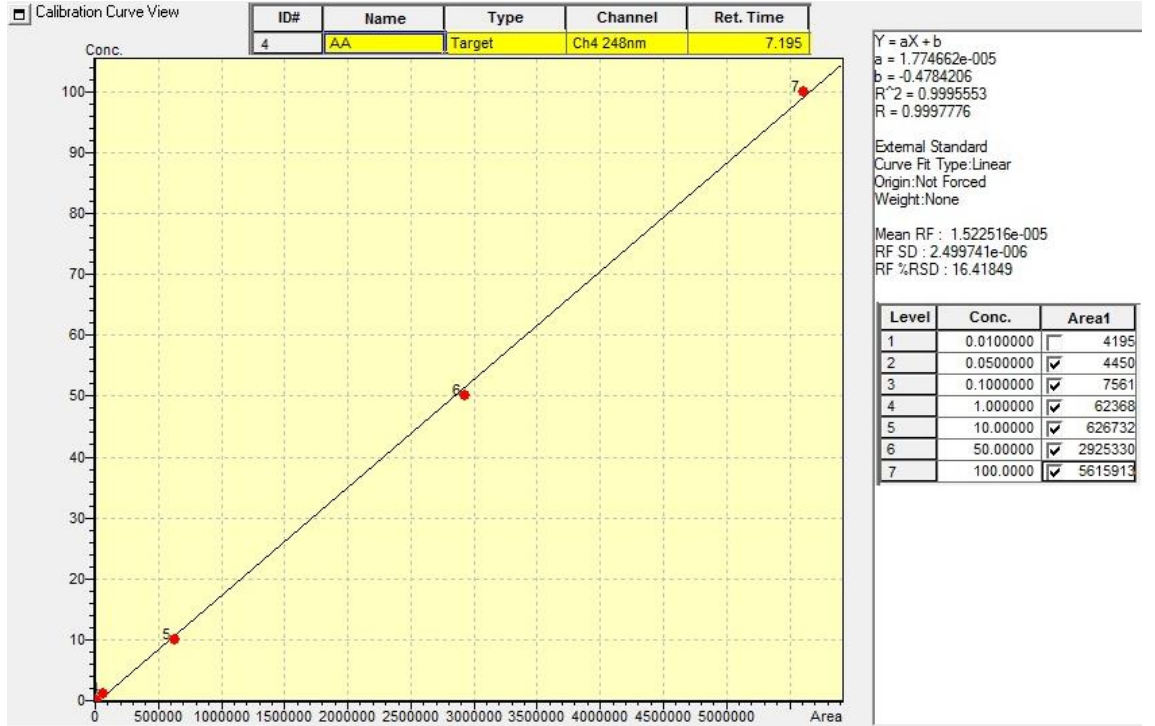
Şekil 4.1 Atlara MS uygulanmadan hemen önce ve sonra alınan (t_{0.dk}- t_{15.dk} kan plazma ekstraktı örneğine ait HPLC kromatogramları.

4.1.2. Doğrusallık

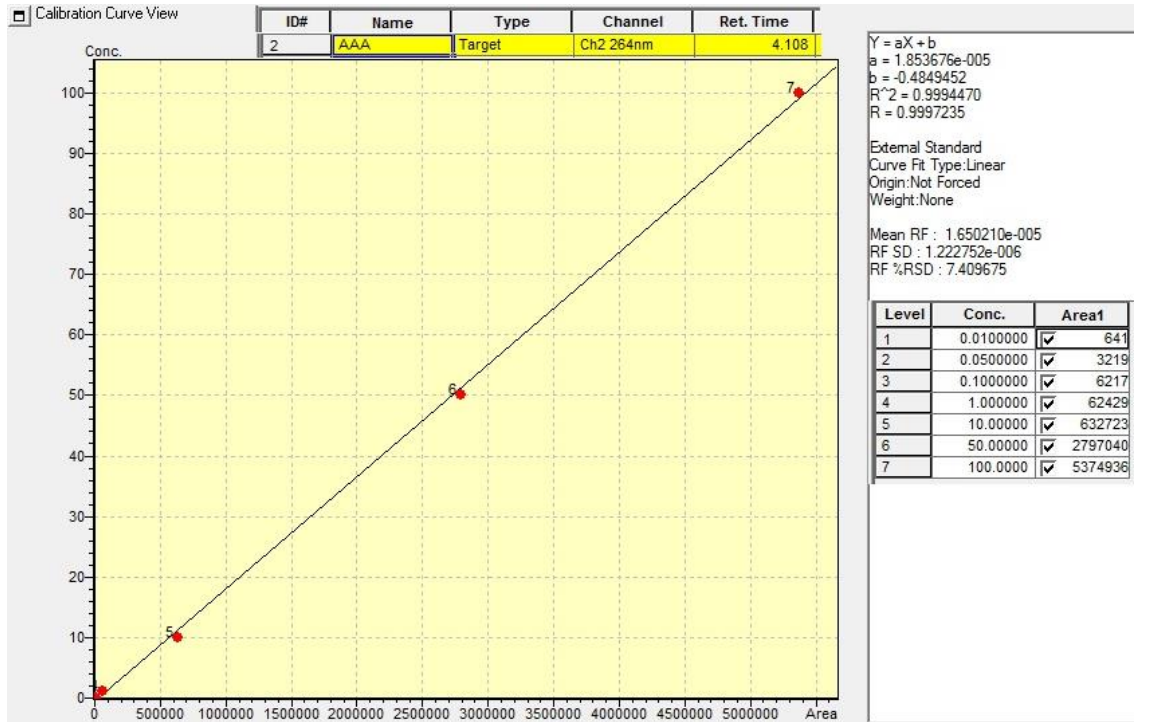
Numunelere uygulanan SPE ekstraksiyon işlemlerinin aynısı, plazmalardaki ilaç derişimlerinin hesaplanması için boş plazmalara eklenerek hazırlanan farklı derişimlerdeki kalibrasyon örneklerine de uygulandıktan sonra, elde edilen pik alanları ile plazma ilaç derişimlerinin karşılaştırılması sonucu çizilen kalibrasyon eğrisinin, Metamizol Sodyum(MS) için (0,01-50 µg/mL) ve ($r^2= 0,99999$), 4-metilaminoantipirin (MAA) (0,01- 100 µg/mL) ve ($r^2= 0,9996$), 4-formilaminoantipirin (FAA) için (0,05-100 µg/mL) ve ($r^2= 0,9998$), 4-asetilaminoantipirine (AAA) için (0,01- 100 µg/mL) ve ($r^2= 0,9995$), 4-aminoantipirine (AA) için (0,05- 100 µg/mL) ve ($r^2= 0,9995$) aralığında doğrusal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



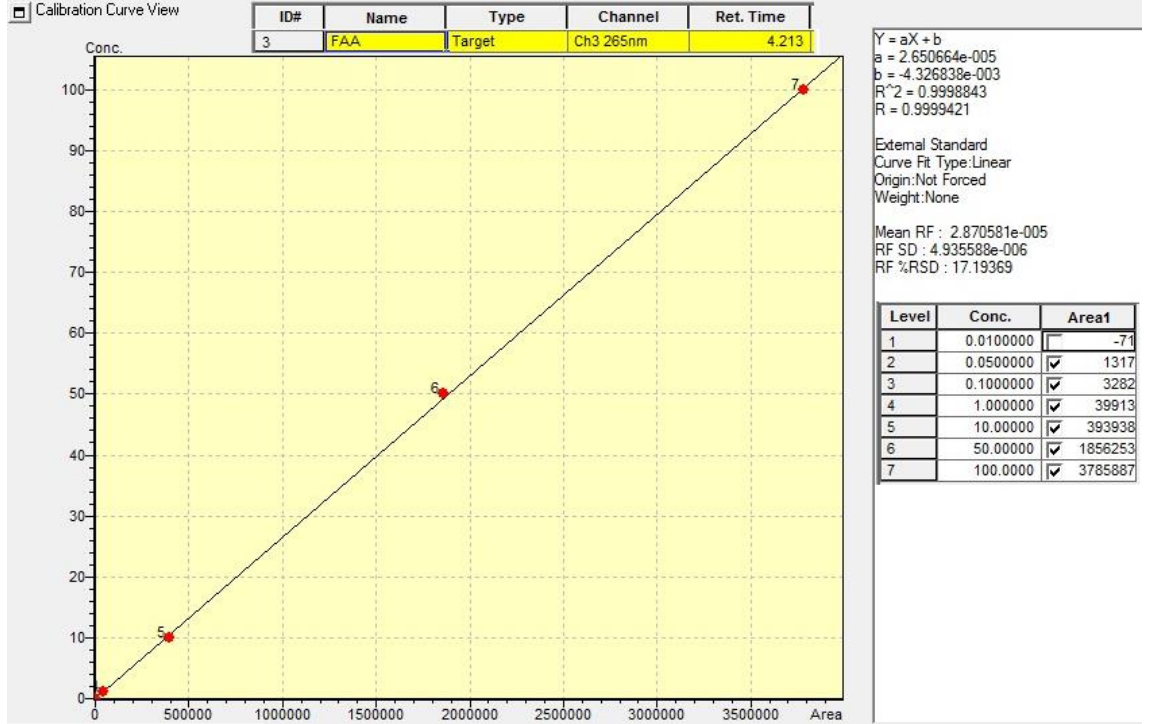
Şekil 4.2 Metil Aminoantipirin (MAA) standart kalibrasyon grafiği



Şekil 4.3 Amino antipirin (AA) standart kalibrasyon grafiği



Şekil 4.4 Asetil amino antipirin (AAA) standart kalibrasyon grafiği



Şekil 4.5 Formil amino antipirin (FAA) standart kalibrasyon grafiği

4.1.3. Geri kazanım

Metamizol Sodyum(MS), 4-metilaminoantipirin (MAA) düşük konsantrasyonlar için >%92 ve orta ve yüksek konsantrasyonlar için >%95; 4-aminoantipirine (AA) için düşük konsantrasyonlarda >%88 ve orta konsantrasyonlarda >85 ve yüksek konsantrasyonlar için >%95; 4-formilaminoantipirin (FAA) düşük konsantrasyonlar için >%92 ve orta ve yüksek konsantrasyonlar için >%93 ve 4-asetilaminoantipirine (AAA) için ise düşük konsantrasyonlar için >%82 ve orta konsantrasyonlar için >%89 ve yüksek konsantrasyonlar için ise >%95 olarak geri kazanımı elde edildi. Metamizol metaboliti olan MAA, AA, AAA ve FAA için geri kazanım sonuçları Tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Metamizol metaboliti olan MAA, AA, AAA ve FAA için geri kazanım sonuçları

Metabolitler	Konsantrasyon Aralığı	Eklene (µg/mL)	% Geri kazanım±ss
MAA	Düşük	0,10	92,4±1,09
	Orta	10	98,5±1,53
	Yüksek	50	96,7±1,28
AA	Düşük	0,10	88,1±3,44
	Orta	10	85,3±2,21
	Yüksek	50	95,2±2,67
AAA	Düşük	0,10	82,7±3,39
	Orta	10	89,8±3,16
	Yüksek	50	95,6±1,12
FAA	Düşük	0,10	93,7±1,25
	Orta	10	92,2±2,93
	Yüksek	50	93,5±3,05

Bu geri kazanım değerleri, çalışmamızın analitik metot kaynağı olarak belirlenen literatür verileriyle benzerlik göstermektedir.

4.1.4. Metot Validasyonu Çalışmaları

Standartlar eklenmiş blank çözeltileri ile 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Tayin ve ölçüm limitleri ana bileşen ve tüm metabolitler için aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Tayin limiti ve ölçüm limiti sonuçları(µg/mL)

Tekrar	MS	MAA	AA	AAA	FAA
1	9,23	17,02	17,92	7,87	17,78
2	7,26	16,39	20,55	9,45	18,52
3	9,02	16,65	17,31	7,99	19,45
4	8,69	18,92	20,35	8,61	16,11
5	7,81	18,34	18,84	8,78	19,45
6	8,94	18,76	18,23	9,82	18,84
7	9,04	17,71	16,47	8,03	18,99
8	7,38	18,08	19,35	9,54	16,25
9	9,67	16,15	19,23	7,56	19,51
10	9,25	16,56	17,18	7,89	18,56
Ortalama	8,63	17,46	18,54	8,55	18,35
Sd	0,84	1,03	1,36	0,81	1,26
LOD	2,52	3,09	4,08	2,43	3,77
LOQ	8,40	10,31	13,61	8,11	12,58

Tablo 4.3. Metamizol sodyumun dişi ve erkek atlara damar içi ve kas içi (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki MAA için ortalama plazma derişimleri

Metabolitler	Gruplar ve Uygulama yolları				
	Kan alım zamanı	Dişi at i.v.	Dişi at i.m.	Erkek at i.v.	Erkek at i.m.
MAA (µg/mL)	Plazma derişimleri(µg/mL))±standart sapma				
	t ₀ .dk	-	-	-	-
	t ₁₅ .dk	107,21±5,54	47,94±6,058	113,67±5,39	46,65±7,17
	t ₃₀ .dk	71,02±4,051	56,64±1,49	99,06±11,62	93,42±5,65
	t ₄₅ .dk	62,34±2,18	50,44±3,90	88,12±15,65	95,87±9,04
	t ₆₀ .dk	42,25±1,242	40,95±1,060	62,72±5,532	71,11±4,42
	t ₉₀ .dk	38,67±2,366	36,79±1,504	57,65±2,911	62,36±2,81
	t ₂ .saat	27,29±3,506	24,86±2,473	56,84±6,486	53,68±1,69
	t ₃ .saat	15,85±1,045	12,91±1,616	42,88±2,287	49,33±2,01
	t ₄ .saat	9,88±0,718	7,22±1,347	36,46±7,669	42,44±3,74
	t ₆ .saat	8,25±1,694	6,80±0,737	24,67±6,430	9,43±2,48
	t ₈ .saat	3,19±0,790	6,17±0,682	9,76±4,990	8,32±1,15
	t ₁₂ .saat	0,79±0,338	4,69±1,365	5,58±2,939	7,12±0,73

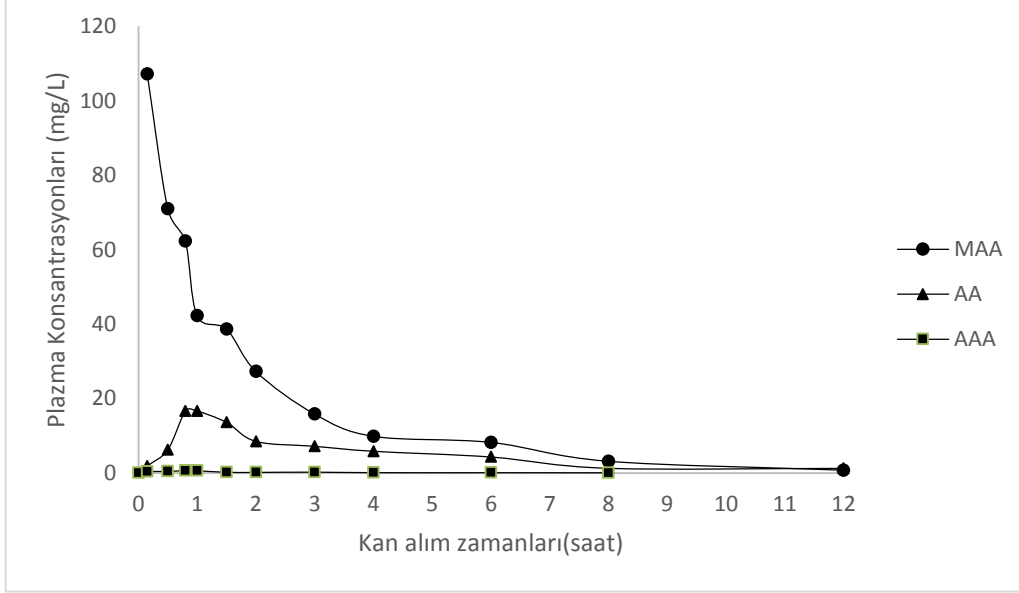
Tablo 4.4 Metamizol sodyumun diři ve erkek atlara damar iči ve kas iči (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki AAA ičin ortalama plazma deriřimleri

Metabolitler	Gruplar ve Uygulama yolları				
	Kan alım zamanı	Dişi at i.v.	Dişi at i.m.	Erkek at i.v.	Erkek at i.m.
AAA ($\mu\text{g/mL}$)	Plazma derişimleri($\mu\text{g/mL}$) \pm standart sapma				
	t ₀ .dk	-	-	-	-
	t ₁₅ .dk	0,107 \pm 0,013	0,14 \pm 0,028	0,142 \pm 0,0144	0,10 \pm 0,041
	t ₃₀ .dk	0,411 \pm 0,024	0,18 \pm 0,0101	0,385 \pm 0,0203	0,12 \pm 0,067
	t ₄₅ .dk	0,479 \pm 0,083	0,232 \pm 0,0164	0,565 \pm 0,0121	0,145 \pm 0,082
	t ₆₀ .dk	0,672 \pm 0,0754	0,306 \pm 0,0281	0,643 \pm 0,0731	0,254 \pm 0,035
	t ₉₀ .dk	0,644 \pm 0,0667	0,354 \pm 0,013	0,547 \pm 0,0532	0,328 \pm 0,042
	t ₂ .saat	0,232 \pm 0,0541	0,187 \pm 0,046	0,231 \pm 0,0133	0,195 \pm 0,053
	t ₃ .saat	0,209 \pm 0,0819	0,192 \pm 0,028	0,147 \pm 0,0164	0,139 \pm 0,028
	t ₄ .saat	0,272 \pm 0,0628	0,181 \pm 0,032	0,165 \pm 0,0205	0,167 \pm 0,81
	t ₆ .saat	0,133 \pm 0,046	0,114 \pm 0,035	0,156 \pm 0,032	0,131 \pm 0,094
	t ₈ .saat	0,120 \pm 0,031	0,107 \pm 0,042	0,132 \pm 0,067	0,118 \pm 0,087
	t ₁₂ .saat	0,109 \pm 0,066	0,110 \pm 0,078	0,106 \pm 0,079	0,109 \pm 0,073

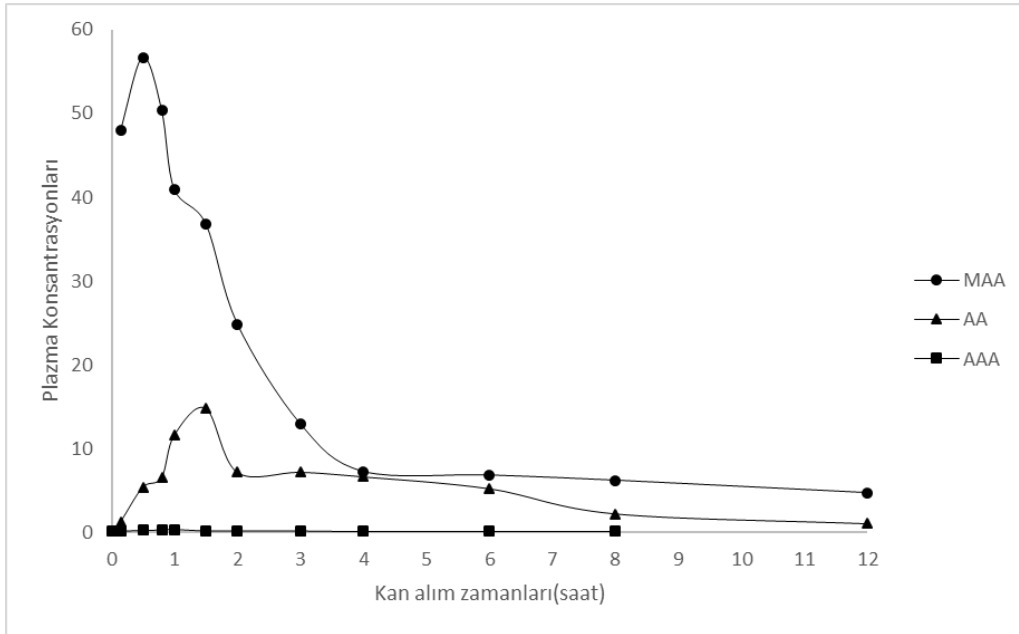
Tablo 4.5 Metamizol sodyumun diři ve erkek atlara damar iči ve kas iči (25,0 mg/kg dozunda) uygulanmasını takiben kan alma zamanlarındaki AA ičin ortalama plazma deriřimleri

Metabolitler	Gruplar ve Uygulama yolları				
	Kan alma zamanı	Dişi at i.v.	Dişi at i.m.	Erkek at i.v.	Erkek at i.m.
AA ($\mu\text{g/mL}$)	Plazma derişimleri($\mu\text{g/mL}$) \pm standart sapma				
	t _{0.dk}	-	-	-	-
	t _{15.dk}	1,90 \pm 0,28	1,24 \pm 0,336	1,64 \pm 0,16	1,30 \pm 0,21
	t _{30.dk}	6,24 \pm 0,37	5,38 \pm 0,560	5,18 \pm 1,14	5,40 \pm 1,04
	t _{45.dk}	16,64 \pm 1,66	6,53 \pm 1,64	17,56 \pm 2,10	5,64 \pm 1,28
	t _{60.dk}	16,67 \pm 1,28	11,60 \pm 1,24	16,64 \pm 1,24	10,75 \pm 2,22
	t _{90.dk}	13,64 \pm 1,33	14,84 \pm 2,47	12,54 \pm 1,19	15,62 \pm 1,31
	t _{2.sa}	8,52 \pm 0,95	7,18 \pm 1,20	7,63 \pm 1,16	9,091 \pm 1,27
	t _{3.sa}	7,21 \pm 1,22	7,19 \pm 1,18	6,14 \pm 1,19	8,03 \pm 1,11
	t _{4.sa}	5,87 \pm 0,81	6,63 \pm 1,10	6,86 \pm 1,10	6,56 \pm 1,11
	t _{6.sa}	4,33 \pm 0,92	5,21 \pm 1,04	4,25 \pm 1,02	5,20 \pm 1,14
	t _{8.sa}	1,300 \pm 0,62	2,20 \pm 0,83	2,23 \pm 1,02	2,18 \pm 1,13
	t _{12.sa}	1,27 \pm 0,29	1,02 \pm 0,306	1,13 \pm 0,22	1,19 \pm 0,33

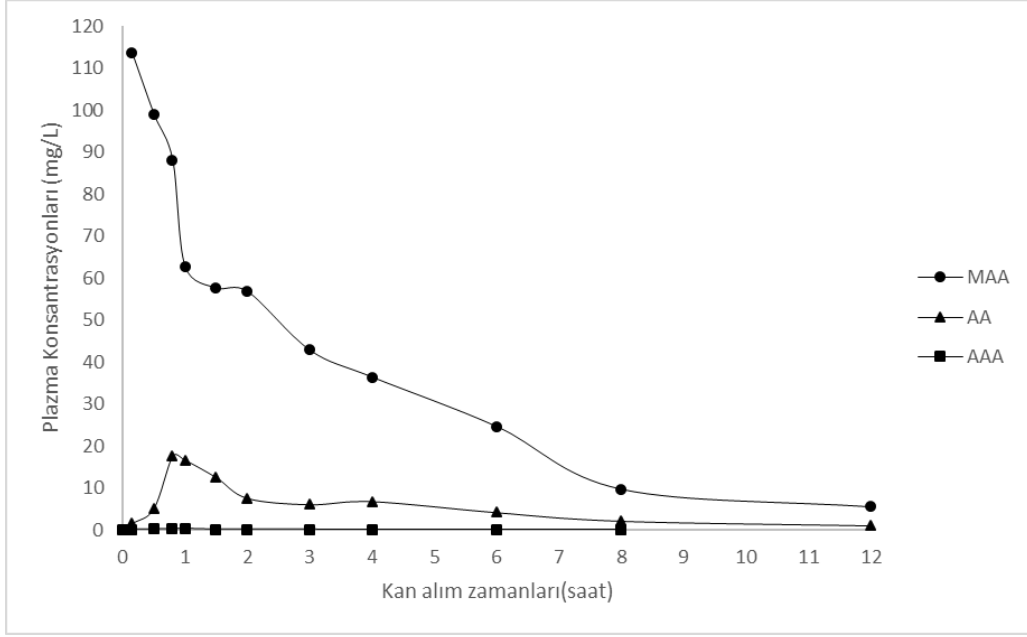
Yapılan analizlerde, dişi ve erkek atlarda i.v. ve i.m. uygulamaları sonrasında 25 mg/kg dozunda MS uygulanmasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi(Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9)



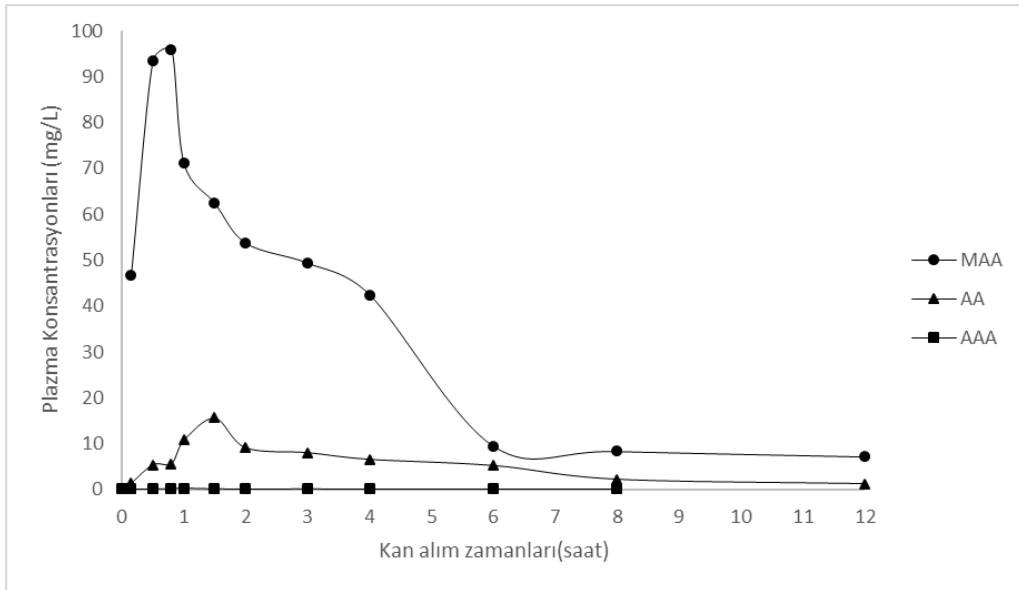
Şekil 4.6 Dişi atlara i.v. 25 mg/kg dozunda MS uygulanmasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.



Şekil 4.7 Dişi atlara i.m. 25 mg/kg dozunda MS uygulanmasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.

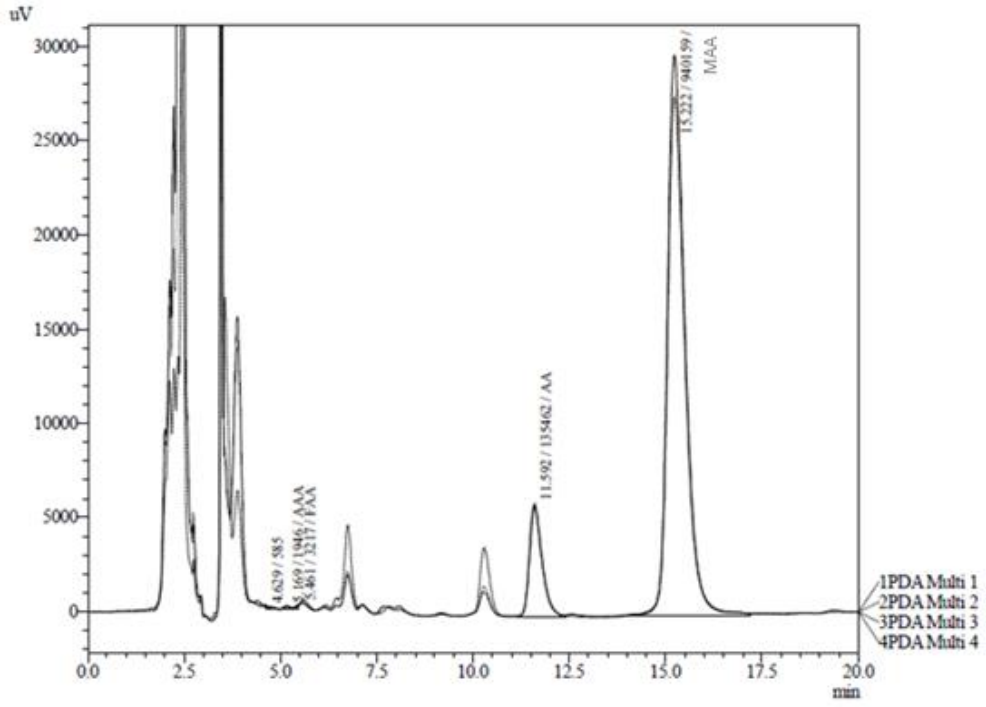


Şekil 4.8 Erkek atlara i.v. 25 mg/kg dozunda MS uygulamasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.

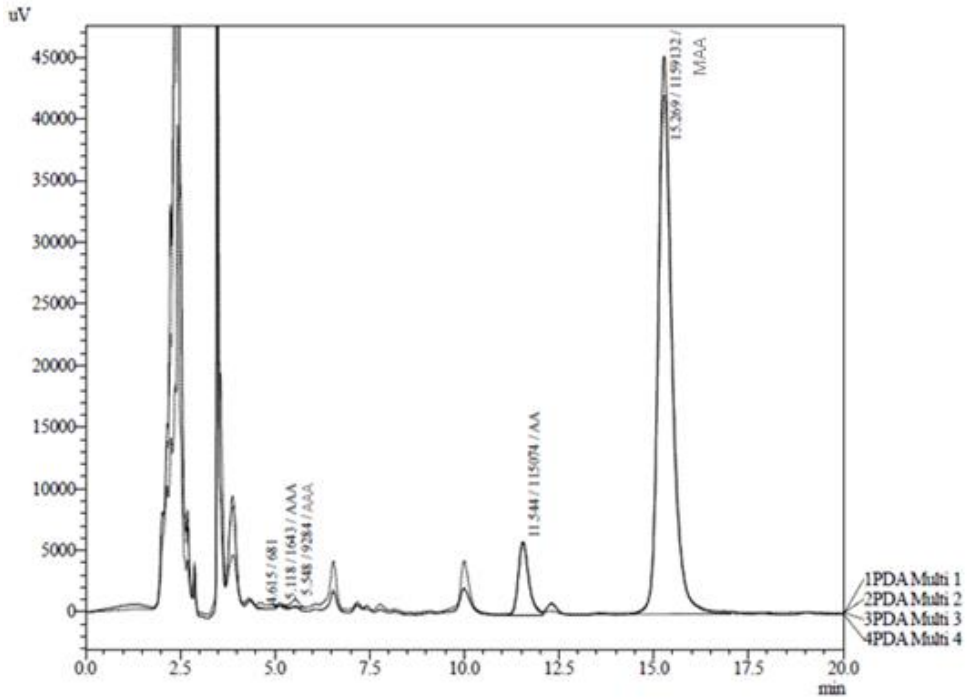


Şekil 4.9. Erkek atlara 25 mg/kg dozunda i.m. MS uygulanmasını takiben MAA, AA ve AAA için ortalama plazma derişimi-zaman eğrisi.

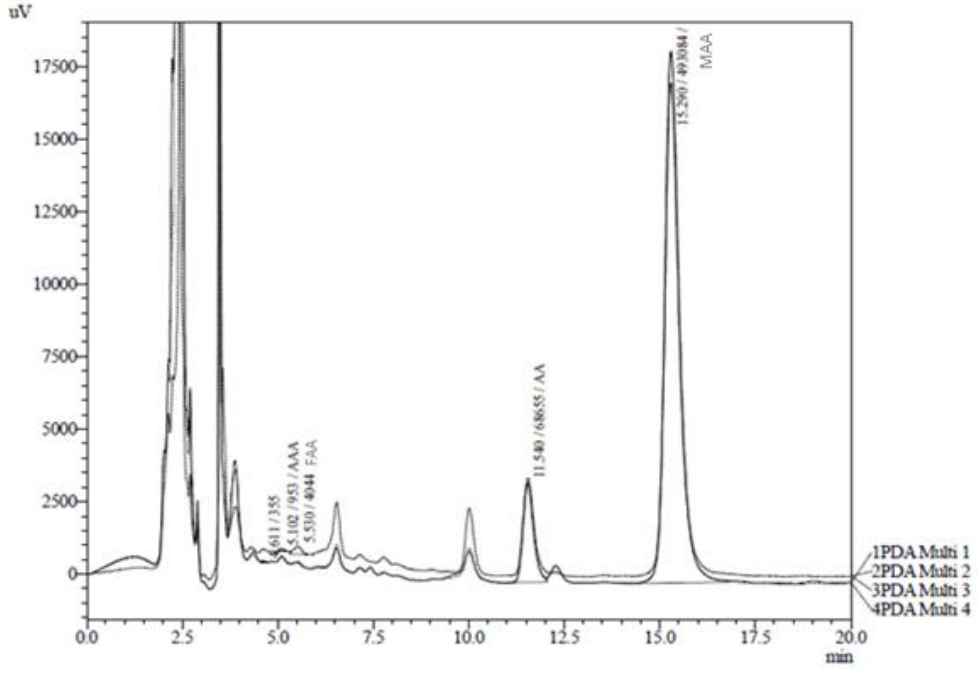
Yapılan analizlerde dişilerde i.v. i.m. MS uygulanması sonrası 15, 30, 60 dakikalar ve 6.saatdeki plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramları verilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 Şekil 4.16, Şekil 4.17).



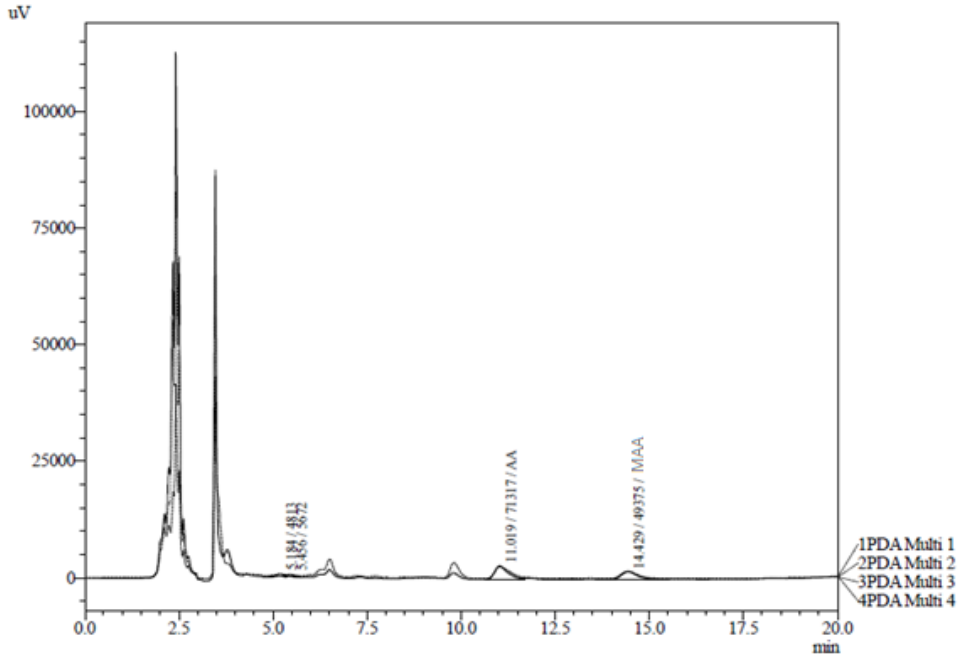
Şekil 4.10. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 15.dakikada ($t_{15.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



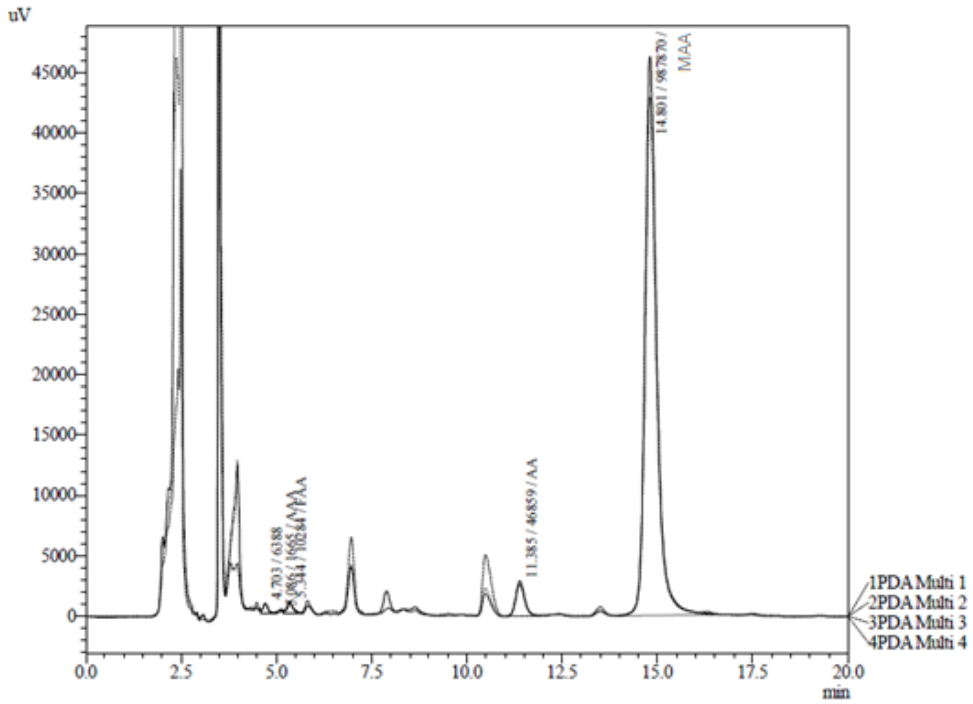
Şekil 4.11. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 30.dakikada ($t_{30.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



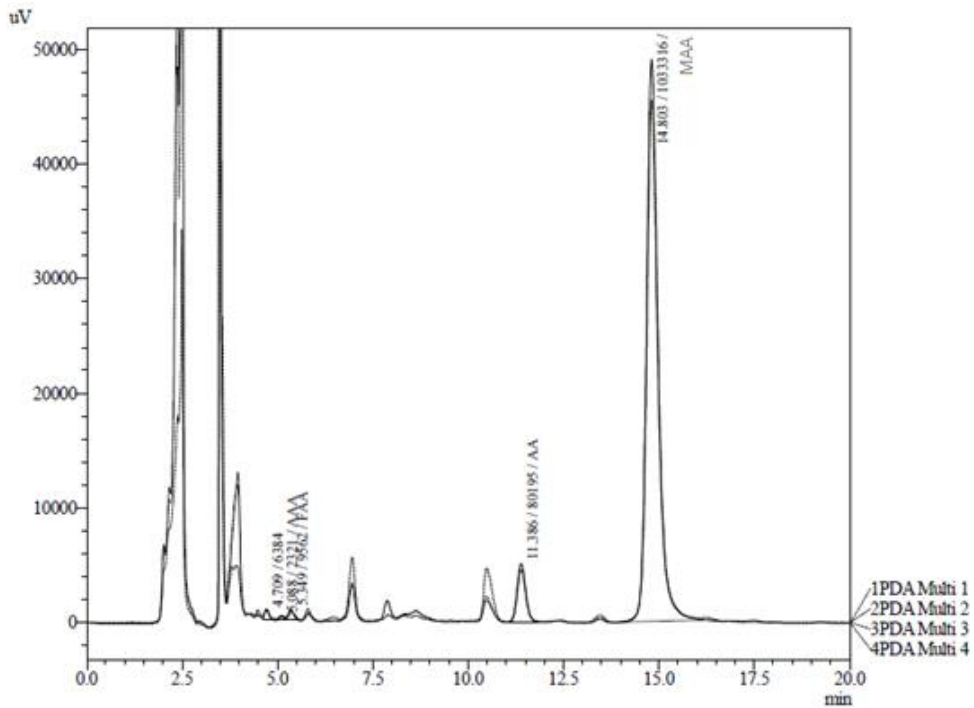
Şekil 4.12. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 60.dakikada ($t_{60.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



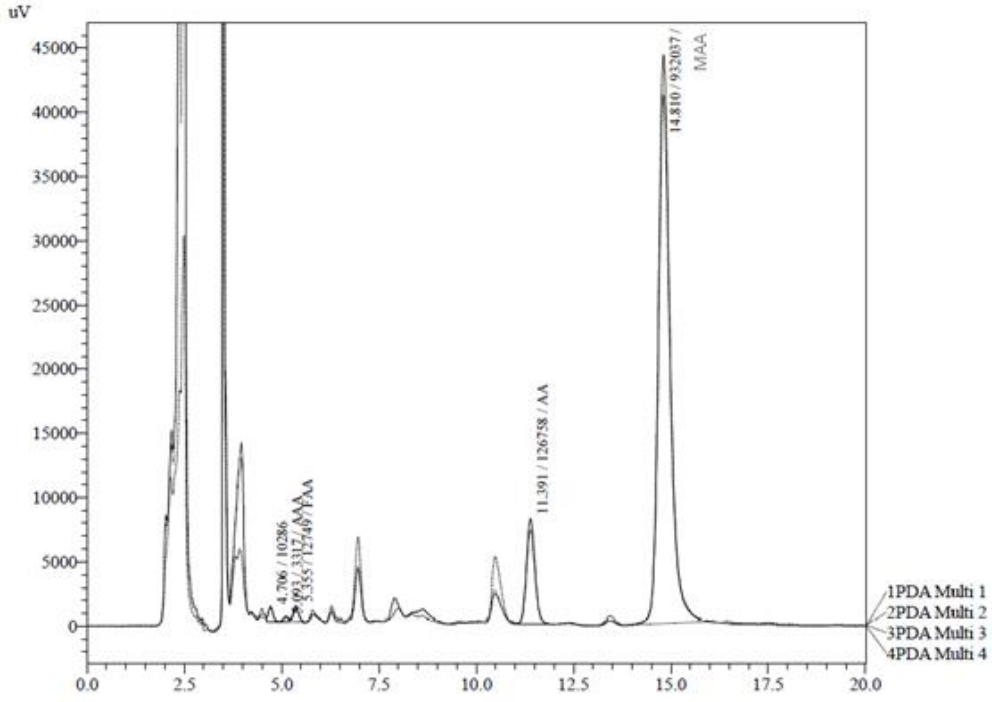
Şekil 4.13. Dişilerde i.v. MS uygulaması sonrası 6.saat ($t_{6.sa}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



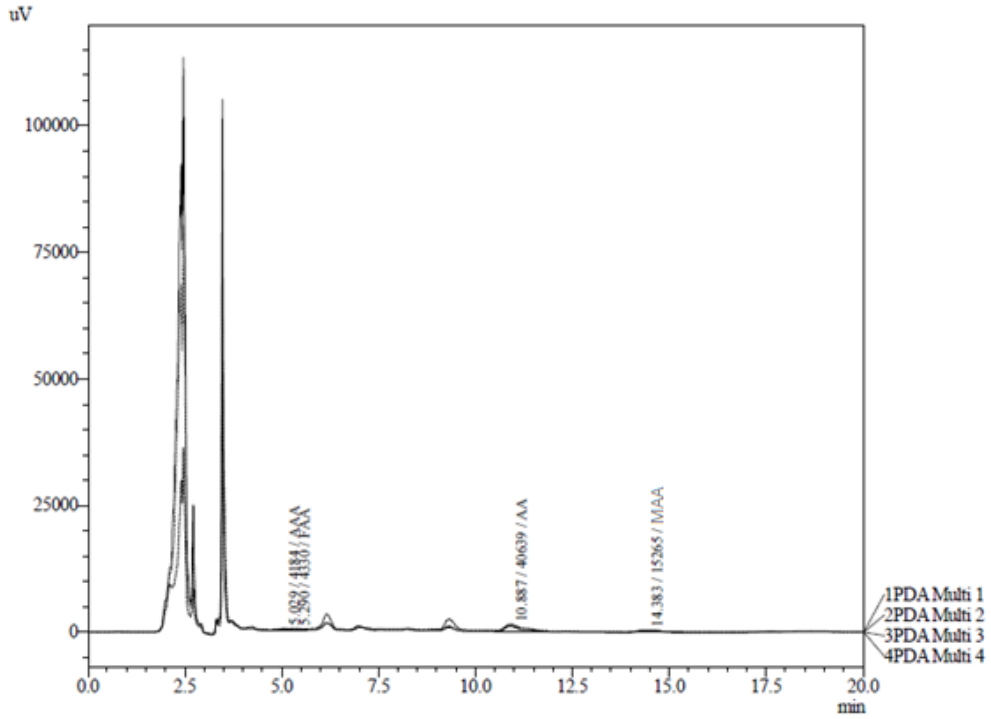
Şekil 4.14. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 15.dakika ($t_{15.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



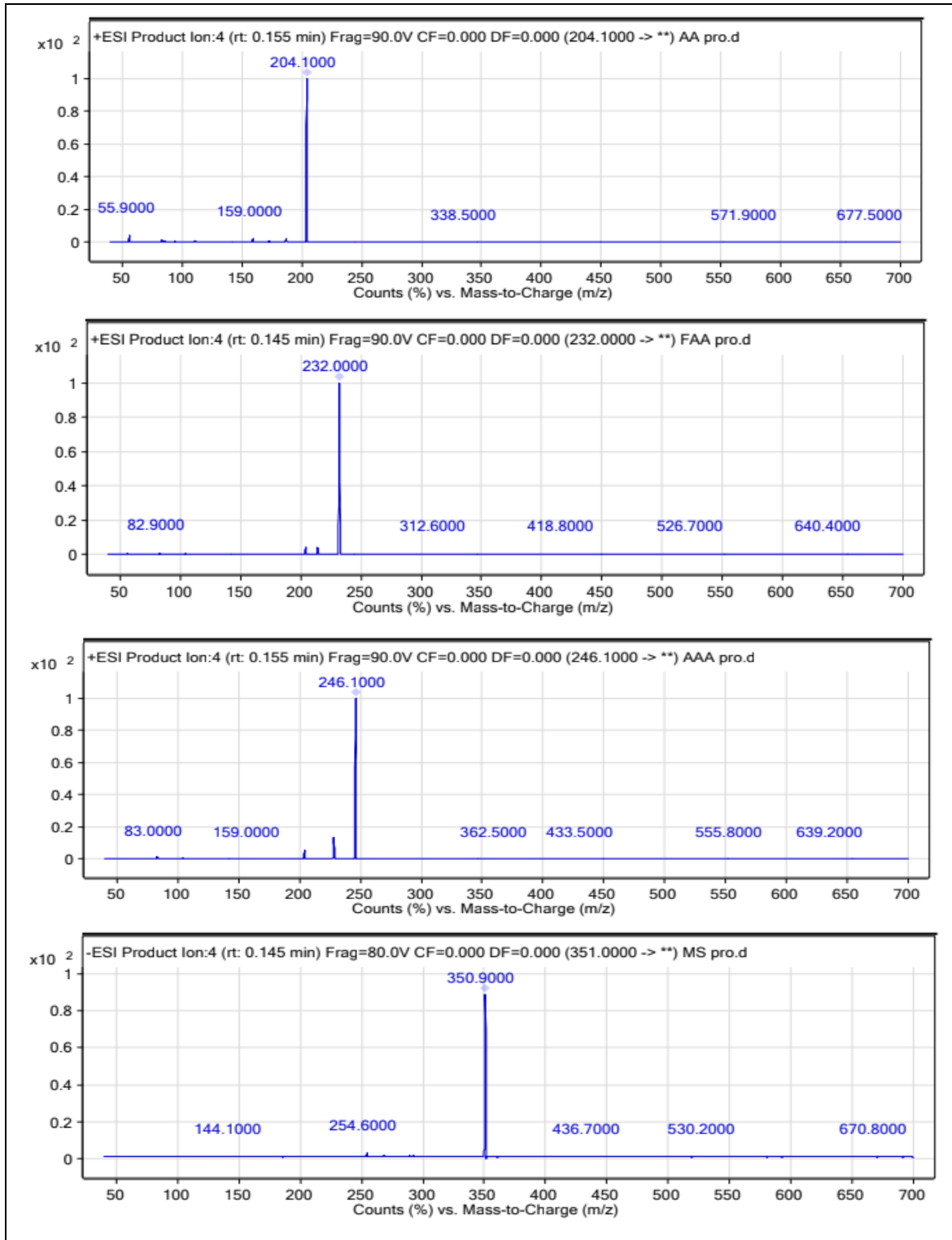
Şekil 4.15 Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 30.dakika ($t_{30.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.16. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 60.dakika ($t_{60.dk}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.17. Dişilerde i.m. MS uygulaması sonrası 6. saat ($t_{6.sa}$) plazma ekstraktına ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.18. Metamizol ve metabolitleri için oluşan LC-MS/MS pikleri

Tablo 4.6. Metamizol sodyumun (MS) atlarda 25 mg/kg dozunda damar içi uygulama sonrası metabolitler MAA, AA ve AAA için ölçülen farmakokinetik parametreler (n=7)

Parametreler↓	Dişi			Erkek		
	MAA	AA	AAA	MAA	AA	AAA
Metabolitler→						
C_{doruk} ($\mu\text{g/mL}$)	107,21± 5,55	16,68±0,04	0,68±0,02	114,40±5,57	17,57±0,01	0,64±0,02
t_{doruk} (h)	0,25± 0,00	0,90±0,14	1,10±0,22	0,30±0,11	0,75±0,00	1,00±0,00
EAA_{0-12} ($\mu\text{g/mL.h}$)	194,42± 4,77	57,05±0,11	2,47±0,08	374,11±38,14	58,48±0,45	2,29±0,09
$EAA_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL.h}$)	196,65± 4,86	62,25±0,11	3,42±0,24	398,53±51,82	63,48±0,48	3,33±0,37
$EAAM_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL.h}^2$)	447,74± 25,85	287,78±0,97	28,63±6,28	1602,29±465,01	304,84±4,37	25,41±5,56
OKZ (h)	2,28± 0,09	4,62±0,05	8,34±1,61	3,96±0,66	4,80±0,05	8,26±2,12
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	1,80± 0,45	2,82±0,03	6,44±1,28	2,81±0,54	3,06±0,04	5,60±1,56
V_{ssobs} (mg/kg)/($\mu\text{g/mL}$)	0,29± 0,01	1,86±0,00	6,09±0,85	0,25±0,02	1,89±0,02	6,86±1,26
Cl, (mg/kg)/($\mu\text{g/mL}$)/h	0,13± 0,01	0,40±0,00	6,13±3,03	0,06±0,01	0,39±0,00	7,59±0,84
λz , 1/h	0,41± 0,14	0,25±0,00	0,12±0,02	0,25±0,05	0,23±0,00	0,11±0,03
$C_{\text{last obs}}/C_{\text{doruk}}$	0,01±0,00	0,08±0,00	0,16±0,03	0,05±0,02	0,06±0,00	0,17±0,05
C_0 , ($\mu\text{g/mL}$)	162,16± 13,56	0,19±0,01	0,11±0,01	132,16±11,59	0,167±0,036	0,14±0,03
V_z , (mg/kg)/($\mu\text{g/mL}$)	0,33± 0,08	1,64±0,02	68,74±11,35	0,25±0,02	1,74±0,03	72,99±19,03

C_{doruk} : Doruk konsantrasyon miktarı; t_{doruk} : Doruk konsantrasyona ulaşmak için geçen süre; EAA_{0-12} : 0. dk' dan 12. saate kadarki eğrinin altındaki alan; $EAA_{0-\infty}$: 0. dk dan ∞ ' a kadarki eğrinin altındaki alan; $EAAM$: Derişim-zaman profilinde 0. dk'dan sonsuza kadarki moment eğrisi altında kalan alan; **OKZ**: Ortalama Kalış Zamanı; $t_{1/2\lambda z}$: Terminal yarılanma ömrü; V_{ssobs} : Kararlı durumda görünen dağılım hacmi; **Cl**: Klirens; λz : Terminal faz oranı sabiti; $C_{\text{lastobs}}/C_{\text{doruk}}$: Son ölçülebilir plazma konsantrasyonu/ Doruk konsantrasyon miktarı; C_0 : İlk intravenöz enjeksiyon takiben sıfır noktasında plazma ilaç konsantrasyon; V_z : Terminal aşamasında görünür dağılım hacmi.

Tablo 4.7. Metamizol sodyumun (MS) atlara 25 mg/kg dozunda kas içi uygulama sonrası metabolitler MAA, AA ve AAA için ölçülen farmakokinetik parametreler (n=7)

Parametreler↓ Metabolitler→	Dişi			Erkek		
	MAA	AA	AAA	MAA	AA	AAA
C _{doruk} (µg/mL)	56,65±1,50	14,85±0,67	0,35±0,05	96,00± 8,96	15,63±0,03	0,33±0,03
t _{doruk} (h)	0,50±0,00	1,50±0,00	1,50±0,00	0,70± 0,11	1,50±0,00	1,50±0,00
EAA ₀₋₁₂ (µg/mL/h)	156,45±13,46	56,71±0,32	1,79±0,06	328,19± 12,49	58,81±0,96	1,73±0,09
EAA _{0-∞} (µg/mL.h)	221,37±64,22	61,18±0,32	5,25±2,59	387,96±78,08	64,39±1,47	3,95±1,38
EAA _{0-∞} (µg/mL.h ²)	1537,29± 725,32	302,84±10,78	21,98±4,32	1452,84±210,25	329,81±20,81	23,18±5,46
OKZ (h)	6,81±2,56	4,95±0,02	5,03±1,75	4,55± 0,66	5,12±0,23	7,18±2,89
t _{1/2λz} (h)	5,93±0,69	3,02±0,01	10,68±2,27	3,03± 0,67	3,22±0,17	11,77±4,05
Vz/F, (mg/kg)/(µg/mL)	1,40±0,54	1,78±0,01	135,49±51,88	0,25± 0,07	1,80±0,07	119,65±25,80
Cl/F, (mg/kg)/(µg/mL)/h	0,12±0,03	0,41±0,00	5,71±2,41	0,07± 0,01	0,39±0,01	6,89±2,14
λ _z , 1/h	0,11± 0,07	0,23±0,00	0,05±0,03	0,23± 0,05	0,22±0,01	0,06±0,013
Cl _{astobs} /C _{doruk}	0,08± 0,02	0,07±0,00	0,32±0,07	0,07± 0,01	0,08±0,01	0,33±0,02

C_{doruk}: Doruk konsantrasyon miktarı; t_{doruk}: Doruk konsantrasyona ulaşmak için geçen süre; EAA₀₋₁₂: 0. dk' dan 12. saate kadarki eğrinin altındaki alan; EAA_{0-∞}: 0. dk dan ∞'a kadarki eğrinin altındaki alan; EAAM: Derişim-zaman profilinde 0. dk'dan sonuza kadarki moment eğrisi altında kalan alan; OKZ: Ortalama Kalış Zamanı; t_{1/2λz}: Terminal yarılanma ömrü; Vz/F: İntravenöz olmayan uygulamadan sonra Terminal faz aşamasında görünür dağılım hacmi; Cl: Klirens; F: Biyoyararlanım; Cl/F: Uygulama sonrası plazmada ilacın toplam klirensi; λ_z: Terminal faz oranı sabiti; Cl_{astobs}/C_{doruk}: Son ölçülebilir plazma konsantrasyonu/ Doruk konsantrasyon miktarı.

Yapılan çalışmada aktif maddenin dört metabolitinin plazmadaki düzeyinin belirlenmesi için yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) ve LC-MS/MS'den faydalanıldı. Metamizol Sodyum(MS) için (0,01-50 µg/mL) arasında lineer olduğu ve ($r^2= 0,99999$), 4-metilaminoantipirin (MAA) (0,01- 100 µg/mL) arasında lineer olduğu ve ($r^2= 0,9996$),4-formilaminoantipirin (FAA) için (0,05- 100 µg/mL) arasında lineer olduğu ve ($r^2= 0,9998$), 4-asetilaminoantipirine (AAA) için (0,01- 100 µg/mL) arasında lineer olduğu ve ($r^2= 0,9995$), 4-aminoantipirine (AA) için (0,05- 100 µg/mL) arasında lineer olduğu ve ($r^2= 0,9995$) olduğu belirlendi. En düşük tespit edilebilir limitinin (LOD) ise MS aktif madde için 2,52 ve metabolitlerden MAA için 3,09; AA için 4,08; AAA 2,43 ve FAA için ise 3,77 µg/mL olarak tespit edildi. Tayin edilebilir limitinin (LOQ) belirleme çalışmalarında ise MS aktif madde için 8,40 ve metabolitlerden MAA için 10,31; AA için 13,61; AAA 8,11 ve FAA için ise 12,58 µg/mL olduğu gözlemlendi. Ölçümde kullanılan standartların gün içi ve günler arası varyansının yaklaşık olarak %3–5 arasında değiştiği tespit edildi. Tüm metabolitler için geri kazanım değerlerinin % 82,7-98,5 arasında değiştiği gözlemlendi. Belirlenen bu yöntemin biyoeşdeğerlik değerlendirmesinde tercih edilecek bir analitik yöntem için yeterli şartları sağladığı görüldü.

Plazma örneklerinden aktif madde ve tüm metabolitlerinin optimum ekstraksiyonu için bazı yöntemler ve bu yöntemlerde bazı solventler değiştirilmiştir. Tüm ekstraktlarda hem aktif madde analizi yapılmış ve hem de tüm metabolitler tayin edilmiştir. Ekstraksiyonlar için sıvı ekstraksiyon ve SPE ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen veriler ışığında hem solvent tüketimi, zaman, %geri kazanım değerleri ve hem de ekstraksiyon etkinliği için en uygun yöntemin SPE ekstraksiyon yöntemi olduğu görülmektedir. Optimum ekstraksiyon sağlanan karışımının polariteleri ve diğer kimyasal özellikleri açısından pek farklı olmazsa da, sıvı sıvı ekstraksiyonda çözünen karışımı ile yapılan ekstraksiyon işlemleri oldukça uzun olması ve bazı aşamalarının ise ekstraksiyon sisteminden bağımsız olarak ve havaya açık bir ortamda uygulanması gerektiği için, plazma numunelerinin ekstraksiyon sürecinde değişik oluşumlara neden olduğu ve bu nedenle oldukça fazla kayıpların olduğu gözlemlenmiştir.

Atlara iki farklı damar içi ve kas içi uygulama ile 25 mg/kg dozunda Naproksen sodyumun damar içi uygulanmasını takiben dişi atlarda MAA metaboliti için analiz sonucu hesaplanan farmakokinetik parametrelerden plazma doruk yoğunluğu (107.10 ± 5.55 µg/mL) ve plazma derişimi-zaman grafiğinde eğri altında kalan alan (EAA) (194.42 ± 4.77 µg/mL) iken; AA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu

(16.68±0.04 µg/mL) eğri altı alanı (57.05±0.11 µg/mL) ve AAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (0.68±0.02 µg/mL) eğri altı alanı (2.47±0.08 µg/mL) olduğu tespit edildi. Aynı yol ile uygulanan Naproksen sodyumun erkek atlarda ise MAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (114.10±5.57 µg/mL) eğri altı alanı (374.11±38.14 µg/mL) iken; AA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (17.57±0.01 µg/mL) eğri altı alanı (58.48±0.45 µg/mL) ve AAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (0.64±0.02 µg/mL) eğri altı alanı (2.29±0.09 µg/mL) olduğu tespit edildi.

Naproksen sodyumun kas içi uygulanmasını takiben ise dişi atlarda MAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (56.65±1.50 µg/mL) eğri altı alanı (156.45±13.46 µg/mL) iken; AA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (14.85±0.67 µg/mL) eğri altı alanı (56.71±0.32 µg/mL) ve AAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (0.35±0.05 µg/mL) eğri altı alanı (1.79±0.06 µg/mL) olduğu tespit edildi. Aynı yol ile uygulanan Naproksen sodyumun erkek atlarda ise MAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (96.00±8.96 µg/mL) eğri altı alanı (328.19±12.49 µg/mL) iken; AA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (15.63±0.03 µg/mL) eğri altı alanı (58.81±0.96 µg/mL) ve AAA metaboliti için plazma doruk yoğunluğu (0.33±0.03 µg/mL) eğri altı alanı (1.73±0.09 µg/mL) olduğu tespit edildi.

Damar içi uygulanmasını takiben dişi atlarda doruk plazma yoğunluğuna ulaşma zamanının MAA metaboliti için en kısa (t_{doruk} : 0.25±0.00 saat) AA için (t_{doruk} : 0.90±0.14 saat) ve AAA da ise t_{doruk} :1.10±0.22 saat en uzun olduğu tespit edilmiştir. Aynı yol ile uygulama sonrası erkek atlarda ise doruk plazma yoğunluğuna ulaşma zamanının MAA metaboliti için en kısa (t_{doruk} : 0.33±0.11 saat) AAA dişi atlardaki gibi (t_{doruk} : 0.75±0.00 saat) ve AAA da ise t_{doruk} : 1.00±0.00 saat) olduğu tespit edilmiştir.

Kas içi uygulanmasını takiben dişi atlarda doruk plazma yoğunluğuna ulaşma zamanının MAA metaboliti için en kısa (t_{doruk} :0.50±0.00 saat) AAA ve AAA da ise en uzun (t_{doruk} :1.50±0.00 saat) olduğu tespit edilmiştir. Aynı yol ile uygulama sonrası erkek atlarda ise doruk plazma yoğunluğuna ulaşma zamanının MAA metaboliti için en kısa (t_{doruk} :0.70±0.00 saat) AAA ve AAA da ise dişi atlardaki gibi (t_{doruk} :1.50±0.00 saat) olduğu tespit edilmiştir. Doruk plazma yoğunluğuna ulaşma zamanının MAA metaboliti için dişi atlarda en kısa (t_{doruk} :0.25±0.00 saat) ve yine AAA metaboliti için en uzun dişi atlarda (t_{doruk} : 1.10±0.22 saat) olduğu tespit edilmiştir.

Damar içi uygulama sonrası; yarılanma ömrü ve ortalama kalış süresinin MAA metaboliti için en uzun erkek atlarda $t_{1/2\lambda Z}$: 3.96±0.66 saat, OKS: 2.81±0.54 saat) AAA metaboliti için ($t_{1/2\lambda Z}$: 4.80±0.05 saat, OKZ: 3.06±0.04 saat) olduğu tespit edildi.

Kas içi uygulama sonrası; yarılanma ömrü ve ortalama kalış süresinin MAA metaboliti için en uzun dişi atlarda ($t_{1/2\lambda z}$: 6.81±2.56 saat, OKZ: 5.93±0.69 saat) AAA metaboliti için en uzun erkek atlarda ($t_{1/2\lambda z}$: 7.18±2.89 saat, OKZ: 11.77±4.05 saat) olduğu gözlemlenmiştir. AA metaboliti için ise erkek ve dişi atlarda istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı bulunmuştur ($P < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada; Metamizol Sodyumun metabolitlerinin, Ülkemizin de önemli bir ekonomik gelir kaynağı olan saf kan Arap atlarında, 25 mg/kg dozunda iki farklı damar içi ve kas içi uygulama sonrası 12 saat boyunca plazma dağılımları değerlendirildi. Bu amaçla 14 adet safkan Arap atı cinsiyete göre her grupta 7 erkek ve 7 dişi hayvan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Kan örnekleri ilaç uygulamasından önce ve ilaç uygulamasını takiben 15. dakika ile 12. saatler arasında toplam 12 farklı zaman noktasında her defasında 5 mL kadar kan kulak venasından (V. aurocularis) alındı. Alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konularak santrifüj sonrası elde edilen plazmalardan gerekli ekstraksiyon sonrası plazma örnekleri DAD dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) ve LC-MS/MS kullanılarak analiz edildi.

Giorgi ve ark. nın atlara 25mg/kg dozunda i.v. MS uygulama sonrası MAA için C_{doruk} değeri bizim değerlerimizle yakınlık sergilemektedir. i.v. uygulama sonrası AA için C_{doruk} değeri bizim değerlerimizden düşüktür. MAA ve AA'nın i.m. uygulama sonrası C_{doruk} değerleri bizim değerlerimizden düşüktür. Giorgi ve ark. nın i.v. uygulama sonrası MAA için t_{doruk} değeri bizim değerlerimizden düşük olup bu farklılık ilk örnek alma zamanından kaynaklanmaktadır. Şöyle ki, çalışmamızda ilaç uygulaması sonrası ilk kan örneği alımı her iki uygulama yolunda da 15. dk. da yapılmıştır. i.v. uygulama sonrası AA için t_{doruk} değerleri verilerimizden düşüktür. Giorgi ve ark. nın i.m. uygulama sonrası MAA ve AA'nın t_{doruk} değerleri bizim değerlerimizden yüksektir. Giorgi ve ark. nın i.v. uygulama sonrası MAA için ölçtükleri EAA_{0-12} ve $EAA_{0-\infty}$ değerleri bizim değerlerimizle yakınlık sergilerken, aynı metabolitin i.m. uygulama sonrası EAA_{0-12} , $EAA_{0-\infty}$ değerleri değerlerimizden biraz düşüktür. Giorgi ve ark.nın i.v. ve i.m. uygulama sonrası AA için EAA_{0-12} ve $EAA_{0-\infty}$ değerleri değerlerimizden düşüktür. Giorgi ve ark.nın i.v. uygulama sonrası MAA için EAAM değerleri çalışmamızdaki her iki cinsiyet ait i.v. uygulama sonuçlarıyla yakınlık arz etmekte olup i.m. uygulama verilerimizden biraz düşüktür. Çalışmamızın i.v. uygulama sonrası MAA için OKZ değerlerinin Giorgi ve ark.'a nispeten yakın olduğu söylenebilir, bu parametre bağlamında uygulama yoluna göre belirgin bir farklılık çalışmamızda da gözlenmemiştir. Çalışmamızın AA için i.v. ve i.m. uygulama sonrası OKZ değerleri Giorgi ve ark.'nın değerlerine çok yakındır. Çalışmamızdaki önemli bir hususu vurgulamak gerekirse; OKZ parametresi her iki cinsiyette de damar içi uygulamalarda metabolitlerin MAA, AA ve FAA sıralamasıyla belirgin farklılık sergilerken, aynı

durumun kas içi uygulamada dişilerde azalan, erkeklerde artan bir seyir izlediği gözlenmektedir (26).

Klaus ve ark. atlara 25 mg/kg dozunda i.v. yolla MS uygulaması sonrası MAA için ölçtüğü $t_{1/2}$ değeri, çalışmamızın aynı parametre değerinden yüksektir. Çalışmamızın MAA için ölçülen EAA_{0-12} ve $EAA_{0-\infty}$ değerleri, Klaus ve ark.'nın aynı parametre için buldukları değerden erkeklerde yüksek, dişilerde yakındır. Bu farklılıkların çalışmada kullanılan atların yaşı, canlı ağırlıkları, türü, fizyopatolojik farklılıklar ve beslenme durumlarından kaynaklanabileceği söylenebilir (31).

Aupanun ve ark.'nın eşeklerde 25 mg/kg dozunda i.v., i.m. uygulama sonucunda buldukları MAA için C_{doruk} değeri (211,72) ve i.m. (46,33) olup, bu değerler bizim i.v. yolla uygulama sonuçlarımızdan yüksek, i.m. yolla elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Aupanun ve ark.'nın MAA için t_{doruk} değeri bizim değerlerimizden düşük olup bu farklılık ilk örnek alma zamanından kaynaklanmaktadır. Şöyle ki, çalışmamızda ilaç uygulaması sonrası ilk kan örneği alımı her iki uygulama yolunda da 15. dk. da yapılmıştır. Aupanun ve ark.'nın i.v. uygulamada MAA için ölçtükleri $t_{1/2}$ değeri (1,81) ve i.m. (1,94) olup, bu değerler bizim i.v. yolla uygulamada elde ettiğimiz verilerle aynı olup, i.m. yolla ölçülen değerlerimizden düşüktür. Bu çalışmada MAA için i.v. yolla uygulamada λz parametresi olarak ölçülen değer (0,40) olup sonucumuzla aynıdır, bu parametre için i.m. yolla ölçülen değerleri bizim değerimizden yüksektir. Yine MAA için i.v. uygulama sonrası ölçülen EAA_{0-12} ve $EAA_{0-\infty}$ değerleri, değerlerimizden düşük olup, i.m. değerlerimiz ise aynıdır. Çalışmamızın i.v. uygulama sonrası MAA için OKZ değerlerinin Aupanun ve ark.'nın değerlerinden yüksektir, bu farklılığın en son kan örneği alma süresine göre değişebileceğini de vurgulamak gerekir. Şöyle ki; çalışmamızda en son kan örneği alınması 12. Saat yapılmış olup onlarda bu süre 8. Saatte tamamlanmıştır. Bu parametre bağlamında uygulama yoluna göre belirgin bir farklılık çalışmamızda da gözlenmemiştir. Aupanun ve ark.'nın i.v. ve i.m. uygulama sonrası AA için ölçtükleri t_{doruk} değeri bizim değerlerimizden düşüktür. Bunun yanında i.v. ve i.m. uygulama sonrası AA için ölçülen $EAA_{0-\text{last}}$ değerleri değerlerimizden düşüktür. i.v. ve i.m. uygulama sonrası AA için ölçülen OKZ değerlerimiz, Aupanun ve ark.'nın değerlerine çok yakındır. Bu çalışmada AA için i.v. yolla uygulamada λz parametresi olarak ölçülen değer, sonucumuzdan düşük olup, bu parametre için i.m. yolla ölçülen değerleri bizim değerimizle aynıdır (35).

Giorgi ve ark.'nın koyunlarda 20 mg/kg dozunda i.v. ve i.m. uygulama sonrasında MAA için ölçtükleri C_{doruk} değerleri uygulama yolu sırasıyla (218) ve (108)

olup bu değerler bizim değerlerimizden yüksektir. MAA için i.v. uygulama sonrası t_{doruk} değeri bizim değerlerimizden düşük olup bu farklılık ilk örnek alma zamanından kaynaklanmaktadır, ancak i.m. uygulama sonrası elde ettikleri sonuçlar bizim değerlerimizle aynıdır. Giorgi ve ark.'nın koyunlarda i.v. uygulamada MAA için ölçtükleri $t_{1/2}$ değeri (3,01) ve i.m. (1,45) olup, bu değerler bizim i.v. yolla uygulamada elde ettiğimiz verilere benzer olup, i.m. yolla ölçülen değerlerimizden düşüktür. Bu çalışmada MAA için i.v. yolla uygulamada λ_z parametresi olarak ölçülen değer (0,24) olup sonucumuzla benzerdir, bu parametre için i.m. yolla ölçülen değerleri bizim değerimizden yüksektir. Yine MAA için, i.v. ve i.m. uygulama sonrası ölçülen EAA_{0-12} ve $EAA_{0-\infty}$ değerleri, bizim elde ettiğimiz değerlerle benzerdir. Çalışmamızın i.v. uygulama sonrası MAA için ölçülen OKZ değeri Giorgi ve ark.'nın değerlerine benzerdir. Ancak i.m. uygulamada elde ettikleri değerler bizim değerlerimizden düşüktür. Söz konusu bu farklılığın Giorgi ve ark.'nın yaptığı çalışmada en son kan örneği alma süresi 10. saat olup, farklılığın buradan kaynaklanabileceği söylenebilir (36).

Domínguez-Ramírez ve ark.'nın sıçan plazmasında s.c. (177.8 mg/kg) dozunda s.c. MS uygulama sonrası MAA için ölçtükleri C_{doruk} değeri (95.8) çalışmamızdaki her iki cinsiyetteki i.v. uygulamanın değerlerine nispeten yakın olurken, i.m. uygulama sonrası dişi atlarınkinden çok yüksek olup, erkek atlarınkiyle neredeyse aynıdır. AA için ölçülen aynı parametre değeri (21.9) çalışmamızın her iki cinsiyet ve her iki uygulama yoluna ait değerlerden biraz yüksektir. AAA için ölçülen yine aynı parametre değeri (11.8) sonuçlarımızın (her iki cinsiyet ve her iki uygulama yoluna ait) değerlerinin çok üzerindedir. Aynı çalışmada MAA için ölçülen t_{doruk} değeri (0.25) çalışmamızın her iki cinsiyete ait i.v. uygulama verisiyle aynıdır. AA'nın değerleri (2) çalışmamızın her iki cinsiyete ait i.m. uygulama sonuçlarına nispeten yakın, fakat AAA için ölçülen (4) değer, çalışmamızın her iki cinsiyete ait i.m. uygulama sonuçlarından yüksektir. Domínguez-Ramírez ve ark.'nın MAA için ölçülen $EAA_{0-\infty}$ (198.2) değeri çalışmamızdaki dişilere i.v. uygulamada ölçülen değere çok yakın olurken, aynı uygulama yoluyla erkeklerde ölçülen değerden çok düşük, yine dişilere i.m. uygulamada ölçülen değere benzerlik gösterirken, erkeklerde ölçülen değerden çok düşüktür. Domínguez-Ramírez ve ark.'nın MAA için ölçülen $t_{1/2}$ değeri (1,3) çalışmamızda sadece dişilerdeki i.v. uygulama sonucuna biraz yakın olup erkeklerde i.v. ve her iki cinsiyette i.m. uygulamada ölçülen değerlerden çok düşüktür. AA için aynı parametre değerleri (2,4) bizim her iki cinsiyetteki i.v. uygulamada ölçülen

değerlerimize çok yakın olup, bizim her iki cinsiyetteki i.m. uygulamada ölçülen değerlerimizden biraz düşüktür. Domínguez-Ramírez ve ark.'nın MAA için ölçülen Cl/F (0,9) değeri çalışmamızdaki her iki cinsiyetteki i.m. uygulamada ölçülen değerlerimizden oldukça yüksektir. AA için ölçülen Cl/F değeri (1,4) değeri çalışmamızdaki her iki cinsiyetteki i.v. ve i.m. uygulamalarda ölçülen değerlerimizden yüksektir. Kuşkusuz bu farklılıkların, çalışmanın yapıldığı hayvanın türü (sıçan ve at) ile ekstraksiyon işlemlerinden kaynaklanabileceği söylenebilir (25).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Atlar, kas-iskelet sistemleri gelişimini tamamlamadan antrenman ve yarışlarda saatte yaklaşık 30 mil hızla koşmaya zorlanmakta ve meydana gelen yaralanmaların tedavisinde yüksek dozda narkotik analjezikler veya temini -kontrolle tabi reçetelere bağlı olmadığı için- kolay olan NSAİİ'ler kullanılmaktadır. NSAİİ'in yarış atlarında, ağrıya karşı aşırı duyarlılığı azaltarak ya da ortadan kaldırarak atların fiziksel performansını arttırmak için doping amacıyla kötüye kullanılabilirdiği de bilinmektedir.

Bu çalışmanın verileri ışığında:

- 1- Ülkemizin önemli ekonomik gelir kaynaklarından olan Saf kan Arap atlarında her iki cinsiyette 7 adet ata böylesi bir çalışmanın yapılması emeği geçenler adına gurur vericidir. Çünkü bu çalışmanın projelendirilmesi aşamasında yaptığımız literatür taramalarında bu çalışmadaki gibi ırk, cinsiyet, yaş gibi homojenlik sağlayan başka bir yayına rastlanmamıştır.
- 2- Geliştirdiğimiz bu yöntem, çok düşük limitlerde metamizol metabolitlerinin kısa sürede analizlerine imkân sağlamıştır. Analiz sonucunda tüm metabolitlerin kan düzeyi ve hesaplanan parametrelerin atların hem cinsiyet ve hem de uygulama yollarına göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.
- 3- Bu çalışmada farmakolojik parametrelerin ölçümü için geliştirilen metot/yöntem daha sonraki çalışmalara rehberlik edecek niteliktedir. Çünkü benzeri çalışmalarda metabolitler bu çalışmadaki kadar net olarak ölçülememiştir.
- 4- Bu çalışmada ölçülen farmakokinetik parametrelerden bazılarının (C_{doruk} , t_{doruk} , EAA, $t_{1/2}$ gibi) BE çalışmaları için de önem arz etmesi gelecekte İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AD'nın BE çalışmalarında referans laboratuvar olmasına öncülük edecektir.
- 5- Atlarda MS uygulamada dozlamaların (ilaç uygulama aralıkları) belirlenmesinde bu çalışma verilerinin kullanılması isabetli bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Tatar E, Topçu T, Küçükgülzel İ. Yarış atlarında kullanımı suistimal edilen bazı non-steroidal antiinflamatuar ilaçların biyolojik örneklerden kromatografik yöntemlerle miktar tayini. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2012; 16: 91-106.
2. Bowers LD. The International Antidoping System and Why It Works. *Clin Chem* 2009; 55: 1456-61.
3. Nikolova I, Tencheva J, Voinikov J, Petkova V, Benbasat N, Danchev N. Metamizole: A Review Profile of A Well-Known Forgotten, Drug. Part I Pharmaceutical and Nonclinical Profile. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq* 2013; 27(2): 3605-19.
4. Maurer HH. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 15: 3-25.
5. You Y, Uboh CE, Soma LR, Guan F, Li X, Liu Y, Rudy JA, Chen J, Tsang D. Simultaneous separation and determination of 16 testosterone and nandrolone esters in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control. *J Chromatogr A* 2011; 1218(26): 3982-93.
6. Şentürk T. Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAİİ). *İç Hast Derg* 2014; 2: 490-5.
7. Özbudak H, Ünal AZ, Sabuncuoğlu S. Gebelikte Non-Steroid Antiinflamatuar İlaçların Kullanımının Değerlendirilmesi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2016; 20: 64-71.
8. Hanedan B. Ratlarda Nöropatik Ağrı Modelinde Siklooksijenaz Selektivitelere Göre Nonsteroidal Anti-İnflamatuar İlaçların (NSAİİ) Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Konya: Necmettin Erbakan Üniversitesi, 2013.
9. Kayaalp SO. Klinik Farmakolojinin Temel Esasları Ve Temel Düzenlemeler, Ankara, Hacettepe- Taş Kitapçılık, 2. Baskı. 2001: 305-47.
10. Carabaza A, Cabré F, Rotllan E, Gómez M, Gutiérrez M, García ML, Mauleón D. Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pharmacol* 1996; 36(6): 505-12

11. Çakal E. İlaç Numunelerinde Kafein ve Metamizol'ün Kemometrik Yöntemlerle Tayinleri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2012.
12. Adadioğlu İ. Metamizol, Diklofenak Sodyum ve Parasetamol'ün Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Organofosfat Zehirlenmesi Üzerine Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Acil Tıp Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Afyon Karahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2010.
13. Flecknell P. Analgesia from a Veterinary Perspective. *Br J Anaesth* 2008; 101: 121-24.
14. Jasiocka A, Maşlanka T, Jaroszewski JJ. Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2014; 17(1): 207–14.
15. Nazlı M. Busulfanın Klinik Farmakokinetik Olarak irdelenmesi ve Sağaltımsal ilaç izlemi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2008.
16. Yıldız G. Terapötik İlaç İzleme İçin Türkçe Yazılım ve Validasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2008.
17. Kaya S. Merkezi Sinir Sistemi İlaçları. İçinde: Pirinçi İ, Bilgili A. (editörler). *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*, 2. Baskı. Ankara, Medisan Yayıncılık, 2000: 353-72.
18. Yılmaz İ. Bioequivalence of the Veterinary Medicine. *J. Fac. Pharm* 2008; 37(3): 217-32.
19. Yılmaz İ, Elmas M. The Bioequivalence Determination of Two Different Formulations of Enrofloxacin in Heifers Following Intramuscular Administration. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2010; 16(3): 377-82.
20. Ağabeyoğlu İ. <http://ekutuphane.teb.org.tr/pdf/tebakademi/modernfarmasotk/13.pdf>. Temel Famokinetik. 14 Eylül 1018.
21. <https://www.doktorilac.com/ilac/novalgin-500-mg-tablet/> 20 Haziran 2018
22. Driessen B. Pain: Systemic and Local/Regional Drug Theraphy. *Clin Tech Equine Pract* 2007; 6: 135-44.
23. Dirikolu L, Woods WE, Boyles J, Lehner AF, Harkins JD, Fischer M, Schaeffer DJ, Tobin T. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents and Musculoskeletal Injuries in Thoroughbred Racehorses in Kentucky. *J Vet Pharmacol Therap* 2008; 32: 271-79.

24. Yıldırım E, Sağıroğlu O, Kılıç FS, Erol K. Effects of Nabumetone and Dipyron on Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats. *Inflammation* 2013; 36(2): 476-81.
25. Domínguez-Ramírez AM, Calzadilla PC, Cortés-Arroyo AR, Hurtado y de la Peña M, López JRM, Gómez-Hernández M, et al. High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 71:173–78.
26. Giorgi M, Aupanun S, Lee HK, Poapolathep A, Rychshanova R, Vullo C, Faillace V, Laus F. Pharmacokinetic Profiles of the Active Metamizole Metabolites in Healthy Horses. *J. vet. Pharmacol Therap* 2016; 40(2): 165-71.
27. Tanyıldızı S, Bozkurt T. Effects of Acetylsalicylic Acid and Metamizol on Hyaluronidase Activity and Sperm Characteristics in Rams. *Animal Reproduction Science* 2003; 76: 195–204.
28. Gökçimen A., Özgüner M., Bayram D. UM ve SO. Metamizol Sodyumun Sıçan Karaciğer, Böbrek ve Akciğer Dokuları Üzerine Etkisi. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2006; 13(1): 27–31.
29. Zhang C, Zhang L, Cao S, Jiang Z, Wu H, Yan M, Zhang X, Jiang S, Xue F. Simultaneous determination of residues of dipyron metabolites in goat tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2016; 196: 83–9.
30. Jedziniak P, Pietruk K, Śledzińska E, Olejnik M, Juskiewicz T S, Żmudzki J. Simultaneous Determination of Residues of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Glucocorticosteroids in Animal Muscle by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Additives & Contaminants* 2016; 9: 1837–48.
31. Klaus AM, Schlingloff Y, Kleinitz U, Böttcher M, Hapke HJ. Pharmacokinetic Study of Dipyron Metabolite 4-MAA in the Horse and Possible Implications For Doping Control. *J Vet Pharmacol Therap* 1997; 20: 204-08.
32. Pamel EV, Daeseleire E. A Multiresidue Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometric Method For the Detection and Quantitation of 15 Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Bovine Meat and Milk. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407: 4485–94.
33. Yapar K, Atakişi E, Uzlu E, Atakişi O, Çitil M, Uzun M, Erdoğan HM. Farklı Dozlardaki Metamizol Sodyum'un Farelerde Serum Enzim Aktiviteleri ile Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Oksidant Seviyeleri Üzerine Etkileri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2007; 13(2): 121-25.

34. Ibanez L, Vidal X, Ballarin E, Laporte JM. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 60: 821-29.
35. Aupanun S, Laus F, Poapolathep A, Owen H, Vullo C, Faillace V. Pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-Methyl-amino-antipyrine and 4-Acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (Dipyron) in Healthy Donkeys. *J Equine Vet Sci* 2016; 47: 55-61.
36. Giorgi M, Vito VD, Lee HK, Laus F, Kowalski C, Faillace V, Burmanczuk A, Vullo C. Pharmacokinetic Investigations of the Marker Active Metabolite-4-Methylamino-Antipyrin After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole in Healthy Sheep. *Small Ruminant Res* 2015; 132: 143-46.

EKLER

EK.1. Özgeçmiş

1990 yılında Nottingham/ İNGİLTERE' de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Malatya' da tamamlayıp, 2009 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başlayarak, 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Malatya Büyükşehir Belediyesi MASKİ Genel Müdürlüğün' de Kimya mühendisi olarak işe başladı. MASKİ Genel Müdürlüğü Çevre Laboratuvarının kurulmasında görev aldı ve su kimyası üzerine çalıştı. TS EN ISO 9001(kalite yönetim sistemi temel eğitimi), 18001(İSG yönetim sistemi ve dokümantasyon eğitimi),14001(çevre yönetim sistemi ve dokümantasyon eğitimi), 10002 (müşteri memnuniyeti ve şikayet yönetim sistemi eğitimi), 17025(Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel gereklilikler standardı ve iç denetçi eğitimi) alanlarında sertifikalar alarak akreditasyon ve kalite çalışmalarında yer aldı. IC, ICP-OES ve ICP-MS cihazlarında uzmanlaştı. 2017 yılında pedagojik formasyon eğitimi aldı. 2015 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D' da yüksek lisans eğitimine başladı.

EK.2. Etik Kurul



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 07-12-2017
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-25
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : At
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Salkın Arap atı (*Equus ferus caballus*)
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 14 Adet (7 erkek ve 7 dişi)
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : En az 2-2,5 yaş ve ortalama 380-450±kg c.a.

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Selim ERDOĞAN'ın yürütücüsü olduğu "Atlarda iki farklı yolla uygulanan metamizolun farmakokinetiğinin belirlenmesi" isimli 2016/A-25 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağrı TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
 Vet. Hek. Özge ÖZYALIN Üye	 Akın ÖZ Sivil Üye	 Dr. Mehmet DENİZ Sivil Üye