

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MASTİTİSİN BENZİMİDAZOL ANTHELMİNTİKLERİN SÜTLE
ATILIM FARMAKOKİNETİĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Alper SEZGİN

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ

KONYA - 2012

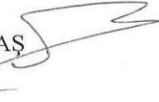
S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Alper SEZGİN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ender YARSAN
Ankara Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Bünyamin TRAS
Selçuk Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Enver YAZAR
Selçuk Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Muammer ELMAS
Selçuk Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. A. Levent BAŞ
Selçuk Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tevfik TEKELİ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER	i-ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iii
1. GİRİŞ	1-19
1.1. Benzimidazol Grubu Anthelmintikler	3
1.2. Benzimidazollerin Kimyasal Yapıları	3-8
1.3. Benzimidazollerin Farmakokinetikleri	9-12
1.4. Benzimidazollerin Etki Mekanizması	12
1.5. Benzimidazollerin Etki Spektrumu	13
1.6. Benzimidazollerin Kullanılmaları ve Dozları	14
1.7. Güvenlik ve Toksikite	14-16
1.8. Kontrendikasyonları ve Yasal Düzenlemeler	16
1.9. Benzimidazol Antelmintiklerin Analiz Metodları	16-17
1.10. Mastitisin Süte İlaç Geçişi Üzerine Etkisi	17-19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	20-29
2.1. Kullanılan Ekipman	20
2.2. Kimyasallar	21
2.3. Hayvan Denemesi	22
2.4. Metot	22-26
2.4.1. Kan Ekstraksiyon Yöntemi	23
2.4.2. Süt Ekstraksiyon Yöntemi	23-26
2.5. İstatistiksel Analiz	26-29
3. BULGULAR	30-46
4. TARTIŞMA	47-50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
6. ÖZET	52

7. SUMMARY	53
8. KAYNAKLAR	54-62
9. EKLER	63
Ek-A: Etik Kurul Raporu	64
10. ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

C_{doruk}	İlacın serumdaki veya sütteki doruk yoğunluğu
dak	Dakika
EAA	Eğrinin altındaki alan
HPLC	Yüksek basınçlı likit kromatografi
i.m.	Kas içi
i.v.	Damar içi
KGA	Kabul edilebilir günlük alım
kg	Kilogram
LC	Likit kromatografi
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Ölçülebilirlik sınırı
mg	miligram
ml	mililitre
μg	mikrogram
μl	mikrolitre
MRL	Maksimum kalıntı limiti
μm	mikrometre
MS	Kütle spektrometri
ppm	milyonda bir
ppb	milyarda bir
SD	Standart sapma
t_{doruk}	İlacın serumdaki veya sütteki doruk yoğunluğa ulaşma zamanı
$t_{1/2\alpha}$	İlacın dağılma yarı ömrü
$t_{1/2\beta}$	İlacın eliminasyon yarı ömrü
$t_{1/2ab}$	İlacın emilim yarı ömrü

1. GİRİŞ

Bir ilacın vücuttaki davranışını ilaç ve canlıya ait çeşitli faktörler belirler. İlaçla ilgili faktörleri ilaca ait fizikokimyasal özellikler, uygulanan ilacın dozaj rejimi (doz, doz intervali, uygulama yolu ve uygulama süresi) ve ilacın farmasötik şekli oluşturur. İlaç davranışını etkileyen canlı ile ilgili çok sayıda faktör belirlenmiş olup, bunlar tür, ırk, yaş, cinsiyet, hastalık durumu, gebelik, verim düzeyi, beslenme alışkanlığı, içinde bulunduğu çevre şartlarıdır. Gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda ilaç davranışını etkileyen faktörlerin bilinmesi çok önem arz eder. İnsan ve çevre sağlığını korumak amacı ile insan tüketimine sunulan gıdalarda ilaçlar için kabul edilebilir kalıntı limitleri ve ilaçların hayvanlarda kullanımını takiben gıdaların insan tüketimine sunulması için yasal arınma süreleri belirlenmiştir. Karsinojenik etkisi veya etki tehlikesi bulunan maddelerin dışında kalan bileşiklerin besinlerde bulunmasına izin verilen düzeyi (tolerans) besin maddesinin tüketim veya besin faktörü, ilgili maddenin kendisine en duyarlı hayvan türündeki etkisiz miktarı (veya kabul edilebilir günlük alım miktarı) ve güven faktörü dikkate alınarak hesaplanabilir. Veteriner ilaç geliştirme çalışmalarının en önemli ve masraflı safhasını hedef türlerde yasal arınma süresinin belirlenmesi oluşturur (Fletouris ve ark 1996, Paige ve ark 1997, Serratos ve ark 2006, Traş ve ark 2011). Yasal arınma süreleri standardize edilmiş deney şartları ve normal sağlıklı hayvanlar üzerinde yürütülmektedir. İlaç ve konakçı ile ilgili çeşitli faktörlerin ilaçların farmakokinetik özelliklerini değiştirdiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Yangı ile seyir eden hastalıkların ilaç farmakokinetiğinde değişimlere neden olabilecek derecede fizyolojik olaylarda değişimlere neden olduğu ortaya konmuştur (Blood 1983, Gips ve Soback 1999, Gruet ve ark 2001, Traş ve Elmas 2005, Gehring ve Smith 2006). Bu değişikliklerden bazıları damar geçirgenliğinin artması, plazma protein oran ve çeşitliğinde değişiklik, biyolojik sıvılarda pH değişiklikleri, transmembran protein aktivitelerinde, ilaç metabolizmasından sorumlu enzim düzeyinde, mide-barsak hareketlerinde ve organ ve dokuların kan perfüzyonundaki değişiklikleri kapsar (Blood 1983, Gips ve Soback 1999, Gruet ve ark 2001, Gehring ve Smith 2006).

İlaçların vücuttan atılma yerlerinden biri de laktasyonda olan canlılar için meme ve dolayısı ile süttür. Mastitis gibi meme fonksiyonlarını etkileyen hastalıklar sütle ilaç atılımı üzerinde önemli bir faktördür.

Mastitis süt işletmelerinde en sık gözlenen ve en fazla ekonomik kayıplara yol açan hastalıkların başında gelir. Ayrıca, mastitis, sütün nitelik ve niceliğini önemli ölçüde etkiler. Mastitisin ortaya çıkmasında çeşitli faktörler rol oynamakla birlikte asıl etken başta bakteriler olmak üzere mikroorganizmalardır (Gips ve Soback 1999, Gruet ve ark 2001, Gehring ve Smith 2006).

Mastitide ilaçların süte geçiş oran ve sürelerini değiştirebilecek düzeyde meme dokusu ve sütün nitelik ve niceliklerinde değişikliklerin meydana geldiği ortaya konmuştur (Gips ve Soback 1999, Gruet ve ark 2001, Gehring ve Smith 2006). Sütün miktar, pH, somatik hücre sayısı, yağ ve protein oranında değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir. İlaçların plazma ve sütteki proteinlere bağlanma oranlarının farklı olduğu, süt verimi ve sağım sayısının sütle ilaç atılımını etkilediği ileri sürülmektedir. Ayrıca meme dokusundaki kapillar damarların geçirgenliğinin arttığı, süt kanallarının bütünlüğünün bozulduğu ve P-glikoprotein gibi taşıyıcı membran protein fonksiyonlarında değişikliklerin gözleendiği ortaya konmuştur (Gips ve Soback 1999, Gruet ve ark 2001, Ito ve Lee 2003, Larsen ve ark 2003, Holford 2004, The Merck Veterinary Manual 2005, Zhao ve ark 2006, Lee 2007).

Antibakteriyel ilaçlar başta olmak üzere bazı ilaçların mastitiste süte geçiş oranlarının değiştiği ifade edilmektedir (Rantala ve ark 2002, Schneider ve ark 2004, Serieys ve ark 2005, Belloli ve ark 2006, Marin ve ark 2007, Lucas ve ark 2009).

Büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde en çok kullanılan ilaç grupları arasında ikinci sırada antelmintikler bulunur. Bu grup ilaçlar arasında ise en yaygın benzimidazol grubu ilaçlar kullanılmaktadır. Benzimidazollerin etki spektrumu geniş olduğundan nematodlar başta olmak üzere sesto, trematod ve giardia'ya karşı kullanılmaktadır.

İnsanların artan gıda güvenliği kaygıları, ulusal ve uluslar arası gıda ticaretinde ilaç kalıntısına yönelik uygulanan yasal kontrol ve denetimler gıda üreten firmaları süt gibi hayvansal ürünlerde kimyasal madde kalıntısı konusunda tedbir almayı zorunlu kılmıştır. Alınan tedbirlerin başında süt üreticisinden süt alınırken ilaç kalıntısını belirlemeye yönelik uygulanan testlerdir. Özel sektör

daha çok hayvanlarda sık kullanılan antibakteriyal ilaçları belirlemeye yönelik testler uygulamaktadır (Paige ve ark 1997, Canavan 2004, Lützow 2004, Serratos ve ark 2006). Türkiye'nin de içinde yer aldığı çoğu ülkede hayvansal gıdalarda ilaç kalıntı izleme programları resmi kurumlarca rutin olarak sürdürülmektedir.

Kaynak taramalarında sığırlarda sütle benzimidazol atılımı üzerine mastitisin etkisini belirlemeye yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmanın amacı mastitisin benzimidazol antelmintik ilaçların süte geçiş oranı üzerinde etkisinin olup olmadığını belirlemektir.

1.1. Benzimidazol (BZD) Grubu Antelmintikler

Antelmintikler, sindirim kanalı, solunum yolları, karaciğer gibi organlarda yerleşen parazitlere karşı kullanılan ilaçlardır.

BZD grubu antelmintikler bu endikasyonda kullanılan en yaygın ilaç grubunu oluşturur. Tiyabendazolun 1960 yılındaki sentezinden günümüze çok sayıda BZD ve ön BZD bileşiği sentezlenmiş olup dünya genelinde bunların 20 tanesi insan ve hayvanlarda farklı ticari isim ve farmasotik şekilde kullanılmaktadır (Roberson 1988, Lanusse ve Prichard 1993, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Spasov ve ark 2000, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, Rigter ve ark 2004, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005).

BZD grubu antelmintik bileşiklerden veteriner hekimlikte kullanılanlar, tiyabendazol (TBZ), albendazol (ABZ), oksfendazol (OFZ), triklabendazol (TKBZ), fenbendazol (FBZ), oksibendazol (OBZ), luksabendazol (LBZ), siklobendazol (SBZ), flubendazol (FLBZ), parbendazol (PBZ), mebendazol (MBZ), kambendazol (KBZ) ve rikobendazol (RBZ, ALBSO)'dır .

1.2. Benzimidazollerin Kimyasal Yapıları

Tüm BZD' ler 1,2 – diamin benzen merkezi yapısına sahiptirler. İmidazol grubunun 4 ve 5 pozisyonuna benzen bağlanmasından oluşan bir bisiklik halka yapısındadırlar. BZD türevleri tiyabendazolden farklı olarak benzen halkasının C5 karbon atomu üzerinde tiofanat grubu taşırlar (Roberson 1988, Kaya 2000). İmidazolun nitrogen atomlarındaki moleküller hem asidik

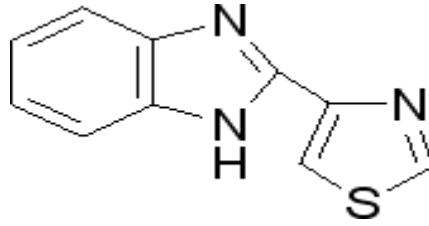
hem de bazik karaktere sahiptir. BZD bileşikleri beyaz kristal toz şeklindedir. Beş aşamada sentetik işlemle sentezlenen albendazol ise soluk yeşil renkte şekilsiz tozdur. Benzimidazoller suda çözünmeyen veya çok az çözünen ve yüksek erime derecesine sahip bileşiklerdir. ABZ ve FBZ metanolde, TKBZ ise tetrahidrofuran ve sikloheksanda iyi çözünür (Constantinou ve ark 2000, Rosenthal ve Goldsmith 2004).

Antelmentik olarak kullanılan BZD'ler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

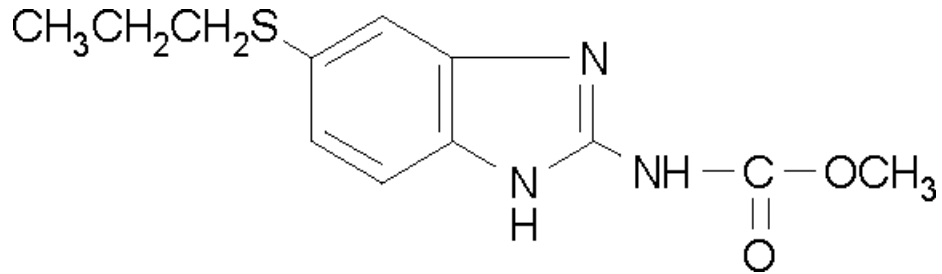
Tiazolil BZD: TBZ, KBZ

Metilkarbamatlı BZD: MBZ, ABZ, FBZ, OFZ, OBZ, FLBZ, LBZ, SBZ

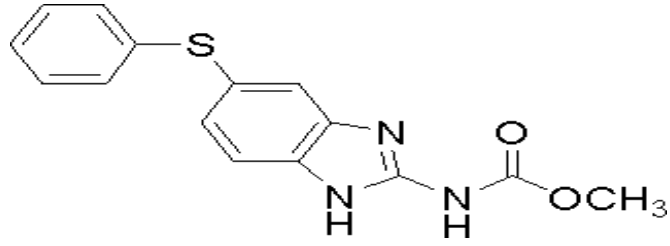
Halojenli BZD: TKBZ, Ön BZD (tiofonat, febantel, netobimin)



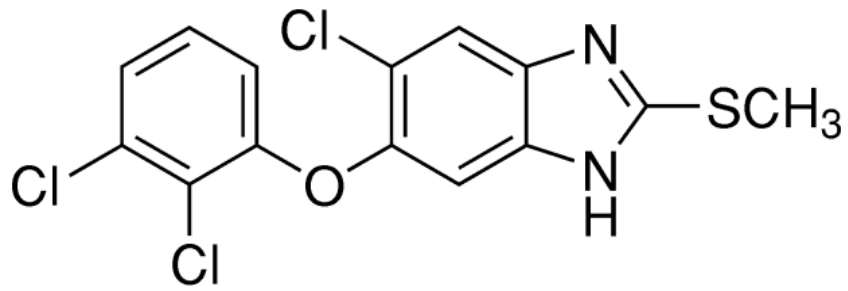
Tiyabendazol (2-(4-Thiazolyl)benzimidazole) $C_{10}H_7N_3S$



Albendazol (Methyl 5-(propylthio)-2-benzimidazole carbamate), $C_{12}H_{15}N_3O_2S$



Fenbendazol (Methyl 5-(phenylthio)-2-benzimidazolecarbamate), $C_{15}H_{13}N_3O_2S$



Triklabendazol (5-Chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-(methylthio)-1H-benzimidazole), $C_{14}H_9Cl_3N_2OS$

Şekil 1. 1. Benzimidazollerin kimyasal yapıları.

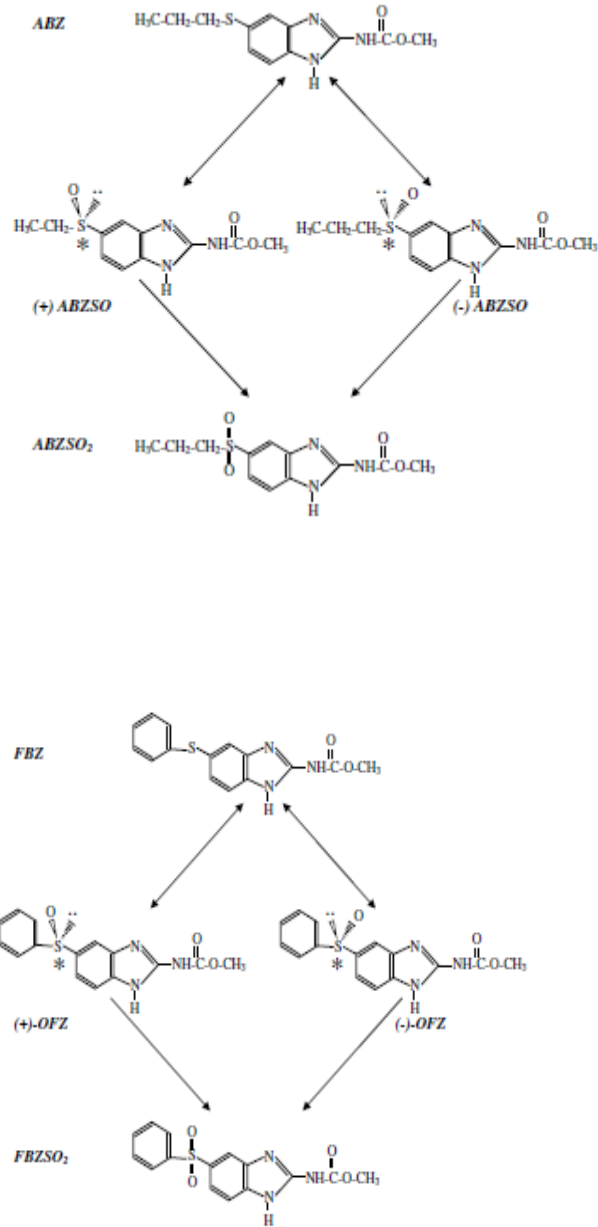
Suda çözünmeme ve zayıf emilim, metilkarbamatlı BZD'lerin etkinlik, biyoyararlanım ve farmasotik üretiminde önemli sınırlayıcı özelliklerdir. Bu problemler ön BZD ilaçların sentezlenmesiyle aşılmaya çalışılmış ve lobendazola dönüşen tiofonat ve ABZ ve FBZ'e dönüşen netobimin ile febantel sentezlenmiştir.

Tiyabendazol, albendazol ve oksfendazolun dışındaki benzimidazoller hayvanların mide-barsak kanalından çok az emilirler. Bu özellikleri, suda az çözünmelerine bağlıdır. Uygulanan hayvan türüne bağlı olarak tiyabendazol, flubendazol ve mebendazol genellikle hızlı emilimlerinden dolayı, plazma pik seviyelerine 2-7 saat içerisinde ulaşırlar. Albendazol, fenbendazol, oksfendazol, oksibendazol ve parbendazolde için bu süre 6-30 saat arasındadır. Genellikle plazma seviyeleri oral formülasyondaki dozun %1'i düzeyindedir. Albendazol, diğerlerine göre daha fazla oranda emilmekte, buna bağlı olarak uygulanan doz 9 gün içerisinde (% 28'i ilk 24 saatte) idrarla atılmaktadır (Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Capece ve ark 2001, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, EMEA 2004a, EMEA 2004b, Rosenthal ve Goldsmith 2004, Virkel ve ark 2004, Capece ve ark 2009).

BZD'lerin metabolizma oranı ilaca göre değişir. Fenbendazol, sığır ve koyunlarda %44-50 oranında değişmemiş halde feçesle ve %1'den azıda idrarla atılmaktadır. Ruminantlarda temel metabolit, fenil halkasının hidroksilasyonu ile oluşmaktadır. Domuzlarda oluşan metabolit sayısı daha fazla olabilmektedir. Albendazol, başlıca sülfoksit ve sülfon metabolitlerine dönüştürülmekte ve çoğunlukla idrarla atılmaktadır. Triklabendazol vücutta sülfoksit ve sülfona çevrilir; ikisi de serbest ve birleşme ürünleri halinde safrada bulunur. Vücuttan % 40 kadarı safra ve % 6.5 kadarı da idrarla atılmaktadır (Kaya 2000, Capece ve ark 2001, Cristofol ve ark 2001, Virkel ve ark 2002, Rosenthal ve Goldsmith 2004, Capece ve ark 2009).

Mebendazol çok az oranda metabolize olur ve çoğu değişmemiş halde feçesle 24-48 saat içerisinde atılır. İlaç % 5 ve 10 oranında dekarboksilasyon türevi metabolitleri şeklinde idrarla atılır. Tiyabendazol ve kambendazol hızla ve yüksek oranlarda metabolize edilir ve vücuttan atılan tiyabendazolün sadece % 1'i ve kambendazolün % 5'inden azı değişmemiş haldedir. İki ilaç ve

metabolitleri 48-72 saat içerisinde feces ve idrarla atılmaktadır. Oksfendazol, ruminantlarda % 65 oranında feçesle atılırken, tek mideli hayvanlarda daha çok idrarla atılmaktadır. Ruminantlarda bu ilacın emilimi tek mideli hayvanlardan daha düşüktür. 4'- hidroksi metaboliti idrarla glukronid ve sülfat formu halinde atılmaktadır. Flubendazol, karbamat hidrolizi ve keton grubunun indirgenmesi sonucu oluşan metabolitleri halinde feces ve idrarla atılmaktadır (Van Den Bossche 1982, Roberson 1988, Kaya 2000, Capece ve ark 2001, Cristofol ve ark 2001, Virkel ve ark 2002, Rosenthal ve Goldsmith 2004, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005, Capece ve ark 2009).



Şekil 1.2. Albendazol ve fenbendazolün metabolizmaları.

1.3.Benzimidazollerin Farmakokinetikleri

Hayvanlarda genel olarak oral yolla kullanılan bu ilaçlar suda genellikle çok az çözündüklerinden sindirim kanalından sınırlı bir şekilde emilirler. Bu bileşiklerin ve metabolitlerinin biyoyararlanımlarının düşük olmasında transmembran proteinlerinin rolü olabileceği, ABZSO ve FBZSO'un Bcrp substratı olduğu ve ABZSO'un barsak lumenine sekresyonu gösterilmiştir (Redondo ve ark 1999, Merino ve ark 2005, Muenster ve ark 2008, Poller ve ark 2010). Albendazol ve oksfendazol diğerlerine göre daha iyi emilir. Farmakokinetik özellikleri her ilaca göre değişkenlik arz eder. Grup olarak verildikten sonra, genellikle 2-4 saat içerisinde plazmada doruk yoğunluğa ulaşırlar; bu süre albendazol, fenbendazol ve oksfendazolda 15-18 saate kadar uzayabilir. BZD'lerin emilimleri genellikle hızlıdır; koyun ve sığırlarda albendazol 6-30, triklabendazol 10-40 ve fenbendazol ise 6-12 saat sonra kan dolaşımında pik seviyelerine ulaşırlar. Plazmada bulunan ilaç miktarı verilenin genellikle %1-10'u kadardır. Karaciğerde birçoğu (ABZ, TKBZ) ilk geçişte tamamen metabolizmaya uğradığından plazmada sadece metabolitleri (sulfon, sulfoksit) bulunur. Metabolizma hızı BZD türevleri arasında farklılık gösterir (TKBZ çok hızlıdır) faz I ve faz II reaksiyonları aracılığı ile metabolize olurlar. Karaciğer mikrozomal miks fonksiyonlu oksidazlarla, sulfoksizasyon, demetilasyon ve hidrosilasyon uğrarken, metabolitleri glukuronid ve sulfatla faz II reaksiyonlarına uğrarlar. Fasiolasis gibi karaciğer hasarına neden olan olgularda BZD'lerin metabolizmasının değiştiği ortaya konmuştur (Martin ve ark 2009). BZD'ler plazma proteinlerine % 50 oranında bağlanır, bu nedenle kısmen yüksek dağılım hacmi ve hızlı eliminasyon hızına sahiptir. Ancak triklabendazol yüksek oranda bağlanır ve bu yüzden dağılım hacmi küçük ve yarı ömrü uzundur (Edwards ve Breckenridge 1988, Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, Batzias ve Delis 2004, EMEA 2004a, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005).

ABZ sulfoksidasyonu farklı iki enzimce sağlanır. Flavın içeren monioksigenaz sistemince ABZSO'e ve ABZSO de CYP 450 enzimince ABZSO₂'e dönüşümsüz olarak okside olur. Sığırlarda ABZSO' ın ABZSO₂ oksidasyon kapasitesi düşük olduğundan plazma ABZSO₂ seviyesi ABZSO'a göre

geç yükselir. Dışkı ve tüm sindirim sistemi organlarında ABZ bulunurken diğer dokularda bulunmaz. Plazmada tedaviden sonra 30-36 saatte ABZSO tespit edilirken 72 saat sonra hem ABZ ve hemde ABZSO sindirim sisteminde görülmekte, bu da sindirim sisteminde plazmadan gelen ABZSO'un ABZ'a dönüştürüldüğünü göstermektedir. Sindirim sistemindeki metabolizmadan mikroflora sorumludur. BZD sulfoksit metabolitleri zayıf bazik karakterli olduklarından ($pK_a = 7.8$) plazmadan değişik dokulara ve sindirim sistemine pasif difüzyonla geçerler (Lanusse ve Prichard 1993, Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, EMEA 2004a, EMEA 2004b, Rosenthal ve Goldsmith 2004, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005, Capece ve ark 2009)

BZD'lerin plazmadan sindirim sistemine geçen sulfoksit metabolitlerinin tekrar sulfid bileşiklerine indirgenmesi siklus şeklinde belirli bir süre devam ettiği ve özellikle rumenin BZD'ler için bir depo ya da yavaş salınım yapan bir organ gibi davrandığı belirtilmektedir (Lanusse ve Prichard 1993, Redondo ve ark 1999). BZD sulfidler (ABZ, FBZ), sulfoksitler (ABZSO, FBZSO) ve sulfonlar farklı lipofiliklerinden dolayı farklı dağılım hacmine sahiptir (Lanusse ve Prichard 1993).

Sığırlarda albendazolun rumen içi uygulanmasını takiben yürütülen kinetik çalışma sonunda ABZSO ve ABZSO₂'in sığırlarda doza bağlı kinetik gösterdiği, 7.5 mg/kg dozunda sırası ile yarı ömürleri 9.10 ve 8.93 ve 15 mg/kg dozda ise 13.92 ve 13.17 saat olduğu ve ayrıca yarı ömür bakımından sığırla buffalo arasında fark olmadığı tespit edilmiştir (Sanyal 1997). Aynı çalışmada 7.5 mg/kg dozda ABZSO ve ABZSO₂'nin EAA'sı 35.37 ve 30 mg/L/saat ve 15 mg/kg' da da ABZSO₂'in EAA'sı (242 mg/L/saat) daha yüksek bulunmuştur. 7.5 mg/kg dozda ABZSO'in t_{max} ve c_{max} değerleri 13 saat ve 2.18 mg/l, ABZSO'inki ise 18 saat ve 1.60 mg/l olarak ölçülmüştür. Hiç bir örnekleme (0,2,4.....saat) zamanında plazmada albendazol ana bileşik olarak ölçülmemiş, dolayısıyla periferik dolaşımda çok hızlı albendazolun sulfoksit metabolitlerinin gözlenmesinin, albendazolun sulfoksidasyonunun çok hızlı olduğuna atf edilmiştir. ABZ metabolitleri plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır ve bu yüzden metabolizması ve atılımı hızlıdır (Sanyal 1997).

In ve ark (2001), 4 sığır üzerinde yürüttükleri çalışmalarında oral 5 mg/kg albendazol kullanımını takiben, kanda ana ilacın sadece 0.5-1 saatlik zaman

diliminde, metabolitlerinin ise 0.5-72. saatler arasında tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada ABZSO₂'in plazma maksimum konsantrasyon değeri ABZSO'inkinden yüksek bulunmuştur. Diğer bir çalışmada oral 5 mg/kg ABZ kullanımını takiben, plasmada ana ilacın tespit edilemediği, 10-48 saatlik zaman dilimleri arasında ABZSO ve ABZSO₂ tespit edildiği belirtilmektedir (Moreno ve ark 2005).

ABZ, albendazol sulfoksit, albendazol sulfon dışında albendazol -2-amino sulfon olarak ta plazmada bulunur. ABZ'un, koyunlarda uygulanan dozunun %50'si 5 günde ve danalarda %80 kadarı 3 günde idrarla atılır (Edwards ve Breckenridge 1988, Roberson 1988, Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Sanchez ve ark. 2000, Goudah 2003, Rigter ve ark 2004).

Triklabendazol, ABZ'a benzer metabolizmaya uğrar. Ağızdan verilince sindirim kanalından bir miktar emilir. Sığırlarda eliminasyon yarı ömrü sırasıyla 13 ve 40 saattir (Van Den Bossche 1982, Edwards ve Breckenridge 1988, EMEA 2006). TKBZ metabolitlerinin plazma proteinlerine yüksek oranda bağlandığından biyolojik yarı ömrünün uzun ve dağılım hacminin küçük olduğu belirtilmektedir (Lanusse ve Prichard 1993, Sanyal 1997). Uygulanmasından sonraki 10 gün içerisinde hemen hemen tamamı safrayla olmak üzere vücuttan atılmaktadır. Oral yolla 10 mg/kg dozunda TKBZ verilen buzağılarda TKBZSO için t_{doruk} 30 saat ve yarı ömür 23.8 saat, TKBZSO₂ için yarı ömür 52.9 saat ve t_{doruk} 42 saat ve TKBZSO₂/TKBZSO oranı 2.96 olarak ölçülmüş ve oral uygulamayı takiben TKBZ plazmada tespit edilememiştir (Mestorino ve ark 2008). Aynı araştırmacılar rumen boşalma hızının ve yem kalitesinin BZD bileşiklerin farmakokinetik parametrelerini etkilediğini belirtmektedirler.

Fenbendazol, metabolizma ve etkinlik yönünden albendazole benzer ve sulfoksit metaboliti (oksfendazol) sindirim sisteminde ana bileşiğe indirgenir. Fenbendazol ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından son derece az emilir, plazmada ulaşılan en yüksek yoğunluğu sığırlarda 7.5 mg/kg dozda 1.1 µg/ml, köpeklerde 10 mg/kg dozda 0.04-0.4 µg/ml ve koyunlarda 5 mg/kg dozda 0.4 µg/ml'dir. Plazmadaki ilaç miktarı sığır ve koyunlarda 2 hafta sonunda sırasıyla 0.1 ve 0.2 µg/ml'in altına iner. İlaç vücutta büyük ölçüde metabolitlerine çevrilir ve ayrıca 2-amino türevi metaboliti de oluşur. İlacın plazma yarı ömrü sığırlarda 13, köpeklerde 15 ve koyunlarda 26 saat civarındadır. 7.5 mg/kg dozunda 10 aylık

erkek danalara intraruminal olarak FBZ uygulanmasında, yarı ömrünün yeme göre değişmekle birlikte 7.11 saat olarak bulunduğu belirtilmiştir (Knox ve Steel 1997). Aynı araştırmacılar FBZ'un farmakokinetiği üzerinde sığır ırkının etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır. Sığırlarda, FBZ'un oral uygulamayı takiben; FBZ, FBZSO ve FBZSO₂'nin plazma pik konsantrasyonuna 24, 30 ve 36. saatte eriştiği ve rumende biriktiği ve total dozunun % 44.6' sının tedaviden 6 gün sonra idrar ve dışkı ile atıldığı belirtilmektedir (Lanusse ve Prichard 1993, Spasov ve ark 2000, Capece ve ark 2001). Sığırlarda oral FBZ uygulanmasından sonra plazmada ana bileşik olarak tespit edilirken, OFZ oral yolla verildiğinde sindirim sisteminde FBZ'e dönüşür ve sütte 48 saate kadar gözlenir (Takeba ve ark 2003, Moreno ve ark 2005).

Oksfendazol (FBZSO) köpeklerde başlıca idrarla ve ruminantlarda ise dışkıyla (%65 kadarı) atılır. Yarı ömrü köpeklerde 28 saat, koyun ve keçilerde 5-7.5 saat dolayındadır. (Piscopo ve ark 1997, Spasov ve ark 2000, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, EMEA 2004a, EMEA 2004b, Rigter ve ark 2004, EMEA 2006).

1.4.Benzimidazollerin Etki Mekanizması

Benzimidazol grubu antelmintik ilaçların kesin etki mekanizması ortaya konulamamakla birlikte, parazit hücreesindeki serbest beta tubulinlere seçici bir şekilde bağlanarak parazit mikrotubul polimerisasyonunun spesifik olarak inhibe edilmesi sonucu glukozun mikrotubullere bağlı alınımını bloke ettiği kabul edilmektedir. Benzimidazoller, parazit beta tubulinlerine memeli beta tubulin proteinlerine göre oldukça spesifik olarak bağlanırlar. Memelilerde glukoz alınımını inhibe etmez ve insanlarda kan glukoz konsantrasyonu üzerinde her hangi bir etkisi gözlenmez. Fumarat redüktaz enzim aktivitesini de inhibe ettiği ileri sürülmektedir. Glikozun emilimini önlemesi yanında, glikojen kullanımını arttırdığı ve ATP üretimini azalttığı da ifade edilmektedir. Ayrıca heksokinaz, fosfoenol pruvat, karboksikinaz ve fosfofruktokinaz gibi enzimlerin salgılanmasını da bozar (Roberson 1988, Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Spasov ve ark 2000, Capece ve ark 2001, Cristofol ve ark 2001, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, Rigter ve ark 2004, Rosenthal ve Goldsmith 2004).

Parazitlerdeki sistemik etkiye karaciğerdeki metabolizmaları sonucu oluşan sulfoksit metabolitlerinin aracılık ettiğine inanılmaktadır. ABZ

nematotlarda tubuline ABZSO'den daha fazla affinite gösterir. ABZSO sindirim sisteminde yüksek konsantrasyonu ve uzun süre bulunuşu ile bu dezavantajını önler (Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Capece ve ark 2001, Cristofol ve ark 2001).

1.5.Benzimidazollerin Etki Spektrumu

Benzimidazol grubu antelmintikler; sığır, koyun ve keçilerin iç parazitleriyle mücadelede tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gevişenlerde *Bunostomum*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Nematodirus*, *Chabertia* ve *Dictyocaulus* türlerindeki parazitlerin ergin ve farklı gelişme dönemlerindeki larva şekillerine son derece etkilidirler. Albendazol koyun ve keçilerde 3.8 mg/kg dozda olgun ve olgun olmayan mide-bağırsak kurtlarına karşı son derece etkilidir. Akciğer kurtları, *Bunostomum*, *Trichuris* ve *Strongyloides* türlerine etkisi daha zayıftır. Aynı ilaç 7.5 mg/kg dozda sığırlarda mide-bağırsak kurtlarıyla şeritlere karşı çok etkilidir. *Haemonchus* ve *Trichuris* türlerine etkisi yetersizdir ve yuvarlak kurtlara karşı kullanılan dozun 2 katı miktarda (15 mg/kg) kullanıldığında *F. hepatica*'yı da az derecede (%55-65) etkiler, dozun artırılması etkide değişikliğe yol açmaz. *S. vulgaris*'in larvaları üzerine 5 gün süreyle günde 3 kez 25 mg/kg dozda kullanıldığında çok etkilidir (Roberson 1988, Kaya 2000, Rigter ve ark 2004, Rosenthal ve Goldsmith 2004).

Fenbendazol, koyun ve keçilerde mide, bağırsak ve akciğer kurtlarına karşı yüksek derecede etkilidir. Şeritlere 10 mg/kg dozda etkilidir. *Fasciola* ve *Dicrocoelium*'a karşı >100 mg/kg gibi yüksek dozlarda kullanılmalıdır. Tekrarlayan dozlarda *Strongylus* larvalarına da etkilidir. Sığırlarda bu ilaç mide-bağırsak, akciğer kurtlarıyla şeritlere karşı son derece etkilidir. *Trichuris* ve *Strongyloides* türlerine etkisi yetersiz ve normal dozlarda *F. hepatica* ve *Paramphistomum* türlerine etkisi zayıftır. *Ostertagia*'nın 3-10 günlük larvalarının ilaca duyarlılığı %90'nın üzerindedir. Başta albendazol olmak üzere giardiaya karşı da etkilidirler (Rigter ve ark 2004, Rosenthal ve Goldsmith 2004).

1.6.Benzimidazollerin Kullanılmaları ve Dozları

Dozları kullanım amacı ve hayvanlara göre değişir. Tablet, süspansiyon, bolus ve solusyon şeklindeki ticari ürünleri oral ve parenteral yolla verilir. Banyo ve ıslatma şeklinde de uygulanmaktadır. Albendazol, at için 5 mg/kg, sığır, koyun ve keçide 7.5-15 mg/kg dozda; fenbendazol, at için 5 mg/kg, sığırdaki 7.5-10 mg/kg, koyun ve keçide 5 mg/kg dozda; triklabendazol ise sığır, koyun ve keçide 12 mg/kg dozda kullanılmaktadır (Rigter ve ark 2004, Rosenthal ve Goldsmith 2004).

1.7.Güvenlik ve Toksikite

Terapötik indeksi geniş olan BZD'ler evcil ve yabani hayvanlar için güvenli olup, genç, hasta ve zayıf hayvanlar da bile terapötik dozlarda belirgin yan etkilere neden olmaz.

Tiyabendazol koyunlarda 800-1000 mg/kg dozda depresyon ve anoreksiye neden olur ve minimum öldürücü dozu koyun ve sığırdaki ortalama 1200 ve 700 mg/kg'dır. Fenbendazolun minimum öldürücü dozu sığırlarda, terapötik dozun 100 katı (750 mg/kg)'dır. Uzun süreli kullanımda fenbendazol iyi tolere edilir. Ruminant ve atlarda oksfendazolun terapötik dozun 3 katının 4 günlük bir zaman diliminde 8 enjeksiyon ile verilmesi toksik etkilere sebep olmaz. Koyunlar aynı şartlarda oksfendazolun terapötik dozunun 20 katını tolere edebilirken, 50 katında iştahsızlık, ateş, ishal ve %16 oranında ölüm görülebilmektedir. KBZ önerilen dozun 3 katı dozda sığırlarda iştah azalması ve durgunluk yapabilmektedir (Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Spasov ve ark 2000, Capece ve ark 2001, EMEA 2004a, EMEA 2004b, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005, EMEA 2006)

Fenbendazolun oral LD₅₀ değerleri laboratuvar hayvanlarında 10000 mg/kg'dan daha büyük bulunmuştur. Fenbendazolun Wistar ratlarında yürütülen toksisite çalışmalarında, 90 gün günlük 0, 25, 200 ve 2600 mg/kg oral dozların herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı belirtilmiştir (Van Den Bossche ve ark 1982, EMEA 2004b). Yine aynı ilaç köpeklere 6 gün ile 6 aylık sürelerde verilmiş; başlıca toksik etkinin mesenterik lenf nodülleri ve mide mukozasında

lenfoid hiperplazi olduğu tespit edilmiştir (Van Den Bossche ve ark 1982, EMEA 2004b).

Albendazol hamster, tavşan, domuz ve ratlarda oral yolla kullanıldığında en belirgin yan etkisi hepato ve testiküler toksisitedir

Triklabendazolun ratlarda oral, intraperitoneal, dermal ve inhalasyon yoluyla verilerek yapılan toksisite çalışmalarında düşük toksisite gösterdiği ve oral LD₅₀ değeri 8000 mg/kg ve intraperitoneal LD₅₀ değeri ise 1666 mg/kg olarak belirlenmiştir (EMEA 2006). Koyunlarda %10 suspansiyon halinde oral 250, 500 ve 1000 mg/kg uygulanan triklabendazolun toksisite çalışmasında doz gruplarında sırasıyla 1/20, 6/20 ve 5/5 ölüm ve otopside kanamalı akciğer ve böbrek lezyonları, doza bağılı olarak bazı hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde değışiklikler gözlenmiştir (Van Den Bossche ve ark 1982, Hennessy 1994, EMEA 2006).

Bu gruptaki ilaçların belirtilenlerin yan etkileri yanında en ciddi yan etkileri erken gebelikte kullanılmaları sonucu ortaya çıkar. PBZ ve KBZ koyunlara gebeliğin 2-4. haftalarında verildiğinde teratojenik etkilere neden olur. Koyunlarda normal embriyonik gelişme dönemi olan gebeliğin 20. gününde teratojenik etkileri daha belirgin olabilmektedir. Kuzularda rotasyonel şekil bozuklukları, karpal eklemdede aşırı bükülme, vücut duruşunda bozukluklar görülmüştür. Gebeliğin 10-14. günleri arasında bu ilaçlar kullanıldığında yukarıdaki belirtilerle karşılaşılmazken, kuzu doğum oranında %17 azalma meydana gelmiştir. KBZ gebeliğin 4. haftasından sonra kullanılmasında herhangi bir sakınca yoktur (Van Den Bossche ve ark 1982, Hennessy 1994).

Albendazolun sığırlarda gebeliğin erken dönemlerinde kullanılmasının embriyotoksik ve teratojenik etkilere sebep olmadığı, ancak gebelik oranında azalmaya sebep olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu yüzden sığır ve koyunlarda gebeliğin ilk 45 gününde albendazol kullanılmamalıdır.. Yine rat, tavşan ve koyunlarda yürütölen çalışmalarda albendazolun organlarda gelişme geriliği, kafa ve yüz kemiklerinde bozukluk gibi teratojenik etkilere neden olduğu saptanmıştır. Karsinojenik bioassay çalışmalarda albendazolun neoplaziye sebep olmadığı belirtilmiştir (Roberson 1988, Piscopo ve ark 1997, Redondo ve ark 1999, Kaya 2000, Capece ve ark 2001, Virkel ve ark 2002, Goudah 2003, Batzias ve ark 2004, EMEA 2004a, Rigter ve ark 2004, Rosenthal ve Goldsmith 2004, Virkel ve ark 2004, Velik ve ark 2005, Capece ve ark 2009).

Fenbendazolun Wistar ratlarında yapılan çalışmalarda teratojenik etkiye neden olmadığı ve koyun ile atlarda testis fonksiyon testlerine etkisi olmadığı da bildirilmiştir (Van Den Bossche ve ark 1982, EMEA 2004b).

Triklabendazol oral yolla tek başına veya kombinasyon halinde verildiğinde koyunlarda üreme parametrelerinde herhangi bir yan etkisi gözlenmemiştir. Ancak, gebe koyunlara fenbendazole kombinasyon halinde verildiğinde (150 mg/kg 1:1 karışım 12, 17, 21 veya 28 gün) kuzularda böbrek ve iskelet anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (Van Den Bossche ve ark 1982, Hennessy 1994, EMEA 2006). Sığırlarda 15-30 mg/kg dozda gebeliğin ilk veya 2-7. aylarında herhangi bir yan etkiye yol açmamaktadır. Oral 50 mg/kg dozda dört hafta uygulanması, koçlarda testis ağırlığı, sperma konsantrasyonunda ve doğan erkek kuzularda her hangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. (Edwards ve Breckenridge 1988, Roberson 1988, Hennessy 1994, Kaya 2000).

1.8.Kontrendikasyonları ve Yasal Düzenlemeler

Süt üretimindeki hayvanlar ve erken gebelikte bu ilaçların kullanılması yasaktır. Gıda üreten hayvanlarda yasal bekletilme sürelerine uyulma zorunluluğu vardır. BZD grubu ilaçların diğer ilaçlarla arasında geçimsizlik belirtilmemiştir. Yalnız FBZ ve OFBZ bromsolanlar birlikte kullanıldığında abortlara neden olur (Edwards ve Breckenridge 1988, Roberson 1988, Kaya 2000).

1.9.Benzimidazol Antelmintiklerin Analiz Metodları

De Ruyck ve ark (2000), sütte BZD'lerin analizinde HPLC metodunun uygunluğu için yaptıkları çalışmada, 10 mg/kg olarak kullanılan levamizolün ekstraksiyonunu, FBZ, TBZ, ABZ ve OKBZ'un geri kazanım çalışmalarıyla karşılaştırmışlar ve kullanılan bu ilaçların 3 gün içinde tespit miktarları arasında sırasıyla % 11.9, 3.9, 8.2 ve 12.7 varyasyon belirlemişlerdir.

BZD grubu antelmintik ilaçların süt ve kan gibi biyolojik materyallerdeki analizlerinde HPLC metodunun yaygın kullanıldığı görülmektedir (De Liguoro ve ark 1996, Piscopo ve ark 1997, Titus ve ark 2000,

De Ruyck ve ark 2000, Brandon ve ark 2002, De Ruyck ark 2002, Mirfazaelian ve ark 2002, Takeba ve ark 2003, Batzias ve Delis 2004, Fletouris ve ark 2005).

Çizelge 1. 1. BZD'lerin sığırlarda izin verilen kalıntı miktar ve yasal bekletme süreleri.

İlaçlar	Tolerans düzeyleri (ppb)				Bekletme Süresi (oral uyg.) (gün)		KEGAL (mg/kg/gün)
	Et	Kc	Böbrek	Süt	Et	Süt	
Albendazol	100	1000	500	100	14	3	0-500
Fenbendazol	50	500	50	10	21	5-6	0-100
Triklabendazol	110	120	70	-	28	10	0-30

Çiğ sütte benzimidazol grubu antelmintiklerin tespiti amacıyla yapılan çalışmalarda, geri kazanım çalışmaları açısından SPE (Solid Phase Extraction) ekstraksiyon metodunun MSPD (Matrix Solid Phase Extraction) ekstraksiyon metoduna göre daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Juskiewicz 1996, Karasova ve ark 2003).

1.10.Mastitisin Süte İlaç Geçişi Üzerine Etkisi

İlaçların süte geçiş ve sütle eliminasyonunu etkileyen ilaça ve canlıya ait faktörler vardır. İlaçların pKa, çözünürlük, yük, partikül hacmi ve plazma proteinlerine bağlanma oranı gibi fizikokimyasal özellikleri ve farmasotik şekilleri süte geçişte önemlidir. Mastitis gibi hastalıklar ve süt verimi ise süte ilaç geçişinde önemli canlıya ait faktörlerdir. Plazmadan süte ilaç geçişinde süt üretiminden sorumlu aktif transport ve sekresyon olayları etkinken ilaın süten plazmaya geçişi pasif diffuzyonla olur (Gehring ve Smith 2006).

Mastitis, mikroorganizma, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı meme dokusunun yangısel bir tepkisidir (Blood ve ark 1983). Mastitis süte ilaç geçişini etkileyebilecek derecede süt ve meme bezinde kimyasal ve fiziksel değişime neden olur. Mastitisin ilaçların sütle eliminasyonu üzerindeki etkisi tartışmalı

olup, genelde atılımı uzattığı belirtilse de etkisinin olmadığı ve lokal uygulanan ilaçların atılımını uzattığı fakat sistemik uygulanan ilaçların hakkında yeterli bilgi olmadığı belirtilmektedir (Gehring ve Smith 2006). Mastitisler klinik seyirlerine göre klinik ve subklinik olarak sınıflandırılırlar.

Kan-meme doku bariyeri kandaki bazı ilaçların süte geçmesine engel olmaktadır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük, moleküler ağırlığı küçük ve bazik ilaçlar süte daha iyi geçebilmektedir (Fleishaker 2003, Ito ve Lee 2003, Su ve ark 2003, Lee 2007). ABZSO ve FBZSO dolaşımdan süte ilaç atılımını sağlayan BCRP'nin substratı olduğu, ancak ana bileşiklerinin olmadığı belirtilmektedir (Merino ve ark 2005, Muenster ve ark 2008).

Klinik mastitis, damar permabilitesini arttırarak, meme içi uygulanan ilaçların sistemik dolaşıma ve meme dokusuna geçiş oranını artırabilmektedir. Artışa ayrıca, epitel hücre bütünlüğünün bozulması da katkı sağlamaktadır. Ayrıca, mastitiste vasküler permeabilitedeki değişikliklere bağlı olarak süt bileşiminde değişiklik de gözlenir. Örneğin, süt pH'sı yükselir (bikarbonat seviyesindeki konsantrasyon artışı), süt kazein oranı azalır, süt albumin konsantrasyonu (kandan süte albumin sızması), somatik hücre sayısı artar ve sütün yağ oranı düşebilir. Bu faktörlere bağlı olarak ilaçların sütteki farmakokinetikleri değişik derecelerde etkilenebilmektedir. Klinik mastitisli sığırlarda normal sığırlara göre süt üretiminin azalması, sütün ilaçtan arınma süresini de uzatabilmektedir (Gehring ve Smith 2006, Gruet ve ark 2001, Traş ve Elmas 2005). Takeba ve ark (2000), sığırlara 12 mg/kg dozunda oral yolla triklabendazol kullanımlarını takiben sütte 24 saatte ortalama konsantrasyon seviyesini 0.024 µg/g, 48 saatte ise 0.013 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Sütte BZD kalıntılarının tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada 10 mg/kg olarak kullanılan albendazolün 12-24. saatler arasında <7 ng/ml; 7 mg/kg olarak verilen fenbendazolun 12. saatte 85, 24. saatte 77.3 ng/ml, 36. saatten sonra da 40 ng/ml'nin altında bulunduğu bildirilmiştir (De Ruyck ve ark 2002). Moreno ve ark (2005), oral yolla 5 mg/kg dozunda ALB verilmesinden sonra sütte ALB'a rastlamamış ve ALBSO ve ALBSO2'in 12. saatte sütte maksimum konsantrasyonunu sırası ile 0.28 ve 0.86 mg/ml olarak ölçmüş ve 24. saatte ise ALBSO'in ALBSO2' den daha yüksek olduğunu bulmuştur. Parenteral ALBSO uygulanmasında hem 12 ve 24. saattlerde ALBSO daha yüksek bulunmuştur (Moreno ve ark 2005).

De Liguoro ve ark (1996), koyunlarda oral 12.5 mg/kg olarak verilen albendazolün 3 gün sonra sütte tespit limiti olan 50-500 mg/kg değerlerinin HPLC metodu ile tespit edilmediğini belirtmişlerdir.

OFZ' un oral uygulanmasından sonra FBZ, OFZ, FBZSO2 sütte bulunurken SC uygulamada FBZ bulunmamıştır. Oral uygulamayı takiben OFZ sütte 12., FBZSO2 ise 36. saatte maksimum konsantrasyona erişir. OFZ 5 mg/kg dozunda oral yolla verildiğinde sütte FBZ 12-24 saat aralığında ölçüldüğü 24. saatte maksimum seviyeye (0.10±0.02 mg/ml) eriştiği ve 48. saatte de gözlenebildiği belirtilmektedir (Moreno ve ark 2005).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Ekipman

- Thermo Finnigan MSQ LC-MS sistem (Italy),
 - Surveyor Autosampler
 - Surveyor LC pump
 - Surveyor PDA dedector
 - Software ve firmware:
Xcalibur 1.4 SR1 DSQ 1.4.1 (Italy)
Xcalibur 1.4 SR1 DSQ 1.4.1 PDA dedector (Italy)
- LC-MS analitik kolon (Sinergy Max) (USA)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus) (Germany)
- 200 ml'lik cam beher (Duran) (Germany)
- 50 ml. tek kullanımlık santrifüj tüpü
- 25 ml. tek kullanımlık santrifüj tüpü,
- 15 ml'lik santrifüj tüpü, (Duran)
- 75ml'lik santrifüj tüpü , (Duran)
- Vorteks karıştırıcı (IKA) (Germany)
- Sample concentrator LV (Zymark) (Germany)
- Ultrasonik su banyosu (Heidolph) (Germany)
- Homojenizator (IKA) (Germany)
- Vial, Insert vial, septum ve vidalı kapaklar.

2.2. Kimyasallar

- Metanol (Merck, HPLC grade) (Germany)
- Asetonitril (Merck, HPLC grade) (Germany)
- Amonyum format (Fluka) (USA)
- NaSO₄ (Merck) (Germany)
- KH₂PO₄ (Merck) (Germany)
- NaHCO₃ (Merck) (Germany)
- Etil Asetat (Riedel) (Germany)
- Formik asit (Merck) (Germany)
- Albendazol (BVL) (Germany)
- Albendazol Sülfoksit (BVL) (Germany)
- Albendazol Sülfon (BVL) (Germany)
- Albendazol 2-aminosülfon (BVL) (Germany)
- Triklabendazol (BVL) (Germany)
- Triklabendazol Sülfoksit (BVL)
- Triklabendazol sülfon (BVL) (Germany)
- Fenbendazol (MD Pharm) (Czech Rep.)
- Oksfendazol (BVL) (Germany)
- Fenbendazol sülfon (BVL) (Germany)

2.3. Hayvan denemesi

İstanbul ili Kartal ilçesinde bulunan Yöre Süt Ürünleri Gıda ve İnş. Paz. San. Tic. Ltd. Şti'ne ait işletmede bir veya iki meme lobunda klinik olarak mastitis olduğu belirlenen ve erken gebelik döneminde olmayan (1.5 aylık) 7 İsviçre Esmeri sığırlar çalışmada kullanıldı. Çalışmada çapraz dizayn metodu kullanıldı. İlk önce albendazol (Vetalben Fort oral tablet, 1200 mg Albendazol, VETAŞ), triklabendazol (Levatrizol oral tablet, 375 mg Levamizol ve 600 mg Triklabendazol, VETAŞ) ve fenbendazol (safe-guard, Fenbendazole 92 g paste %10, Intervet) sırasıyla 7.5 mg/kg, 10 mg/kg, ve 7.5 mg/kg dozlarında oral yolla tek doz olarak uygulandı. Çalışma süresince sığırlara herhangi bir sistemik ilaç uygulaması yapılmadı ve fizyolojik ve klinik şartlara dikkat edildi. Mastitis tedavisi, herhangi bir ilaç etkileşimine neden olmamak için lokal (meme içi) antibakteriyel (Masticol LC meme içi süspansiyon, 200 mg Ampisilin sodyum ve 200 mg Dikloksasilin sodyum, Vilsan) ilaç uygulaması ile yapıldı. Hayvanların mastitisli meme loblarından süt ve *v. jugularis*'ten kan örnekleri (5 ml), oral ilaç uygulamasını takiben 0., 8., 16., 24., 36., 48., 72. ve 120. saatte alındı ve derin dondurucuya kaldırıldı. İlaç uygulanan hayvanların sütleri insan tüketimine 10 gün sunulmadı (Türk Gıda Kodeksi 2005). Aynı hayvanlar, tedavi edilip iyileştirildikten sonra (mastitisli meme lobları CMT testiyle kontrol edilerek, meme içi Masticol LC meme içi süspansiyon, 200 mg Ampisilin sodyum ve 200 mg Dikloksasilin sodyum, Vilsan uygulandı.) 20. günde aynı ilaç uygulaması tekrar yapıldı ve belirlenen örnekleme zamanlarında süt ve kan numuneleri alındı.

2.4. Metot

Süt ve kandaki ilaç analizleri, tarama testlerinde Ulusal referans Laboratuvar olan Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün referans metotları kullanılarak gerçekleştirildi. Metod çok küçük miktarlarda doku ve çok az miktarlarda kimyasal maddeler kullanılarak süt numunelerinde benzimidazol antelmintik kalıntılarının SPE (Solid Phase Extraction - Katı Faz Özütleme) ekstarksiyon tekniği ile ekstrakte edilmesi, temizlenmesi ve toplanması esasına dayanmaktadır. Sütte benzimidazol ilaç kalıntılarının analizi için standart madde çözeltilerinin hazırlanması, numunelerin hazırlanması, metot validasyonu, cihaz

performans testlerinin yapılması, kısaca, genel ekstraksiyon ve elde edilen eluatların analitik sistemlerde ölçümünü kapsar. Bu yöntemler, benzimidazol ilaç kalıntılarının analizlerinde numunenin organik yapısı ile kimyasal maddenin ayrıştırılması amacıyla, uygun organik çözücülerde ekstraksiyon-purifikasyon işlemleri ve ardından analitik sistemler üzerinde ölçüm amacıyla kromatografi değerlendirme çalışmalarını içermektedir. Bu metotlar aynı zamanda Avrupa Birliği'nin referans laboratuvarı (Community Reference Laboratory – CRL) olan Berlin bgVV – BVL' nin referans metotlarıdır (BGVV 2002).

2.4.1.Kan Ekstraksiyon Yöntemi

Derin dondurucudan çıkarılan heparinize kan numunelerden oda sıcaklığında çözdürülerek 10 ml'lik deney tüplerine 1.5 ml alındı ve 100 mM sodyum karbonat solusyonu ile vortekslenerek karıştırıldı.

SPE (C18) kartuj şartlandırması için; kartujdan sırasıyla 10 ml etil asetat, 10 ml asetonitril ve 10 ml deiyonize su geçirildi ve kartujun kurumamasına dikkat edildi. Analit şartlanmış kartuja aktarıldı. Analit geçtikten sonra kartuj 3 ml deiyonize su ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. 4 ml etil asetat:asetonitril (50:50) karışımı ile kartuj elüt edildi. Elüt 40 °C' de N altında kurutuldu. Tüpler 200 µl mobil fazla çözüldü ve vorteks edilip filtrelerden geçirilerek HPLC viallerine transfer edildi (BGVV 2002).

2.4.2.Süt Ekstraksiyon yöntemi

Numunelerden 5 ml 50 ml'lik santrifüj tüplerine kondu ve üzerlerine 2.5 g susuz sodyum sülfat ve 10 ml asetonitril ilave edilerek 1 dakika vortekslendi ve 10 ml etil asetat eklendi. Tüpler 4 °C' de 3000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz başka bir tüpe alındı. Ekstraksiyon 10 ml etil asetat ile tekrarlanarak ve birleştirilen üst fazlar 60 °C'de N₂ altında kurutuldu. Uçurulan ekstrakt 1 ml 0.1 M K₂H₂PO₄ ve 5 ml 0.1 M NaHCO₃ ile çözdürülerek vortekslendi.

SPE (C18) kartuj şartlandırması için, kartujdan sırasıyla 10 ml etil asetat, 10 ml asetonitril ve 10 ml deiyonize su geçirildi ve kartujun kurumamasına dikkat edildi. Analit şartlanmış kartuja aktarıldı. Analit geçtikten sonra kartuj 3 ml suyla yıkandı ve vakum altında kurutuldu ve 4 ml etil asetat:asetonitril ile kartuj elüt edildi.

Elüt 40 °C'de N₂ altında kurutuldu ve 200 µl mobil fazla çözdürüldürülerek vortekslendi ve filtrelerden geçirilerek HPLC viallerine aktarıldı (BGVV 2002, Sezgin ve ark 2005).

HPLC şartları:

Kolon: Inertsil 150 x 4.6 µm C18 ODS II

Ön kolon: Inertsil C18 ODS II 4.6 x 20 mm

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Mobil faz olarak A: 0.01 M amonyum format (formik asitle pH~ 5.7)

B: Asetonitril/metanol (70/30)

LC gradient şartları:

0. dak. %90 A %10 B

0-5. dak. %87.5 A %12.5 B

5-30. dak. %60 A %40 B

45. dak. %35 A %65 B

50. dak. %35 A %65 B

65. dak. %90 A %10 B

Akış hızı: 0.8 ml/dak

Dalga boyu: 254, 290, 298

Enjeksiyon volümü: 20 µl

MS şartları:

Ionization mode: ESI+

API Nebulizing Gas Pressure: 55 psi

Drying Gas Temperature: 400 °C

Scan Time: 0.69 sec

SIM Width: 2.0 amu

Needle: + 5000 V

Shield: + 500 V

Capillary: 70 V

Detector: + 1600 V

Spray Chamber T: 65 °C

Tarama Parametreleri

	MS MH+	MS-MS	Capillary	Parçalanma	Dwell
	(m/z)	(m/z)		Enerjisi	Time
ABZSO ₂	266	234	70 V	20	0.0027
ABZSO	298	266	70 V	18	0.0027
TBZ	358	196	70 V	18	0.0027
TBZSO	208	181	70 V	25	0.0027
TBZSO ₂	218	191	70 V	25	0.0027
FBZ	332	300	70 V	20	0.0027
FBZSO ₂	335	300	70 V	20	0.0027

Tespit limiti olarak kromotogramın temel çizgisi üzerinde maddelerin oluşturdukları sinyallerin geri plan gürültüye oranının (S/G) 3 olduğu konsantrasyon, hesaplanabilir limit olaraksa S/G oranının 6 olduğu konsantrasyon düzeyi temel alındı. Bu doğrultuda, ALB, ALBSO, ALBSO₂, TKBZ, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ, FBZSO ve FBZSO₂'in geri kazanım çalışmalarındaki kromotogramlar üzerinde gözlenebilirlik sınırı (Limit of Detection, LOD) 1 µg/L (ppb), ölçülebilirlik sınırı (Limit of Quantification, LOQ) ise 5 µg/L (ppb) olarak belirlenmiştir.

Lineerite çalışmaları ALB, ALBSO, ALBSO₂, TKBZ, TKBZSO, TCBSO₂, FBZ, FBSO (OFZ) ve FBSO₂'in 0.01-200 µg/ml'lik dilüsyonlarının

HPLC sisteminden elde edilen pik alanlarına göre yapıldı. ALB, ALBSO, ALBSO₂, TKBZ, TKBZSO, TCBSO₂, FBZ, FBSO (OFZ) ve FBSO₂ için sırasıyla $r^2 = 0.9990, 0.9997, 0.9999, 0.9995, 0.9994, 0.9991, 0.9989, 0.9982$ ve 0.9988 hesaplanan korelasyon katsayılarına dayanılarak metodun lineer olduğu belirlendi.

Geri kazanım çalışmaları ALB, ALBSO, ALBSO₂, TKBZ, TKBZSO, TCBSO₂, FBZ, FBSO (OFZ) ve FBSO₂'in bilinen konsantrasyonları tüplere ilave edilerek, 50, 100, 150 ve 200 ppb olarak 4 farklı seviyede yapılmıştır (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2, Şekil 2.1).

2.5. İstatistiksel analiz

Tüm değerler ortalama \pm SD olarak gösterildi. Zaman parametreleri ($t_{1/2ab}$, $t_{1/2\alpha}$ ve $t_{1/2\beta}$) harmonik ortalama \pm SD olarak hesaplandı. 3 ilaç için de kan ve süt konsantrasyonları c_{doruk} ve EAA değerleri arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 13.0 (SPSS for Windows Evaluation Version, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanılarak hesaplandı. Normal dağılım gösteren iki grubun verilerinin karşılaştırılmasında t testi, üç grubun sürekli verilerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), nitel verilerin karşılaştırılmasında ki kare testi kullanıldı. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı için $p < 0.05$ düzeyi esas alındı. Plazma konsantrasyon zaman eğrisi, her hayvana ait her bir uygulamadan sonra Win Nonlin (4.1) bilgisayar programı kullanılarak elde edildi. (Pharsight Corporation, North Carolina, USA). Her 3 ilaç için de en uygun farmakokinetik model bireysel kan konsantrasyonlarının zaman eğrilerinin direk bakışı temel alınarak belirlendi. 3 ilaç için her hayvanın kan farmakokinetik değişkenleri iki kompartmanlı dışa açık modelle uygun olarak hesaplandı. Aynı ilaçların süttaki farmakokinetik parametreleri her hayvandan alınan örneklerden bölmeli olmayan model kullanılarak hesaplandı. Maksimum plazma yoğunluğu (c_{doruk}) ve maksimum plazma yoğunluğuna ulaşma zamanı (t_{doruk}) her hayvandan elde edilen plazma konsantrasyon-zaman eğrisi kullanılarak hesaplandı.

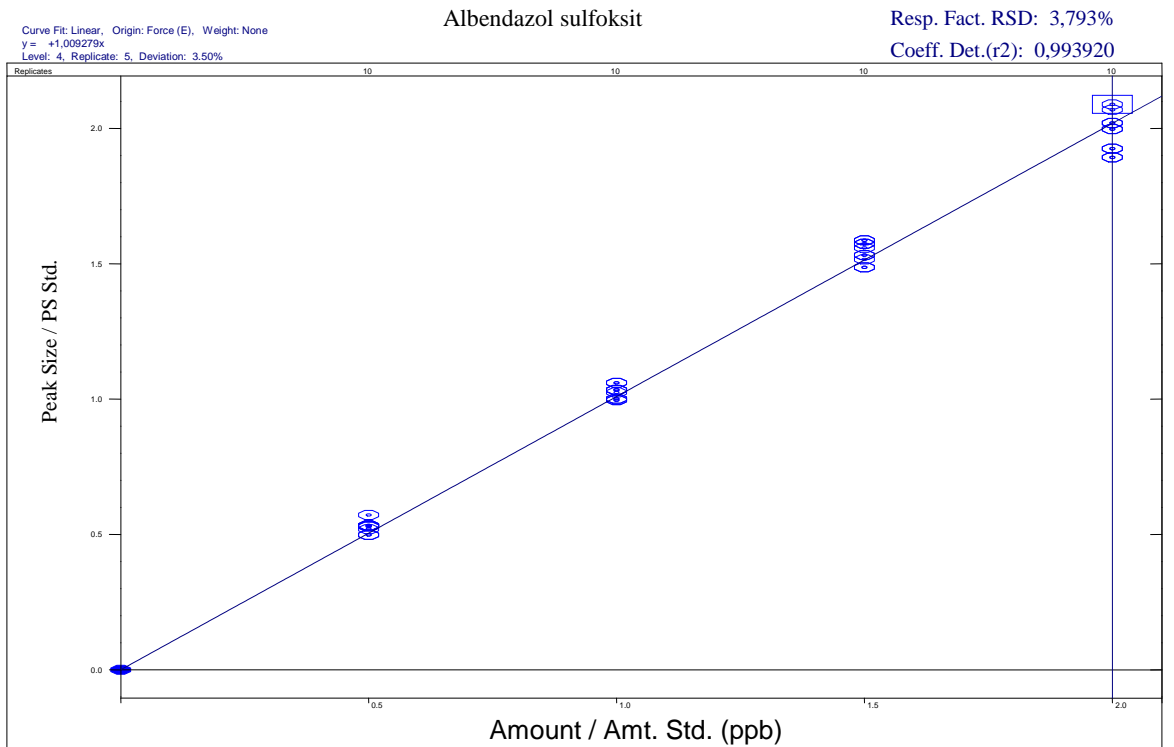
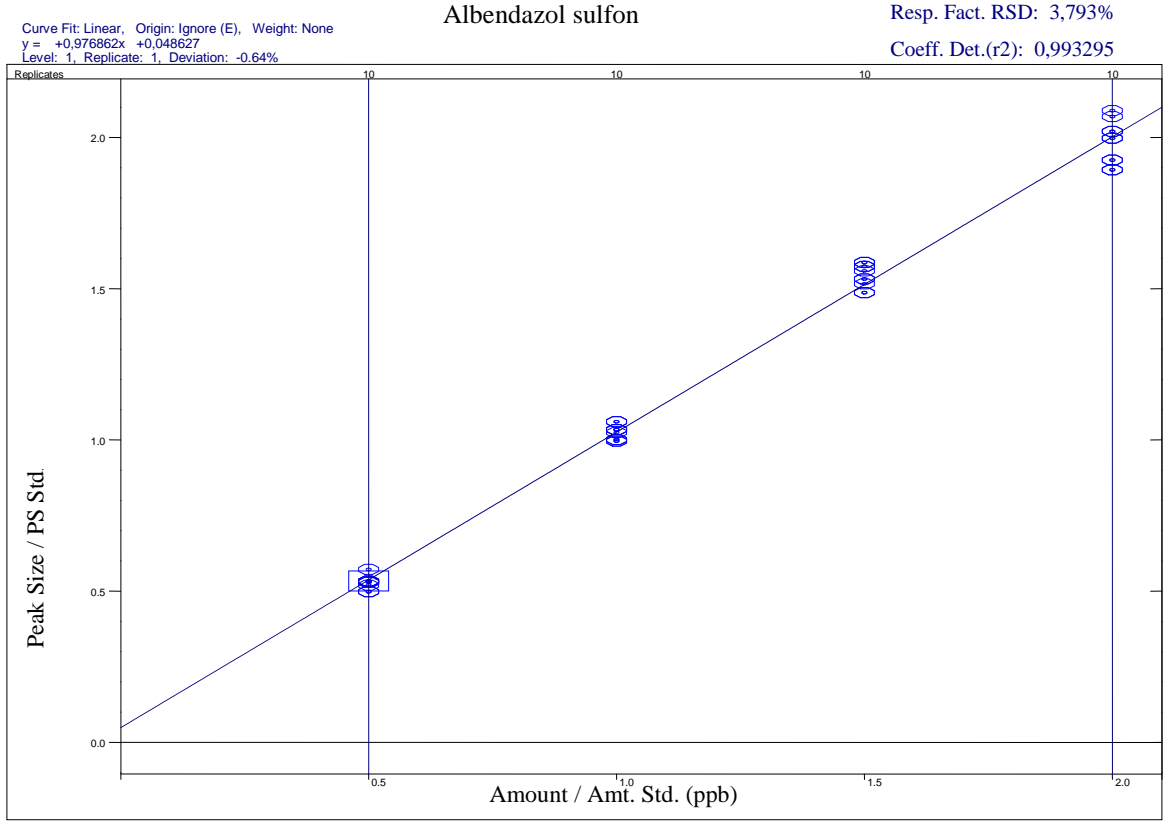
Çizelge 2.1. Çiğ sütte albendazol, triklabendazol ve fenbendazolün geri kazanım oranları (n=6 her konsantrasyon seviyesi için).

Geri kazanım oranı (%)							
	ABZSO	ABZSO2	TKBZ	TKBZSO	TKBZSO2	FBZ	FBZSO2
Yüklenmiş konsantrasyon (µg/ml)							
50	89±0.31	95±0.66	92±0.55	89±0.52	85±0.69	84±0.42	82±0.34
100	89±0.30	94±0.65	97±1.03	89±0.51	94±0.88	85±0.47	90±0.41
150	92±0.39	90±0.58	92±0.60	81±0.48	90±0.61	88±0.49	91±0.44
200	96±0.60	90±0.54	91±0.58	86±0.55	90±0.59	89±0.53	94±0.51

Çizelge 2.2. Çiğ sütte albendazol, triklabendazol ve fenbendazol'un kesinlik değerleri.

Gün içi tekrar edilebilirlik																		
	ABZSO			ABZSO2			TKBZSO			TKBZSO2			FBZ			FBZSO2		
YK	ÖK	SD	CV	ÖK	SD	CV	ÖK	SD	CV	ÖK	SD	CV	ÖK	SD	CV	ÖK	SD	CV
50	45.2	2.3	4.3	47.3	3.3	4.9	48.2	0.3	0.9	48.9	0.3	0.1	49.9	1.9	6.1	49.1	1.1	5.1
100	92.8	3.1	5.6	97.9	3.1	1.6	95.0	0.9	1.6	95.9	0.9	1.8	98.9	4.3	6.8	97.2	8.2	4.4
150	145.7	5.4	9.1	140.1	10.4	2.0	142.2	2.9	8.8	146.2	2.2	5.5	140.9	0.9	3.5	139.3	4.9	9.1
200	196.6	6.5	8.8	195.6	6.5	9.3	190.1	6.9	7.0	189.7	7.7	11.2	184.1	6.1	1.5	188.4	6.6	2.5
Günler arası tekrar edilebilirlik																		
50	42.6	2.5	3.0	42.3	3.0	4.0	40.8	2.3	0.9	43.2	0.3	0.9	41.1	2.2	3.0	44.6	0.8	3.1
100	90.2	0.4	1.6	95.5	3.0	1.1	91.0	3.3	1.9	90.1	3.9	8.8	93.5	4.4	6.1	90.2	1.2	2.4
150	144.0	2.6	1.9	133.9	8.4	4.4	140.7	0.4	10.8	140.2	2.9	10.5	133.3	3.7	0.9	136.9	4.9	4.5
200	190.6	5.1	8.2	191.8	9.5	10.8	190.9	7.8	5.0	185.1	7.9	10.9	180.1	6.8	10.0	184.8	5.5	7.0

YK: Yüklenen konsantrasyon ($\mu\text{g/L}$), ÖK: Ölçülen konsantrasyon ($\mu\text{g/L}$), CV(%): Varyasyon katsayısı.

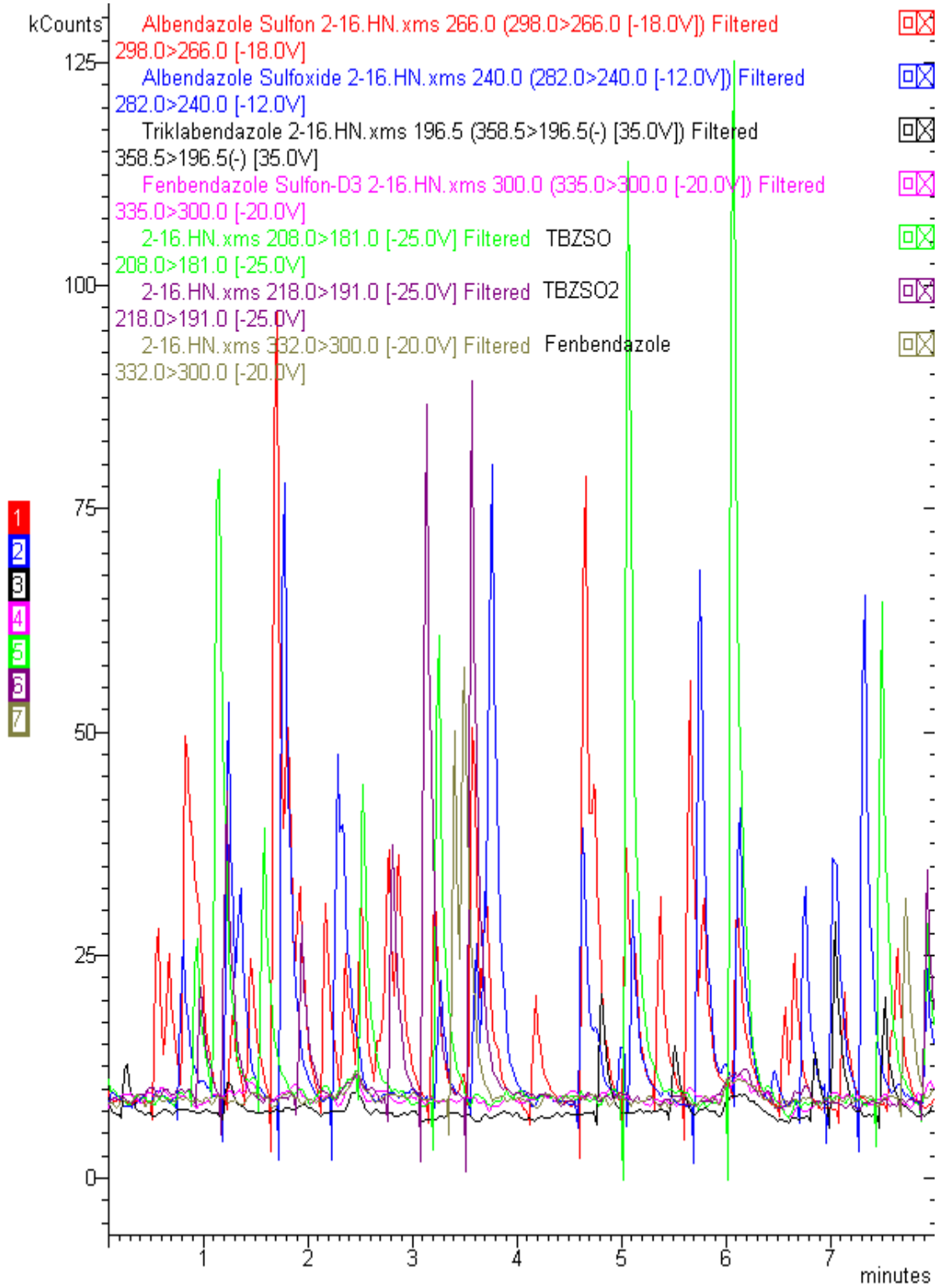


Şekil 2.1. Albendazol sülksit ve albendazol sülfonun farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerinin (50, 100, 150 ve 200 µg/ml) matris kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayıları.

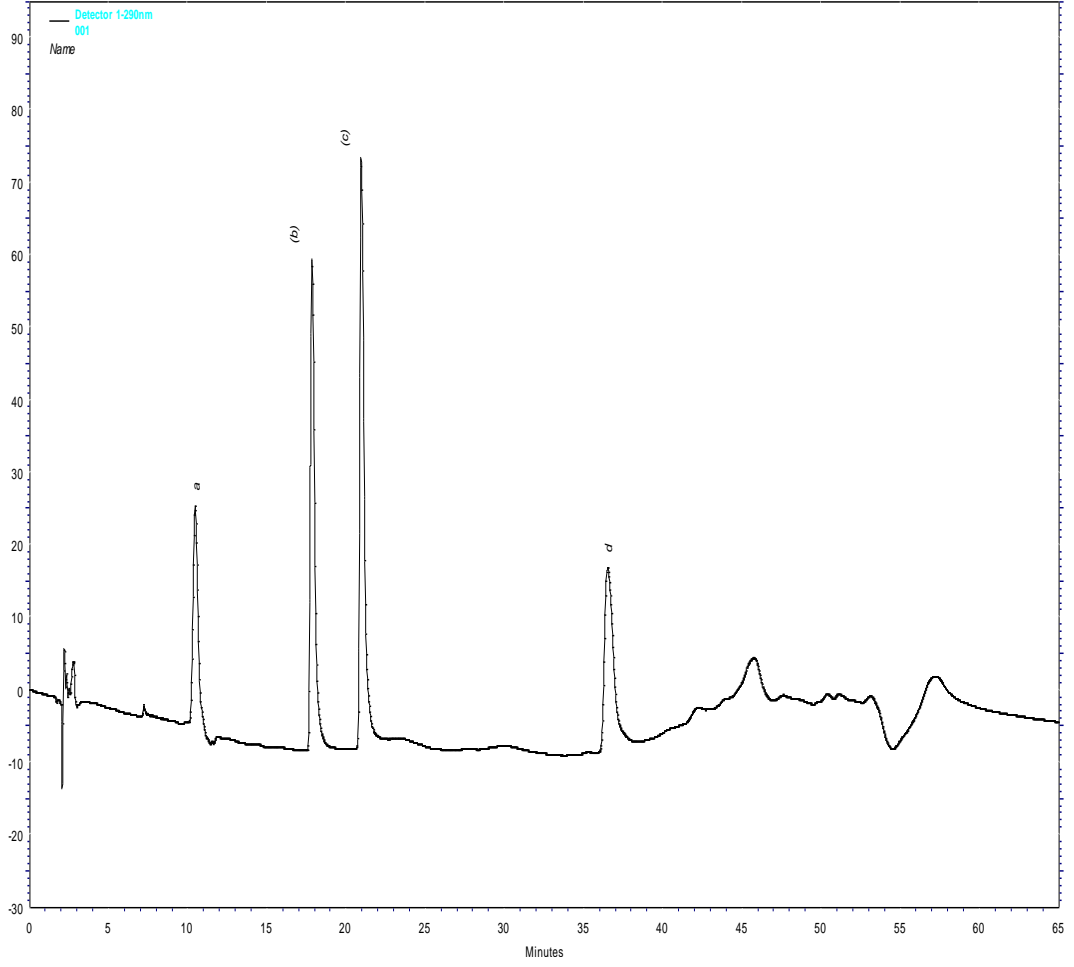
3. BULGULAR

ABZ, ABZSO, ABZSO₂, TRKB, TKBZSO, TKBZSO₂, fenbendazol, FBZSO ve FBZSO₂'in 6 farklı konsantrasyonu mobil faza doğrudan verilerek bunlara ait kromatogramlardan lineer kalibrasyon eğrisi hesaplandı. Bu kromatogramlar incelenerek, piklerin geliş zamanları (retention time), pik alanları (peak area), tespit edilme limitleri (detection limit) ve geri alım kazançları (recovery) tespit edildi. Bu çalışmada, ABZSO, ABZSO₂, FBZ, FBZSO ve FBZSO₂ için analitik tespit limiti 1 µg/L (ppb), TKBZ, TKBZSO, TKBZSO₂ için ise 0.05 µg/L (ppb) olarak belirlenmiştir.

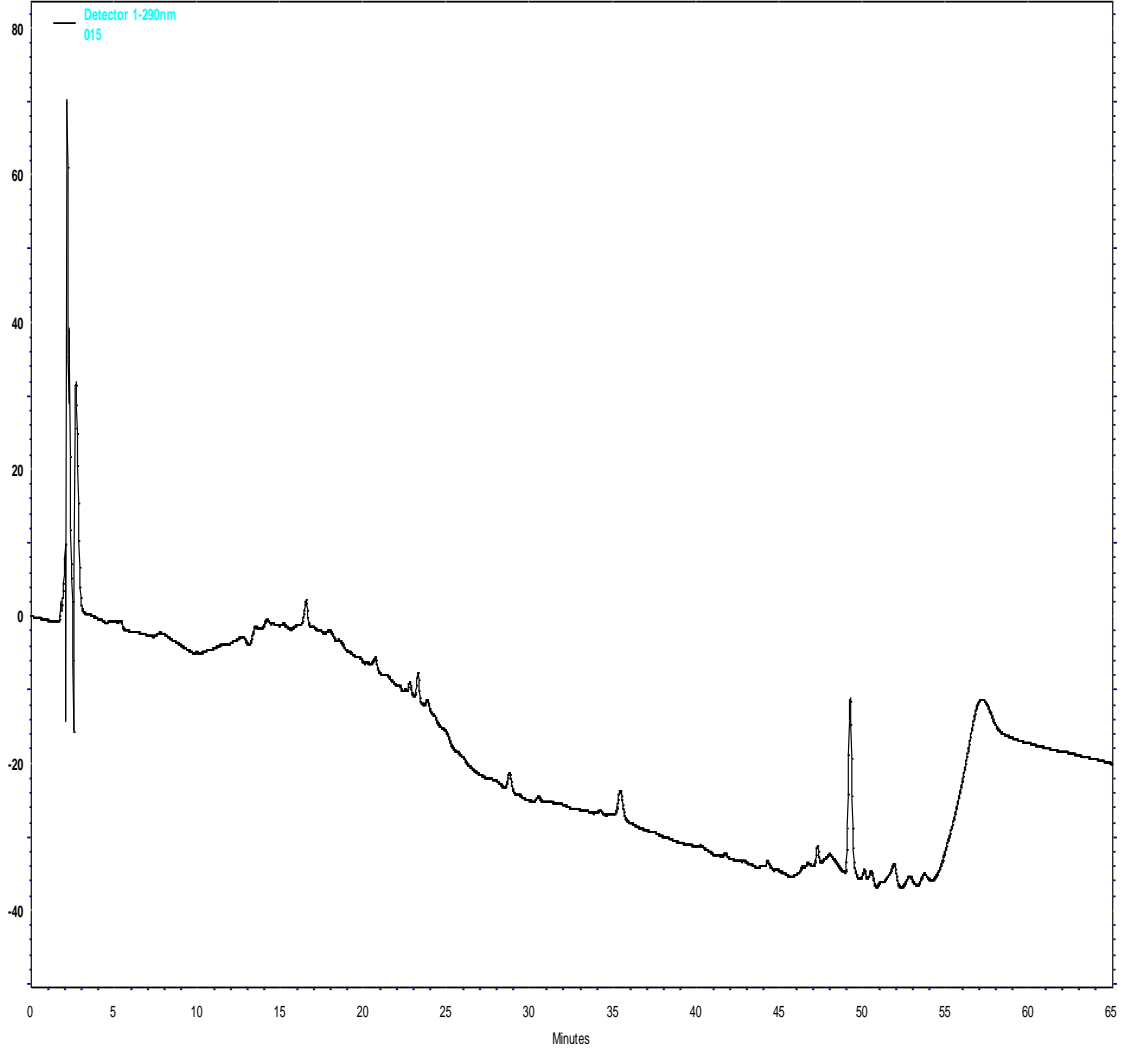
TKBZ, ABZ ve FBZ ait hesaplanan kan farmakokinetik parametreleri sırası ile Çizelge 3.1`de verilmistir.



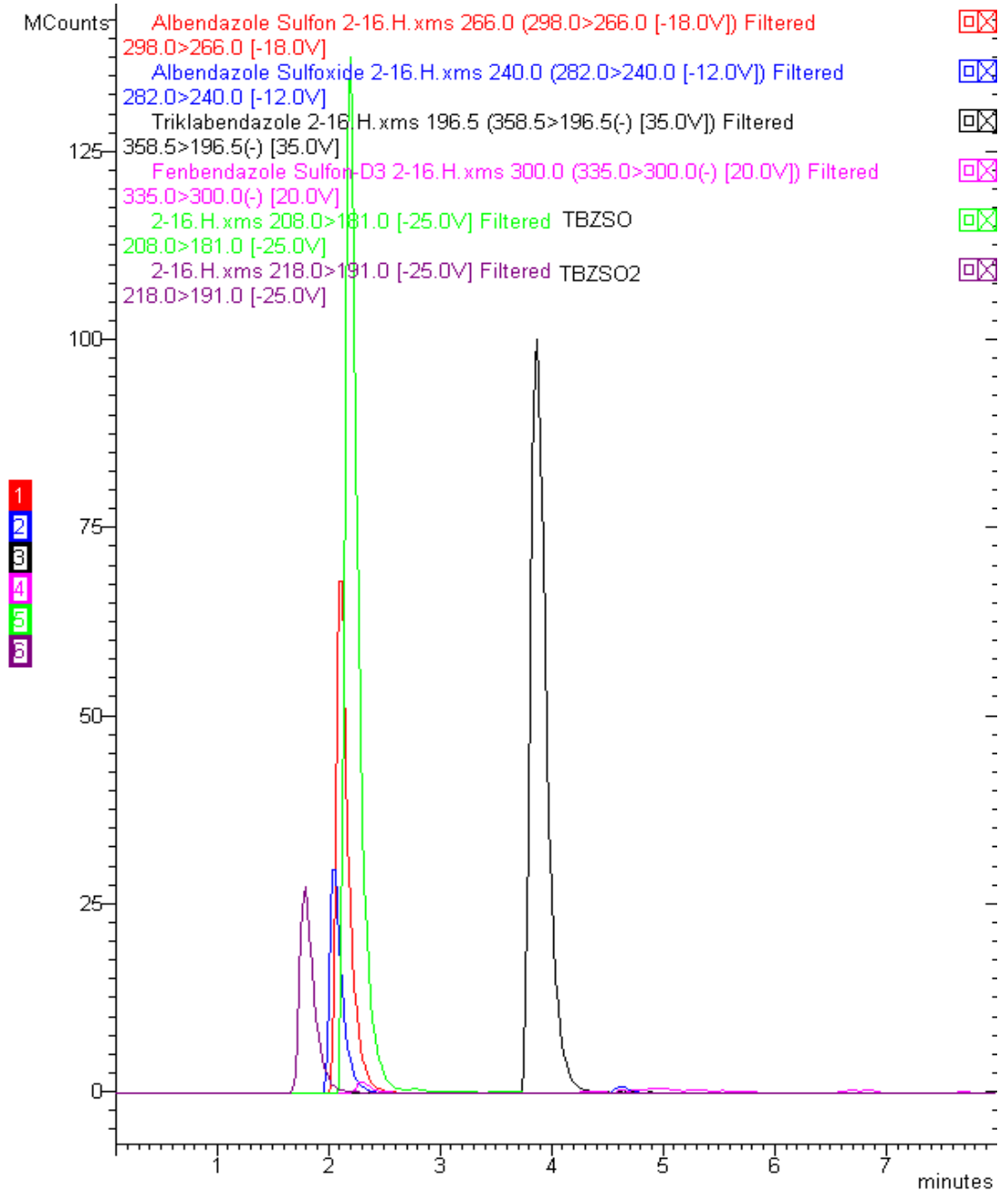
Şekil 3. 1. HPLC' ye verilen ilaçsız süt örneklerinin standart geliş zamanlarına göre alınan kromotogram.



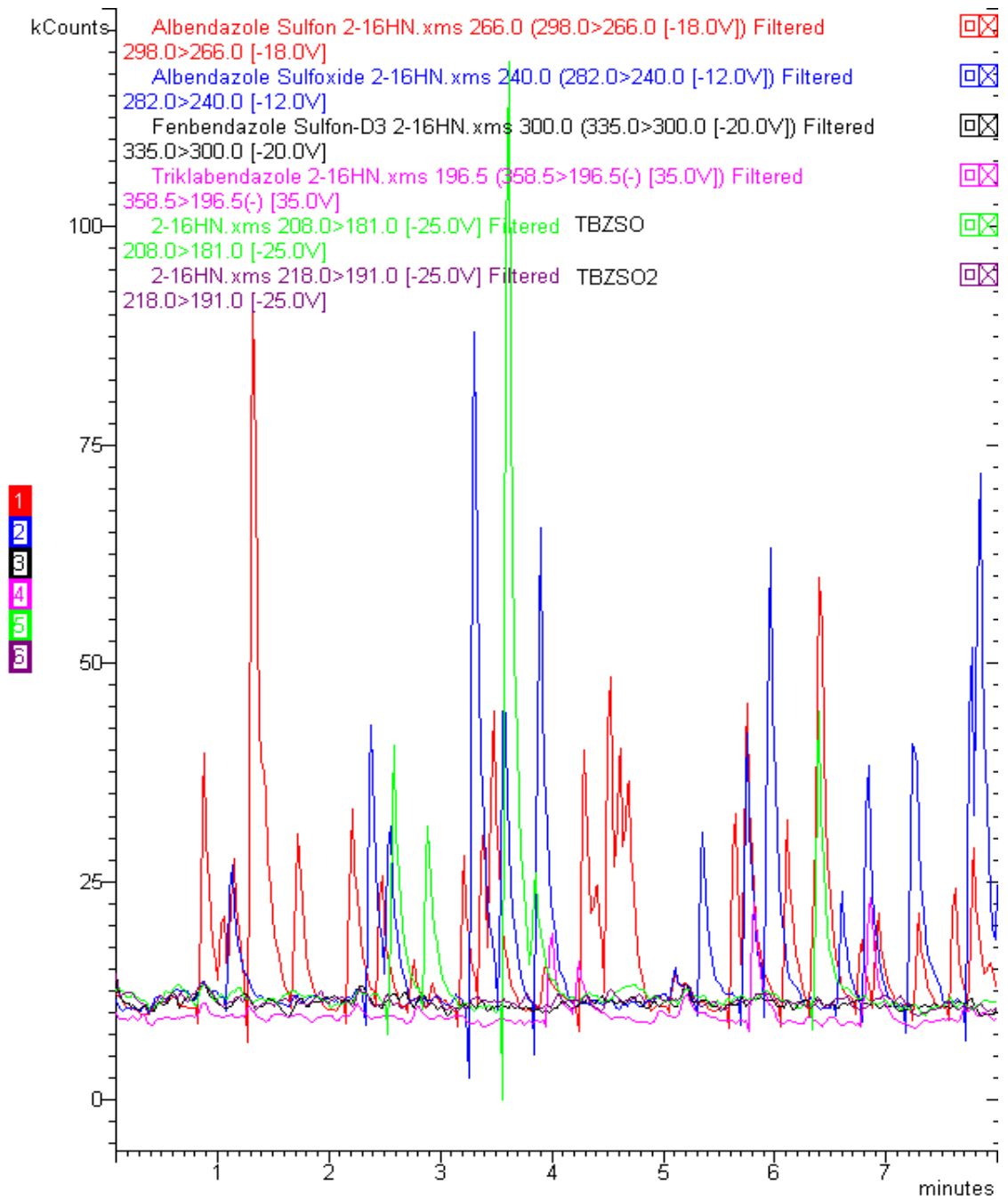
Şekil 3.3. Oral 7.5 mg/kg olarak kullanılan albendazolün 24. saatte süt dokusuna ait kromotogramları. a) albendazol 2-aminosulfon ($ABZSO_2A$), b) albendazol sulfoxit ($ABZSO$), c) albendazol sulfon ($ABXSO_2$), d) albendazol.



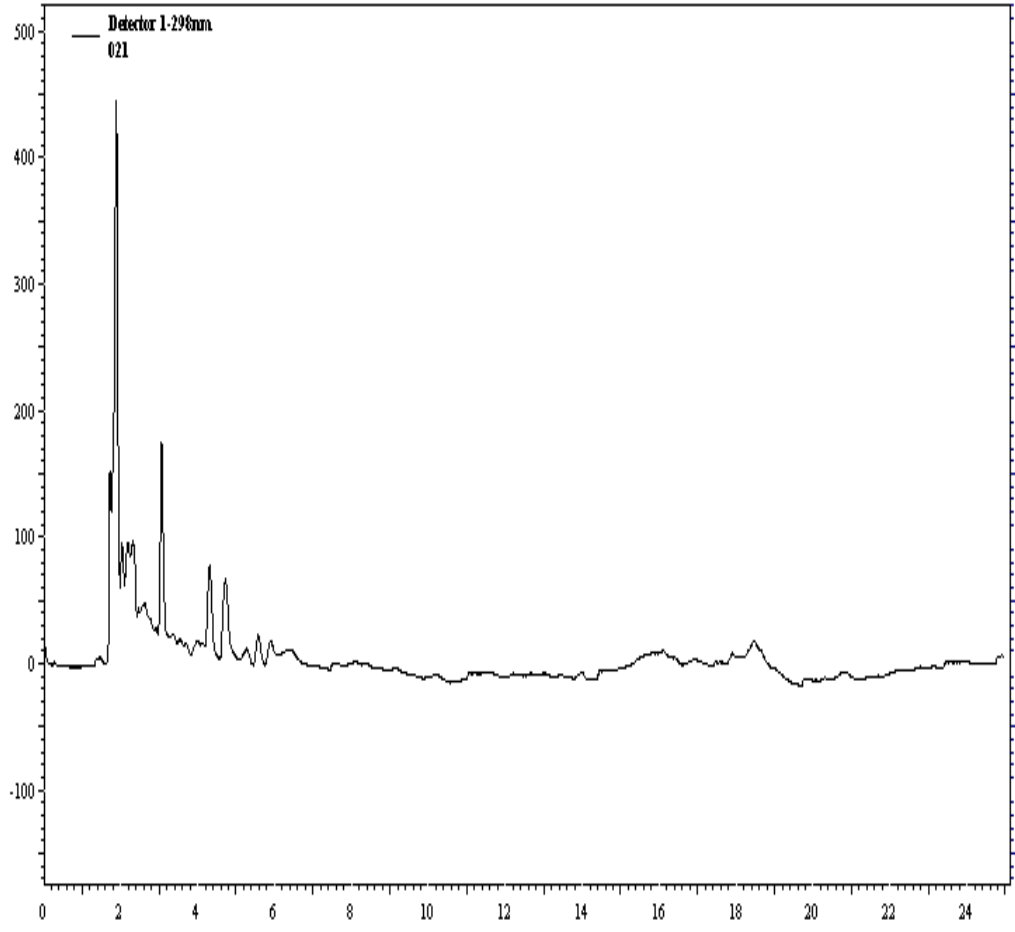
Şekil 3.4. Aynı saatte ilaç kullanılmayan süt numunelerinden alınan kromotogram.



Şekil 3.5. Albendazol, triklabendazol ve fenbendazolün 16. saatte mastitisli süt dokusuna ait kromotogramları.



Şekil 3.6. 16. saatte ilaç kullanılmayan süt dokusuna ait kromotogram.



Şekil 3.7. 5. gün alınan süt numunesi ekstraksiyonu sonucu alınan kromotogram.

Çizelge 3.1. Oral 10 mg/kg olarak kullanılan triklabendazolun ve 7.5 mg/kg olarak kullanılan albendazol ve fenbendazolun sağlıklı sığırlarda farmakokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

	Parametreler					
	t_{doruk} (saat)		C_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)		EAA_{son} ($\mu\text{g saat/ml}$)	
	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt
ABZSO	13.95 ± 1.81	25.02 ± 1.88	3.5 ± 0.76	0.922 ± 0.08	66 ± 14	73.22 ± 6.09
ABZSO2	21.40 ± 3.88	15.99 ± 1.39	3.2 ± 1.73	0.812 ± 0.06	55 ± 25	69.18 ± 4.52
TBZSO	23.90 ± 2.1	14.85 ± 1.22	14.55 ± 2.66	0.930 ± 0.08	660.02 ± 140.44	728 ± 144.52
TBZSO2	45.10 ± 6.95	13.19 ± 1.38	12.22 ± 2.33	0.873 ± 0.08	949.37 ± 225.32	902.85 ± 154.11
FBZ	27.72 ± 2.93	20.09 ± 1.78	0.46 ± 0.08	0.120 ± 0.03	5.81 ± 0.12	6.51 ± 0.13
FBZSO	37.11 ± 4.40		0.12 ± 0.01		1.58 ± 0.09	
FBZSO2	45.02 ± 1.43	23.64 ± 1.82	0.52 ± 0.08	0.166 ± 0.031	6.13 ± 0.14	8.88 ± 0.15

	Parametreler															
	$t_{1/2ab}$ (saat)		α (saat ⁻¹)		β (saat ⁻¹)		$t_{1/2\alpha}$ (saat)		$t_{1/2\beta}$ (saat)		V_d (L)		k_{12} (saat ⁻¹)		k_{21} (saat ⁻¹)	
	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt	Kan	Süt
ABZSO	4.67 ± 1.02		0.53 ± 0.11		0.05 ± 0.009		1.24 ± 0.12		10.55 ± 0.80	17.49 ± 0.44*	59 ± 1.41		0.80 ± 0.11		0.35 ± 0.08	
ABZSO2	6.37 ± 1.13		0.52 ± 0.11		0.05 ± 0.009		1.18 ± 0.11		9.94 ± 0.85	20.03 ± 0.46*	61 ± 1.42		0.79 ± 0.10		0.37 ± 0.08	
TBZSO	6.85 ± 1.22		0.81 ± 0.13		0.008 ± 0.001		3.36 ± 0.25		24.11 ± 1.99	17.39 ± 0.41	766.1 ± 50.1		2.83 ± 0.44		0.91 ± 0.02	
TBZSO2	9.27 ± 1.31		0.83 ± 0.14		0.007 ± 0.001		5.95 ± 0.39		31.75 ± 2.15	15.26 ± 0.41	1070.2 ± 59.9		2.95 ± 0.45		0.93 ± 0.02	
FBZ	5.25 ± 0.89		0.18 ± 0.06		0.014 ± 0.002		1.71 ± 0.16		12.18 ± 1.44	30.66 ± 1.22	1.34 ± 0.14		0.05 ± 0.09		0.05 ± 0.01	
FBZSO	7.28 ± 0.93		0.12 ± 0.03		0.010 ± 0.001		1.64 ± 0.15		15.83 ± 1.70		0.89 ± 0.10		0.02 ± 0.09		0.02 ± 0.01	
FBZSO2	10.8 ± 1.47		0.23 ± 0.07		0.015 ± 0.003		1.89 ± 0.17		14.19 ± 1.49	37.11 ± 1.93	1.95 ± 0.19		0.07 ± 0.09		0.06 ± 0.01	

*: Aynı satırdaki değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

C_{doruk} : Kan ve sütteki doruk ilaç yoğunluğu, t_{doruk} : kan ve sütte doruk ilaç yoğunluğa ulaşma süresi, EAA: kan ve sütte ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altında kalan alan, $t_{1/2ab}$: emilme yarı ömrü, MRT: Mean Residence Time – Ortalama Kalış Süresi, α : kan ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin dağılım dönemi hız sabitesi, β : kan ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin atılma dönemi hız sabitesi, $t_{1/2\alpha}$: dağılım yarı ömrü, $t_{1/2\beta}$: atılma yarı ömrü, V_d : dağılım hacmi, k_{12} : merkezi ve çevresel bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi, k_{21} : Çevresel ve merkezi bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi.

Çizelge 3.2. Albendazol, fenbendazol ve triklabendazolün sağlıklı ve mastitisli gruptaki süt konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

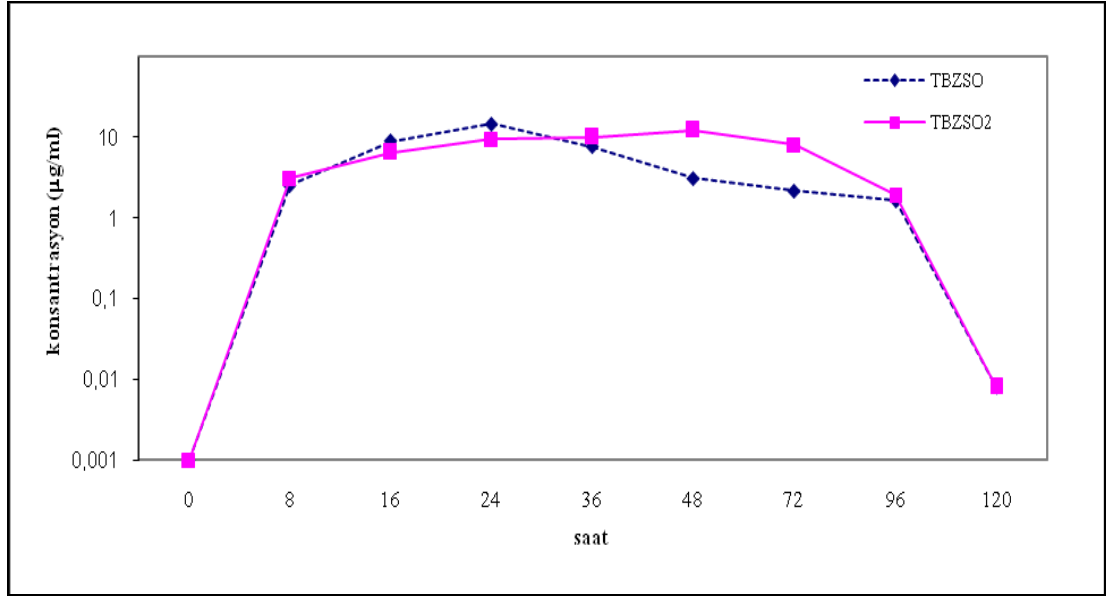
		İlaçlar					
	Saat	Albendazol		Fenbendazol		Triklabendazol	
		ABZSO	ABZSO2	FBZ	FBZSO2	TKBZSO	TKBZSO2
Mastitisli (µg/ml)	0	-	-	-	-	-	-
	8	0.352±0.03	0.908±0.08*	0.055±0.01	0.065±0.01	0.880±0.06	0.877±0.07
	16	0.292±0.03	0.853±0.08	0.080±0.01	0.121±0.01	0.340±0.03	0.349±0.03
	24	1.115±0.09*	0.094±0.01	0.119±0.01	0.157±0.02	0.093±0.01	0.168±0.02
	36	0.090±0.01	0.026±0.01	0.033±0.01	0.0627±0.01	0.058±0.01	0.203±0.02
	48	0.071±0.01	0.014±0.01	0.0115±0.01	0.029±0.01	0.045±0.01	0.327±0.03
	72	0.044±0.01	0.011±0.01	0.05±0.01	0.017±0.01	0.008±0.01	0.0077±0.01
	96	-	-	-	-	-	-
	Sağlıklı (µg/ml)	0	-	-	-	-	-
8		0.315±0.02	0.781±0.06*	0.056±0.01	0.063±0.01	0.860±0.09	0.855±0.08
16		0.225±0.03	0.812±0.07	0.0792±0.08	0.119±0.01	0.395±0.04	0.341±0.03
24		0.901±0.08	0.093±0.01	0.116±0.09	0.153±0.01	0.094±0.01	0.162±0.01
36		0.088±0.01	0.034±0.01	0.0334±0.01	0.0624±0.01	0.047±0.01	0.209±0.02
48		0.062±0.01	0.014±0.01	0.0114±0.01	0.0288±0.01	0.046±0.01	0.331±0.03
72		0.028±0.01	0.011±0.01	0.05±0.01	0.016±0.01	0.007±0.01	0.0079±0.01
96		-	-	-	-	-	-

*: Aynı sütündeki değerler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

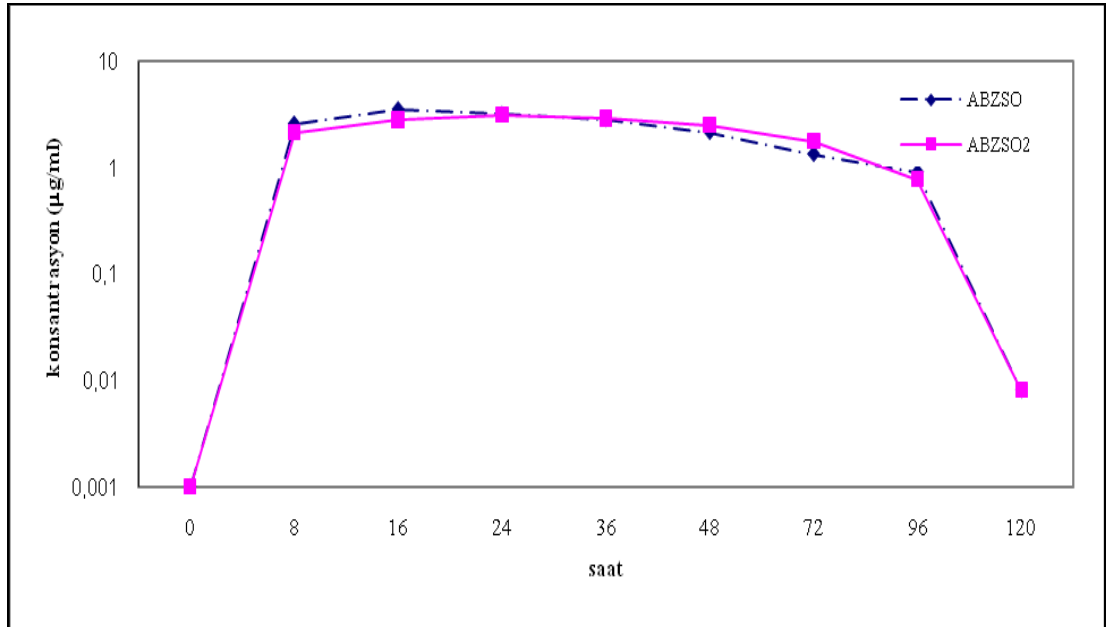
ABZ, FBZ ve TKBZ'e ait sağlıklı ve mastitisli sütteki hesaplanan farmakokinetik parametreler Çizelge 3.2.'de sunulmuştur. ABZ mastitisli grupta süt konsantrasyonlarının 8., 16. ve 24. saatlerde sırasıyla daha yüksek olduğu, mastitisli ve sağlıklı grup arasında 36., 48. ve 72. saatlerdeki süt konsantrasyonları değerlerinin benzer olduğu görülmüştür. TKBZ'ün mastitisli ve sağlıklı gruplara ait tüm süt alım zamanlarında ölçülen konsantrasyonlarının da benzer olduğu saptanmıştır. FBZ'ün, mastitisli grupla sağlıklı grubun tüm örnekleme zamanlarındaki süt konsantrasyon değerlerinin benzer olduğu ve 72. saatte sütte tespit edilebilen en yüksek ilaç kalıntı konsantrasyonlarının FBZ'e ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Üç ilacın da 5. günden sonra, sütte tespit limitlerinin üzerinde kalıntılara rastlanılmamıştır.

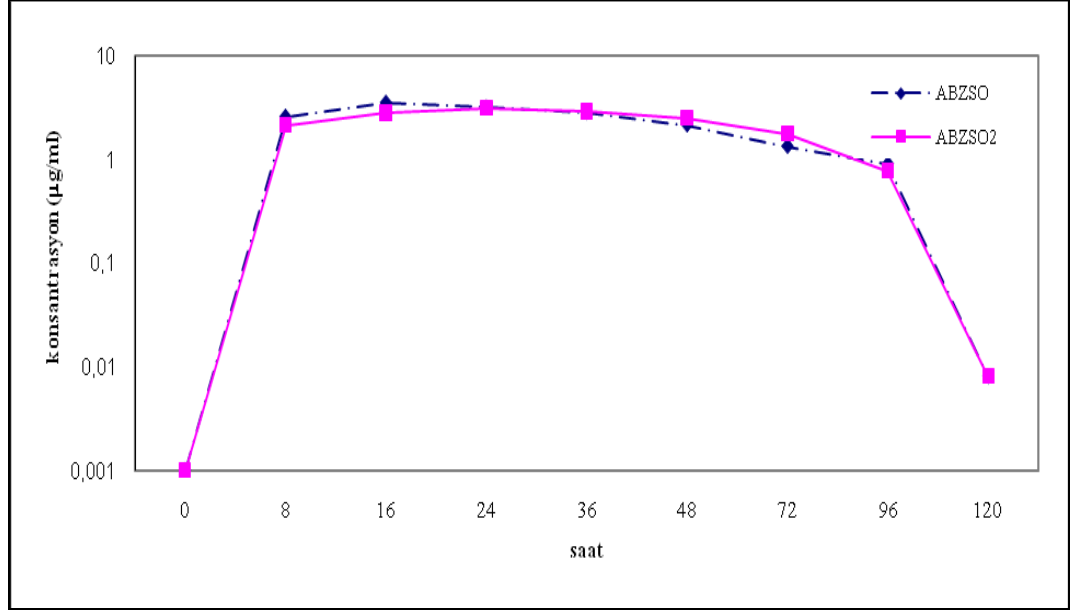
7.5 mg/kg oral olarak kullanılan fenbendazol, 120 saat süresince tüm süt alım zamanlarında tespit limitlerinin üzerinde tespit edilmesine rağmen bu değerlerin kantitatif anlam ifade etmemektedir. Oral 7.5 mg/kg olarak kullanılan albendazol 24 saat içerisinde sütte ortalama 1916 µg/L, 48 saat içerisinde 127 µg/L ve 72 saat içerisinde 9 µg/L olarak tespit edildi. Uygulamanın ilk 48 saatindeki sütteki toplam kalıntı miktarının yalnızca %2-3'ü albendazol olarak belirlendi. İlk 24 saatteki toplam kalıntı miktarının %85'ini metabolitleri (albendazol sülfoksit, albendazol sülfon, albendazol 2-aminosülfon) oluşturmuştur. Sütte en fazla rastlanan ilaç miktarının ABZSO' e ait olduğu (1.122 ± 0.107 µg/L) ve bunu sırasıyla TKBZSO, ABZSO2, TKBZSO2, FBZSO2 ve FBZ' ün izlediği; sütte yarılanma ömürleri değerleri bakımından TKBZ'ün diğer iki ilaçtan daha düşük değerlere sahip olduğu, ancak sütte rastlanabilen metabolitler açısından TKBZ'ün diğer iki ilaçtan yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür (Çizelge 3.3).



Şekil 3.1. Oral 10 mg/kg olarak kullanılan triklabendazolun kan konsantrasyon zaman egrisi.



Şekil 3.2. Oral 7.5 mg/kg olarak kullanılan albendazolun kan konsantrasyon zaman egrisi.

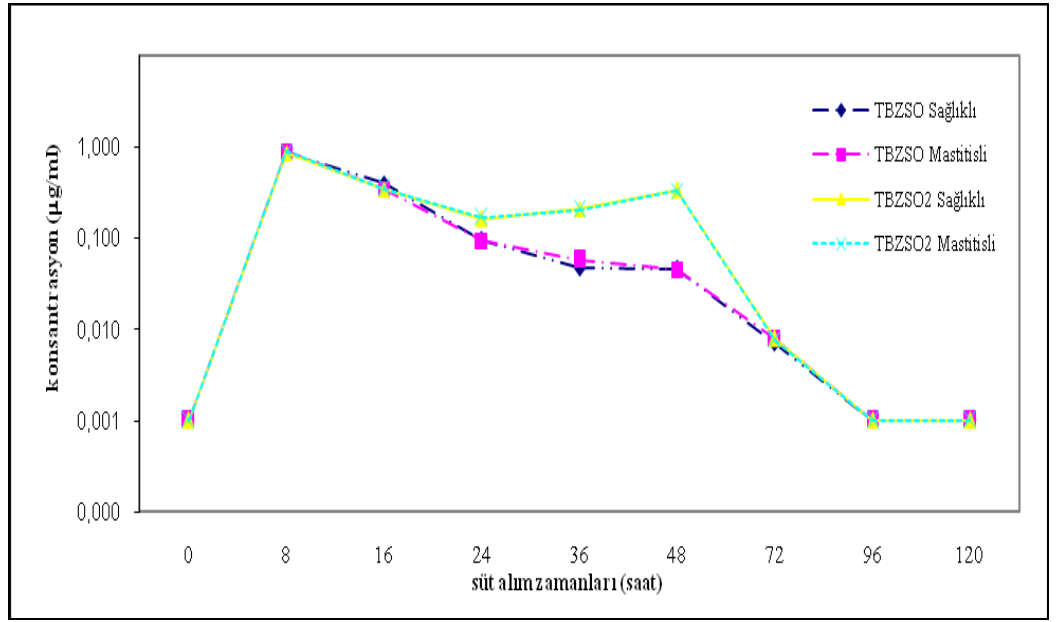


Şekil 3.3. Oral 7.5 mg/kg olarak kullanılan fenbendazolun kan konsantrasyon zaman egrisi.

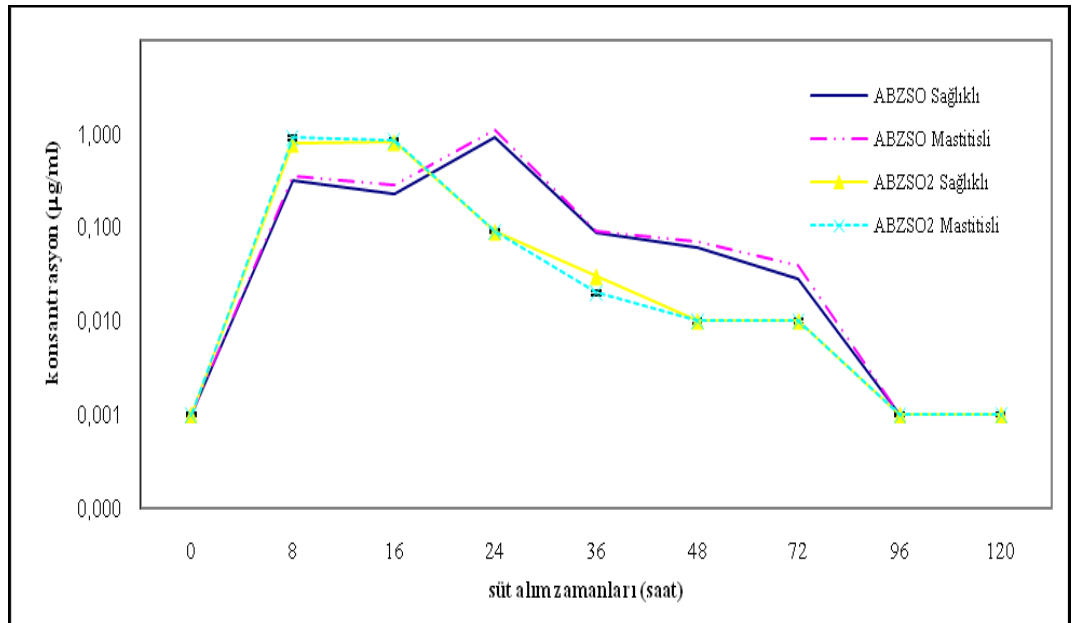
Çizelge 3.3. Oral 10 mg/kg olarak kullanılan triklabendazolun ve 7.5 mg/kg olarak kullanılan fenbendazol ve albendazolün sağlıklı ve mastitisli gruptaki süt farmakokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

	MASTITIS					
	ABZSO	ABZSO2	TKBZSO	TKBZSO2	FBZ	FBZSO2
c_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	1.122 \pm 0.107	0.911 \pm 0.086	0.921 \pm 0.076	0.868 \pm 0.078	0.122 \pm 0.031	0.168 \pm 0.031
t_{doruk} (saat)	24.13 \pm 1.75	14.58 \pm 1.30	14.21 \pm 1.18	13.00 \pm 1.33	20.25 \pm 1.80	24.06 \pm 1.85
$t_{1/2\beta}$ (saat)	24.01 \pm 0.62*	20.92 \pm 0.49*	15.88 \pm 0.38	14.93 \pm 0.39	30.13 \pm 1.21	37.49 \pm 1.94
MRT_{son} (saat)	69.28 \pm 3.54	75.02 \pm 3.93	218.77 \pm 8.82	227.30 \pm 9.21	135.23 \pm 7.92	129.25 \pm 7.71
$EAA_{süt\ 0-24}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	76.09 \pm 6.99*	71.17 \pm 6.26*	1195.44 \pm 182.31	1096.33 \pm 175.50	0.619 \pm 0.007	0.679 \pm 0.009
$EAA_{süt\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	99.46 \pm 9.18**	93.95 \pm 8.44*	1473.52 \pm 185.44	1422.30 \pm 178.16	0.6795 \pm 0.010	0.713 \pm 0.011
$EAA_{süt\ total}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	135.40 \pm 11.12**	118.65 \pm 10.07**	1933.77 \pm 205.50	1875.46 \pm 202.40	1.1486 \pm 0.40	1.1722 \pm 0.040
$EAA_{süt\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)/ $EAA_{plazma\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$) oranı	1.28*	1.21*	0.98	0.93	0.97	0.94
	SAĞLIKLI					
c_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	0.922 \pm 0.088	0.812 \pm 0.064	0.930 \pm 0.081	0.873 \pm 0.080	0.120 \pm 0.030	0.166 \pm 0.031
t_{doruk} (saat)	25.02 \pm 1.88	15.99 \pm 1.39	14.85 \pm 1.22	13.19 \pm 1.38	20.09 \pm 1.78	23.64 \pm 1.82
$t_{1/2\beta}$ (saat)	17.49 \pm 0.44	19.77 \pm 0.46	17.39 \pm 0.41	15.26 \pm 0.41	30.66 \pm 1.22	37.11 \pm 1.93
MRT_{son} (saat)	68.55 \pm 3.25	73.40 \pm 3.80	219.48 \pm 8.85	227.93 \pm 9.22	138.19 \pm 8.05	130.20 \pm 7.88
$EAA_{süt\ 0-24}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	66.15 \pm 5.88	63.95 \pm 5.76	1100.61 \pm 172.08	1070.14 \pm 170.22	0.615 \pm 0.007	0.670 \pm 0.008
$EAA_{süt\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	88.10 \pm 7.44	85.21 \pm 7.22	1494.86 \pm 188.34	1430.30 \pm 182.02	0.6825 \pm 0.011	0.720 \pm 0.012
$EAA_{süt\ total}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)	119.24 \pm 9.05	108.20 \pm 8.90	1949.33 \pm 208.77	1881.39 \pm 204.69	1.1560 \pm 0.41	1.1734 \pm 0.042
$EAA_{süt\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$)/ $EAA_{plazma\ 0-72}$ ($\mu\text{g saat/ml}$) oranı	0.96	0.95	0.97	0.92	0.91	0.89

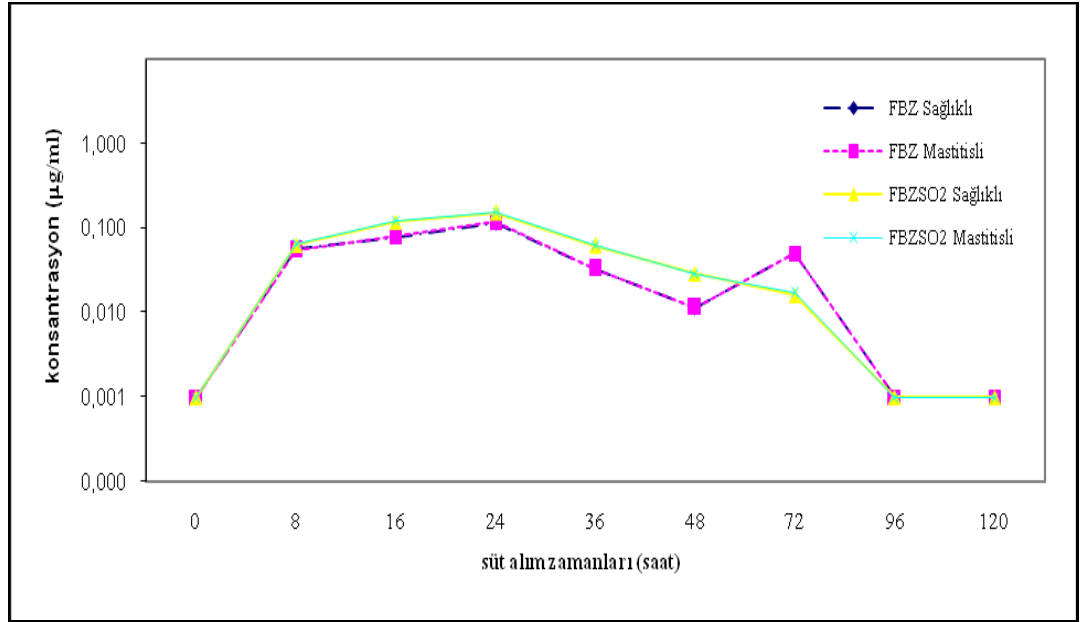
*: Aynı sütündeki değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). **: Aynı sütündeki değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.01$).



Şekil 3.4. Mastitisli ve sağlıklı süt numunelerinde, oral triklabendazol kullanılması takiben süt konsantrasyon zaman eğrisi.



Şekil 3.5. Mastitisli ve sağlıklı süt numunelerinde, oral kullanılması takiben süt konsantrasyon zaman eğrisi.



Şekil 3.6. Mastitisli ve sağlıklı süt numunelerinde, oral fenbendazol kullanımasını takiben süt konsantrasyon zaman eğrisi.

4. TARTIŞMA

Halk sağlığı, gıda kalite ve güvenliğine yönelik artan kaygılar, gıda üreten hayvanlarda ilaç kullanımınnın yeniden gözden geçirilmesine neden olarak yakın zamanda bazı ilaçların kullanımına yasaklama ve kısıtlama getirilmesine neden olmuştur. Diğer yandan artan hayvansal gıda talebini karşılamak amacı ile hayvansal üretimi artırmak ve hayvan sağlığını korumak için dünya genelinde çeşitli ilaç ve kimyasallar yaygın olarak kullanılmaktadır. nemli oranda verim kaybına neden olan parazitlere karşı kullanılan antiparaziter ilaçlar, gıda üreten hayvanlarda antibakteriyel ilaçlardan sonra en yaygın kullanılan ilaç grubunu oluşturmaktadır.

Hayvansal gıdalardaki ilaç kalıntılarının, halk sağlığı ve ekonomik açıdan büyük problemlere yol aması nedeniyle kalıntının nedenleri ve kontrolü üzerine detaylı çalışmalar yürütülmüş ve yrtlmeye de devam edilmektedir. Doku ve organlardaki tolerans düzeylerinin üzerindeki tüm kalıntılar toksikolojik yönden önem taşırlar ve tehlikeli olarak kabul edilirler. Kalıntı nedenleri üzerine yapılan çalışmalarda kalıntının ana nedeni olarak ilaçların etiket dışı kullanımı gösterilmektedir. Ayrıca, hastalık, ırk, evre, beslenme farklılıkları, yaş gibi hayvanlarda ilaç davranışını etkileyebilecek fizyolojik ve patolojik faktörlerin de kalıntı nedeni olabileceği öngörülmektedir (Paige ve ark 1997, De Ruyck ve ark 2000, Serratos ve ark 2006, Traş ve ark 2011).

Sütü hayvanlarda, kemoterapotik ilaçlardan çoğunluğunun pasif difüzyonla kan-süt engelini geçerek, değişik yoğunluklarda sütte biriktikleri belirlenmiştir. Süt dokusu, pH'sı 6.5-6.8 olan, diğer biyolojik membranlar gibi gerçek lipid bir bariyerdir ve bazik ilaçların atılımı açısından önemli bir organdır (Gruet ve ark 2001, Ito ve Lee 2003, Larsen ve ark 2003, Holford 2004, Zhao ve ark 2006, Lee 2007). Akut mastitis gibi yangısel olaylarda kan-meme dokusu bariyerinin daha geçirgen olduğu ve değişen süt fizikokimyasal özelliklerinin meme dokusu ve süte antibakteriyel ilaç geçişlerinin artırdığı ifade edilmektedir (Gips ve Soback 1999, Rantala ve ark 2002, Scheneider ve ark 2004, Serieys ve ark 2005 Kietzmann ve ark 2008, Lucas ve ark 2009).

İlaç davranışını değiştirebilecek potansiyele sahip yangı ile seyreden hastalıkların BZD ilaç davranışı üzerindeki etkisini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmanın olmaması göz önüne alınarak, mastitisin BZD'lerin sütteki davranışı üzerindeki etkisini belirlemeye yönelik olarak mevcut çalışma yürütülmüştür. Ayrıca çalışmada kullanılan İsviçre esmeri ırkı ineklerde ABZ, FBZ ve TKBZ'un farmakokinetiği ortaya konmuştur.

Mevcut araştırmada Çizelge 3.3 incelendiğinde mastitisin sadece ABZ metabolitlerinin sütteki davranışını değiştirdiği ve TKBZ ile FBZ'un davranışlarında ise bir değişikliğe neden olmadığı görülmektedir. Hem ALBSO ve hem de ALBSO2'un EAA, biyolojik yarılanma ömrü ve süt/plazma oranlarının mastitisli sütlerdeki değerleri sağlıklı süttükine göre yüksek olduğu ve bunun da istatistiksel yönden önem arz ettiği görülmektedir.

Mastitisin sadece ABZ'un farmakokinetiğinde değişikliğe neden olup diğer iki ilaç ta olmamasında değişik faktörler rol oynayabilir. Bu faktörlerin başında plazmadan süte madde geçişinde etkili olan BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) transmembran proteini rol oynayabilir. ABZ metabolitlerinin BCRP substratları olduğu ve bu taşıyıcı proteinlerin aktivitesinin yangısel olaylarda çift yönlü değişebildiği bildirilmektedir (Merino ve ark 2005, Muenster ve ark 2008, Poller ve ark 2010). Ayrıca ilaçların fizikokimyasal özelliklerinin farklı oluşu da önemli olabilir. TKBZ'un plazma proteinlerine bağlanma oranının daha yüksek olduğuda bilinmektedir. ALB metabolitlerinin mastitisli hayvanların süt yarı ömrünün uzamasına rumen hareketlerindeki azalma neden olabilir. Çünkü mastitis, rumen hareketlerinde azalmaya neden olmakta (Traş ve ark 2011) ve rumen hareketlerindeki azalmanın da BZD'lerin farmakokinetiğini değiştirebileceği ortaya konulmuştur (Capece ve ark 2001, Mestorino ve ark 2008). Mastitisin ALBSO'in farmakokinetiğini ALBSO2'na göre daha fazla değiştirdiği, bunun da iki metabolitin farklı fizikokimyasal özelliği ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Bu ilaçların kan farmakokinetik parametreleri incelendiğinde (Çizelge 3.1), sülfoksit metabolitlerinin emilim yarı ömürlerinin sulfon metabolitlerine göre daha kısa olduğu ve buna bağlı olarak ta t_{doruk} değerlerinin de daha kısa olduğu görülmektedir. Özellikle TKBZ ve kısmende ABZ sulfon metabolitlerinin Vd değerleri daha büyüktür. k_{12} değerleri incelendiğinde TKBZ metabolitlerinin dokuya dağılımlarının daha yüksek olduğu söylenebilir. İlaçların sistemik

dolaşıma dönüşlerinin düşük olduğu belirtilebilir. İlaçların metabolitlerinin biyolojik yarı ömrü incelendiğinde TKBZ'un sulfon metabolitinin yarı ömrünün sulfit metabolitine göre daha uzun olduğu görülmektedir ki buna TKBZSO₂'nin Vd değerinin büyük olması neden olabilir. Çünkü beta değerleri arasında fark belirgin değildir. ABZ ve FBZ'un metabolitlerinin biyolojik yarı ömürleri birbirine yakın bulunurken, FBZ'un yarı ömrü metabolitlerine göre daha kısa bulunmuştur. Metabolitler arasındaki farklılıklara fizikokimyasal özellikleri neden olabilir (Çizelge 3.3).

TKBZ'un plazma proteinlerine bağlanma oranının yüksek olduğunun, buna bağlı olarak Vd değerinin diğerlerine göre küçük olduğu belirtilmesine (Sanyal 1997, Lanusse ve Prichard 1993) rağmen, çalışma sonucunda TKBZ metabolitlerinin Vd değerlerinin fizyolojik sınırların üzerinde olduğu görülmektedir. Bu duruma metabolitlerin rumen başta olmak üzere sindirim sisteminde akümüle olması neden olabilir. Çünkü BZD türevleri için rumenin bir rezervuar görevi üstlendiği ifade edilmektedir (Lanusse ve Prichard 1993, Redondo ve ark 1999, Capece ve ark 2001). Ayrıca BZD bileşiklerinin oral uygulanması sonucu emilimlerinin düzensiz ve sindirim sistemi ile plazma arasında bir siklusun oluşu, hesaplanan Vd değerlerinin sağlıklı bir veri olarak değerlendirilmesine mani olduğunu da belirtmekte fayda vardır. TKBZ metabolitlerinin EAA değerlerinin diğerlerine göre daha yüksek olması, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanma, dağılım yarı ömrünün daha uzun olması, k₂₁'in yüksek olması ve beta değerinin diğerlerine göre küçük olmasına bağlı olabilir.

Sığırlarda aynı dozda ABZ'u rumene uygulayan Sanyal (1997), sülfid ve sulfon metabolitlerinin yarı ömrünü 9.10 ve 8.93 saat olarak bulmuş, bu değerler bizim sonuçlarımıza (10.55 ve 9.94) göre biraz daha kısa olmakla beraber benzer olduğu söylenebilir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre daha kısa bulunmasına rumen içi uygulama neden olabilir.

Sanyal ve Gupta (1998), 8-9 aylık danalarda TKBZSO ve TKBZSO₂'nin biyolojik yarı ömrünü sırası ile 31.47 ve 45.59 saat olarak tespit etmişlerdir. Bu değerler çalışmamız sonuçlarına göre daha uzun olduğu görülmekte, bu durum araştırmacıların kullandığı dozun fazla olması (12 mg/kg), yemleme ve hayvanların yaş faktörü ile ilgili olabilir. Ruminantlarda hızlı ve tamamen metabolitlerine dönüştüğü bildirilen TKBZ'un yemleme şeklinin farmakokinetik davranışta

değişikliğe neden olduğu, keçilerde TKBZSO un yarı ömrünün 16, 16-24, 47 ve TKBZSO2'un ise 21, 43- 29.75 saat olarak belirlendiği ilk değerlerin otlayan hayvanlara diğer değerlerin ise konsantre yem tüketen hayvanlara ait olduğu bildirilmiştir (Gökbulut ve ark 2007).

Imperiale ve ark (2011), sütçü sığırlarda oral 12 mg/kg olarak kullanılan triklabendazolün sütte 36. ve 144. saat aralığında metabolitlerinin tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada bu sütlerle yapılan peynirlerdeki triklabendazol metabolitleri miktarının, çalışmadaki sütlerde tespit edilebilen miktarından 13 kat daha fazla olduğu ortaya konmuştur.

Direkt rumene uygulanan fenbendazolun erkek danalarda biyolojik yarı ömrü sırası ile FBZ, OFBZ ve FBZSO2 için 7.11, 8.91 ve 6.89 saat olarak belirtilmektedir (Knox ve Steell 1997). Diğer bir araştırmada ise FBZ'un da diğer BZD türevleri gibi farmakokinetik davranışının yemleme rejimi ve yeme göre değiştiği ve koyunlarda biyolojik yarı ömürleri, FBZ için 12 - 21.11, OFB için 12 – 23.98 ve FBZSO2 için ise 18.32 – 30.32 saat olarak bildirilmektedir (Oukessou ve Chkounda 1997). Danalardaki değerlerin çalışma sonuçlarına göre daha kısa olması rumen içine uygulama ile ilişkili olabilir. Rumen hareketleri ve uygulanan ilacın katı veya sıvı oluşu ilacın rumende kalış süresini değiştirir. Danalarda da FBZSO2 yarı ömrü çalışmamızdaki gibi diğerlerinden daha uzun olarak bildirilmektedir. Koyunlardaki bildirilen değerler çalışmadaki FBZ sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

İsviçre esmeri ergin ineklere oral yolla 7,5 mg/kg dozundaki ALB ve FBZ verildiğinde ALBSO, ALBSO2, FBZ, FBZO ve FBZO2'un plasma biyolojik yarı ömrü sırası ile 10.55, 9.94, 14.68, 20.13 ve 16.75 saat olarak ve 10 mg/kg dozunda verilen TKBZ verildiğinde TKBZSO ve TKBZSO2'un plazma biyolojik yarı ömrü ise 24.11 ve 31.75 saat olarak belirlenmiştir.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; mastitis, fenbendazol ve triklabendazolün sütteki farmakokinetik davranışlarında bir değişikliğe neden olmazken, albendazolün süte geçiş oranında ve yarılanma ömründe artışa neden olmuştur.

Sağlıklı hayvanlar temel alındığında fenbendazolün süte geçiş oranı diğerlerine göre daha düşüktür.

Mastitisin albendazolün sütteki davranışında önemli değişikliğe neden olmasından dolayı albendazolün subklinik mastitis gibi olgularda yasal bekletme süresinin yeniden gözden geçirilmesinin uygun olacağı anlaşılmaktadır.

6. ÖZET

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mastitisin Benzimidazol Anthelmintiklerin Sütle Atılım Farmakokinetiği Üzerindeki Etkisi

Alper SEZGİN

Farmakoloji ve Toksikoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA - 2012

Benzimidazol antelmintiklerin sütle davranışı üzerine mastitisin etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada; bir veya iki meme lobunda klinik olarak mastitis olduğu belirlenen ve erken gebelik döneminde olmayan (1,5 aylık) 7 adet İsviçre Esmeri ırkı sığırlar kullanıldı. Çalışmada çapraz dizayn yöntemi kullanıldı. Hayvanlarda mastitis varken ve tedavi edildikten sonra oral yolla tek doz albendazol, triklabendazol ve fenbendazol sırasıyla 7.5 mg/kg, 10 mg/kg, ve 7.5 mg/kg dozlarında uygulandı. İlaç uygulamasını takiben 0., 8., 16., 24., 36., 48., 72. saatte ve 5. günde süt ve kan örnekleri alındı. Toplanan örneklerin, katı faz yöntemi ile (Solid Phase Extraction) ekstraksiyonu yapılarak HPLC metodu ile analizi gerçekleştirildi.

ABZ, ABZSO, ABZSO₂, TKBZ, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ, FBZSO ve FBSO₂'in geri kazanım çalışmalarındaki kromatogramlar üzerinde gözlemlenebilirlik sınırı (Limit of Detection, LOD) 1 µg/L (ppb); ölçülebilirlik sınırı (Limit of Quantification, LOQ) ise 5 µg/L (ppb) olarak ve geri kazanım değerleri ise sırasıyla % 84, 89, 94, 97, 89, 94, 85 ve 90 olarak belirlenmiştir.

Mastitisin ilaçlardan sadece ABZ'un sütteki davranışında değişikliğe neden olduğu belirlendi. Sağlıklı ve mastitisli sütlerde ABZSO, ABZSO₂, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ ve FBSO₂ için hesaplanan $EAA_{süt}/EAA_{plazma}$ oranları normal süt için 0.96, 0.95, 0.97, 0.92, 0.91 ve 0.89 iken mastitisli sütler için sırasıyla 1.28, 1.21, 0.98, 0.93, 0.97 ve 0.94 olarak hesaplandı. Mastitisli ve normal sütlerde ABZSO, ABZSO₂ için hesaplanan biyolojik yarılanma ömrü 24.01, 20.92, 17.49 ve 19.77 saattir. İsviçre Esmeri ırkı sığırlarda ABZSO, ABZSO₂, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ, FBZSO ve FBSO₂ için kan biyolojik yarılanma ömrü sırasıyla 10.55, 9.94, 24.11, 31.75, 14.68, 20.13 ve 16.75 saat olarak hesaplandı.

Anahtar Sözcükler: Sığır, mastitis, benzimidazol antelmintikler, farmakokinetik

7. SUMMARY

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Effects of mastitis on pharmacokinetics of elimination with milk of benzimidazole anthelmintics

Alper SEZGİN

Department of Pharmacology and Toxicology

DOKTORA TEZİ / KONYA - 2012

Benzimidazole anthelmintic drugs in order to investigate the effects of mastitis on milk behavior in this study; as a subclinical mastitis infection in one or two udder quarters and during early pregnancy are not identified (1.5 months) were used in 7 Brown Swiss cattle breed. The study used a method designed to cross. While animals with mastitis and after treatment, single oral dose albendazole, triclabendazole and fenbendazole 7.5 mg/kg, 10 mg/kg and 7.5 mg/kg doses were applied, respectively. Following drug application at 0., 8., 16., 24., 36., 48., 72. hours and 5 d milk and blood samples were collected. The collected samples were extracted by SPE (Solid Phase Extraction) and analysed by HPLC.

ABZ, ABZSO, ABZSO₂, TKBZ, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ, FBZSO and FBSO₂ of recovery studies on chromatograms observability limit (Limit of Detection, LOD) 1 µg/L (ppb); measurability limit (Limit of Quantification, LOQ) 5 µg/L (ppb) and recovery rates % 84, 89, 94, 97, 89, 94, 85 ve 90 determined respectively.

Mastitis caused by changes in the behavior of drugs in milk was determined only ABZ. AUC_{milk}/AUC_{plasma} rates, respectively calculated as 0.96, 0.95, 0.97, 0.92, 0.91 and 0.89 for ABZSO, ABZSO₂, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ and FBSO in normal milks, for mastitic milk was 1.28, 1.21, 0.98, 0.93, 0.97 and 0.94 calculated. Mastitic and normal milk, the milk biological half-life calculated for ABZSO ve ABZSO₂ 24.01, 20.92, 17.49 and 19.77 hours. The biological half-life of plasma to Brown Swiss cattle breed for ABZSO, ABZSO₂, TKBZSO, TKBZSO₂, FBZ and FBSO 10.55, 9.94, 24.11, 31.75, 14.68, 20.13 and 16.75 hours were calculated.

Key Words: Cow, mastitis, benzimidazole anthelmintics, pharmacokinetic.

8. KAYNAKLAR

1. Batzias GC, Delis GA. Reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma. *J. Chromatogr. B*, 2004; 805 (2): 267-274.
2. Batzias GC, Theodosiadou E, Delis GA. Quantitative determination of albendazole metabolites in sheep spermatozoa and seminal plasma by liquid chromatographic analysis with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 35 (5): 1191-1202.
3. Belloli C, Lai OR, Ormas P, Zizzadoro C, Sasso G, Crescenzo G. Pharmacokinetics and mamary elimination of imidocarb in sheep and goats. *J. Dairy Sci.*, 2006; 89: 2465-2472.
4. BGVV. EU Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs. Benzimidazoles in milk and plasma. 2002; Short description.
5. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Mastitis. In "Veterinary Medicine". 6th edition. 1983; s. 451- 500. Bailliére Tindall, London, England.
6. Brandon DL, Bates AH, Binder RG, Montague WC Jr, Whitehand LC, Barker SA. Analysis of fenbendazole residues in bovine milk by ELISA. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50 (21): 5791-5796.
7. Canavan A. Capacity building for veterinary drug residue monitoring programmes in developing countries. Technical workshop on residues of veterinary drugs without ADI/MRL. 24-26 August 2004, Bangkok, Thailand.
8. Capece BPS, Calsamiglia S, Castells G, Arboix M, Cristofol C. Effect of ruminal microflora on the biotransformation of netobimin, albendazole, albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide enantiomers in an artificial rumen. *J. Anim. Sci.*, 2001; 79: 1288-1294.
9. Capece BPS, Afonso SMS, Lazaro R, Harun M, Godoy C, Castells G, Cristofol C. Effect of age and gender in the pharmacokinetics of

- albendazole and albendazole sulphoxide enantiomers in goats. *Research in Veterinary Science*, 2009, 86: 498-502.
10. Cristofol C, Virkel G, Alvarez L, Sanchez S, Arboix M, Lanusse C. Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2001; 24 (2): 117-124.
 11. Constantinou S, Hadjigeorgiou M, Papachrysostomou C, Kanari PN. Multiresidue method for the detection of anthelmintics in samples of bovine milk by HPLC. Euroresidue IV. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. 8-10 May, 2000; Veldhoven, The Netherlands.
 12. De Liguoro M, Longo F, Brambilla G, Cinquina A, Boca A, Lucisano A. Distribution of the anthelmintic drug albendazole and its major metabolites in ovine milk and milk products after a single oral dose. *J. Dairy Res.*, 1996; 63 (4): 533-542.
 13. De Ruyck H, Van Renterghem R, De Ridder H, De Brabander D. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. *Food Control*, 2000; 11: 165-173.
 14. De Ruyck H, Daeseleire E, De Ridder H, Van Renterghem R. Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. *J. of Chromatography A*, 2002; 976: 181-194.
 15. Edwards G, Breckenridge AM. Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 1988; 15: 67-93.
 16. EMEAa. Albendazole (Extrapolation to all ruminants). Summary Report (3). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. 2004; EMEA/MRL/865/03-FINAL.
 17. EMEAb. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Fenbendazole (extrapolation to all ruminants). 2004; Summary Report (4).
 18. EMEA. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use.

- Triclabendazole (Modification of Maximum Residue Limits). 2006; Summary Report (4).
19. Fleishaker JC. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003; 55: 643-652.
 20. Fletouris DJ, Botsoglou N, Psomas IE, Mantis A. Rapid quantitative screening assay of trace benzimidazole residues in milk liquid chromatography. *J. AOAC Int*, 1996; 79 (6): 1281-1287.
 21. Fletouris DJ, Papapanagiotou EP, Nakos DS, Psomas IE. Highly sensitive ion pair liquid chromatographic determination of albendazole marker residue in animal tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53 (4): 893-898.
 22. Gehring R, Smith GW. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29, 237-241.
 23. Gips M, Soback S. Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1999; 29, 237-241.
 24. Goudah A. Aspects of pharmacokinetics of albendazole sulphoxide in sheep. *Vet. Res. Commun.* 2003 ; 27 (7): 555-566.
 25. Gökbulut C, Karademir U, Boyacıoğlu M, Akar F. The effect of diet type on the plasma disposition of triklobendazole in goats. *Research in Veterinary Science* 2007; 82, 388-391.
 26. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 50: 245-259.
 27. Hennessy DR. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. *Acta Tropica*, 1994, 56, 125-141.
 28. Holford NHG, Rosenthal PJ, Goldsmith RS. Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Rational dosing & the time course of drug action. In "Basic & Clinical Pharmacology". 9th edition. 2004; Ed. Bertram G. Katzung. McGraw Hill Comp. 34-50.
 29. Imperiale F, Ortiz P, Cabrera M, Farias C, Sallovitz JM, Iezzi S, Perez J, Alvarez L, Lanusse C. Residual concentrations of the flukicidal

- compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2011; 28 (4): 438-445.
30. In HY, Kwon BP, Hwan KP, Hwan JL, Hwan YH, Chun SP, Hee SJ, Hyong JC. Metabolism and pharmacokinetics of albendazole in Korean native cattle. *J. Vet. Clin.* 2001; 18 (3): 195-200.
 31. Ito S, Lee A. Drug excretion into breast milk- overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003; 55: 617-627.
 32. Juskiewicz TS. Determination of fenbendazole in milk by HPLC: Comparison of matrix solid phase dispersion (MSPD) and solvent extraction with SPE clean-up procedure. *Euroresidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food.* 6-8 May, 1996; Veldhoven, The Netherlands.
 33. Karasova G, Brandšteterova E, Lachova M. Matrix solid phase dispersion as an effective preparation method for food samples and plants before HPLC analysis. (Review). *Czech J. Food Sci.*, 2003; 21 (6): 219-234.
 34. Kaya S. Antelmintikler. Alınmıştır "Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 2., Ed. S. Kaya, İ. Pirinçci, A. Bilgili". 2000; 434-450. *Medisan Yayın Serisi 42*, Ankara.
 35. Kietzmann M, Braun M, Schneider M, Pankow R. Tissue distribution of marbofloxacin after systemic administration into the isolated perfused bovine udder. *The Veterinary Journal* 2008; 178: 115-118.
 36. Knox MR, Steel JW. Effects of diet and species on the pharmacokinetics of fenbendazole in cattle. *Veterinary Research Communications*, 1997; 21: 37-43.
 37. Lanusse CE, Prichard RK. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metab. Rev.* 1993; 25 (3): 235-279.
 38. Larsen LA, Ito S, Koren G. Prediction of milk/plasma concentration ratio of drugs. *Ann. Pharmacother.*, 2003; 37 (9): 1299-1306.
 39. Lee KG. Lactation and drugs. (occasional review). *Pediatrics and Child Health*, 2007; 17 (2): 68-71.

40. Lucas MF, Errecalde JO, Mestorino N. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 2009; 33, 132-14.
41. Lützw M. Residues of veterinary drugs without ADI/MRL: What Codex and WTO rules apply? Technical workshop on residues of veterinary drugs without ADI/MRL. 24-26 August 2004, Bangkok, Thailand.
42. Marin P, Carceles CM, Escudero E, Varon EF. Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats. (Short communication). The Canadian Journal of Veterinary Research, 2007; 71: 74-76.
43. Martin PJ, Chambers M, Hennessy DR. Efficacy against *Fasciola hepatica* and the pharmacokinetics of triclabendazole administered by oral and topical routes. Australian Veterinary Journal, 2009; 87 (5): 200-203.
44. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, Pulido MM, Molina AJ, Alvarez AI, Schinkel AH. Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (Bcrp/ABCG2) (short communication) Drug Met. Disp. 2005; 33 (5): 614-618.
45. Mestorino N, Formentini EA, Lucas MF, Fernandez C, Modamio P, Marino Hernandez E, Errecalde JO. Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulfoxide. Veterinary Research Communications, 2008; 32: 21-33.
46. Mirfazaelian A, Dadashzadeh S, Rouini MR. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of albendazole metabolites in human serum. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002; 30 (4): 1249-1254.
47. Moreno L, Imperiale F, Mottier L, Alvarez L, Lanusse C. Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. Analytica Chimica Acta. 2005; 536: 91-99.
48. Muenster U, Grieshop B, Ickenroth K, Gnoth MJ. Characterization of substrates and inhibitors for the in vitro assessment of Bcrp mediated drug-drug interactions. Pharm. Res. 2008; 25 (10): 2320-2326.

49. Oukessou M, Chkounda S. Effect of diet variations on the kinetic disposition of oxfendazole in sheep. *Int. J. Veterinary Paras.*, 1997; 27 (11): 1347-1351.
50. Paige JC, Tollefson L, Miller M. Public health impact on drug residues in animal tissues (scientific reviews). *Vet. Human Toxicol.* 1997; 39 (3): 162-169.
51. Piscopo SE, Farin CE, Bai SA. Determination of concentration of albendazole sulfoxide in plasma and uterine fluid of heifers. *Am. J. Vet. Res.* 1997; 58 (1): 62-65.
52. Poller B, Drewe J, Krahenbuhl S, Huwyler J, Gutmann H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol. Neurobiol.* 2010; 30: 63-70.
53. Rantala M, Kaartinen I, Valimaki E, Stryman M, Hiekkaranta M, Niemi A, Saari I, Pyörala S. Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2002; 25: 251-258.
54. Redondo PA, Alvarez AI, Garcia JL, Larrode OM, Merino G, Prieto JG. Presystemic metabolism of albendazole: Experimental evidence of an efflux process of albendazole sulfoxide to intestinal lumen. *Drug Met. Disp.* 1999; 27 (6): 736-740.
55. Rigter IM, Schipper HG, Koopmans RP, van Kan HJM, Frijlink HW, Kager PA, Guchelaar HJ. Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: A randomized crossover study with healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (3): 1051-1054.
56. Roberson EL. Antinematodal drugs. In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed. 1988; Ed. Nicolas H. Booth, Leslie E. McDonald". Iowa State University Pres. 887-895.
57. Rosenthal PJ, Goldsmith RS. Clinic pharmacology of the anthelmintic drugs. In "Basic & Clinical Pharmacology". 9th edition. 2004; Ed. Bertram G. Katzung. McGraw Hill Comp. 886-888.

58. Sanchez S, Alvarez L, Sallovitz J, Lanusse C. Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2000; 23 (4): 193-201.
59. Sanyal PK. Disposition kinetics of albendazole in buffalo and cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1997; 20: 240-242.
60. Sanyal PK, Gupta SC. Pharmacokinetics and efficacy of long-term low levels administration of triclabendazole in urea malasses blocks against induced bovine and bubaline fasciolosis. *Veterinary Parasitology* 1998; 76, 57-64.
61. Schneider M, Vallé M, Woehrlé F, Boisramé B. Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J. Dairy Sci.*, 2004; 87: 202-211.
62. Sérieys F, Raguet Y, Goby L, Schmidt H, Fritton G. Comparative efficiency of local and systemic antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2005; 88: 93-99.
63. Serratos J, Blass A, Rigau B, Mongrell B, Rigau T, Tortadés M, Tolosa E, Aguilar C, Ribo O, Balagué J. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food producing animals: a European Union perspective. *Rev. Sci. Tec. OIE*, 2006; 25 (2): 637-653.
64. Sezgin A, Ünal HH, Kabil E, Saraç B, Okutan B. Çiğ sütte benzimidazol grubu antelmantik ilaç kalıntılarının yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ile analizi. *Pendik Vet. Mik. Derg.* 2005; 36 (1-2): 53-59.
65. Spasov AA, Smirnova LA, Iezhitsa IN, Sergeeva SA, Ozerov AA. Pharmacokinetics of benzimidazole derivatives. *Vopr. Med. Khim.* 2000; 48 (3): 233-258.
66. Su SC, Chang CL, Chang PC, Chou SS. Simultaneous determination of albendazole, thiabendazole, mebendazole and their metabolites in livestock by high-performance liquid chromatography. *J. of Food and Drug Analysis.* 2003; 11 (4):307-319.

67. Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Miyazaki T, Oka H, Itoh Y, Nakazawa H. Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. A*, 2000, 882, 99-107.
68. Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Jimbo K, Oka H, Ito Y, Nakazawa H. Determination of benzimidazole anthelmintics in livestock foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2003; 44 (5): 246-252.
69. The Merck Veterinary Manual. The Merck Veterinary Manual 9th edition. In "Pharmacology: Disposition and Fate of Drugs: Distribution of Drugs." 2005; Ed. Cynthia M. Kahn, B.A. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA
70. Titus A, Msagati M, Nindi MM. Determination of benzimidazole anthelmintic compounds by supported liquid membrane extraction and liquid chromatography. *J. of Separation Sci.*, 2001; 24 (7): 606-614.
71. Traş B, Elmas M. Klinik Farmakokinetik. İlaç Farmakokinetiğini Etkileyen Faktörler. 2005; S.Ü. Basımevi, Konya.
72. Traş B, Üney K, Çetin G. Veteriner farmakoloji ve terapötiklerin geleceği için öngörüler. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 2011; 3: 8-13.
73. Türk Gıda Kodeksi. Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaç Kalıntıları. Maksimum Kalıntı Limitleri. 2005; Tebliğ no: 2002/30.
74. Van Den Bossche H, Rochette F, Hörig C. Mebendazole and related anthelmintics. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, 1982; 19:67-128.
75. Velik J, Baliharova V, Skalova L, Szotakova B, Wsol V, Lamka J. Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. *J. Vet. Pharmacol. Ter.* 2005; 28 (4): 377-384.
76. Virkel G, Lifschitz A, Pis A, Lanusse C. In vitro ruminal biotransformation of benzimidazole sulphoxide anthelmintics: enantioselective sulphoreduction in sheep and cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ter.* 2002; 25 (1): 15-23.

77. Virkel G, Lifschitz A, Sallovitz J, Pis A, Lanusse C. Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug Met. Disp.* 2004; 32: 536-544.
78. Zhao C, Zhang H, Zhang X, Zhang R, Luan F, Liu M, Hu Z, Fan B. Prediction of milk/plasma drug concentration (M/P) ratio using support vector machine (SVM) method. *Pharmaceutical Research.* 2006; 23 (1): 41- 48.

9. EKLER

Ek-A

T.C.
TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI
Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
34890 Pendik-İSTANBUL



Sayı: 100

Konu: Etik Kurul Kararı /4

28.07.2008

ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ' ne

S. Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji ABD.da yürüttüğüm "Mastitisin benzimidazol anthelmintiklerin sütle atılım farmakokinetiği üzerindeki etkisi" adlı doktora çalışmamın Etik Kurulu İlkelerine uygun olduğuna dair karar için;

Gereğini bilgilerinize saygıyla arz ederim.

Alper SEZGİN

Başkan
Dr. Muhammet AKSİN
(Enstitü Müdürü)

Başkan Yardımcısı
Yusuf ENGİNAR
(Müdür yrd.)

Raporör Üye
Doç. Dr. Gülay VURAL
(Veteriner Hekim)

Üye
Doğan YARDİBİ
(Veteriner Hekim)

Üye
Güliz ÇELİK
(Veteriner Hekim)

Tel.: Santral (0216) 390 12 80 / 4 Hat Müdüriyet.: (0216) 390 06 00 / 3 Hat Telefax : (0216) 354 76 92 - (0216) 354 02 49
http://pendik.vet.gov.tr

68

10. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Erzincan ilinin Tercan ilçesinde doğdum. İlk ve ortaokulu Tercan, lise öğrenimimi ise Erzincan Laborant Meslek Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde göreve başladım. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. Halen Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Farmakoloji Laboratuvarı'nda veteriner hekim olarak çalışmaktayım.