

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EMPAGLİFLOZİN VE METFORMİN DÜZEYLERİNİN SIVI  
KROMATOĞRAFI KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE  
TAYİNİ**

**MENEKŞE KUZU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. SEDAT ABUŞOĞLU**

**KONYA-2022**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EMPAGLİFLOZİN VE METFORMİN DÜZEYLERİNİN SIVI  
KROMATOĞRAFİ KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE  
TAYİNİ**

**MENEKŞE KUZU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. SEDAT ABUŞOĞLU**

*“Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri-21202012”*

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202012 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2022**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitim sürecim boyunca ilminden faydalandığım, olumlu tavrıyla beni cesaretlendiren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, yol göstericiliği ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörüden dolayı, tez danışmanım Doç. Dr. Sedat Abuşoğlu hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek olan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali Ünlü hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Prof. Dr. Hüsamettin Vatansev, Prof. Dr. Fatma Hümeysra Yerlikaya Aydemir, Prof. Dr. Abdullah Sivrikaya, Prof. Dr. Bahadır Öztürk, Prof. Dr. Esmâ Menevşe, Doç. Dr. Ramazan Kocabaş, Doç. Dr. Fikret Akyürek'e eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük bir keyif aldığım, azmini ve çalışkanlığını örnek aldığım, tecrübelerini ve bilgilerini her daim benimle paylaşan, sabrıyla ve desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili Arş. Gör. Duygu Eryavuz Onmaz'a ve tez çalışmamda hiçbir yardımı ve bilgisini esirgemeyen Oğuzhan Tok'a teşekkür ederim.

Her zaman her durumda yanımda olan, bana her türlü desteği sağlayan sevgili annem Hatice Kuzu, sevgili babam Şahabettin Kuzu, canım kardeşim Zafer Kuzu'ya teşekkür ederim.

Arkadaşlıkları ve tez çalışmam dahil her konudaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Sara Çıbık ve Firdevs Sak, Mohammed Bik, Karam Mazin Kamil Gharab ve Uzm. Dr. Süeda Uçar'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. ANTİDİYABETİK İLAÇLAR.....	1
1.2. BİGUANİDLER ve METFORMİN.....	2
1.2.1. Metforminin Tarihçesi.....	2
1.2.2. Metforminin Fizikokimyasal Özellikleri.....	3
1.2.3. Metforminin Farmakokinetiği.....	3
1.2.4. Metforminin Etki Mekanizması.....	4
1.2.5. Metforminin Yan Etkileri ve Toksisitesi.....	6
1.3. SGLT-2 İNHİBİTÖRLERİ ve EMPAGLİFLOZİN.....	7
1.3.1. Empagliflozinin Tarihçesi.....	7
1.3.2. Empagliflozinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	8
1.3.3. Empagliflozinin Farmakokinetiği.....	9
1.3.4. Empagliflozinin Etki Mekanizması.....	9
1.3.5. Empagliflozinin Yan Etkileri ve Toksisitesi.....	11
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	13
2.1. YÖNTEM.....	13
2.1.1. İstatiksel analiz.....	13
2.1.2. Validasyon çalışmaları.....	13
2.2. KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER.....	15
2.2.1. Cihazlar.....	15
2.2.2. Kimyasallar.....	15

2.3.	METOT OPTİMİZASYONU .....	16
2.3.1.	LC-MS/MS Parametreleri .....	16
2.3.2.	Akış Gradienti .....	17
2.3.3.	Çalışma Prosedürü .....	17
2.3.4.	Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	17
2.4.	METOT VALİDASYONU .....	18
2.4.1.	Linearite .....	18
2.4.2.	Analitik Ölçüm Limitleri (LOD ve LOQ).....	19
2.4.3.	Tekrarlanabilirlik .....	19
2.4.4.	Geri Kazanım .....	20
2.4.5.	Matriks Etkisi .....	20
2.4.6.	Taşıma .....	21
2.4.7.	Stabilite .....	22
2.4.8.	Klinik Örneklerle Uygulama.....	22
3.	BULGULAR.....	23
3.1.	LİNEARİTE.....	23
3.2.	LOD ve LOQ .....	25
3.3.	TEKRARLANABİLİRLİK .....	27
3.4.	MATRİKS ETKİSİ .....	30
3.5.	GERİ KAZANIM .....	30
3.6.	TAŞIMA .....	31
3.7.	STABİLİTE .....	32
3.8.	KLİNİK ÖRNEKLERE UYGULAMA.....	35
4.	TARTIŞMA .....	38
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
6.	KAYNAKLAR .....	45
7.	EKLER.....	48
	EK-A: Etik Kurul Raporu.....	48

8. TURNİTİN RAPORU .....	50
9. ÖZGEÇMİŞ .....	52



## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

ACC: Asetil CoA Karboksilaz

AMPK: Adenozin monofosfat aktive edici protein kinaz

cAMP: siklik AMP

DPP-4: Dipeptidil peptidaz-4

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

FDA: U.S. Food and Drug Administration

GLP-1: Glukagon benzeri peptit-1

GLUT: Glukoz taşıyıcılar

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

MATE: Çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon

NHE: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiştirici

OCT: Organik katyon taşıyıcı

SGLT: Sodyum glukoz taşıyıcı proteinler

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

TIAFT: Uluslararası Adli Toksikologlar Birlięi

RP-UPLC: Ters Faz Ultra Saf Sıvı Kromatografisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Guanidin ve Metformin Kimyasal Yapısı.....	3
Şekil 2. Metforminin Absorpsiyon ve Eliminasyon Mekanizması (Florez JC, 2017. The pharmacogenetics of metformin. Diabetologia:60(9):1648-1655.) .....	5
Şekil 3. Metforminin Etki Mekanizması (Kaynak: Pernicova, I., Korbonits, M, 2014. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol 10, 143–156.) .....	6
Şekil 4. Florizin ve Empagliflozin Kimyasal Yapısı .....	8
Şekil 5. Empagliflozin etki mekanizması (Kaynak: <a href="https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/sglt-2_inhibitors">https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/sglt-2_inhibitors</a> ) .....	11
Şekil 6. Akış Gradient Eğrisi .....	17
Şekil 7. Empagliflozine ait kalibrasyon grafiği .....	24
Şekil 8. Metformine ait kalibrasyon grafiği .....	24
Şekil 9. Empagliflozin ve metformine ait örnek pik kromatogram görüntüsü.....	25
Şekil 10. Empagliflozin LOD değeri .....	25
Şekil 11. Metformin LOD değeri.....	26
Şekil 12. Empagliflozin LOQ değeri .....	26
Şekil 13. Metformin LOQ değeri.....	27
Şekil 14. Metformin Taşıma Çalışması Analizi.....	31
Şekil 15. Empagliflozin Taşıma Analizi Sonuçları.....	32



## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. LC-MS/MS Parametreleri.....	16
Tablo 2. Analitler ve internal standarta ait cihaz verileri.....	16
Tablo 3. Empagliflozin ve Metformin Linearite Çalışması Sonuçları .....	23
Tablo 4. Empagliflozin ve Metformin Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik Çalışmaları .....	28
Tablo 5. Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçlarının CLIA'ya Göre Değerlendirilmesi .....	29
Tablo 6. Empagliflozin ve Metformin Matriks Etkisi Çalışması Analizleri .....	30
Tablo 7. Empagliflozin ve Metformin Geri Kazanım Çalışması .....	30
Tablo 8. Empagliflozin ve Metformin Stabilite Çalışmaları.....	33
Tablo 9. Empagliflozin ve Metformin Stabilite BIAS Değerleri.....	34
Tablo 10. Empagliflozin Kullanan Hastalarda İlaç Düzeyi Sonuçları .....	36
Tablo 11. Metformin Kullanan Hastalarda İlaç Düzeyi Sonuçları.....	37

## ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### EMPAGLİFLOZİN VE METFORMİN DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFI KÜTLE SPEKTROMETRI YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

MENEKŞE KUZU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

#### YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2022

Son yıllarda prevalansı dünya çapında artan Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) hastalığının tedavisi için piyasada monoterapi veya kombinasyon halinde kullanılabilen ilaçlar bulunmaktadır. Metformin ve empagliflozin Tip II Diyabet tedavisinde kullanılan antihiperglisemik ilaçlardır. Farklı organlarda farklı etkiler yaparak kan glukoz seviyesini düşürme hedefli etkiler yaparlar. Metforminin antihiperglisemik etkisi esas olarak hepatik glikoz çıkışının inhibisyonundan kaynaklandığından ve hepatositlerdeki metformin konsantrasyonu kandan çok daha yüksek olduğundan, karaciğerin metformin fonksiyonunun birincil bölgesi olduğu varsayılır. Empagliflozin, böbreklerdeki proksimal tübüllerde bulunan sodyum-glukoz ko-transporter-2'yi (SGLT-2) inhibe ederek çalışır. SGLT-2 inhibisyonu yoluyla empagliflozin, glukozun renal reabsorbsiyonunu azaltır ve idrarda glikoz atılımını artırır. İlacın glikoz düşürücü etkisi insülin bağımsızdır.

Empagliflozin ve metformin tayini; dozajı optimize etmeye, toksisite riskini en aza indirmeye ve olası ilaç-ilaç etkileşimlerini araştırmaya yardımcı olabilir. Klinikte ilaç düzeyi ölçümünde hassasiyet önemli bir kriter olduğundan geliştirdiğimiz yöntemin spesifitesi ve sensitivitesinin yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) cihazı ile yeni, multipleks, hızlı bir ölçüm metodu geliştirdik.

Metot validasyon çalışmamızda empagliflozin ve metformin için lineer aralıklar sırasıyla 5000-4.8 ve 10000-4.8 ng/mL ve korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) sırasıyla 1-0,975  $\mu\text{g/l}$  aralığında 0.999 ve 0.997 olarak hesaplanmıştır. Empagliflozin ve metformin için LC-MS/MS'de sinyal/gürültü oranına göre belirlenmiş olan LOD değeri sırasıyla 3.8 ve 2.5 ng/mL, LOQ değeri ise sırasıyla 9.5 ve 10.5 ng/mL'dir. Çalışmamız hızlı, ekonomik, doğru, multipleks bir çalışma olması yönüyle özgün olup literatüre bu açıdan katkı sağlamaktadır. Çalışmamız amacımız doğrultusunda seçici, duyarlı ve doğru bir sonuç vermiş olup elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan yöntem klinik uygulamaya konmaya açıktır.

**Anahtar Kelimeler:** Antidiyabetik; Empagliflozin; LC-MS/MS; Metformin; SGLT-2.

## **ABSTRACT**

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

### **DETERMINATION OF EMPAGLIFLOZIN AND METFORMIN LEVELS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY METHOD**

**MENEKŞE KUZU**

**Department of Medical Biochemistry**

**MASTER'S THESIS /KONYA-2022**

There are drugs on the market that can be used as monotherapy or in combination for the treatment of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), the prevalence of which has increased worldwide in recent years. Metformin and empagliflozin are antihyperglycemic drugs used in the treatment of Type II Diabetes. By making different effects in different organs, they have targeted effects on lowering blood glucose levels. Since the antihyperglycemic effect of metformin is mainly due to inhibition of hepatic glucose output, and the concentration of metformin in hepatocytes is much higher than in blood, the liver is assumed to be the primary site of metformin function. Empagliflozin works by inhibiting the sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) found in the proximal tubules of the kidneys. Through SGLT-2 inhibition, empagliflozin reduces renal reabsorption of glucose and increases glucose excretion in the urine. The glucose-lowering effect of the drug is independent of insulin.

Determination of empagliflozin and metformin; can help optimize dosage, minimize the risk of toxicity, and investigate possible drug-drug interactions. Since sensitivity is an important criterion in the measurement of drug levels in the clinic, the specificity and sensitivity of the method we developed should be high. In this study, we developed a new, multiplex, rapid measurement method with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS).

In our method validation study, linear ranges for empagliflozin and metformin were calculated as 5000-4.8 and 10000-4.8 ng/mL, respectively, and the correlation coefficient ( $r^2$ ) was calculated as 0.999 and 0.997 in the range of 1-0.975  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The LOD value determined according to the signal/noise ratio in LC-MS/MS is 3.8 and 2.5 ng/mL, respectively, and the LOQ value is 9.5 and 10.5 ng/mL, respectively. Our study is unique in that it is a fast, economical, accurate, multiplex study and contributes to the literature in this respect. Our study gave a selective, sensitive and accurate result in line with our purpose, and the method created in line with the data obtained is open to clinical practice.

**Keywords:** Antidiabetic; Empagliflozin; LC-MS/MS; Metformin; SGLT-2

# 1. GİRİŞ

## 1.1. ANTİDİYABETİK İLAÇLAR

Diabetes mellitus (DM), kalıcı hiperglisemi ile karakterize kronik bir metabolik bozukluktur. Bozulmuş insülin sekresyonuna, insülinin periferik etkilerine direnç veya her ikisine bağlı olabilir. DM'li hastalardaki diğer metabolik anormallikler ile sinerji içinde olan kronik hiperglisemi, çeşitli organ sistemlerinde hasara neden olarak, en belirginleri mikrovasküler (retinopati, nefropati ve nöropati) olan ve yaşamı tehdit eden sağlık komplikasyonlarının gelişmesine yol açabilir. DM genel olarak etiyoloji ve klinik prezentasyona göre Tip I Diyabet, Tip 2 Diyabet ve Gestasyonel Diyabet olmak üzere üç tipte sınıflandırılır.

Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. T2DM'de insüline yanıt azalır ve bu insülin direnci olarak tanımlanır. Bu durum sırasında insülin etkisizdir ve başlangıçta glukoz homeostazını sürdürmek için insülin üretimindeki bir artışla karşılanır, ancak zamanla insülin üretimi düşer ve T2DM ile sonuçlanır. T2DM ile en çok 45 yaşın üstündeki yetişkinlerde karşılaşılsa da artan obezite, fiziksel hareketsizlik ve kalori açısından yoğun diyetler nedeniyle çocuklarda, ergenlerde ve genç erişkinlerde giderek daha fazla görülmektedir (Goyal ve Jialal, 2021).

Özellikle T2DM için tedavinin temel taşı diyet ve egzersiz olarak kabul edilmektedir. Obez olan T2DM hastalarında ana hedef kilo kaybıdır. Doymuş yağ oranı, rafine karbonhidratlar, yüksek fruktozlu mısır şurubu açısından düşük ve ayrıca lif ve tekli doymamış yağlar bakımından yüksek bir diyet teşvik edilmelidir. Kilo kaybı ve belirlenen glisemi hedefi sağlanamıyorsa ilaç tedavisi önerilmektedir.

Son yıllarda prevalansı dünya çapında artan T2DM hastalığının tedavisi için piyasada monoterapi veya kombinasyon halinde kullanılabilen ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçların bileşikleri ve etki mekanizmaları farklıdır. Antidiyabetik ilaçlar, insülin sekresyonunu veya insüline duyarlılığı artırma gibi etki mekanizmaları ile glukoz metabolizmasını kontrol ederek kan glukoz düzeylerini düşürmeyi amaçlamaktadır. Bu etki mekanizmaları ise yaş, cinsiyet gibi demografik faktörlerin yanında doza bağlı olarak da değişebilmektedir.

Antidiyabetik ilaçlar etki mekanizmalarına göre insülin salgılatıcı ilaçlar (sekretagoglar), insüline duyarlılaştırıcı ilaçlar (sensitizerler), glukozun emilimini yavaşlatan ilaçlar ve inkretin mimetik ilaçlar olarak veya insülin etkilerine göre insülinotropik ve insülinotropik olmayan ilaçlar olarak sınıflandırılabilir. İnsülinotropik ilaçlar meglinitidler, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri, sülfonilüreler ve glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) agonistleri olarak; insülinotropik olmayan ilaçlar ise biguanidler, sodyum glukoz ko-transporter-2 (SGLT-2) inhibitörleri, alfa-glukozidaz inhibitörleri, tiazolidindionlar, amilin analogları olarak alt gruplara ayrılabilir {Meneses, 2015 #1}.

## **1.2. BİGUANİDLER ve METFORMİN**

Biguanidler, özellikle metformin, T2DM için birinci basamak tedavide yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Hipoglisemik etkisini hepatik glukoz üretimini glukoneogenez ve glikojenolizi baskılama yoluyla periferik glukoz alımını azaltarak yapmaktadır (Yaribeygi, 2019).

### **1.2.1. Metforminin Tarihçesi**

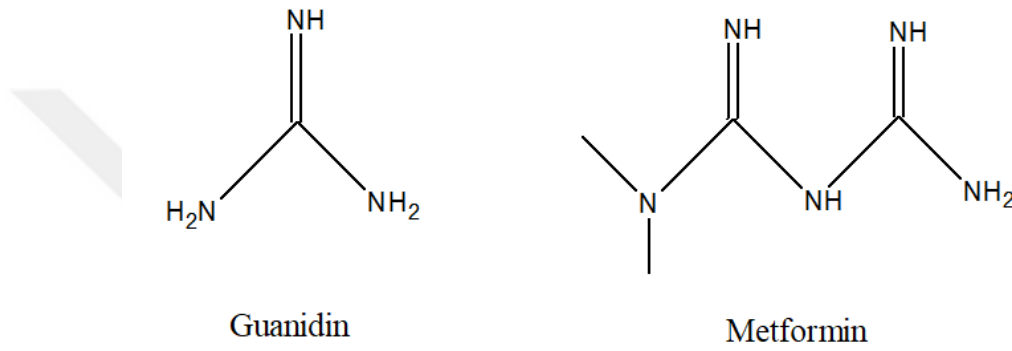
Metformin (dimetil biguanid) farmakolojik olarak, antidiyabet ilaçlarının biguanid sınıfına aittir. Biguanidlerin tarihi, Ortaçağ Avrupasında diyabet tedavisi için *Galega officinalis*'in (keçi otu) kullanımına uzanmaktadır. *Galega*'nın aktif bileşeni olan guanidin, biguanidleri sentezlemek için kullanılan ana bileşiktir.

Metformin, 1957'de Fransız doktor Jean Sterne tarafından diyabet tedavisi için duyurulan üç ana biguanid arasında yer almıştır. Diğer iki biguanid fenformin ve buformin, laktik asidoz riski ve artan kardiyak mortalite nedeniyle 1970'lerin başında geri çekilmiştir. Aynı ilaç sınıfından 2 ilacın geri çekilmesinin ardından metforminin kullanımı bir süre insanları kuşkuda bırakmıştır. Metforminin insülin direncine karşı koyma, kilo artışı veya hipoglisemi riski olmaksızın erişkin başlangıçlı hiperglisemiyi kontrol edebilmesi Avrupa'da yavaş yavaş güven kazanmış ve yoğun incelemelerden sonra metformin 1995'te ABD'ye tanıtılmıştır. 1998'de Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması tarafından metforminin başlangıç tedavisi olarak kullanılması önerilmiştir. Diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmasından 65 yıl sonra bugün, metformin, daha fazla terapötik uygulama potansiyeli ile dünya çapında en çok reçete edilen hipoglisemik ilaç haline gelmiştir (Clifford, 2017; Ruisheng, 2016).

### 1.2.2. Metforminin Fizikokimyasal Özellikleri

Metformin, acı bir tada sahip beyaz, higroskopik kristal bir tozudur. Molekül formülü  $C_4H_{11}N_5$  ve IUPAC adlandırması 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidin olan metforminin moleküler ağırlığı 129.16 g/mol'dür. Erime noktası 223-226°C'dir.

Metforminin ilaçlardaki formu olan Metformin Hidroklorürün molekül formülü  $C_4H_{12}ClN_5$ , moleküler ağırlığı 165.6246 g/mol, pKa: 12.4'tür. Metformin Hidroklorür suda serbestçe çözünürken alkolde az çözünür. Eter, kloroform, metilen klorür ve asetonda çözünmez (PUBCHEM).



Şekil 1. Guanidin ve Metformin Kimyasal Yapısı

Metformin etken maddesi içeren ilaçlar ticari olarak; DIABEST, DIAFORMIN, GLIFOR, GLINEXT, GLUCOPHAGE, GLUFORCE, GLUFORMIN, GLUKOFEN, INSUFOR, MATOFIN, MEFODAY, METFORIX, METFULL, METODEL, METVEL olarak bulunmaktadır. Film tablet, efervesan tablet, uzatılmış salımlı tablet ve süspansiyon şeklinde kullanımları vardır.

### 1.2.3. Metforminin Farmakokinetiği

Memelilerde metforminin oral emilimi 6 saat içinde gerçekleşir, yarılanma ömrü yaklaşık 5 saattir ve biyoyararlanımı yaklaşık %50-60 düzeyindedir. Metformin duodenum ve jejunumdan emilir, dolaşımında plazma proteinlerine bağlanmaz ve daha sonra karaciğere iletilir. Metformin metabolize edilmez dolayısıyla vücuttaki dolaşımı boyunca yapısı değişmez, idrarla da değişmeden atılır. İlaçla eş zamanlı gıda alımı, metformin emilimini hafifçe bozabilir (Ruisheng, 2016).

Metforminin antihiperglisemik etkisi esas olarak hepatik glukoz çıkışının inhibisyonundan kaynaklandığından ve hepatositlerdeki metformin konsantrasyonu kandakinden çok daha yüksek olduğundan, karaciğerin bu nedenle metformin

fonksiyonunun birincil bölgesi olduğu varsayılır. 500 ile 1000 mg'lık bir oral dozdan 1-2 saat sonra plazma konsantrasyonları ortalama 10-40 µmol/L (165-660 ng/mL) düzeyinde ve maksimum 2 µg/mL (2000 ng/mL)'ye kadardır, karaciğerdeki konsantrasyonu ise portal vendekinden (ortalama 40-70 µmol/L veya 660-1155 ng/mL) 3 ile 5 kat daha yüksektir. Terapötik seviyeler 0,5 ile 2 mg/L (açlık durumunda 0,5-1 mg/L ve yemeklerden sonra 1-2 mg/L) arasında olabilir (Jagia, 2011).

#### **1.2.4. Metforminin Etki Mekanizması**

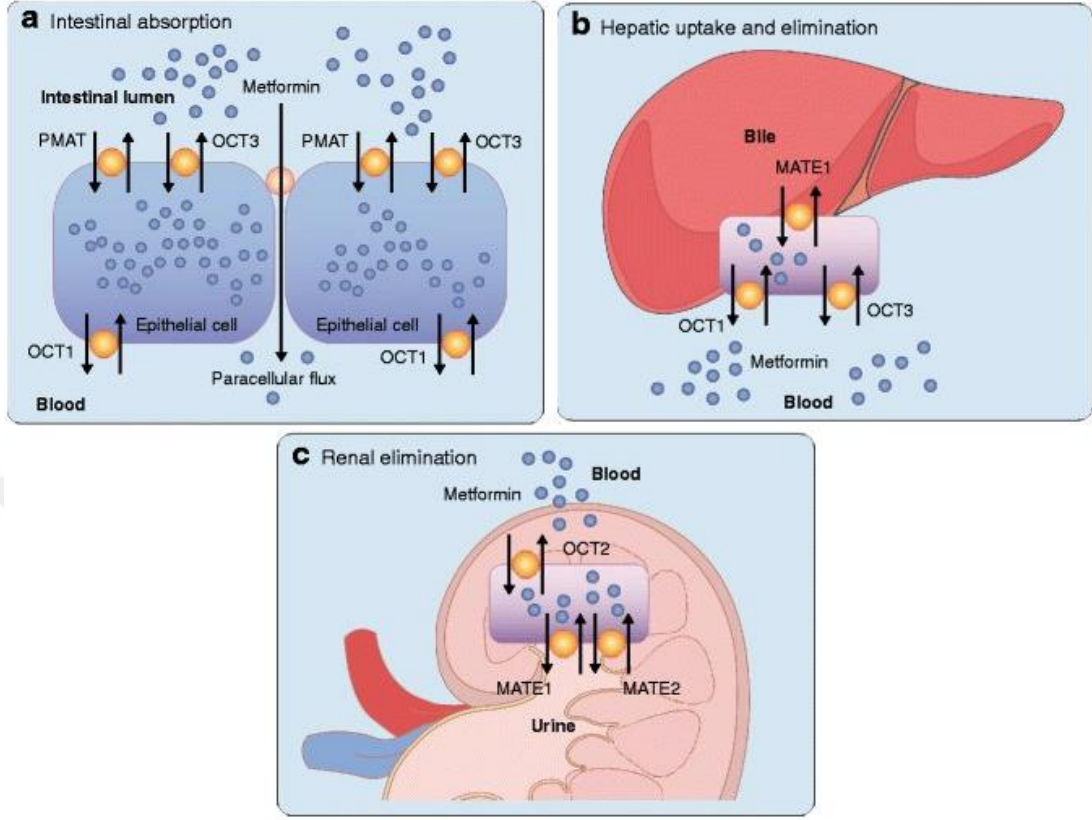
Metformin 50 yılı aşkın süredir T2DM hastalarına yaygın olarak reçete edilmesine ve hem monoterapi olarak hem de sülfonilüreler, a-glukozidaz inhibitörleri, insülin, tiazolidindionlar, DPP-4 inhibitörleri ve ayrıca GLP-1 agonistleri dahil olmak üzere diğer antidiyabetik ajanlarla kombinasyon halinde güvenli ve etkili olduğunun bulunmasına rağmen, metforminin etki mekanizması net olarak açıklanamamış olup hala karmaşıklığını sürdürmektedir ve bu konudaki tartışmalar devam etmektedir.

Organik katyon taşıyıcılar (OCT'ler), geniş bir endojen substrat yelpazesinin alınmasından ve hücre içi inaktivasyonundan ve ksenobiyotikler ile kemoterapötiklerin detoksifikasyonundan sorumludur. Metforminin taşınmasında üç organik katyon taşıyıcı rapor edilmiştir: OCT1, OCT2 ve OCT3. İnsanlarda, OCT1 esas olarak karaciğerde eksprese edilir ve metforminin hepatik alımında rol oynar. Son çalışma, OCT1'in çıkarılmasının, metforminin adenosin monofosfat aktive edici protein kinazı (AMPK) fosforilasyonu ve glukoneogenez üzerindeki etkilerinde bir azalma ile sonuçlandığını göstermiştir (Dresser, 2001). OCT2 böbrekte işlev görür ve metforminin renal epitelyal hücrelere alınması ile ilişkilidir. OCT3, iskelet kası, kalp, beyin ve plasenta dahil olmak üzere birçok dokuda yaygın olarak dağılmıştır (Wu, 2018).

Plazma monoamin taşıyıcıları (PMAT), OCT1 ile birlikte metforminin bağırsak absorpsiyonundan sorumludur. PMAT, enterositlerin apikal (lümen) membranında eksprese edilir (Dawed, 2019).

Metformin salgılanması birbirini takip eden iki aşamada gerçekleşir: Birincisi, organik katyon taşıyıcısı, OCT2 aracılığıyla kandan renal tübül hücresine, ardından ikinci adım ve idrara son atılımı, çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon (MATE) ailesindeki 2 taşıyıcı aracılığıyla gerçekleşir: MATE1 ve MATE2-K. Metforminin biliyer atılımı,

insanda önemsiz olmasına rağmen, hepatositlerin kanaliküler membranında bulunan MATE1 aracılığıyla gerçekleşir (Mostafa-Hedeab, 2018).

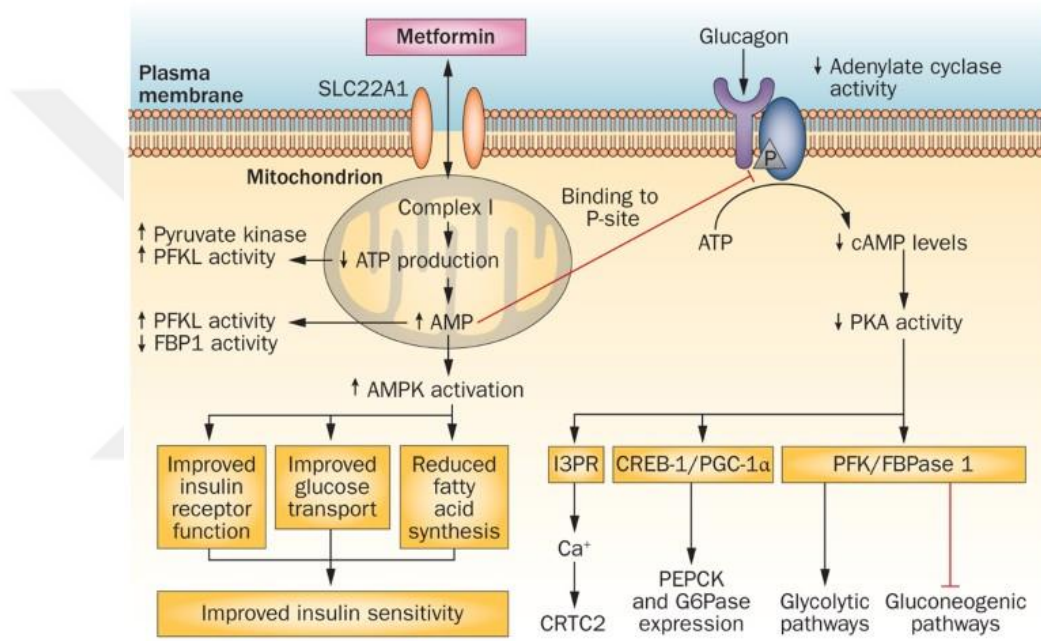


Şekil 2. Metforminin Absorpsiyon ve Eliminasyon Mekanizması (Florez JC, 2017. *The pharmacogenetics of metformin. Diabetologia*:60(9):1648-1655.)

Pozitif yüklü olan ilaç, plazma zarı ve mitokondriyal iç zar boyunca zar potansiyelleri nedeniyle hücrelerde ve ayrıca mitokondride birikir. Metforminin en çok bilinen ve kabul gören etkisi solunum zincirinde Kompleks I'in inhibisyonu ile ATP üretiminin azalması, AMP miktarının artışı ve dolayısıyla AMPK aktive ederek glukoneogenezi inhibe etme ve glukoz üretimini azaltma üzerinedir. ATP üretiminin yanı sıra  $NAD^+ : NADH$  oranındaki değişiklikler gibi solunum zinciri inhibisyonunun diğer sonuçları da metforminin glukoneogenez üzerindeki etkilerine katkıda bulunabilir. Ayrıca aktive edilmiş AMPK, Asetil CoA Karboksilaz'ın (ACC), ACC1 ve ACC2 izoformlarını fosforile eder, yağ sentezini inhibe eder ve bunun yerine yağ oksidasyonunu teşvik eder, böylece hepatik lipid depolarını azaltır ve hepatik insülin duyarlılığını artırır. İnsülin reseptör duyarlılığını artırarak adipositlere ve iskelet kas hücrelerine glukoz alımını artırır, hücre içi glikojen sentezini uyarır ve spesifik membran glukoz taşıyıcı proteinlerinin (GLUT1 ve GLUT4) taşıma kapasitesini artırır (Rosa, 2014). Ayrıca AMP, adenilat siklaz enziminde 'P-sitesi' olarak



adlandırılan yere bağlanır ve aktivitesini inhibe ederek glukagon reseptörünün uyarılması üzerine cAMP oluşumunun azalmasına yol açar. Sonuç olarak, Protein Kinaz A (PKA) aktivasyonu ve aşağı akış yolları inhibe edilir. Glukoneogenez, glukoneojenik akışta yer alan enzimlerin aktivitesinin azalması (örneğin, PFK/FBPase 1 fosforilasyonunun olmaması nedeniyle) ve gen ekspresyonunun azalması (transkripsiyon faktörü CREB-1'in fosforilasyonunun azalması nedeniyle) sonucu baskılanır (Pernicova, 2014). Metformin ayrıca bağırsaktan glukoz emilimini azaltarak kan glukoz seviyelerinin düşürülmesine de yardımcı olur. Gastrik boşalmayı geciktirme ve iştahı azaltma etkisi ile de bazı vakalarda kilo kaybını desteklemektedir.



Şekil 3. Metforminin Etki Mekanizması (Kaynak: Pernicova, I., Korbonits, M, 2014. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol 10, 143–156.)

### 1.2.5. Metforminin Yan Etkileri ve Toksisitesi

Böbrek yetmezliği olan hastalarda metforminin yarı ömrü uzasa da, spesifik bir doz ayarlaması önerilmemektedir. Kontrollü klinik araştırmalarda, maksimum metformin plazma seviyelerinin, maksimum dozlarda bile 5 µg/mL'yi geçmediği görülmüştür.

Tek başına görülen ciddi yan etkileri bulunmayan metformin, diğer antidiyabetik ajanlar özellikle sülfonilüreler grubu ilaçlarla birlikte kullanıldığında hipoglisemiye sebep olabilmektedir. En yaygın yan etkiler diyare ve hazımsızlık olup, hastaların %30'a kadarında görülür. En korkulan yan etkisi çok nadir görülen (0.3/10

000) laktik asidozdur (Rosa, 2014). Metabolik asidoza bağlı kardiyak toksisite, kardiyak kontraktilitenin azalmasına neden olur ve kardiyak arreste yol açabilir (Jagia, 2011).

### **1.3. SGLT-2 İNHİBİTÖRLERİ ve EMPAGLİFLOZİN**

Sodyum bağımlı glukoz yardımcı taşıyıcıları (SGLT), glukoz ve sodyumun çok çeşitli dokulardan hücrelerin plazma zarı boyunca taşınmasını kolaylaştıran geniş bir protein sınıfıdır. Daha spesifik olarak, SGLT ailesinin iki üyesi SGLT-1 ve SGLT-2, böbrekte glukozun geri emilimine aracılık eder. Bunlardan SGLT-2, aktif renal glukoz geri emiliminin yaklaşık %90'ından sorumlu olan yüksek kapasiteli ve düşük afiniteli bir taşıyıcıdır (Menenes, 2015). SGLT-2 inhibitörleri, hipoglisemik etkilerini renal proksimal tübüllerde glukoz geri alımını inhibe ederek sergileyen ve böylece glikozüriyi indükleyen yeni tanıtılan sentetik antidiyabetik ajan sınıfıdır (Yaribeygi, 2019). Canagliflozin, dapagliflozin ve empagliflozin, SGLT-2 inhibitörleri sınıfına ait ilaçlardır.

#### **1.3.1. Empagliflozinin Tarihçesi**

SGLT-2 inhibitörleri, 150 yılı aşkın bir geçmişe sahiptir. 1835'te elma ağaçlarının kök kabuğundan izole edilen bir dihidrokalkon olan Phlorizin'in, SGLT inhibe edici aktiviteye sahip ilk doğal ürün maddesi olduğu bilinmektedir (Singh, 2021). Kınakına ve söğüt ağacından elde edilen özlerle benzerliği sebebiyle, phlorizin daha önce ateş, bulaşıcı hastalıklar ve sıtma tedavisi için bir aday olarak kabul edildi (Choi, 2016). Yaklaşık 50 yıl sonra Chasis ve ark. tarafından phlorizinin renal glukoz reabsorpsiyonunu inhibe ettiği ve üriner glukoz atımını arttırdığı bildirilmiştir (Chasis, 1933). Phlorizin ile proksimal tübül fırça sınırının aktif glukoz taşıma sistemi arasındaki ilişki 1970'lerin başında ortaya çıkarılmıştır (Vick, 1973). SGLT'lere karşı yeterli inhibitör etkilerine rağmen, phlorizin'in bazı kritik dezavantajlardan dolayı bir antihiperglisemik ilaç olarak daha fazla geliştirilmesi için nihai olarak uygun olmadığı kabul edildi. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için birkaç ilaç şirketi, SGLT-2 seçiciliğinin yanısıra gelişmiş biyoyararlanım ve stabilizeye sahip yeni phlorizin bazlı analoglar geliştirmek için çalışmalara başladı. Sonuç olarak, 2008 yılında Meng ve ark. dapagliflozini geliştirdi. Dapagliflozin ilk olarak 2012 yılında Avrupa'da onaylanmış ve pazarlanmıştır. U.S. Food and Drug Administration (FDA) komitesi de bu ilacı T2DM tedavisi için Ocak 2014'te onaylamıştır. Dapagliflozinin ortaya

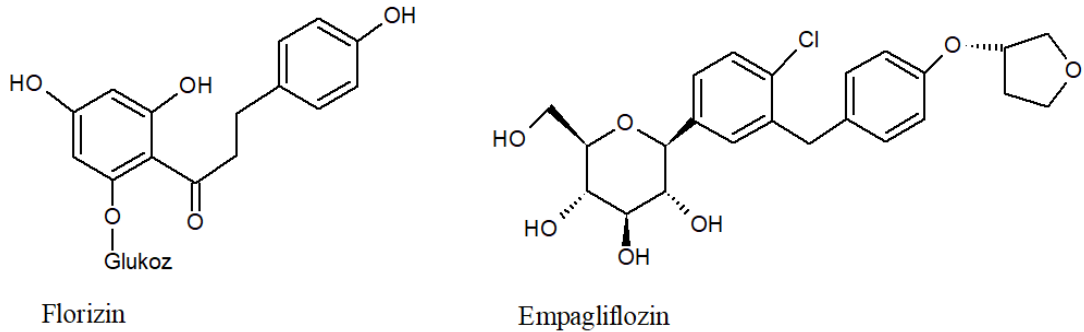
çıkmasıyla çeşitli araştırmalarla ortaya çıkan canagliflozin, 2013 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Empagliflozin, hem Avrupa İlaç Ajansı (EMA) hem de FDA tarafından 2014 yılında onaylanan gliflozin sınıfındaki üçüncü ajandı ve piyasadaki SGLT-2 inhibitörleri arasında SGLT-2 için SGLT-1'e göre en yüksek seçiciliğe (yaklaşık 2700 kat) sahiptir (Grampler, 2012). Empagliflozin, Eli Lilly and Company ile işbirliği içinde Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals tarafından geliştirilmiş ve Jardiance adıyla pazarlanmıştır. İlaç ayrıca Aralık 2016'da T2DM hastalarının kardiyovasküler hastalık geliştirme riskini azaltmak için FDA tarafından onaylandı (FDA).

### 1.3.2. Empagliflozinin Fizikokimyasal Özellikleri

Molekül formülü  $C_{23}H_{27}ClO_7$ , molekül ağırlığı 450.9 g/mol olan empagliflozin, anomerik merkezinde bir (4-kloro-3-{4-[(3S)-tetrahidrofuran-3-iloksi]benzil}fenil grubuna sahip bir beta-glukozil kalıntısından oluşan bir C-glikozil bileşiğidir. IUPAC adlandırması (2S, 3R, 4R, 5S, 6R)-2-[4-kloro-3-[[4-[(3S)-oksolan-3-il]oksifenil]metil]fenil]-6-(hidroksimetil)oksan-3,4,5-triol'dür.

Çözünürlüğü 0.28 mg/mL'dir (PUBCHEM).

Empagliflozin beyaz ile sarımsı higroskopik olmayan kristal bir katıdır, suda çok az çözünür (pH 1-7.4). Asetonitril, metanol ve etanolde az çözünür ve toluende pratik olarak çözünmez (EMA).



Şekil 4. Florizin ve Empagliflozin Kimyasal Yapısı

Empagliflozin etken maddesi içeren ilaçlar ticari olarak; JARDIANCE, SYNJARDY, TRIJARDY, GLYXAMBI olarak bulunmaktadır. Film tablet ve uzatılmış salımlı tablet şeklinde kullanımları vardır.

### 1.3.3. Empagliflozinin Farmakokinetiği

Empagliflozin, %78 biyoyararlanımı olan, aktif metaboliti olmayan ve çok sınırlı ilaç-ilaç etkileşimleri olan, oral olarak aktif, seçici bir SGLT-2 inhibitörüdür.

Oral uygulamayı takiben, pik plazma konsantrasyonlarına yaklaşık 1.5 saatte ulaşılır. Kararlı durumda, günlük 10 mg ve 25 mg empagliflozin tedavisini takiben plazma  $C_{maks}$  değerleri sırasıyla 259 nmol/L ve 687 nmol/L idi. Terminal eliminasyon yarı ömrü 12.4 saat ve görünür oral klirens 10.6 L/saat olarak bulunmuştur (FDA). Sağlıklı gönüllülere oral [14C]-empagliflozin solüsyonunun uygulanmasını takiben plazma protein bağlanması % 86 olmuştur ve ilaca bağlı radyoaktivitenin yaklaşık %96'sı; feçeste %41, idrarda %54 oranında olacak şekilde elimine edilmiştir. Feçesteki ilaca bağlı radyoaktivitenin çoğunluğu ve idrarla atılan ilaca bağlı radyoaktivitenin ise yaklaşık yarısı değişmemiş ana ilaçtı. Empagliflozinin toplam vücut klirensi saatte 10.6 L'dir ve empagliflozinin beklenen yarı ömrü yaklaşık 12.4 saattir. Empagliflozinin uzun yarı ömrü, günde bir kez dozlamaya izin vermektedir (Ndefo 2015).

Empagliflozin minimal metabolizmaya uğrar ve insan plazmasında empagliflozinin majör metabolitleri saptanmamıştır. Öncelikle 5'-difosfoglukuronosiltransferazlar 2B7, 1A3, 1A8 ve 1A9 tarafından glukuronidasyon yoluyla metabolize edilerek üç glukuronid metaboliti oluşur: 2-O-, 3-O- ve 6-O-glukuronid. Hiçbir metabolit, toplam ilaçla ilgili materyalin %10'undan fazlasını temsil etmemiştir (EMA 2).

Gıda ile birlikte uygulama empagliflozinin emilimini önemli ölçüde etkilemez. Yüksek yağlı ve yüksek kalorili bir yemeğin tüketilmesinden sonra, empagliflozin 25 mg'ın oral yoldan verilmesi, aç karnına uygulamaya kıyasla eğrinin altındaki alanda %16'lık bir azalmaya ve pik konsantrasyonunda ( $C_{maks}$ ) %37'lik bir azalmaya neden olmuştur ancak bu değişikliklerin klinik olarak önemli olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla besinin empagliflozinin farmakokinetiği üzerinde gözlemlenen etkisi klinik olarak anlamlı kabul edilmemiştir (Ndefo 2015).

### 1.3.4. Empagliflozinin Etki Mekanizması

SGLT reseptörleri böbrekte glukoz geri emilimine aracılık eder. Renal glukoz reabsorpsiyonunun yaklaşık %90'ı proksimal tübülün ilk segmentinde meydana gelir

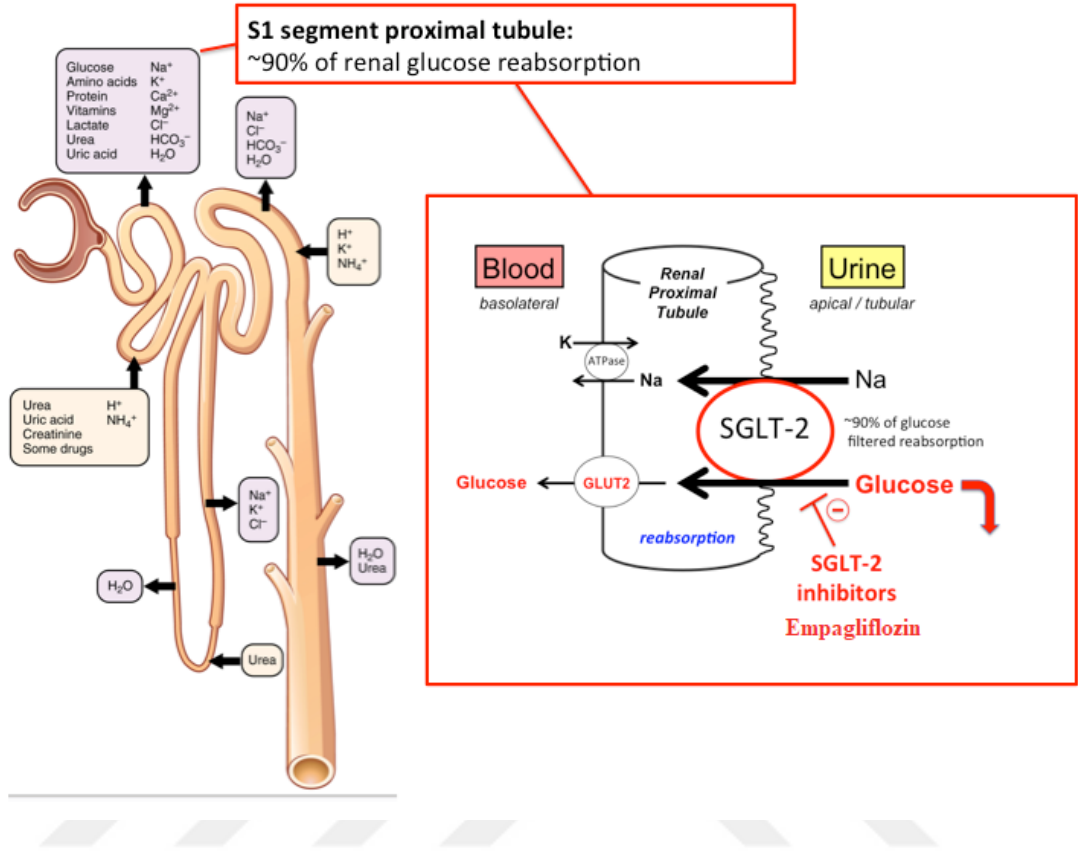
ve düşük afiniteli yüksek kapasiteli bir taşıyıcı olan SGLT-2 aracılık eder ve kalan %10'u yüksek afiniteli düşük kapasiteli taşıyıcı SGLT-1 yoluyla distal segmentten çıkarılır. Proksimal tübüler hücrelerin bazolateral membranındaki  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz, tübülü çevreleyen interstisyuma  $\text{Na}^+$  iyonlarını aktif olarak pompalamak için ATP'yi kullanır ve tübüler hücre içinde bir  $\text{Na}^+$  gradyanı oluşturur. Bu hücrelerin apikal membranındaki SGLT-2 daha sonra hem  $\text{Na}^+$ 'nın hem de glukozun filtrattan ikincil aktif birlikte taşınmasını kolaylaştırmak için bu gradyanı kullanır, böylece glukozu kana geri emer (FDA; Kalra, 2014).

SGLT-2 inhibitörü olarak görev yapan empagliflozin renal glukoz reabsorpsiyonunu azaltır, üriner glukoz atılımını destekler ve plazma glukoz konsantrasyonunu azaltır. Empagliflozin, diğer SGLT-2 inhibitörleriyle karşılaştırıldığında (tofogliflozin >1.875 kat, dapagliflozin > 1.200 kat, ipragliflozin >550 kat ve kanagliflozin >250 kat) SGLT-1'e göre SGLT-2 için en yüksek seçiciliğe (>2.500 kat) sahip olduğunu bildirmiştir (Grempler, 2012). SGLT-2 inhibisyonu insülininden bağımsız bir mekanizma yoluyla gerçekleştiğinden, hipoglisemi riski düşüktür (Scheen, 2014). SGLT-2 inhibisyonu ayrıca üriner glukoz atımına bağlı olarak mevcut kalorilerde bir azalmanın neden olduğu kilo kaybı ve hem subkutan hem de viseral yağ kütlelerinde bir azalma ile ilişkilidir (Toubro, 2012). Empagliflozin, sodyum ve hacim yükünü azaltır, diüretik ve natriüretik özellikleri ile intravasküler kontraksiyona neden olur. Ayrıca, empagliflozin, kalp hızını artırmadan kan basıncında azalma ile kilo kaybı ile ilişkilidir (Heise, 2016).

Empagliflozin, 0,5-10 mg'lık tek günlük dozlarda filtrelenmiş glukozun < %40'ının, daha yüksek dozlarda filtrelenmiş glukozun %40-60'ının geri emilimini engellemiştir (Seman, 2013). T2DM hastalarında, idrarla glukoz atımı, 10 mg empagliflozin ile günde yaklaşık 64 gram ve 25 mg empagliflozin ile günde 78 gram artmıştır (Sinar, 2021).

Empagliflozin ayrıca, kan şekerini düşürücü etkilerinden bağımsız olarak kardiyovasküler faydalar sağlıyor gibi görünse de, bu yararın tam mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Miyokartta  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  değiştirici (NHE) 1'in ve proksimal tübülde NHE3'ün potansiyel inhibisyonu, diüretik/natriüretik etkiler yoluyla ön yükün azaltılması ve kan basıncının düşürülmesi, kardiyak fibrozisin önlenmesi, pro-fibrotik

belirteçlerin baskılanması ve pro-inflamatuar adipokinlerin azaltılması gibi çeşitli teoriler öne sürülmüştür (Verma, 2018).



Şekil 5. Empagliflozin etki mekanizması (Kaynak: [https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/sglt-2\\_inhibitors](https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/sglt-2_inhibitors))

### 1.3.5. Empagliflozinin Yan Etkileri ve Toksisitesi

Jardiance, empagliflozin tedavisi için geliştirilmiş ilk ilaç olup 10 ve 25 mg'lık tabletler halinde bulunmaktadır. İlaç tedavisinde 10 mg'lık tabletlerle tedaviye başlanmasını takiben hastadaki yan etki gözlemi ile birlikte ve hekim tarafından hastanın ihtiyacı değerlendirildikten sonra 25 mg'lık ilaç tedavisine geçiş yapılabilir.

Empagliflozin, hipotansiyon, ketoasidoz, akut böbrek hasarı, genital mikotik enfeksiyonlar; insülin ile birlikte kullanıldığında hipoglisemi, dislipidemi, Fournier kangren ve piyelonefrit dahil olmak üzere birçok yan etkiye sahiptir. Bir sülfonilüre grubu ajan veya insülin ile birlikte empagliflozin kullanıldığında hipoglisemi riski artmaktadır. Empagliflozin, glukozüri sebebiyle genital mikotik enfeksiyonlar ve idrar yolu enfeksiyonları riskini artırmaktadır.

Empagliflozin serum kreatininini arttırır ve e-GFR'yi azaltır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda e-GFR  $\geq 45$  mL/dk/1.73 m<sup>2</sup> ise doz ayarlaması gerekli

değildir ancak e-GFR < 45 mL/dk ise empagliflozin kullanımı önerilmez ve 30 mL/dk'dan az ise ilaç kontrendikedir (Sizar, 2021).

Kontrollü klinik çalışmalarda; sağlıklı gönüllülerde 800 mg'a kadar tek doz ve T2DM hastalarında günde 100 mg'a kadar çoklu empagliflozin dozları herhangi bir toksisite göstermemiştir. İnsanlarda 800 mg'ın üzerindeki dozlarla ilgili çalışma bulunmamaktadır (EMA 2).

Empagliflozin ve metformin tayini; dozajı optimize etmeye, toksisite riskini en aza indirmeye ve olası ilaç-ilâç etkileşimlerini araştırmaya yardımcı olabilir. Klinikte ilâç düzeyi ölçümünde hassasiyet çok önemli olduğundan kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada LC-MS/MS cihazında yeni bir ölçüm metodu geliştirmek amaçlanmıştır.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. YÖNTEM**

#### **2.1.1. İstatiksel analiz**

İstatiksel analiz, SPSS 22.0 istatistiksel yazılım paketi, EP Evaluator Release 10 (Data Innovations, South Burlington, VT) ve Excel (2016) ile yapıldı. EP Evaluator Release 10 ile örnekler arası taşıma değerleri hesaplanmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir. Yöntem karşılaştırmalarında ise LC-MS/MS verilerinin regresyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### **2.1.2. Validasyon çalışmaları**

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberleri ve FDA protokollerine göre validasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda doğruluk, linearite, alt limit tayinleri, stabilite, tekrarlanabilirlik, taşıma, geri kazanım, matriks etkisi çalışmaları yapılmıştır.

##### **2.1.2.1. Validasyon**

Analitik yöntemlerin güvenilirliğini gösterme prosedürüne validasyon denir. Terminolojide yöntem doğrulaması olarak adlandırılır. Yöntemin performans özelliklerini ve sınırlamalarını belirleme işleminin yanı sıra bu özelliklerin değişimine sebep olacak etkileri belirleme işlemidir (Sak, 2020).

##### **2.1.2.2. Doğruluk**

Doğruluk, bir ölçüm sisteminin sistematik hatasıyla ilgilidir ve sonsuz sayıda tekrarlanan ölçülen büyüklük değerlerinin ortalaması ile bir referans büyüklük değeri arasındaki uyuşmanın yakınlığı, doğruluğu verir. Pratikte, doğruluk, sonsuz değil ancak oldukça fazla sayıda ölçümden değerlendirilir ve gerçek değer yerine referans değerler kullanılır (Kruve, 2015-2; EURACHEM).

##### **2.1.2.3. Linearite (Doğrusallık)**

Bir analitik prosedürün doğrusallığı, belirli bir aralık içinde numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğidir.



Analitik prosedürün aralığı, analitik prosedürün uygun bir kesinlik, doğruluk ve doğrusalık seviyesine sahip olduğu gösterilen numunedeki analitin üst ve alt konsantrasyonu arasındaki aralıktır (EMA3).

#### **2.1.2.4. Limit of Detection (LOD)**

LOD diğer adıyla tespit limiti, bir numunede güvenilir bir şekilde tespit edilebilen ve metotla tanımlanabilen analitin en düşük miktarı veya en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır (Kruve, 2015-1).

#### **2.1.2.5. Limit of Quantification (LOQ)**

LOQ diğer adıyla kantitasyon limiti, kabul edilebilir bir tekrarlanabilirlik ve doğrulukla belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır (EURACHEM).

#### **2.1.2.6. Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik, laboratuvarında homojen bir numuneden bağımsız olarak hazırlanmış alt numunelerin aynı gün içinde ve farklı günlerde belli sayılarda hazırlanarak analiz edilmesi sonucu elde edilir ve sonuçlarda en küçük varyasyonun oluşması beklenir (Kruve, 2015-2).

#### **2.1.2.7. Geri Kazanım**

Bir analizde bir analitin geri kazanımı, çözücü içindeki analitin gerçek konsantrasyonu için elde edilen dedektör yanıtına kıyasla biyolojik matrikse eklenen ve biyolojik matriksten ekstrakte edilen analitin bir miktarından elde edilen dedektör yanıtıdır. Geri kazanım, aynı konsantrasyon seviyesindeki standart bir çözeltiye kıyasla numune hazırlamadan elde edilen bir çözeltideki analit sinyalinin yüzdesi olarak hesaplanabilir (Kruve, 2015-2; EURACHEM).

#### **2.1.2.8. Matriks Etkisi**

Çalışmada istenen analitle birlikte ayrıştırılan numune matriksinden kaynaklanan moleküller, kütle spektrometresindeki iyonizasyon sürecine müdahale ederek iyonlaşmanın baskılanmasına veya artmasına neden olabilir. Bu olay matriks etkisi olarak adlandırılır (Van Eeckhaut, 2009).

### 2.1.2.9. Taşıma

Taşıma, seri bir çalışmada daha önce analiz edilen bir numuneden kalan analitin sonraki numune veya numunelerde görülmesidir. Analitik yöntemlerde numuneler arasında taşıma meydana gelebilir. Metot validasyonu sırasında herhangi bir taşıma ortadan kaldırılmalıdır. Taşıma ortadan kaldırılamıyorsa, taşımanın çalışma numunesi konsantrasyonlarının doğruluğu üzerindeki etkisi değerlendirilmelidir (FDA; Hughes, 2007).

## 2.2. KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER

### 2.2.1. Cihazlar

- HPLC (Shimadzu UFLC; dgu-20 a3 (Degasser), LC-20 ad (A pompası) LC20 ad (B pompası) ve sıl-20 AC HT (Auto sampler) (Japonya)
- Tandem MS (Absciex API 3200) (Singapur)
- HPLC kolonu (Phenomenex Luna 5u C18, 50x4.6mm, part no: 00b-4041e0)
- Evaporatör (Teknosem Teb 40-wel wt, Türkiye)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegratm x-2212)
- Nitrojen tüpü (Habaş)
- Vortex (Dragon Lab, Almanya)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)
- Ultrasonik Banyo

### 2.2.2. Kimyasallar

- Empagliflozin standart {Sigma (CAS No: 680590-49-2) Almanya}
- Metformin standart {Sigma (CAS No: 1115-70-4) Almanya}
- Metanol {Sigma, (Product no: 34860) Almanya}
- HPLC Grade su {Sigma, (CAS No:7732-18-5) Almanya}
- Formik asit {Sigma, (Product no: F0507) Almanya}
- Karbamazepin {Karazepin 200 mg tablet}

## 2.3. METOT OPTİMİZASYONU

### 2.3.1. LC-MS/MS Parametreleri

Çalışmamızdaki LC-MS/MS cihazına ait parametreler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. LC-MS/MS Parametreleri

Curtain gas (CUR)	20.0
Collision gas (CAD)	6
Ionspray voltage (IS)	5500
Temperature (TEM)	450
Ion source gas1 (GS1)	50
Ion source gas2 (GS2)	50
Interface heater	ON
Ionisation mode	Elektro sprey iyonizasyon
Ionisation source	Turbo sprey
Pompa modu	Binary Flow
Total akış	1 ml/min
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Analiz süresi	6 dakika
Kolon	Phenomenex Luna C18 Kolon
Mobil faz A	%0.1 Formik Asit içeren HPLC Grade Su
Mobil faz B	%0.1 Formik Asit içeren Metanol

Empagliflozin ve metformine ait öncü iyon (Q1) ve ürün fragman iyonu (Q3) tayini için Absciex API 3200 kütle spektrometre cihazındaki autotune algoritması kullanılmıştır.

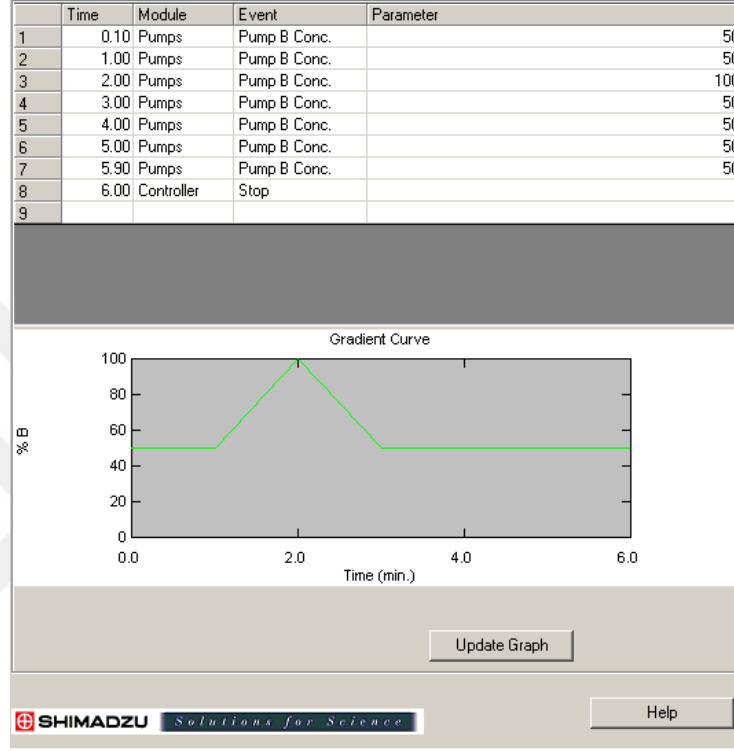
Empagliflozin, metformin ve internal standart karbamazepine ait Q1 ve Q3 iyon geçişleri, Dwell Time, Declustering potential (DP), Entrance potential (EP), Collision energy (CE), Collision cell exit potential (CXP) verileri tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Analitler ve internal standarta ait cihaz verileri

ID	Q1	Q3	Dwell Time	DP	EP	CE	CXP
Empagliflozin	468.000	451.100	400	30	4	10	4
Metformin	130.000	71.100	400	50	4	27	4
Karbamazepin	237.000	194.000	400	30	4	40	4

### 2.3.2. Akış Gradienti

Çalışmamızda akış gradienti B pompası için 0.10 dk/50; 1.00 dk/50; 2.00 dk/100; 3.00 dk/50; 4.00 dk/50; 5.00 dk/50; 5.90 dk/50; 6.00 dk/Stop olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda LC-MS/MS cihazında kullanılan akış gradient eğrisi Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Akış Gradient Eğrisi

### 2.3.3. Çalışma Prosedürü

250 µl numune ependorf tüplere alınıp üzerine 100 µl internal standart (karbamazepin) eklenerek ardından 980 µl metanolde çöktürüldü. 1 dakika boyunca vortekslendi. Ardından 15 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatandan 850 µl temiz cam tüplere alınıp nitrojen gazı altında 40°C'de buharlaştırıldı. Cam tüplerdeki kalıntılar 200 µL metanolde çözdürüldü ve ardından LC-MS/MS sistemine 20 µL örnek enjekte edildi.

### 2.3.4. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### 2.3.4.1. Standartların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan empagliflozin ve metformin HPLC grade standart Sigma'dan alınmıştır.

Empagliflozin için hazırlanan stoklar:

Stok 1: Tablet halindeki empagliflozin standardı 20000 ng/mL olacak şekilde % 100 metanolde (500 mL) çözdürüldü.

Stok 2: Stok 1'den ½ seri dilüsyon ile 10000 ng/mL'lik standart elde edildi.

Metformin için hazırlanan stoklar:

Stok 1: Metformin standardı  $10^6$  ng/mL olacak şekilde % 100 metanolde (1000 mL) çözdürüldü.

Stok 2: Stok 1'den 1/10 seri dilüsyon ile  $10^5$  ng/mL'lik standart elde edildi.

Stok 3: Stok 2'den 1/10 seri dilüsyon ile  $10^4$  ng/mL'lik standart elde edildi.

#### **2.3.4.2. Internal Standart Hazırlama Prosedürü**

Laboratuvarımızda bulunan karbamazepin ana stoktan (20000 ng/mL) 3 dilüsyon yapılarak 100 ng/mL'lik standart elde edildi.

### **2.4. METOT VALİDASYONU**

#### **2.4.1. Linearite**

Linearite çalışmaları, CLSI EP06-A protokolüne göre yapılmıştır. Linearite çalışması ile kalibrasyon grafiği oluşturmak ve analitik ölçüm aralığı belirlemek amaçlanmıştır. Protokole göre dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır:

- Doğrusal bir aralık oluşturmak için 9 ila 11 seviye ve her seviyede 2 ila 4 tekrar önerilir.
- Çalışmanın amacına göre kaç seviye oluşturulması gerektiği ve tekrar sayısı değişebilir.
- En az 5 örnek çift olarak çalışılmalıdır.
- İlk çalışma için lineer aralık beklenenden %20-30 daha geniş tutulmalıdır.
- Linearite, polinom regresyon yöntemi kullanılarak değerlendirilir.
- Her doğrulama çalışmasında kalibratörün konsantrasyonları LLOQ dışındaki (LLOQ için  $\pm\%$  20) konsantrasyonların  $\pm\%$  15'i olmalıdır.

- Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları ( $r^2$ ) 0.980'den büyük olmalıdır.

Belirtilen maddelere göre empagliflozin ve metformin için kalibrasyon solüsyonları sırasıyla 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.1, 39, 19.5, 9.75, 4.8 ng/mL ve 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.1, 39, 19.5, 9.75, 4.8 ng/mL konsantrasyonlarında en az 6 farklı sağlıklı kişiden elde edilen ve belirtilen ilaçları içermeyen atık serum örneklerine stok solüsyonun seri dilüsyonla eklenmesi ile hazırlanmıştır.

#### 2.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri (LOD ve LOQ)

LOQ düzeyi kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak belirlenmektedir. FDA kılavuzu, en az üç farklı analitik run da düşük düzey analit spike edilmiş bir numunenin,  $\geq$  beş tekrardan elde edilen verilerin kullanılmasını önermektedir. LOQ düzeyinin kabul edilebilir olması için, bu çalışmadan hesaplanan varyasyon katsayısı (%CV)  $\leq \pm\% 20$  ve doğruluktaki sapma (% Bias)  $\leq \pm\% 20$  olmalıdır. %CV ve %BIAS hesaplama formülleri aşağıda verilmiştir:

$$\% CV = \left( \frac{\text{standard deviation}}{\text{mean}} \right) \times 100 \quad \% \text{Bias} = \left( \frac{\text{measured value} - \text{expected value}}{\text{expected value}} \right) \times 100$$

LOD değeri kromatografik yöntemlerde pik sinyal/gürültü oranının 3 olduğu ve LOQ değeri sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon düzeyi ile belirlenmektedir.

#### 2.4.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları FDA rehberine göre gerçekleştirilmiştir. Empagliflozin ve metformin için bulunan LLOQ, düşük (LOQ), orta konsantrasyon (MQC1, MQC2) ve lineer aralığın üst limiti (HQC) düzeylerinde tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları gün içi ve günler arası olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında 100, 300, 2500, 3750, 5000 ng/mL düzeyi için sabah 20, öğleden sonra 20 adet olmak üzere toplam 40'ar örnek hazırlanarak ön işlem prosedürü uygulanmış ve yine bu metabolitlerin düzeyleri ölçülmüştür. Günler arası tekrarlanabilirlik deneyinde ise tüm konsantrasyon düzeylerinden 4 gün boyunca günde 5 örnek hazırlanmış, toplamda 20'şer adet örnek ön işlem basamaklarından geçirilerek analiz edilmiştir. LOQ,

MQC1, MQC2 ve HQC düzeylerindeki kalite kontrol numuneleri için, gün içi ve günler arası kesinlik %15'e eşit veya daha az olmalı ve gün içi ve günler arası doğruluk % 85 ve % 115 arasında olmalıdır. LLOQ numuneleri için, gün içi ve arası kesinlik %20'den fazla olmamalı ve gün içi ve arası doğruluk % 80 ile % 120 arasında olmalıdır.

Westgard'ın websitesinde CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) tarafından kabul edilen ilaç düzeyleri için genel olarak izin verilen total hata değeri %25 olarak belirtilmiştir. Elde edilen SD değerinin, hesaplanan SD değerinden küçük olması halinde tekrarlanabilirlik sonuçları kabul edilebilir. Buna göre tekrarlanabilirlik çalışması sonuçlarının kabul edilebilir düzeyleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmaktadır:

$$\text{Elde edilen SD} < \frac{\text{Çalışılan konsantrasyon} \times 0.25}{4}$$

#### 2.4.4. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmaları CLSI EP-34 protokolüne göre yapılmıştır. Geri kazanım çalışmaları, kalibrasyon eğrisi ile belirlenen düşük, orta ve yüksek düzeydeki analitlerin kalıntı serum örneklerine eklenmesiyle hazırlanan çalışma çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. % Geri kazanım aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmaktadır:

$$\% \text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Ölçülen değer}}{\text{Beklenen değer}} \times 100$$

CLSI kılavuzuna göre konsantrasyon seviyesinin LLOQ'nun 3 katından fazla olduğu noktalarda geri kazanım değerleri %85 ile %115 arasında, düşük konsantrasyon seviyelerinde ise %80 ile %120 arasında olmalıdır.

Geri kazanım çalışmaları iki ilaç düzeyi için de terapötik aralığı kapsayan 100, 500 ve 1000 ng/mL düzeylerinde yapılmıştır. Suda 1000, 5000 ve 10000 ng/mL olarak hazırlanan düzeyler su ve serum matrisinde 1/10 dilüsyon ile 100, 500 ve 1000 ng/mL düzeylerine getirilir ve elde edilen numuneler normal prosedüre uygun olarak çalışılır.

#### 2.4.5. Matris Etkisi

Matris etkisi çalışması Chambers ve ark. yaptığı post-ekstraksiyon spike yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Chambers ve ark. 2007). Bu yöntemde, saf çözelti

(metanol) içindeki analitin tepkisi, ön işlemde geçirilmiş boş matris içindeki tepkisi ile karşılaştırılmıştır. Matris etkisi izleyen formülle hesaplanmıştır:

$$\% \text{Matris etkisi} = \frac{\text{Ekstrakte edilmiş numunenin pik alanı}}{\text{Ekstrakte edilmemiş numunenin pik alanı}} \times 100$$

CLSI kılavuzuna göre yüzde matris sapması (%100-ME) %15'ten az olmalıdır.

Matris etkisi çalışması empagliflozin ve metformin için de ortak olarak belirlenmiş 100, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. İki ilaç için de ayrı ayrı 2 serum ve 3 mobil faz karışımı (%v:v 50:50, metanol: su) spikesız ön işlem prosedürüne tabi tutulmuştur. Ardından bu iki ilaç için de 10000, 5000 ve 1000 ng/mL düzeyleri suda hazırlanmıştır. Üst faz alınırken 10000, 5000 ve 1000 ng/mL ilaç düzeyleri ile 1/10 seyreltme yapılır ve ön işlem prosedürü aynı şekilde tamamlanır.

#### 2.4.6. Taşıma

Taşıma çalışmasında metformin ve empagliflozin için hazırlanan konsantrasyon düzeyleri;

Düşük konsantrasyon: 100 ng/mL

Yüksek konsantrasyon: 5000 ng/mL'dir.

Taşıma çalışmasında metformin ve empagliflozin için de yüksek ve düşük konsantrasyon düzeyindeki numuneler ön işlem prosedürüne tabi tutulduktan sonra EP Evaluator programında belirtilen düzene göre yerleştirilerek ilaç düzeyleri ölçülmüştür. Numunelerin cihazda analiz edilme sırası aşağıda verilmiştir:

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

Grup 1: D2-D3-D6-D7-D8

Grup 2: D4-D5-D9-D10-D11

Grup 1 düşük konsantrasyon düzeyinden sonra gelen düşük konsantrasyon düzeyindeki numunelerden oluşurken, grup 2 yüksek konsantrasyon düzeyinden sonra gelen düşük konsantrasyon düzeyindeki numunelerden oluşmaktadır.



Taşıma çalışmasında, düşük ve yüksek seviyeli analit eklenmiş kalıntı boş serum numuneleri sırayla analiz edilmiştir. Bu çalışmanın kabul edilebilirliği için hesaplanan bulaşma sonuçlarının  $3 \times SD_{\text{düşük-düşük}}$  sonuçlarından az olması gerekir.

#### 2.4.7. Stabilité

Stabilite çalışmaları CLSI EP25-A protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Don-çöz işleminin ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 45 gün süre saklamanın ilaç stabilitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Stabilite çalışması kalibrasyon eğrisi ile belirlenen düşük, orta ve yüksek düzeydeki ilacın serum örneklerine ekstrakte edilerek hazırlanan çalışma çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışması kapsamında, örnekler 4 ependorfa bölünerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. İlk gün birinci ependorftaki numunede ilaç düzeyleri ölçülmüş ve ardından diğer ependorflardaki numunelerde sırasıyla 15., 30. ve 45. günlerde ilaç düzeyleri ölçülmüştür. Don-çöz işleminin ilaç düzeyi stabilitesi üzerindeki etkisi, toplama gününde yapılan 4 don-çöz döngüsü ile araştırılmıştır. Her analizden sonra %Bias düzeyleri izleyen formülle hesaplanmıştır:

$$\% \text{Bias} = \left( \frac{\text{measured value} - \text{expected value}}{\text{expected value}} \right) \times 100$$

Kabul edilebilirlik kriteri, hesaplanan tüm sapma yüzdesi değerlerinin %15'ten az olmasıdır.

#### 2.4.8. Klinik Örneklere Uygulama

Çalışmamızda belirlenen analitler için doğruladığımız LC-MS/MS yöntemi, metformin kullanan 60 hastadan ve empagliflozin kullanan 73 hastadan alınan randomize kalıntı serum örneklerine uygulandı.

Analiz Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak yapıldı ve Selçuk Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alındı (Sayı: 2021/68, Tarih: 10.02.2021).

Hastalara ait kan örnekleri jel katkısız toplama tüplerine alınarak laboratuvarında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjün ardından serum örnekleri alındı ve ependorflara ayrılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Numuneler iki hafta içinde analiz edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. LİNEARİTE

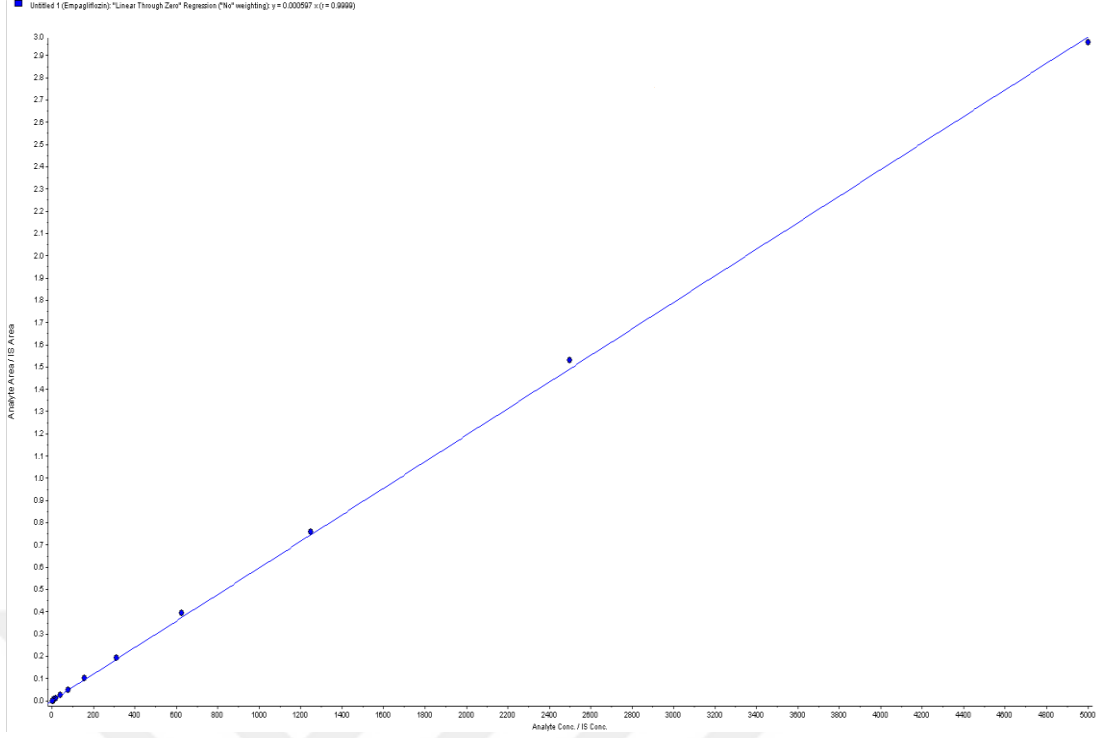
Tablo 3'te empagliflozinin 5000 ng/mL ve 4.8 ng/mL arası ve metforminin 10000 ng/mL ve 4.8 ng/mL arası serumda yapılmış seri dilüsyonlarının cihazdaki ölçüm sonuçları görülmektedir. Uygunluk yüzdesi aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Uygunluk} = \frac{\text{Ölçülen değer}}{\text{Beklenen değer}} \times 100$$

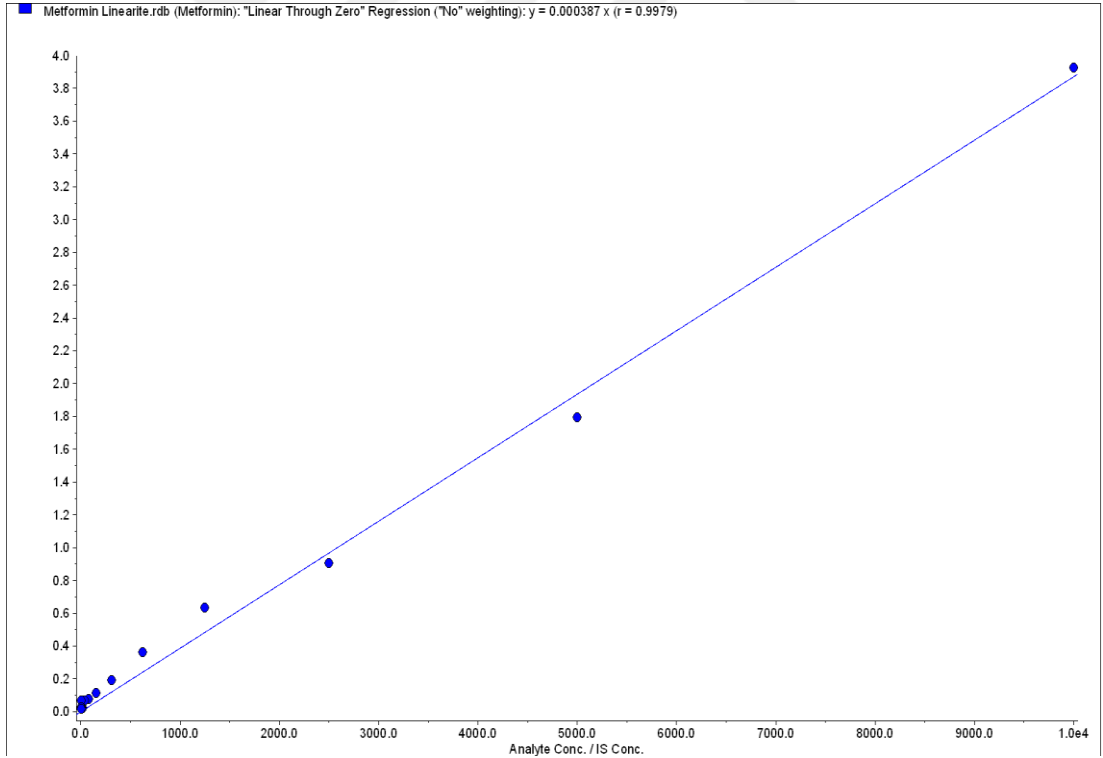
Tablo 3. Empagliflozin ve Metformin Linearite Çalışması Sonuçları

	Ölçülen Değer (ng/mL)	Doğruluk (%)		Ölçülen Değer (ng/mL)	Doğruluk (%)
<b>Empagliflozin</b>			<b>Metformin</b>		
5000 ng/mL	5030	101	10000 ng/mL	10100	101
2500 ng/mL	2460	98,5	5000 ng/mL	4900	98,1
1250 ng/mL	1200	95,9	2500 ng/mL	2320	93
625 ng/mL	614	98,3	1250 ng/mL	1280	103
312.5 ng/mL	340	109	625 ng/mL	663	106
156.25 ng/mL	161	103	312.5 ng/mL	309	99,1
78.1 ng/mL	78	100	156.25 ng/mL	166	107
39 ng/mL	38,5	98,8	78.1 ng/mL	80,1	103
19.5 ng/mL	19,7	101	39 ng/mL	40,1	103
9.75 ng/mL	9,3	95,4	19.5 ng/mL	17,8	91
4.8 ng/mL	4,96	103	9.75 ng/mL	10,3	105
			4.8 ng/mL	5,06	105

Sonuçlar doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, belirtilen analit konsantrasyonuna karşı analit / internal standart pik alanı oranlarının grafiğe aktarılması ile elde edilmiştir. Empagliflozin ve metformin için elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 7 ve Şekil 8'de verilmiştir.  $r^2$  değeri empagliflozin ve metformin için sırasıyla 0.999 ve 0.997 olarak bulunmuştur.

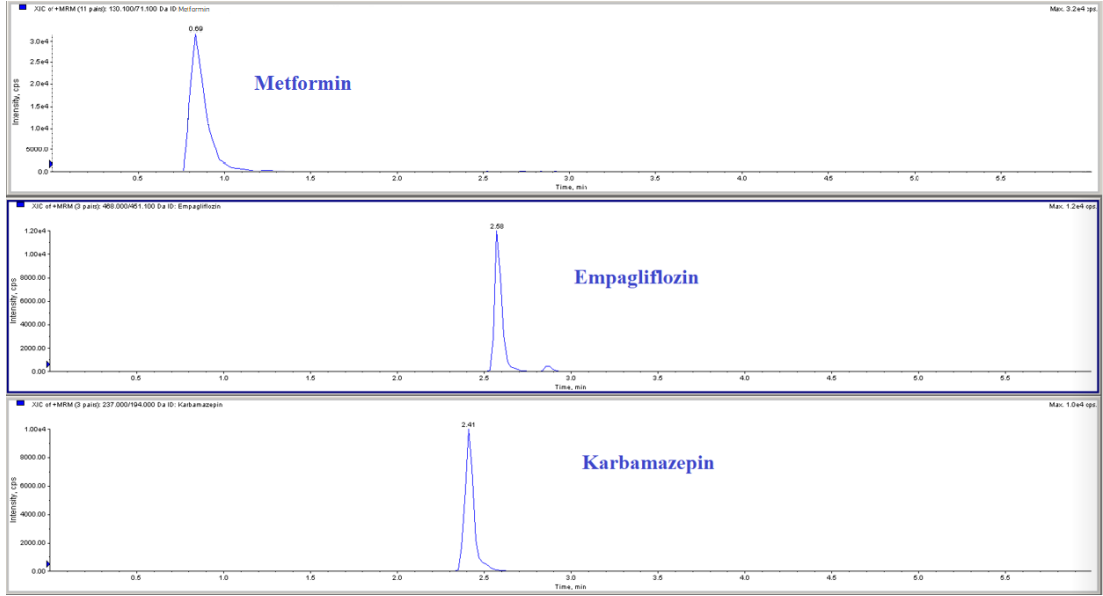


Şekil 7. Empagliflozine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 8. Metformine ait kalibrasyon grafiği

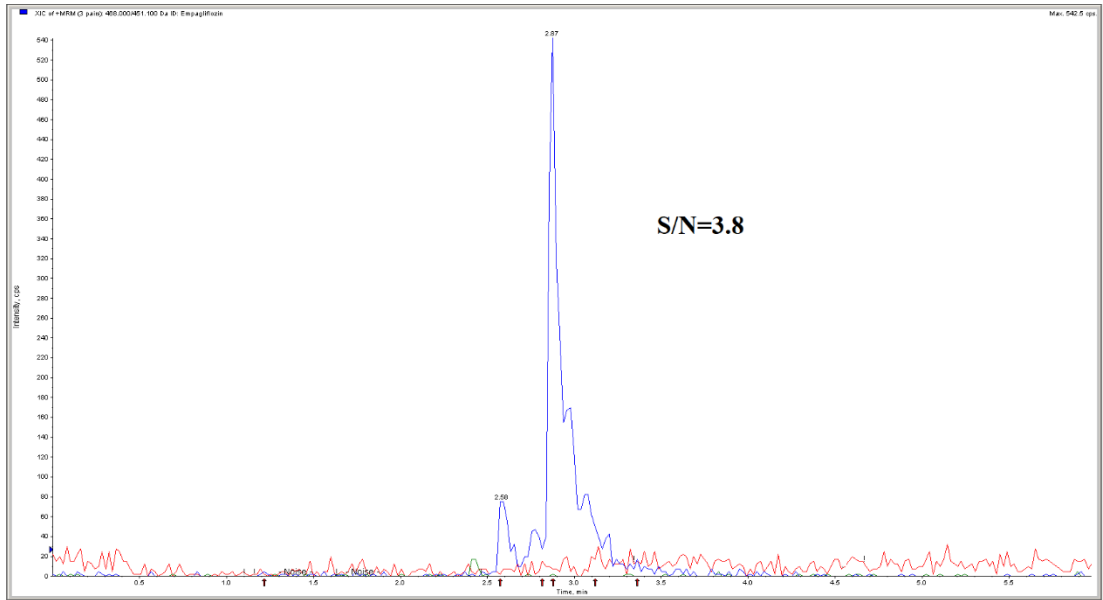
Empagliflozin, metformin ve internal standart karbamazepine ait örnek pik kromatogramları şekil 9'da verilmiştir.



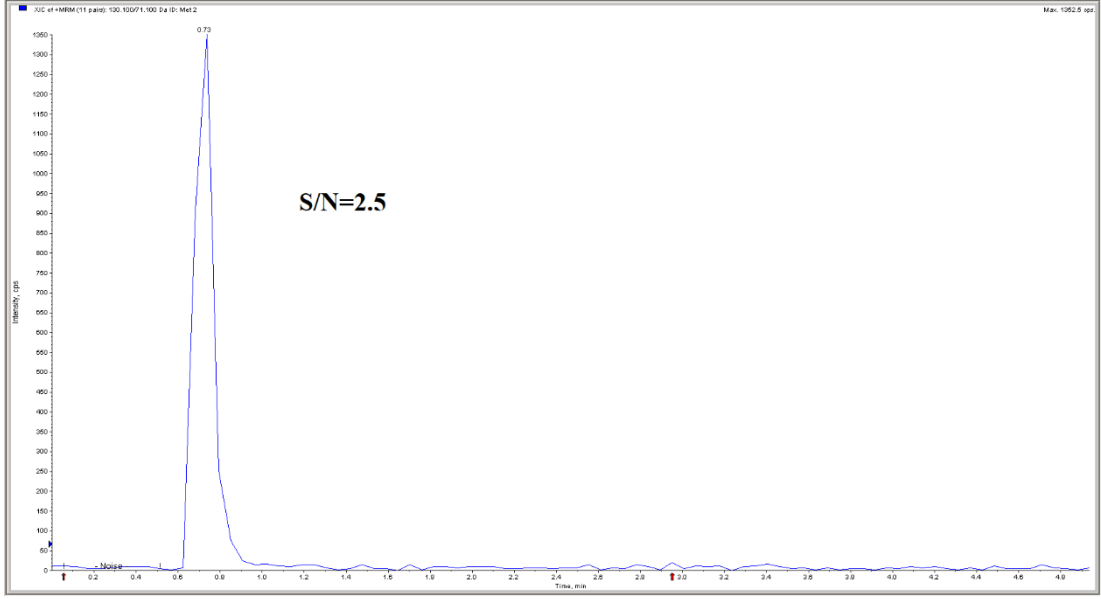
Şekil 9. Empagliflozin ve metformine ait örnek pik kromatogram görüntüsü

### 3.2. LOD ve LOQ

Empagliflozin ve metformin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplanan LOD değerleri için sırasıyla 3.8 ve 2.5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Empagliflozin ve metformin için hesaplanan LOD değerlerine ait veriler sırasıyla Şekil 10 ve 11'de gösterilmiştir.

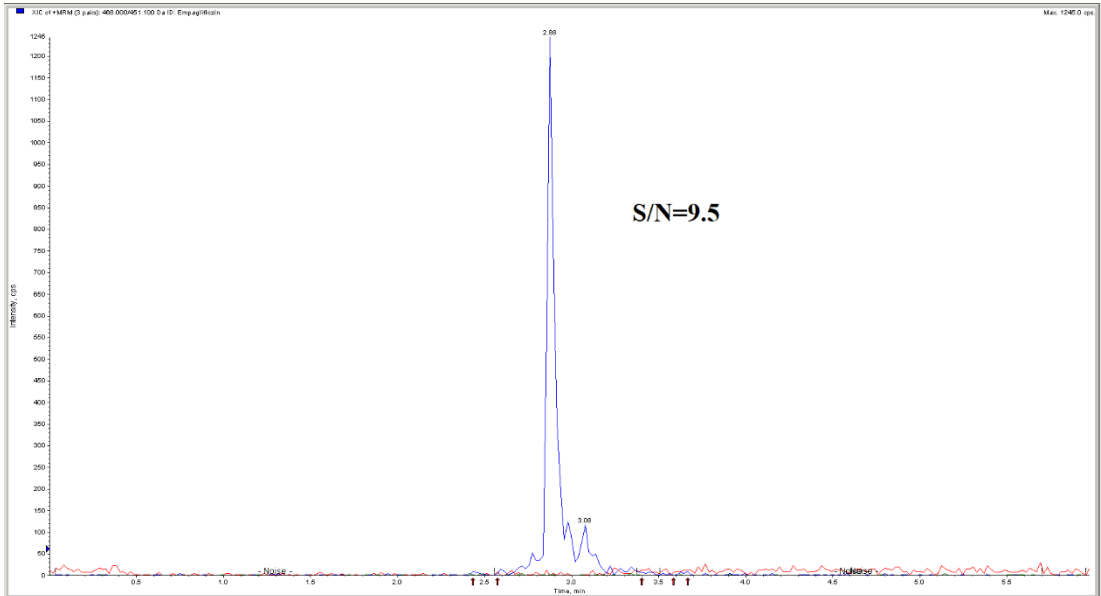


Şekil 10. Empagliflozin LOD değeri

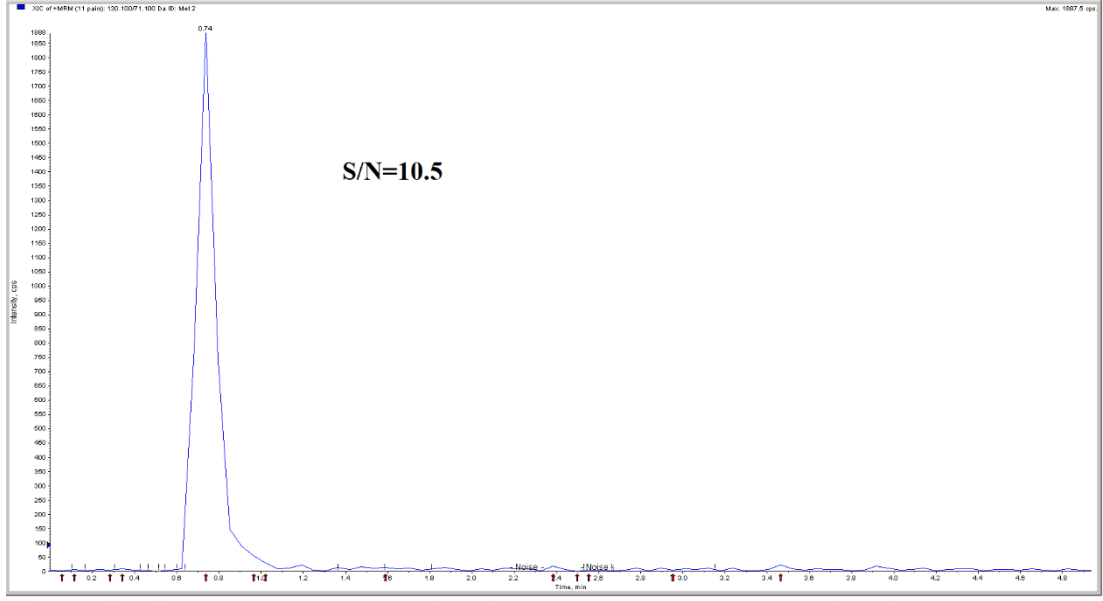


Şekil 11. Metformin LOD değeri

LOQ değeri için çalışma içi ve arası kesinlik ve doğruluk, dört gün boyunca (günlük 5 tekrar) toplam 20 örneğin analiziyle hesaplanmıştır. Buna göre empagliflozin ve metformin için LOQ değerleri kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlik sınırlarında sinyal gürültü oranının 10 olduğu sonuçlarda sırasıyla 9.5 ve 10.5 ng/mL olarak tespit edilmiştir. LOQ değerlerine ait veriler empagliflozin ve metformin için sırasıyla Şekil 12 ve 13'te verilmiştir.



Şekil 12. Empagliflozin LOQ değeri



Şekil 13. Metformin LOQ değeri

### 3.3. TEKRARLANABİLİRLİK

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında empagliflozin ve metformin için 100, 300, 2500, 3750, 5000 ng/mL’lik konsantrasyonlar sabah ve akşam olmak üzere aynı çalışma içinde ardışık 20’şer defa okutulmuştur. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında empagliflozin ve metformin için 100, 300, 2500, 3750, 5000 ng/mL’lik konsantrasyonlar 4 gün boyunca günde 5 farklı numune birer kez okularak günler arası tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Empagliflozin ve metformin için gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla %93-101.8 ve %87-97 aralığında; günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla %89-99 ve %83-96 aralığında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarına ait veriler Tablo 4’te verilmiştir.

Ayrıca CLIA tarafından belirlenen, ilaçlar için izin verilen total hata değerinin %25 altında olması gerekmektedir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmamızda yapılan hesaplamalara göre iki ilaç için de tüm konsantrasyonlarda CLIA tarafından istenen değerler sağlanmaktadır. Buna göre gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için hesaplanan sonuçlar Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 4. Empagliflozin ve Metformin Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

QC	Konsantrasyon (ng/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
		Mean (ng/mL)	Doğruluk (%)	Kesinlik (%CV)	Mean (ng/mL)	Doğruluk (%)	Kesinlik (%CV)
Empagliflozin							
LLOQC	100	93	93	5.3	89	89	7.2
LOQC	300	292	97.3	5.6	278	92.6	7.7
MQC1	2500	2460	98.4	4.9	2380	95.2	5.1
MQC2	3750	3780	100.8	3.8	3640	97	4.7
HQC	5000	5090	101.8	2.1	4930	98.6	2.7
Metformin							
LLOQC	100	87	87	4.6	83	83	6.8
LOQC	300	267	89	5.8	259	86.3	7.0
MQC1	2500	2370	94.8	5.3	2230	89.2	4.2
MQC2	3750	3610	96.2	3.2	3570	95.2	3.9
HQC	5000	4850	97	1.8	4780	95.6	2.5

Tablo 5. Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçlarının CLIA'ya Göre Değerlendirilmesi

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>CLIA'ya göre izin verilebilir total hata (SD)</b>	<b>Gün İçi Tekrarlanabilirlik (SD)</b>	<b>Günler Arası Tekrarlanabilirlik (SD)</b>
<b>Empagliflozin</b>			
100	6,25	5,06	5,38
300	18,75	13,52	15,63
2500	156,25	79,64	85,19
3750	234,75	98,59	107,61
5000	312,50	135,78	151,97
<b>Metformin</b>			
100	6,25	4,93	5,55
300	18,75	11,68	13,87
2500	156,25	78,26	82,30
3750	234,75	95,33	106,80
5000	312,50	130,73	151,91



### 3.4. MATRİKS ETKİSİ

Empagliflozin ve metformin için 100, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarında yapılan matriks etkisi çalışma sonuçlarına göre empagliflozin için matriks etkisi %9'dan ve metformin için %7'den düşük olarak elde edilmiştir. Matriks etkisi çalışma sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Empagliflozin ve Metformin Matriks Etkisi Çalışması Analizleri

	<u>Pik Alanı</u>	<u>Matriks Etkisi (%)</u>
<b>Empagliflozin</b>		
Mobil faz + 1000 ng/mL standart	2,83E x 104	%2.82
Serum havuzu + 1000 ng/mL standart	2,91E x 104	
Mobil faz + 500 ng/mL standart	7,69E x 103	%6.63
Serum havuzu + 500 ng/mL standart	8,20E x 103	
Mobil faz + 100 ng/mL standart	2,62E x 103	%8.01
Serum havuzu + 100 ng/mL standart	2,83E x 103	
<b>Metformin</b>		
Mobil faz + 1000 ng/mL standart	2,57E x 103	%3.11
Serum havuzu + 1000 ng/mL standart	2,65E x 103	
Mobil faz + 500 ng/mL standart	7,69E x 102	%4.29
Serum havuzu + 500 ng/mL standart	8,02E x 102	
Mobil faz + 100 ng/mL standart	1,81E x 102	%6.62
Serum havuzu + 100 ng/mL standart	1,93E x 102	

### 3.5. GERİ KAZANIM

Empagliflozin ve metformin için geri kazanım çalışması 1000, 500 ve 100 ng/mL'lik standartlar ile yapılmıştır. Geri kazanım çalışması sonuçlarına göre sonuçlar empagliflozin için %93-102 aralığında ve metformin için %92-98 aralığında bulunmuştur. Geri kazanım çalışmasının verileri Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. Empagliflozin ve Metformin Geri Kazanım Çalışması

	<u>Konsantrasyon (ng/mL)</u>	<u>Geri kazanım (ng/mL)</u>	<u>% Geri Kazanım</u>
<b>Empagliflozin</b>	1000	970	97
	500	510	102
	100	93	93
<b>Metformin</b>	1000	980	98
	500	473	94.6
	100	92	92

### 3.6. TAŞIMA

EP Evaluator programı yardımıyla grup ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak grup ortalamaları arasındaki farkın total müsaade edilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı kabul edilmiştir. Buna göre empagliflozin ve metformin için taşıma düzeyleri sırasıyla olarak hesaplanmış olup bu düzey istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. Metformin ve empagliflozin için elde edilen taşıma çalışma sonuçları EP-Evaluator Release 8 programı ile analiz edilip 3.70 ve 6.92 ng/mL olarak saptanmış ve taşıma hatası tespit edilmemiştir. Çalışmamız taşıma analizinden başarıyla geçmiştir.

Taşıma çalışması sonuçları Şekil 14 ve 15'te verilmiştir.

#### EP Evaluator® METFORMIN Clinical Lab – Kennett Community Hospital Instrument Analyzer

##### Carryover

Carryover Analysis			
High-Low Mean	104.74	Error Limit	8.34
Low-Low Mean	101.04	Passes?	Yes
Carryover	3.70		

##### Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	106		
L2	103	103	
L3	104	104	
H1	4970		
H2	5080		
L4	110		110
H3	5140		
H4	5210		
L5	109		109
L6	102	102	
L7	98.3	98.3	
L8	97.9	97.9	
H5	4930		
H6	4870		
L9	103		103
H7	5110		
H8	5200		
L10	99.7		99.7
H9	4970		
H10	4920		
L11	102		102
Mean		101.04	104.74
SD		2.78	4.52

##### Supporting Data

Units	ng/ml
Analyst	METFORMIN
Expt Date	24 Jun 2022
Low Conc	100
High Conc	5000
Comment	

Accepted by: \_\_\_\_\_  
Signature Date

Şekil 14. Metformin Taşıma Çalışması Analizi

**Carryover**

Carryover Analysis			
High-Low Mean	106.60	Error Limit	10.38
Low-Low Mean	99.68	Passes?	Yes
Carryover	6.92		

**Experimental Results**

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	98.7		
L2	97.5	97.5	
L3	96.2	96.2	
H1	4910		
H2	4890		
L4	107		107
H3	5010		
H4	5030		
L5	111		111
L6	105	105	
L7	101	101	
L8	98.7	98.7	
H5	4790		
H6	4970		
L9	105		105
H7	5020		
H8	5040		
L10	108		108
H9	4830		
H10	4950		
L11	102		102
Mean		99.68	106.60
SD		3.46	3.36

**Supporting Data**

Units	ng/ml
Analyst	EMPA
Expt Date	24 Jun 2022
Low Conc	100
High Conc	5000
Comment	

Accepted by: \_\_\_\_\_ Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Şekil 15. Empagliflozin Taşıma Analizi Sonuçları

### 3.7. STABİLİTE

Empagliflozin ve metformin için don-çöz işleminin ve uzun dönem dondurmanın etkisini belirlemek için yapılan çalışmaların verimleri ve ölçümlerin arasında ilk ölçüme göre hesaplanan % Doğruluk değerleri Tablo 8’de verilmiştir.

Ayrıca stabilite ölçümlerine göre hesaplanan %BIAS değerleri de Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8. Empagliflozin ve Metformin Stabilite Çalışmaları

	Konsantrasyon (ng/mL)	Dondurulmuş (-80°C) 45 gün			Don-çöz stabilitesi (-20°C)			
		15. gün (%)	30. gün (%)	45. gün (%)	1. (%)	2. (%)	3. (%)	4. (%)
<b>Empagliflozin</b>	100	93 ng/mL (93)	91 ng/mL (91)	88 ng/mL (88)	98 ng/mL (98)	97 ng/mL (97)	95 ng/mL (95)	87 ng/mL (87)
	500	485 ng/mL (97)	468 ng/mL (93.6)	450 ng/mL (90)	490 ng/mL (98)	490 ng/mL (98)	493 ng/mL (98.6)	467 ng/mL (93.4)
	5000	4980 ng/mL (99.6)	4870 ng/mL (97.4)	4800 ng/mL (96)	5010 ng/mL (100.2)	5040 ng/mL (100.8)	4970 ng/mL (99.4)	4810 ng/mL (96.2)
<b>Metformin</b>	100	93 ng/mL (93)	92 ng/mL (92)	89 ng/mL (89)	98 ng/mL (98)	98 ng/mL (98)	96 ng/mL (96)	91 ng/mL (91)
	500	487 ng/mL (97.4)	472 ng/mL (94.4)	460 ng/mL (92)	495 ng/mL (99)	487 ng/mL (97.4)	475 ng/mL (95)	470 ng/mL (94)
	5000	4960 ng/mL (99.2)	4900 ng/mL (98)	4790 ng/mL (95.8)	5000 ng/mL (100)	4910 ng/mL (98.2)	4880 ng/mL (97.6)	4760 ng/mL (95.2)

Tablo 9. Empagliflozin ve Metformin Stabilite BIAS Değerleri

	Konsantrasyon (ng/mL)	Dondurulmuş (-80°C) 45 gün			Don-çöz stabilitesi (-20°C)			
		15. gün (%)	30. gün (%)	45. gün (%)	1. (%)	2. (%)	3. (%)	4. (%)
<b>Empagliflozin</b>	100	-7	-9	-12	-2	-3	-5	-13
	500	-3	-6	-10	-2	-2	-1	-7
	5000	0	-3	-4	0	1	-1	-4
<b>Metformin</b>	100	-7	-8	-11	-2	-2	-3	-9
	500	-3	-6	-8	-1	-3	-5	-6
	5000	-1	-2	-4	0	-2	-2	-5

### 3.8. KLİNİK ÖRNEKLERE UYGULAMA

Çalışmamızda 25 mg'lık empagliflozin tablet kullanan 73 hastadan ve 1000 mg'lık metformin tablet kullanan 60 hastadan alınan serum örneklerine ön işlem prosedürü uygulandıktan sonra ilaç düzeyi ölçümü yapılmıştır.

Empagliflozin ilaç düzeyi ölçümü yapılan 73 hastadan 30 hastanın serum empagliflozin düzeyi belirlenen aralıkların dışında sonuç vermiştir. Bu aralıkları dışındaki sonuçların doğruluğu saptanamayacağı için o sonuçlar dışlanmıştır. Belirlenen aralıklarda çıkan 43 hastanın serum empagliflozin düzeyi için Medyan (Min-Max) değerleri 74.4 ng/mL (9.76-356)'dir. Empagliflozin kullanan hastalara ait sonuçlar Tablo 10'da verilmiştir.

Metformin ilaç düzeyi ölçümü yapılan 60 hastadan 26 hastanın serum metformin düzeyi belirlenen aralıkların dışında sonuç vermiştir. Belirlenen aralıkların dışındaki sonuçların doğruluğu onaylanamayacağı için bu hastaların sonuçları dışlanmıştır. Belirlenen aralıklarda sonuçları çıkan 34 hastanın Medyan (Min-Max) değerleri 402.7 ng/mL (10.7-7000) aralıklarıdır. Metformin kullanan hastalara ait sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10. Empagliflozin Kullanan Hastalarda İlaç Düzeyi Sonuçları

<b>HASTA</b>	<b>EMPAGLİFLOZİN DÜZEYİ (ng/mL)</b>
Hasta 1	56,6
Hasta 2	14,2
Hasta 3	20,8
Hasta 4	118
Hasta 5	11,2
Hasta 6	12,9
Hasta 7	112
Hasta 8	44,5
Hasta 9	67
Hasta 10	36,2
Hasta 11	51,8
Hasta 12	36,8
Hasta 13	18
Hasta 14	9,72
Hasta 15	94,5
Hasta 16	36
Hasta 17	15,7
Hasta 18	18,6
Hasta 19	21,5
Hasta 20	12,7
Hasta 21	34,8
Hasta 22	20,5
Hasta 23	18,9
Hasta 24	15,5
Hasta 25	40,1
Hasta 26	33,6
Hasta 27	49,9
Hasta 28	14,3
Hasta 29	329
Hasta 30	32,4
Hasta 31	23,3
Hasta 32	54,3
Hasta 33	35,8
Hasta 34	64,2
Hasta 35	32,9
Hasta 36	27,1
Hasta 37	116
Hasta 38	248
Hasta 39	128
Hasta 40	305
Hasta 41	356
Hasta 42	375
Hasta 43	36,9

*Tablo 11. Metformin Kullanan Hastalarda İlaç Düzeyi Sonuçları*

<b>HASTA</b>	<b>METFORMİN DÜZEYİ (ng/mL)</b>
Hasta 1	41,3
Hasta 2	35,9
Hasta 3	26,5
Hasta 4	36,1
Hasta 5	13
Hasta 6	12
Hasta 7	14,5
Hasta 8	45,6
Hasta 9	13,9
Hasta 10	11,2
Hasta 11	23,7
Hasta 12	30
Hasta 13	10,7
Hasta 14	25
Hasta 15	19,1
Hasta 16	40,9
Hasta 17	12,6
Hasta 18	15,1
Hasta 19	13,9
Hasta 20	29,5
Hasta 21	15,9
Hasta 22	11,1
Hasta 23	14,8
Hasta 24	30
Hasta 25	125
Hasta 26	5520
Hasta 27	173
Hasta 28	80,5
Hasta 29	7000
Hasta 30	63,8
Hasta 31	24,6
Hasta 32	75,6
Hasta 33	36,2
Hasta 34	50,8



#### 4. TARTIŞMA

T2DM çağımızda ciddi derecede yaygın olarak görülen, önlenemediği ve tedavi edilemediği durumlarda morbidite ve mortaliteye yol açan ve ayrıca ülke ekonomisini önemli ölçüde etkileyen bir hastalıktır. Dolayısıyla T2DM'nin önlenmesine ve tedavisine yönelik ulusal ve uluslararası çaplarda birçok çalışma yürütülmektedir. Sağlıklı yaşam tarzı seçimleri, T2DM'nin önlenmesine yardımcı olabilmektedir.

Metformin, T2DM ilaç tedavisinde 50 yılı aşkın süredir başvuru alan ilk ilaçtır. Klinisyenler tarafından birçok farklı doz ve kombinasyonlarda hastalara önerilmektedir. Metformin genel olarak hastalar tarafından iyi tolere edilmekte olup tek başına kullanımında rastlanan ciddi bir yan etkisi bulunmamaktadır. Diğer antidiyabetik ajanlardan özellikle sülfonilüreler grubu ilaçlarla birlikte alındığında hipoglisemiye sebep olabilmektedir. En korkulan yan etkisi ise çok nadir görülmektedir ve laktik asidozdur.

Empagliflozin ise en yeni antidiyabetik ajanlardandır. SGLT-2 inhibitörleri sınıfına ait bir ilaç olup etkisini insülden bağımsız olarak gösterir. Empagliflozin tedavisinde glukozüri sebebiyle genital mikotik enfeksiyonlar ve idrar yolu enfeksiyonları riski artmaktadır. Bir sülfonilüre grubu ajan veya insülin ile birlikte empagliflozin kullanıldığında ise hipoglisemi riski artmaktadır.

Yukarıda belirtildiği gibi kan düzeylerinin empagliflozin ve metformin düzeylerinin ölçülerek takip edilmesi tedavi etkinliği ve güvenliği açısından son derece önemlidir. Bu çalışma ile amacımız; hastalarda birlikte kullanımı da önerilen iki ilaç olan metformin ve empagliflozin için ortak bir metot geliştirip metodun doğruluğunu validasyon ile onaylamaktır. Validasyonu tamamlanan bu metot, talep edilmesi durumunda hastanemizde rutin ölçümler için kullanıma sunulabilecektir. LC-MS/MS cihazında aynı ön işlem basamakları ve ölçüm yöntemiyle pratik ve ekonomik bir şekilde ölçmeye imkan sağlaması açısından çalışmamız özgün bir çalışmadır.

Shyamala ve ark (2016) RP-HPLC'de yaptıkları empagliflozin metot validasyonunda LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 68 ve 207 ng/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda empagliflozin için yapılan tekrarlanabilirlik sonuçlarına ve sinyal/gürültü oranına göre yapılan analizler de LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 3.8 ve 9.5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen konsantrasyonların daha düşük düzeyler olması sebebiyle daha düşük düzeylerde klinik sonuç verebilme

imkanımız bulunmaktadır. Bununla birlikte klinisyen değerlendirmesinde hastanın ilacı tolere etme düzeyi de değerlendirmeye katılabilir.

Ayoub 2016'da spektrofotometrik bir metotla yaptığı çalışmasında empagliflozin için LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 20 ve 59 ng/mL, metformin için LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 19 ve 58 ng/mL olarak elde etmiştir. Konsantrasyon aralığı her iki ilaç için de 200-12000 ng/mL olarak belirlenmiştir. Aynı çalışma içinde yaptıkları kemometrik yaklaşım ile de konsantrasyon aralığını 200-10000 ng/mL olarak elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise metformin ve empagliflozin için linearite aralıkları 4.8-10000 ng/mL ve 4.8-5000 ng/mL konsantrasyonlarında bulunmuştur. Çalışmamızda linearitede daha düşük düzeylere ulaşılabilmiş ve validasyon sağlanmıştır. Metformin için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2.5 ve 10.5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Empagliflozin için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 3.8 ve 9.5 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen konsantrasyonlar linearite için daha geniş ve LOD ve LOQ değerleri için daha düşük düzeylerdir ve daha detaylı sonuç verebilmeyi sağlamaktadır. Bu açıdan çalışmamız avantajlıdır.

Ayoub ve ark (2017) empagliflozin metot validasyonu için yaptıkları çalışmada LLOQ değerini 25 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Tekrarlanabilirlik çalışması ile yaptıkları doğruluk çalışması sonuçlarının %98.46 ile %101.19 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda tekrarlanabilirlik çalışmaları esnasında LLOQ değeri olarak empagliflozin ve metformin iki ilaç için de 100 ng/mL olarak belirlenmiştir. Sinyal/gürültü oranına göre belirlenen LOQ değeri ise empagliflozin ve metformin için sırasıyla 9.5 ve 10.5 ng/mL'dir. Çalışmamızda empagliflozin için gün içi tekrarlanabilirlik çalışması 93-101.8 ng/mL ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları %89-98.6 ng/mL düzeylerinde sonuçları vermiştir.

Ayoub ve Mowaka (2017) LC-MS/MS ile yaptıkları empagliflozin ve metformin metot geliştirme ve validasyon çalışmasında lineer aralıkları sırasıyla 5-1000 ng/mL ve 50-25000 ng/mL olarak bildirmişlerdir. Pozitif iyon modunda yaptıkları çalışmada empagliflozin ve metformin için sırasıyla Q1 ve Q3 iyon verilerini 451.04→71.07 ve 130.11→71.14 olarak raporlamışlardır. Biz çalışmamızda gradient modda %0.1 formik asit içeren HPLC Grade su ve %0.1 formik asit içeren metanol mobil fazı uyguladık. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak, izokratik modda 0.2 mL/dk akış hızında mobil faz olarak %0.1 formik asit içeren su-asetonitril (75:25, v/v ) uygulanmıştır. Ayrıca empagliflozin ve metformin için LOD ve LOQ sırasıyla 1.38-4.13 ng/mL ve 7.3-21.9 ng/mL olarak bulunmuştur.

Empagliflozin ve metformin için geri kazanım sonuçları sırasıyla %98.87±1.04 ve %99.82±0.42 idi. Bizim geliştirdiğimiz metotta empagliflozin ve metformin için geri kazanım sonuçları %93-102 ve %92-98 aralığında elde edilmiştir.

Hanif ve ark (2021) empagliflozin metot geliştirme üzerine yaptıkları HPLC tabanlı çalışmada lineer aralığı 25-30000 ng/mL olarak bildirmişlerdir. LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 20 ve 61 ng/mL olarak elde etmişlerdir. Yüzde geri kazanım %98.0 ile %100.13 arasında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında 50, 15000 ve 30000 ng/mL düzeylerini kullanmışlar ve bunun sonucunda sırasıyla %100.03-100.13 ve %98.0-99.93 aralığında sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda empagliflozin ve metformin tekrarlanabilirlik çalışmalarında iki analit için de 100, 300, 2500, 3750 ve 5000 ng/mL olarak 5 düzey çalışılmış ve bu 5 düzeyde de kabul edilebilir aralıklarda sonuç verilmiştir.

Biscaino ve ark (2021) misel elektrokinetik kromatografide yaptıkları empagliflozin metot geliştirme çalışmasında 50000-150000 ng/mL konsantrasyon aralığını lineer olarak raporlamışlardır. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla %98.63±0.78 ve %99.08±0.92 olarak bildirilmiştir. Geri kazanım çalışmasında %98-102 aralığında bir sonuç elde etmişlerdir. Uzun dönem stabilite çalışmasında 10<sup>6</sup> ng/mL düzeyindeki ana stok solüsyonda dondurma işlemi gerçekleştirilmiş ve takibinde 10 ve 23. günlerde çözündürme işlemi uygulanmıştır. Bunun sonucunda da sırasıyla 10 ve 23. günlerde %99.6 ve %95.8'lik bir sonuç elde etmişler, verilere göre 10 günlük bir dondurma süresi önermişlerdir. Çalışmamızda tandem MS cihazında çalışılmış ve empagliflozin için 4.8-5000 ng/mL konsantrasyon aralığı linearite düzeyleri olarak belirlenmiştir. Uzun dönem stabilite çalışması 15, 30 ve 45. günlerde 100, 500 ve 5000 ng/mL olmak üzere 3 düzeyde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içinde analiz edilmiştir. Çalışmamızda uzun dönem stabilitede optimum sonuç için elimizdeki verilere göre en fazla 30 günlük dondurma süresi önerilmektedir.

Vankalapati ve ark (2021) ters faz-ultra saf sıvı kromatografisi (RP-UPLC) ile yaptıkları empagliflozin ve metformin için metot geliştirme ve doğrulama çalışmasında metformin için 25000-150000 ng/mL, empagliflozin için 5000-30000 ng/mL aralıklarında lineer bir grafik çizmişlerdir. Linearite için elde edilen r<sup>2</sup> değeri her iki ilaç için de 0.993'ten büyüktü. Metformin ve empagliflozin için LOD değerleri sırasıyla 12.9 ve 18 ng/mL; LOQ değerleri sırasıyla 42 ve 59 ng/mL olarak bildirilmiştir. Metformin, ve empagliflozin yüzde geri kazanımları, kabul kriterleri

dahilinde olan %97.45–102.14 aralığında elde edilmiştir. Çalışmamızda LC-MS/MS cihazında çalışılmış, lineer aralık empagliflozin ve metformin için sırasıyla 5000-4.8 ve 10000-4.8 ng/mL olarak bulunmuştur. Linearite için elde ettiğimiz  $r^2$  değeri her iki ilaç için de 0.997'den büyüktü. Geri kazanım çalışma sonuçlarımız empagliflozin için %93-102 ve metformin için %92-98 aralığında bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen geri kazanım değerleri Vankalapati ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara göre daha geniş bir aralıktadır, bu açıdan çalışmamızın sonuçları onlara göre dezavantajlı durumdadır.

Al Bratty ve ark (2017) metformin için geliştirdikleri LC-MS/MS yönteminde metformin lineer aralığı 0.5-400 ng/mL ve LOD değerini 1.76 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise metformin için lineer aralık 10000-4.8 ng/mL olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı 0.997, LOD değeri 2.5 ng/mL olarak bulunmuştur. Çalışmamızda daha geniş aralıklarda linearite yapılmıştır. LOD değeri de diğer çalışma ile yakın bulunmuştur.

Mohamed ve ark (2019) geliştirmiş olduğu LC-MS/MS yönteminde metformin için 50-5000 ng/mL aralığını lineer bulmuşlardır. Asetonitril ile protein çöktürmesi işleminin ardından etil asetat kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yapmışlardır. Cihazda pozitif iyon modunda çalışıldı, numune çalışma süresi 5 dakika, retention time 3.689, idi. Çalışmamızda metanol ile protein çöktürme yöntemi uygulanmış, azotla uçurma yöntemini takiben cihazda pozitif iyon modunda çalışılmıştır. Numune çalışma süremiz 6 dakika idi. Çalışmamızdaki linearite düzeyinin 4.8-10000 ng/mL aralığında olması hastada daha geniş bir aralıkta sonuç almak ve hasta durumunu değerlendirme açısından olumlu bir durumdur.

Ayoub ve ark (2017) empagliflozin için metot geliştirme çalışmasını takiben Mısırlı hastalar ile diğer etnik kökenlerde ilaç düzeyi analizini karşılaştırmışlar ve 25 mg empagliflozin ilaç dozunu takiben 22-33 yaş aralığında 6 sağlıklı erkek bireyde ilaç düzeyi ölçümü yapıp Mean  $\pm$  SD değerinin  $259 \pm 38$  ng/mL konsantrasyonlarında çıktığını belirtmişlerdir.

Sarashina ve ark (2013) Boehringer Ingelheim Co. tarafından ilacın piyasaya sürülmesinden önce yapılan empagliflozinin tolerabilitesi, farmakokinetiği ve farmakodinamiğinin belirlenmesi çalışmalarında 48 Japon sağlıklı erkek gönüllüyü 6 farklı gruba ayırarak ilk gruba 1 mg empagliflozin, 2. gruba 5 mg empagliflozin, 3. gruba 10 mg empagliflozin, 4. gruba 25 mg empagliflozin, 5. gruba 100 mg empagliflozin ve 6. gruba 10 mg empagliflozin+OGTT vererek ve 12 sağlıklı

gönüllüyü placebo olarak ayırarak çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada gönüllülerin plazma örnekleri ile çalışılmış ve çalışma sonucunda  $C_{max}$  değerinde elde edilen Mean  $\pm$  SD sonuçları sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6. gruplar için  $36.6 \pm 23.9$  ;  $166 \pm 26.6$  ;  $379 \pm 17.4$  ;  $661 \pm 10.4$  ;  $2980 \pm 31.2$  ve  $449 \pm 28.9$  nmol/L olarak sunulmuştur. Çalışmamızla karşılaştırılması açısından 25 mg'lık doz alan sağlıklı bireylerde  $C_{max}$  değeri  $298 \pm 4.6$  ng/mL bulunmuştur.

Heise ve ark (2013) Boehringer Ingelheim Co. Şirketi ile birlikte ilacın piyasaya sürülmesinden önce yapılan empagliflozinin tolerabilitesi, farmakokinetiği ve farmakodinamiğinin belirlenmesi çalışmalarında T2DM teşhisi almış 48 hastayı 12 kişilik 4 gruba bölmüşlerdir. Her gruptan 9 hasta kendi grupları için belirlenmiş 2.5, 10, 25, 100 mg'lık dozu ve gruptaki 3 kişi de placebo almıştır. Tek bir dozdan sonra  $C_{max}$  değerinde elde edilen Mean  $\pm$  SD sonuçları sırasıyla 1, 2, 3, 4. Gruplar için  $62.4 \pm 12.3$  ;  $245 \pm 51.5$  ;  $606 \pm 147$  ve  $2,750 \pm 701$  nmol/L olarak elde edilmiştir. Çalışmamızla karşılaştığımızda 25 mg'lık doz alan hastalarda mean değeri  $273 \pm 66$  ng/mL bulunmuştur.

Çalışmamızda ise 43 T2DM tanısı almış ve düzenli 25 mg empagliflozin kullanan hastanın serumunda empagliflozin düzeyi ölçümü yapılmıştır. Sonuçlarımızda da Medyan (Min-Max) değerleri 74.4 ng/mL (9.76-356) olarak çıkmıştır.

Sutkowska ve ark (2021) 1500 mg/gün metformin dozu ile tedavi uyguladıkları 20 prediyabetli kişide 6 ve 15. haftalarda metformin serum konsantrasyon ölçümü yapmışlar ve Mean  $\pm$  SD sonuçlarını sırasıyla  $4.65 \pm 2.41$  ve  $5.41 \pm 3.44$   $\mu$ mol/L olarak bulmuşlardır.

Lalau ve ark (2018) T2DM ve kronik böbrek yetmezliği olan 69 hastada tamamladıkları çalışmada 1500 mg ve 1000 mg'lık iki farklı grupta çalışmışlardır. İki grup için de maksimum plazma metformin konsantrasyonu 3.54 mg/L ve eritrosit metformin konsantrasyonu 3.26 mg/L'yi aşmamıştır.

Graham ve ark (2011) "bir dozaj aralığında metforminin ortalama plazma konsantrasyonlarının 2.5 mg/L'nin altında tutulması gerektiği"ni önermektedir.

FDA, "metformin onayına temel teşkil eden kontrollü klinik deneyler sırasında maksimum metformin plazma düzeylerinin maksimum dozlarda bile 5  $\mu$ g/mL'yi geçmediğini" belirtmiştir.

The International Association of Forensic Toxicologists (Uluslararası Adli Toksikologlar Birliđi-TIAFT) tarafından yayınlanan Terapötik Maddeler Referans Listesi, 1 ila 4 mg/L arasındaki serum metformin konsantrasyonlarının “terapötik” olduğunu belirtmektedir.

Lalau ve ark (2018) bu ifadelere ve geniş bir plazma metformin konsantrasyonları veri tabanına (Lalau, 2011) dayanarak, orta derecede yüksek değerler (2,5 mg/L ile 5 mg/L arasında) ve açıkça yüksek değerler (>5 mg/L) arasında pragmatik bir ayırım yapmayı önermektedir.

Çalışmamızda T2DM tanısı almış ve düzenli 1000 mg/gün metformin tedavisi alan 34 hastada serum metformin düzeyleri ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarında da serum metformin Medyan (Min-Max) değerleri 402.7 ng/mL (10.7-7000) konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Lalau ve ark (2018) önerdiği şekilde çalışmamızda serum metformin konsantrasyonları 5520 ve 7000 ng/mL olan iki hasta için yüksek değerlerde serum metformin konsantrasyonlarına sahip olduğunu söylemek mümkündür. Bu hastalar için klinisyenin bilgilendirilmesi ve dozlamamın ayarlanması sağlıklı bir hasta takibi sağlayacaktır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Empagliflozin ve metformin T2DM tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ilaçlardır. Metformin, yıllardır T2DM tedavisinde birincil olarak başvuru olan bir ilaç olup empagliflozin ise yeni geliştirilmiş bir ilaçtır ve genellikle metformin ile kombinasyon tedavisi uygulanmakta, bunun sonucunda da olumlu sonuçlar görülmektedir.

Terapötik ilaç düzeyi takibinin klinisyenin hasta durumunu değerlendirmesi açısından önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. İlaç düzeyi takibi klinik olarak hem tedavi yanıtının değerlendirilmesi hem de toksik etkilerin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu konudaki talepler de gittikçe artmaktadır. Günümüze kadar antidiyabetik ilaç düzeyi ölçümü için çeşitli HPLC, ELISA, LC-MS, LC-MS/MS ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Bu metotlardan LC-MS/MS spesifik, selektif bir yöntem olması ve interferans, matriks efekti gibi problemlerin az olması açısından öne çıkmakta ve altın standart olarak kabul edilmektedir.

Yaptığımız çalışmada empagliflozin ve metforminin serumdaki miktarını tayin edebilmek için yeni bir metot geliştirilmiştir. Gerçekleştirmiş olduğumuz serumda metformin ve empagliflozin tayini çalışmasında oluşturmak istediğimiz yeni metot için metot validasyonu CLSI ve FDA kuralları çerçevesinde tamamlanmıştır. Çalışmamız çerçevesinde analitik ölçüm limitleri, linearite, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, matriks etkisi, stabilite ve taşıma çalışmalarının analizini yaptığımızda elde ettiğimiz veriler kabul edilebilir sınırlar içindedir. Çalışmamızda yapılan metot validasyonunu takiben hasta çalışması da yapılmış ve literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Talep edildiği takdirde klinisyenin değerlendirilmesine sunulmaya hazırdır.

Elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan LC-MS/MS yönteminin uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Al Bratty M, A. Alhazmi H, SA Javed, G. Lalitha K, Asmari M, Wölker J, El Deeb S, 2017. Development and Validation of LC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Metformin and Four Gliptins in Human Plasma. *Chromatographia*, 80(6): 891-899.
- Ayoub BM, 2016. Development and Validation of Simple Spectrophotometric and Chemometric Methods for Simultaneous Determination of Empagliflozin and Metformin: Applied to Recently Approved Pharmaceutical Formulation. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 168: 118-122.
- Ayoub BM, Mowaka S, 2017. LC–MS/MS Determination of Empagliflozin and Metformin. *Journal of Chromatographic Science*, 55(7):742–747.
- Ayoub BM, Mowaka S, Elzanfaly ES, Ashoush N, Elmazar MM, Mousa SA, 2017. Pharmacokinetic Evaluation of Empagliflozin in Healthy Egyptian Volunteers Using LC-MS/MS and Comparison with Other Ethnic Populations. *Sci Rep* 7, 2583.
- Biscaino PT, Christ AP, Librelotto DRN, Rolim CMB, Adams AIH, 2021. Assay of empagliflozin tablets by a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method and cytotoxicity study of degraded samples. *Braz. J. Pharm. Sci.* 57: 10 pages.
- Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*: 852(1-2):22-34.
- Chasis H, Jolliffe N, Smith HW, 1933. The action of phlorizin on the excretion of glucose, xylose, sucrose, creatinine and urea by man. *J. Clin. Investig* ;12:1083–1090.
- Choi CI, 2016. Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitors from Natural Products: Discovery of Next-Generation Antihyperglycemic Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(9), 1136.
- Dawed AY, Zhou K, van Leeuwen N, Mahajan A, Robertson N, Koivula R, Elders PJM, Rauh SP, Jones AG, Holl RW, Stingl JC, Franks PW, McCarthy MI, 't Hart LM, Pearson ER, 2019. IMI DIRECT Consortium. Variation in the Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT) (Encoded by SLC29A4) and Organic Cation Transporter 1 (OCT1) (Encoded by SLC22A1) and Gastrointestinal Intolerance to Metformin in Type 2 Diabetes: An IMI DIRECT Study. *Diabetes Care*:42(6):1027-1033.
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM, 2001. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci*; 90: 397-421.
- Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (second ed. 2014). Magnusson and U. Örnemark (Eds.). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY 2, ANNEX I, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. Jardiance 10 mg and 25 mg film-coated tablets. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jardiance-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jardiance-epar-product-information_en.pdf).
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY 3, June 1995, CPMP/ICH/381/95, ICH Topic Q 2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY SCIENCE MEDICINES HEALTH. 20 March 2014, EMA/CHMP/137741/2014. Assessment report of Jardiance. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/jardiance-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/jardiance-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- FDA Approved Drug Products: Jardiance (empagliflozin) oral tablets. <https://docs.boehringer-ingenheim.com/Prescribing%20Information/Pis/Jardiance/jardiance.pdf>.
- FDA, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- Goyal R, Jialal I, 2021. Diabetes Mellitus Type 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>



- Graham, GG, Punt J, Arora M, et al, 2011. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet* 50, 81–98.
- Grampler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P, 2012. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: Characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes. Metab.* 14:83–90.
- Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp, DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P, 2012. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, obesity & metabolism*, 14(1), 83–90.
- Heise T, Jordan J, Wanner C, Heer M, Macha S, Mattheus M, Lund SS, Woerle HJ, Broedl UC, 2016. Acute Pharmacodynamic Effects of Empagliflozin With and Without Diuretic Agents in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Clinical therapeutics*, 38(10), 2248–2264.
- Heise T, Seman L, Macha S, Jones P, Marquart A, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K, 2013. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of multiple rising doses of empagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Ther.* 2013 Dec;4(2):331-45.
- Hughes NC, Wong EY, Fan J, Bajaj N, 2007. Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. *The AAPS journal*, 9(3), E353–E360.
- Jagia M, Taqi S, Hanafi M, 2011. Metformin poisoning: A complex presentation. *Indian J Anaesth*; 55(2):190-2.
- Kalra S, 2014. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Ther.* 5(2):355-66.
- Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravio P, Leito I, 2015-1. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, Vol 870; 29-44.
- Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravio P, Leito I, 2015-2. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, Vol 870; 8-28.
- Lalau JD, Kajbaf F, Bennis Y, Hurtel-Lemaire AS, Belpaire F, De Broe ME, 2018. Metformin Treatment in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease Stages 3A, 3B, or 4. *Diabetes Care.* 41(3):547-553.
- Lalau JD, Lemaire-Hurtel AS, Lacroix C, 2011. Establishment of a database of metformin plasma concentrations and erythrocyte levels in normal and emergency situations. *Clin Drug Investig.* 31:435–438
- M Hanif A, Bushra R, Ismail NE, Bano R, Abedin S, Alam S, Ahmed Khan M, Muhammad Arif H, 2021. Empagliflozin: HPLC based analytical method development and application to pharmaceutical raw material and dosage form. *Pak J Pharm Sci.*34(3(Supplementary)):1081-1087.
- Meneses MJ, Silva BM, Sousa M, Sá R, Oliveira PF, Alves MG, 2015. Antidiabetic Drugs: Mechanisms of Action and Potential Outcomes on Cellular Metabolism. *Current pharmaceutical design*, 21(25), 3606–3620.
- Mohamed D, Elshahed MS, Nasr T, Aboutaleb N, Zakaria O, 2019. Novel LC-MS/MS method for analysis of metformin and canagliflozin in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *BMC Chem*; 13(1):82.
- Mostafa-Hedeab G, Mohamed A. A, Thabet G, Sabry D, Salam R. F, Hassen M. E, 2018. Effect of MATE 1, MATE 2 and OCT1 Single Nucleotide Polymorphisms on Metformin Action in Recently Diagnosed Egyptian Type-2 Diabetic Patients. *Biomed Pharmacol J*;11(1).
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11949646, Empagliflozin. Retrieved March 8, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Empagliflozin>.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 4091, Metformin. Retrieved March 9, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>.

- Ndefo UA, Anidiobi NO, Basheer E, Eaton AT. Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P T.* 2015 Jun;40(6):364-8.
- Pernicova, I., Korbonits, M, 2014. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 10, 143–156.
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER, 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 60(9):1577-1585.
- Rosa MM, Dias T, 2014. Commonly used endocrine drugs. *Handbook of clinical neurology*, 120, 809–824.
- Ruisheng S, 2016. Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites. *Diabetes Care* 1. 39 (2): 187–189.
- Sak F. 2020. Metotreksat Düzeylerinin Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri Yöntemi ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Sarashina A, Koiwai K, Seman LJ, Yamamura N, Taniguchi A, Negishi T, Sesoko S, Woerle HJ, Dugi KA, 2013. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Doses of Empagliflozin, a Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitor, in Healthy Japanese Subjects. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 28 (3):213-9.
- Scheen AJ, 2014. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of empagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor. *Clinical pharmacokinetics,* 53(3), 213–225.
- Seman L, Macha S, Nehmiz G, Simons G, Ren B, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K, 2013. Empagliflozin (BI 10773), a Potent and Selective SGLT2 Inhibitor, Induces Dose-Dependent Glucosuria in Healthy Subjects. *Clinical pharmacology in drug development,* 2(2), 152–161.
- Shyamala M, Nirmala K, Mounika J, Nandini B, 2016. Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of empagliflozin. *Der. Pharm. Lett.,*8(2): 457-464
- Singh NK, Chatterjee S, Agnihotri V, Singh L, Manaswita R. Untold story of SGLT-2 inhibitors. *March 2021.* In book: *API Medicine Update 2021;* 362-368.
- Sizar O, Podder V, Talati R, 2021. Empagliflozin. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532925/>*
- Sutkowska E, Fortuna P, Wisniewski J, Sutkowska K, Hodurek P, Gamian A, Kaluza B, 2021. Low metformin dose and its therapeutic serum concentration in prediabetes. *Sci Rep* 11, 11684.
- Toubro S, Cefalu WT, Xie J, et al. Canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, reduces body weight mainly through loss of fat mass in subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55:S313.
- Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y, 2009. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of chromatography.* 877(23), 2198–2207.
- Vankalapati KR, Alegete P, Boodida S, 2021. Stability-indicating ultra performance liquid chromatography method development and validation for simultaneous estimation of metformin, linagliptin, and empagliflozin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Biomed Chromatogr:* 35(4):e5019.
- Verma S, McMurray JJV, 2018. SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: a state-of-the-art review. *Diabetologia.* 61(10):2108-2117.
- Vick H, Diedrich DF, Baumann K, 1973. Reevaluation of renal tubular glucose transport inhibition by phlorizin analogs. *Am. J. Physiol.* 224:552–557
- Wu C, Qiu S, Zhu X, Lin H, Li L, 2018. OCT1-Mediated Metformin Uptake Regulates Pancreatic Stellate Cell Activity. *Cell Physiol Biochem;* 47(4):1711-1720.
- Yaribeygi H, Simental-Mendía LE, Barreto GE, Sahebkar A, 2019. Metabolic effects of antidiabetic drugs on adipocytes and adipokine expression. *Journal of Cellular Physiology* 234: 16987–16997.

## EMPAGLİFLOZİN VE METFORMİN DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFI KÜTLE SPEKTROMETRI YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>11</b>	% <b>10</b>	% <b>4</b>	% <b>4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080">acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>4</b>
<b>2</b>	Submitted to Associatie K.U.Leuven Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>3</b>	Submitted to Izmir Katip Āelebi Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikerisim.erbakan.edu.tr">acikerisim.erbakan.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://pillintrip.com">pillintrip.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://Www.intechopen.com">Www.intechopen.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to University of Florida Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>9</b>	<a href="http://www.ipr.gov.ba">www.ipr.gov.ba</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>