



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ



**SAĞLIKLI VE *LACTOCOCCUS GARVİAE* İLE
ENFEKTE GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM 1792)' NDA
FLORFENİKOL'ÜN FARMAKOKİNETİĞİ**

Erkan TAÇBAŞ

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine BAYDAN**

2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE *LACTOCOCCUS GARVİAE* İLE
ENFEKTE GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM 1792)' NDA
FLORFENİKOL'ÜN FARMAKOKİNETİĞİ

Erkan TAÇBAŞ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine BAYDAN

Bu Tez TAGEM TARAFINDAN TAGEM/HSGYAD /15/A11/P03/65 sayılı
proje kapsamında desteklenmiştir.

2018

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sağlıklı ve *Lactococcus Garvieae* ile Enfekte Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)’ nda Florfenikol’ün Farmakokinetiği” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Erkan TAÇBAŞ

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında
Erkan TAÇBAŞ tarafından hazırlanan
“Sağlıklı ve *Lactococcus Garvieae* İle Enfekte Gökkuşuğu Alabalıkları
(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)’ nda Florfenikol’ün Farmakokinetiği ” adlı
tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Jüri Başkanı
İmza
İmza
İmza
İmza

Tez hakkında alınan Jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Farmakokinetik	3
1.1.1. İlaçların Emilmesi	3
1.1.2. İlaçların Dağılması	4
1.1.3. İlaçların Metabolizması	4
1.1.4. İlaçların Atılması	4
1.2. Florfenikol	5
1.2.1. Farmakokinetiği	5
1.2.2. Kullanımı	5
1.3. <i>Lactococcus garvieae</i>	6
1.4. Patoloji	6
1.5. Enfeksiyonlarda farmakokinetik	7
1.6. Çalışmanın Amacı	8
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
2.1 Gereç	9
2.1.1. Biyolojik Materyal	9
2.1.2. Kimyasal Maddeler, Bakteri Suşu ve Çözeltiler	10
2.1.2.1. Kimyasal Maddeler, Bakteri suşu	10
2.1.2.2 Çözeltiler	11
2.1.3. Araç ve Cihazlar	12
2.1.4. Laboratuvar Malzemeleri	12
2.2. Yöntem	13
2.2.1. Metot Validasyonu	13
2.2.2. Alabalıklarda deney protokolü	15
2.2.2.1. <i>Lactococcus garvieae</i> 'nin LD50 dozunun hesaplanması, alabalıkların enfekte edilmesi ve bakterinin geri izole edilmesi	17
2.2.3. Plazmadan FF ekstraksiyonu	19
2.2.4. Patolojik incelemeler	20
2.2.5. Farmakokinetik Hesaplamalar ve İstatistik	20
3. BULGULAR	22
3.1. Validasyon Çalışma Bulguları	22
3.1.1. Standart FF kalibrasyon eğrisi bulgusu	22
3.2.1. Doğruluk ve Kesinlik	23
3.2.2. Tekrar Üretilebilirlik	23
3.2.3. Duyarlılık	24
3.2.4. Doğrusallık	25

3.3. Florfenikol plazma yoğunluk bulguları	27
3.4. Farmakokinetik bulgular	32
3.5. Patolojik ve mikrobiyolojik bulgular	34
3.5.1. Patolojik Bulgular	34
3.5.2. Mikrobiyolojik Bulgular	38
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
ÖZET	51
SUMMARY	52
KAYNAKLAR	53
EK-1	57
ÖZGEÇMİŞ	58



ÖNSÖZ

Tedavide başarıya ulaşmak için ilaçların doğru doz ve sürede kullanılması gerekmektedir. Dünyada özellikle son dönemde antibiyotiklere karşı gelişen antimikrobiyal direnç konusu göz önüne alındığında, ilaçların uygun doz ve sürede kullanılması gerekliliğinin ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır. Veteriner hekimliğinde farmakokinetik çalışmalar sağlıklı hayvanlarda yapılmakta, ancak özellikle antibiyotikler enfekte hayvanların tedavisinde kullanılmaktadır. Enfeksiyonlarda organlarda meydana gelen değişiklikler dikkate alındığında, ilaçların emilimi, dağılımı, biyotransformasyonu ve atılımında değişiklikler olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile özellikle alabalıklarda ciddi kayıplara sebep olan *Lactococcus garvieae* ile deneysel enfeksiyon oluşturularak, bu enfeksiyonun tedavisinde son yıllarda yaygın olarak kullanılan florfenikolün farmakokinetiği sağlıklı alabalıklar ile karşılaştırılmıştır.

Doktora eğitimim sırasında her an yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Emine BAYDAN'a, Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a, Sayın Prof. Dr. Semih ÖGE'ye. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı elemanlarına, farmakokinetik hesaplamalarda yardımları için Sayın Prof. Dr. Cengiz GÖKBULUT'a, yardımlarından dolayı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünden Dr. Mustafa TÜRE'ye, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesinden Doç. Dr. Ebru YILDIRIM'a teşekkür ederim. Ayrıca sabır ve destekleri için aileme ve oğlum İlter'e teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AUC _{all}	Dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan
AUC _{last}	Dozlama zamanından son ölçülebilir konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan
CFU	Koloni Oluşturan Birim
Cl_F_obs	Ekstravasküler uygulama için gözlenen toplam vücut klirensi
Cl_F_pred	Ekstravasküler uygulama için tahmin edilen toplam vücut klirensi
C _{last}	Son ölçülebilen konsantrasyon
C _{max}	Maksimum konsantrasyon
F	Nispi biyoyararlanım
FF	Florfenikol
LD50	Öldürücü Doz 50
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçülebilir Tespit Limiti
MRT _{last}	Dozlama zamanından ölçülebilir son konsantrasyona kadar olan ortalama kalış süresi.
PBS	Fosfat Tampon Sistemi
T _{last}	Son ölçülebilen konsantrasyon zamanı
T _{max}	Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi
Vz_F_obs	Terminal fazda belirlenen dağılım hacmi (F= emilen doz kısmı)
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Çalışmada kullanılan havuzlar	9
Şekil 2.2.	YBSK cihazı	14
Şekil 2.3.	Kas içi FF uygulaması	18
Şekil 2.4.	Gavajla FF uygulaması	18
Şekil 2.5.	Alabalıktan kan alımı	19
Şekil 2.6.	Azot evaporatör	20
Şekil 3.1.	FF Standart kalibrasyon eğrisi	22
Şekil 3.2.	FF eklenmemiş kör alabalık plazma örneğine ait kromatogram	24
Şekil 3.3.	FF (3 µg/ml) eklenmiş alabalık plazma örneğine ait kromatogram	25
Şekil 3.4.	Plazma FF geri kazanım eğrisi	26
Şekil 3.5.	Sağlıklı alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi	27
Şekil 3.6.	Enfekte alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi	28
Şekil 3.7.	Sağlıklı alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi (µg/ml)	29
Şekil 3.8.	Enfekte alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi (µg/ml)	30
Şekil 3.9.	Gözlerde ekzoftalmus	35
Şekil 3.10.	Gözlerde periorbital kanama	35
Şekil 3.11.	Karaciğerde kanamalar	36
Şekil 3.12.	Karın boşluğunda sıvı	36
Şekil 3.13.	Histolojik bulgular	37
Şekil 3.14.	TSA'da üreyen koloniler	38

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Alabalık farmalokinetik çalışma grupları ve FF dozları	16
Çizelge 3.1.	FF standart regresyon formülü ve katsayısı	22
Çizelge 3.2.	Plazma FF validasyon çalışması doğruluk ve kesinlik sonuçları	23
Çizelge 3.3.	Plazma FF validasyon çalışması tekrar üretilebilirlik sonuçları	23
Çizelge 3.4.	Plazma validasyon çalışması FF tespit ve tayin limitleri	24
Çizelge 3.5.	Plazma validasyon çalışması regresyon formülü ve katsayısı	25
Çizelge 3.6.	Sağlıklı alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)	27
Çizelge 3.7.	Enfekte alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)	28
Çizelge 3.8.	Sağlıklı alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)	29
Çizelge 3.9.	Enfekte alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)	30
Çizelge 3.10.	Kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama yapılan sağlıklı ve enfekte alabalık plazma yoğunluğu-zaman değerleri (µg/ml) istatistik karşılaştırması.	31
Çizelge 3.11.	Gavaj yoluyla 10 mg/kg dozunda FF uygulama yapılan sağlıklı ve enfekte alabalık plazma yoğunluğu-zaman değerleri (µg/ml) istatistik karşılaştırması.	31
Çizelge 3.12.	Sağlıklı ve enfekte alabalıklara kas içi ve gavaj 10 mg/kg dozda uygulanan FF'ye ait farmakokinetik parametreler	32

1. GİRİŞ

Dünya Tarım Örgütü verilerine göre hayvansal kökenli gıdalar arasında su ürünleri sektörü en hızlı büyüyen sektörler arasındadır (Romero ve ark., 2012). Son yıllarda nüfusun hızla artması paralelinde beyaz et ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Doğal kaynakların yeterli olmaması ise üretimi kültür balıkçılığına doğru kaydırmıştır. Ülkemizin yüksek potansiyeli ise kültür balıkçılığında üretim artışını beraberinde getirmiştir. Üretim ise iç sular ve deniz suyunda gerçekleştirilmektedir (Akşit, 2016).

Üretim miktarı olarak Türkiye'deki denizler içerisinde Doğu Karadeniz Bölgesi ilk sıralarda gelmektedir (Kırda, 2016). Bu bölgede ise kültür balıkçılığında, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği tercih edilmektedir. Gökkuşağı alabalıkları iç sularda yetiştirilmesinin yanı sıra kasım ayının ilk yarısından, haziran ayının başına kadar denizlerde mevcut kafeslerde de yetiştirilmektedir (Kurtoglu ve Çakmak, 2007).

Yoğun yetiştiriciliğin hızla artması, ekonomik avantaj sağlamış olmakla birlikte hastalık salgınlarının da artışına neden olmuştur. Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların kontrolü, iyi yönetim ve uygun çevre koşullarının sağlanması ile mümkün olmakla birlikte, çoğu kez yoğun antibiyotik kullanılması da kaçınılmaz olmaktadır. Kullanılan antibiyotiklerin çoğunun insan ve evcil hayvanlarda kullanılanlarla aynı veya benzer olması, uygulamaların gelişigüzel yapılması bakterilerde kolayca direnç gelişmesine, dirençli bakterilerin gıda ya da çevresel faktörlerle insan ve evcil hayvanlara aktarılmasına ve mevcut antibiyotiklerle tedavisi imkansız hastalıkların yaygınlaşmasına neden olmaktadır (De La Pena ve ark., 2009; Serdoz ve ark., 2011) . Özellikle balık yetiştiriciliğinde pelet şeklinde kullanılan antibiyotikli yemler önemli oranda balıklar tarafından değerlendirilemeyerek su ve sedimente, buradan da doğal balıklara ve su kolonundaki bakterilere geçerek bakterilerde direnç gelişimine önemli katkıda

bulunmaktadır (Cabello, 2006; Rigos ve ark., 2004; Tekinay ve ark., 2005; Yıldırım ve Korkut, 2004)

Enfeksiyonlarda başarılı bir antibakteriyel tedavi, doğru teşhis, uygun doz rejimi ve klinik takiple mümkün olur. Tedavide kullanılacak uygun ilaç ve doz rejimi, ilaç, hasta ve hastalık etkenine ait parametrelerin birlikte değerlendirilmesi ile sağlanabilir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyogram sonucunun yanı sıra, uygun farmakodinamik ve farmakokinetik özellikteki antibiyotığın seçimi ve kullanılması da oldukça önemlidir (Baydan ve ark., 2012). Uygun bir dozaj rejiminin düzenlenmesi için, hastada emilme dağılma ve atılma ile ilgili farmakokinetik parametreler belirlenerek, hastada ilacın farmakokinetiğini değiştirebilen organ bozuklukları değerlendirilmelidir (Riviere ve Papich, 2009).

Kritik hastalıklarda daima ilaç kullanımı söz konusu olduğu halde, ilaçların kinetiklerine ait bilgiler yeterli değildir (Smith ve ark., 2012). Bu tip hastalıklarda ilacın emilme, dağılma, metabolizma ve atılmasına kadar giden aşamalarda ciddi değişiklikler olabilmektedir. Bu değişiklikler genel anlamda ilacın hastalık bölgesine yeterince ulaşamaması ya da aşırı dozdan toksikasyon ile sonuçlanabilir (Boucher ve ark., 2006). Teorik olarak enfeksiyon ve enflamasyon olaylarının karaciğer enzim fonksiyonlarında azalmaya ve ilacın kinetiğinde değişikliklere neden olduğu kabul edilmektedir (Morgan, 2009). Hastalıklarda, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulma, bağırsak hareketleri ve emilim yüzeyinde değişiklikler, dokuların kanla beslenmesinde bozulmalar vb görülebilmektedir (Boucher ve ark., 2006). İnsanlarda enfeksiyonlarda ilaçların kinetik profillerine ilişkin bilgiler bulunmakla birlikte, hayvanlarda bu bilgiler oldukça sınırlıdır. Balıklarda bu konu daha önemli bir sorundur ve enfekte balıklarda ise ilaçların kinetiğine ilişkin bilgiler yok denecek düzeydedir.

1.1 Farmakokinetik

Farmakokinetik, kısaca bir canlıya uygulanan ilacın uygulama noktasından emilmesi, vücutta dağılması, biyotransformasyonu ve atılmasına kadar giden olaylar zinciri olarak tanımlanır (Boucher ve ark., 2006).

Balıklar sucul poikiloterm canlılar olmaları nedeniyle anatomik ve fizyolojik olarak insanlar ve memelilerden farklıdırlar. Bu yüzden memelilerde antimikrobiyallerin farmakokinetiği hakkındaki bilgiler balıklar için yeterli olmamaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotiklerin büyük çoğunluğu insan sağlığında kullanılmaktadır. Halk sağlığı açısından, antibiyotik direnç gelişiminin engellenmesi ve etkili bir tedavi için optimal doz rejiminin belirlenmesi gerekmektedir. Optimal doz rejimi için ise farmakokinetik parametreler bilinmelidir (Ocenda ve ark., 2016).

1.1.1 İlaçların Emilmesi

İlaçların istenilen etkiyi gösterebilmeleri için organ ve dokularda belirli bir yoğunlukta bulunmaları gerekmektedir. İlk aşamada ilaç uygulama yerinden emilir, ikinci aşamada kan dolaşımı ile bu kesimlere dağılır. Emilme hızı ilacın uygulama yolu, emilme yüzeyi genişliği, damarlaşıma gibi faktörlerden etkilenir (Riviere ve Papich, 2009).

Biyoyararlanım verilen ilacın dolaşım sistemine değişikliğe uğramadan geçen kısmı olarak ifade edilir (Howland ve ark., 2009). Biyoyararlanımı ilacın kimyasal yapısı, uygulama şekli, canlının yaşı, hastalık ve presistemik eliminasyon etkileyebilmektedir (Traş ve Elmas, 2005).

1.1.2. İlaçların Dağılımı

Çeşitli yollarla verildikten sonra emilerek dolaşıma giren ilaçlar vücuttaki doku ve sıvı kesimlerine dağılırlar. Kan dolaşımına giren ilaç moleküllerinin önemli bir kısmı plazma proteinlerine bağlanarak taşınır. İlaçlar plazma proteinlerine yüksek, orta ve düşük olmak üzere üç grupta bağlanırlar. Plazma proteinlerine bağlanan ilaçların biyotransformasyonu ve atılma hızı genellikle yavaştır (Riviere ve Papich., 2009). Albumin asidik ilaçları, α -1 asit glikoprotein bazik ilaçları bağlamaktadır (Brunton ve ark., 2009).

1.1.3. İlaçların Metabolizması

Karaciğer ilaçların detoksifikasyonu için balıklarda öncelikli organdır ve ilaçların metabolizması memelilere benzerlik göstermektedir. Balık yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaçların; etkisi, metabolizması, dokularda yayılımı, yarılanma ömrü ve insan tüketimine sunulacak balıklarda ilaç kalıntı arınma süresi, sitokrom P450 sistemi tarafından değiştirilebilmektedir (Sekkin ve Kum, 2011).

1.1.4. İlaçların Atılması

İlaçların farmakokinetiğinin bilinmesi hastalıkların sağaltımında doğru doz rejimi ve zaman aralığının belirlenmesi yönünden oldukça önemlidir (Brunton ve ark., 2009). Gerek insanlarda ve gerekse evcil hayvanlarda kullanılan ilaçların farmakokinetik profillerine yönelik yeterli bilgiler bulunmakla birlikte, balıklarda yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Oysa poikiloterm olan bu canlılarda ilaçların kinetikleri su ısısı, tür, ilaç, hastalık etkeni ve sağlık durumu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir (Dağoğlu ve ark., 2004).

1.2. Florfenikol

Kloramfenikole kimyasala yapı yönüyle benzerlik göstermektedir, ancak p-metilsülfonil ve florun bulunmasıyla ondan ayrılmaktadır. Yapısında flor bulunması bakteriyel asetilazlara dirençli kılmaktadır (Riviere ve Papich, 2009). Florfenikol gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı bakteriyostatik etki göstermektedir. Bu etkisini duyarlı patojenlerin, protein sentezini gerçekleştiren 50 S ribozomal alt birimine bağlanarak gerçekleştirmektedir (Yang ve ark., 2013). Florfenikol pH 3-9 arasında iyonlaşmamakta ve sulu çözeltilerde az çözünmektedir. Lipofilik özelliğinden dolayı dokulara geçişi iyi olmaktadır (Anadon, 2008).

1.2.1. Farmakokinetiği

Florfenikolün metabolizması ile ilgili olarak yapılan in vivo çalışmalar kısıtlıdır. Buzağılarda 20 mg/kg dozunda kas içi olarak verilen florfenikol % 64'ü idrarla atılmıştır. İdrardaki metabolitler florfenikol amin, florfenikol alkol, florfenikol oksamik asit ve monokloro florfenikoldür. Florfenikol amin sığır karaciğerinde bulunan en uzun ömürlü metabolittir ve bu yüzden ilaç kalıntı arınma süreleri hesaplamasında kullanılmaktadırlar (Anadon, 2008).

Ağız ve kas içi uygulamalarında yavaş ancak iyi emilmektedir. Yağda güç çözüldüğü için kas içi uygulamalarda emilimi düşüktür. Atlantik salmonlarında ağızdan verildiğinde ≥ 95 emilir. Plazma proteinlerine ilgisi düşüktür. Sığırlarda kas içi ve derialtı uygulamada en yüksek yoğunluğa 3-3.5 saatte ulaşır (Riviere ve Papich, 2009).

1.2.2. Kullanımı

Florfenikol, balıklarda görülen bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde kullanılan sentetik ve geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Güçlü etkisi ve güvenli

olması insan tüketimine sunulacak hayvanların tedavisinde değerli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (Vue ve ark., 2002).

1.3. *Lactococcus garvieae*

Lactococcosis, streptokoklar sınıfında 1950 yılların sonlarında Japonya’da tanımlanmıştır.. Taksonomideki değişiklikler ve genotipik sınıflandırmalar ile cinsi *Lactococcosis* olarak belirlenmiştir. Etken, 1974 senesinde Japonya’da sarıkuyruk balıklarında salgınlar oluşturarak yüksek mortaliteye sebep olmuştur. *L. garvieae* gökkuşağı alabalıklarında İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Fransa, Avustralya, Güney Afrika ve Asya ülkelerinde de rapor edilmiştir (Kubilay ve ark., 2005). *Lactococcosis* etkeni olan *L. garvieae*, yaz aylarında su sıcaklığının 16°C ulaşmasıyla deniz ve tatlı su balıklarında ciddi ekonomik kayıplara sebep olan bir mikroorganizmadır (Vendrell ve ark., 2006). Gram pozitif fakültatif anaerobik, hareketsiz, sporsuz, oksidaz ve katalaz negatif, kanlı agarda alfa hemolitik, uygun besi ortamında 4°C ila 45°C arasında ürer (Türe ve ark., 2012).

1.4. Patoloji

Balıkların hiperakut ve hemorajik sepsisemisi olarak kabul edilen bu hastalığın gelişimi çevresel ortamdaki su sıcaklığı ve suyun mikrobiyal kalitesi ile yakından ilgilidir. Hastalık balıklarda % 50’den fazla mortaliteye neden olarak, ciddi ekonomik kayıplara yol açar. Deneysel enfeksiyonlarda etkenin inkübasyon periyodunun çok kısa ve mikroorganizmanın virülensinin yüksek olduğu bildirilmiştir. İntraperitoneal yolla deneysel olarak enfekte edilen sarı kuyruk balıklarında 2-3 gün sonra semptomların görüldüğü, gökkuşağı alabalıklarında ise 3 gün sonra ilk semptomların ve ölümlerin görüldüğü kaydedilmiştir. Hastalıkta semptom olarak iştahsızlık, melanozis, letarji, yüzüş bozuklukları görülmektedir (Vendrell ve ark., 2006).

Deneyssel oluşturulan enfeksiyonlar da damarlarda ödem, hiperemi ve kanamalar gibi mikroskopik bulgular elde edilmiştir. Lezyonlar genelde kalp, böbrek ve dalakta gözlenmiştir. Histopatolojik olarak ise karaciğer adenoid yapısında bozulma ve hepatositlerde dejenerasyonlar görölmüştür (Avcı ve ark., 2013). Doğal enfeksiyonda ise karaciğer remark kordonları düzensiz ve epitel hücreler çözünmüştür. Parenşimal veya vakuoler dejenerasyon ve hepatositlerin geniş nekrozu gözlenmiştir (Didinen ve ark., 2014).

Böbrek renal tubullerinde hyalin dejenerasyonu ve tubul boşluklarında hyalin yapıları bulunmaktadır (Didinen ve ark., 2014 ; Vendrell ve ark., 2006). Balıklarda şiddetli peritonitis ve yağ nekrozisi görölmektedir. Bağırsaklarda ise geniş yüzeysel erozyon ve pseudomembran benzeri yapılar oluşmuştur (Vendrell ve ark., 2006). Mide bezleri epitelinde dejenerasyon ve nekrozis tespit edilmiştir (Avcı ve ark., 2013).

1.5. Enfeksiyonlarda farmakokinetik

İlaçların farmakokinetiği akut ve kronik yangılar başta olmak üzere böbrek, karaciğer hastalıkları gibi hastalıkların meydana getirdiği fizyopatolojik olaylar ile değişmektedir. Bu olaylar ise ortak bir kavram olan akut faz cevabı olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonlarda salgılanan pirojenik sitokinler (İnterlöykinler, İnterferonlar, Tümör Nekrozis Faktör ve kaşektin) akut faz cevabına neden olan temel etkenler arasındadırlar, aynı zamanda metabolik değişikliklerde farmakokinetik parametreleri etkilemektedir (Traş ve Elmas, 2005).

Plazma proteinlerine bağlanma oranı hastalıklarla değişebilmektedir. Ağır karaciğer hastalıkları ya da nefrotik sendrom, hipoalbuminemiye ve sonuç olarak serbest fraksiyon armasına neden olur. Akut faz reaksiyonu artışı α -1 glikoprotein seviyelerini artırarak bazik ilaç bağlanmasını arttırır (Brunton ve ark., 2009).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, farmakokinetik çalışmaları sağlıklı hayvanlarda yapılmaktadır. Antibiyotikler ise klinik belirtilerin ortaya çıktığı enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Çalışma, *L. garvieae* enfeksiyonlarında kullanılan florfenikol'ün farmakokinetiğinin enfekte alabalıklarda belirlenmesi ve sağlıklı alabalıklardaki farmakokinetik parametrelerle karşılaştırılması amacıyla yapıldı.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 GEREÇ

2.1.1. Biyolojik Materyal

Etik kurul izni alınarak (Etik no: 42208298-040-04-02), Trabzon /Çaykara'daki bir işletmeden temin edilen 232 adet gökkuşuğı alabalığı, denemeden önce 1 ay kadar ortamda alışmaya bırakıldı. Deneyde Karadeniz suyunun deneme boyunca sıcaklığı 17-19°C, tuzluluk oranı % 0.18, suyun debisi 1 litre/dakika ve günlük su değişimi 15 kez olacak şekilde gerçekleştirildi. Oksijen miktarı 8.2 mg/ml'nin altına düşmedi. Çalışmada kullanılan havuzlar Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan havuzlar

2.1.2. Kimyasal Maddeler, Bakteri Suşu ve Çözeltiler

2.1.2.1. Kimyasal Maddeler, Bakteri suşu

- Asetonitril (Merck, 100030)
- Bactident oxydase (Merck, 1.13300.0001)
- Deiyonize su
- Dimetil formamide (Merck, 100397)
- Etil asetat (Merck, 100868)
- Fizyolojik tuzlu su (FTS)
- Florfenikol standardı (Fluka, Lot # 081K1680)
- Florfenikol teknik standartı (Zhejiang Pharmeceutical)
- Fosfat tampon çözeltisi (0.1 M- pH 7,0)
- Glasiyel asetik asit (Merck, K19581956)
- Lactococcus garvieae suşu (ATCC 43921)
- Metanol (Merck, 106007)
- MS-222 (Trikain Methanosulfonate, Sigma, E10521)

2.1.2.2. Çözeltiler

Analitik Çözeltiler

Florfenikolün kas içi ve gavaj uygulama çözeltisi (10 mg/ml): 1008 mg FF etkin maddesi 2ml dimetil formamide çözdürüldü FTS ile 10 ml'ye tamamlandı.

Florfenikol stok standardı (100 µg/ml): 1 mg FF etken maddesi tartıldı, 3 ml metanolde çözdürüldü ve 7 ml saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Ara stoklar %0.1 asetik asitle seyreltilti.

0.1 M Fosfat Tampon: 7.1 NaH₂PO₄ g tartıldı, saf suyla çözdürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

%10'luk Asetik Asit Çözeltisi: 100 ml glasiyel asetik asite, 900 mlt ultra saf su eklenerek hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

%0.1'lik Asetik Asit Çözeltisi: %10'luk asetik asit çözeltisinden alınan 1 ml alınarak ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.3. Araç ve Cihazlar

- Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) ekipmanı (PDA-Detector, LC Pump, C18 Kolon (250mm X 4,6 mm X 5 µm), Otomatik örnekleyici, Marka Shimadzu, Model 20-AT prominence, Japonya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich marka) (Plazma ekstraksiyonu, Ankara)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma marka) (Kan plazması eldesi, Trabzon)
- Deiyonize Su Cihazı (Tip 3 su, Millipore marka)
- Ultra Saf Su Cihazı (Tip 1 su, Millipore marka)
- Azot evaporatörü (VLM Evra marka)
- Hassas terazi (Sartorius marka) (FF standartların tartımı, Ankara)
- Hassas terazi (Monobloc marka) (Alabalıkların tartımı, Trabzon)
- Hassas terazi (Denver marka) (FF teknik standardı tartımı, Trabzon)
- Vortex (Velp marka)
- Çalkalamalı inkubatör (Edmun Bühler T-15 marka)

2.1.4. Laboratuvar Malzemeleri

Ağızlı vidalı cam tüp (10 ml), Li- heparinli vakumlu tüp (10 ml), balon joje (250-1000 ml), cam pipet (1-10 ml), Otomatik pipet (10-100, 100-1000 µl), petri, öze, beher, mezür, huni, ependorf tüp (1.5 ml), insülin enjektörü, balık sondası, rutin laboratuvar araç ve gereçleri ile cam malzemeler.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Metot Validasyonu

Metot validasyonunda seçicilik, doğruluk ve kesinlik, tekrar üretilebilirlik, doğrusallık, duyarlılık parametrelerine bakıldı.

Seçicilik

Yöntemin seçiciliği ve 3 farklı (0.75, 1.5, 3 µg/ml) konsantrasyonda farklı günlerde analitin 5 farklı kör plazmaya eklenmesiyle bakıldı. Kromatogramlarda herhangi bir kirlilik gözlenmedi.

Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, Kesinlik ve Tekrar Üretilebilirlik çalışmaları 3 farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) standardın plazmaya katılmasıyla farklı günlerde çalışıldı.

Tekrar üretilebilirlik

Tekrar Üretilebilirlik çalışmaları 3 farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) standardın plazmaya katılmasıyla üç tekrar olarak çalışıldı.

Doğrusallık

Plazmada FF standardının farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) yüklenmesiyle regresyon eğrisi çizildi.

Duyarlılık

Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), alabalık plazmasında, 3 farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) eğrileri çizdirilerek belirlendi.

Florfenikol standartının YBSK cihazında okutulması

Kalibrasyon eğrisi çizmek amacıyla, FF, standartları (Van de Riet ve ark 2003) yöntemi esas alınarak 3:7 oranında metanol ve ultra saf suda çözölürölerek 100 µg/ml'lik ana stok standardı olacak şekilde hazırlandı. Ana stoktan %0.1 asetik asit ile 0.375, 0.75, 1.5, 3 ve 6 µg/ml yoğunlukta ara standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar 20 µl hacimde YBSK cihazında okutuldu (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. YBSK cihazı

Geriye Kazanım Çalışması

Geri kazanım çalışmaları için ilaç verilmemiş alabalıklardan kan alınarak plazmaları çıkartıldı ve içlerine bilinen miktar (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) standart (FF) katıldı. FF'li plazmalar, plazma ekstraksiyon metoduna göre hazırlanarak YBSK cihazında okutuldu. Belirtilen miktarlardaki geri kazanım çalışması 3 tekrar yapılarak ortalama geri kazanım standart sonuçlara göre % olarak hesaplandı.

2.2.2. Alabalıklarda deney protokolü

Tartımla ortalama canlı ağırlıkları belirlenen 232 adet alabalık 30 günlük süre sonunda; 1-sağlıklı kas içi FF uygulama grubu, 2-sağlıklı gavaj FF uygulama grubu, 3-enfekte kas içi FF uygulama grubu, 4-enfekte gavaj FF uygulama grubu, 5-negatif kontrol (hiçbir işlem yapılmayan) grubu ve 6-enfekte pozitif kontrol grubu olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı (Çizelge 2.1.)

Balıklara FF uygulama (enjeksiyon ve gavaj), enfekte etme ve balıklardan kan alma işlemlerinden önce anestezik olarak Tricaine Methanosulfonate (MS 222) kullanıldı. Uygulamadan 48 saat önce balıklara yem verilmesi kesildi.

Deney Gruplarına;

Grup 1 deki alabalıklara 10 mg/kg c.a dozunda FF sırt bölgesinden kas içi enjekte edildi.(n:5)

Grup 2 deki alabalıklara 10 mg/kg c.a dozunda FF gavajla verildi.(n:5)

Grup 3 deki alabalıklara intraperitoneal olarak 1×10^6 cfu/0.1 ml *Lactococcus garvieae* ile enfekte edildi ve 48 saat inkubasyona bırakıldıktan sonra, 10 mg/kg c.a dozunda FF kas içi enjekte edildi.(n:5)

Grup 4 deki alabalıklara intraperitoneal olarak 1×10^6 cfu/0.1 ml *Lactococcus garvieae* ile enfekte edildi ve 48 saat inkubasyona bırakıldıktan sonra, 10 mg/kg c.a dozunda FF gavajla verildi.(n:5)

Grup 5 (Negatif kontrol), enfekte edilmemiş grup deneme boyunca izlendi.

Grup 6 (Pozitif kontrol), intraperitoneal olarak 1×10^6 cfu/0.1 ml *Lactococcus garvieae* ile enfekte edildi ve 48 saat inkubasyona bırakılarak deney boyunca izlendi.(n:10)

Çizelge 2. 1. Alabalık farmakokinetik çalışma grupları ve FF dozları

Gruplar	FF dozu	Uygulama Yolu
1. sağlıklı	10 mg/kg	I.M.
2. sağlıklı	10 mg/kg	Gavaj
3. enfekte (İntraperitoneal <i>L.garvieae</i> ile)	10 mg/kg*	I.M.
4. enfekte (İntraperitoneal <i>L.garvieae</i> ile)	10 mg/kg*	Gavaj
5. Negatif kontrol (enfekte edilmemiş)	-	-
6. Pozitif Kontrol (enfekte edilmiş)	-	-

*İlaç uygulamaları *L.garvieae* ile 48 saatlik inkubasyon sonrası

Alabalık farmakokinetik çalışmasında Grup 1, 2, 3, 4' teki alabalıklardan (n:5, her zaman dilimi için) 1., 3., 6., 12., 24., ve 48. saatlerde kuyruk venasından lityum heparinli tüplere 1-2 ml civarında kan alındı (Şekil 2.5) ve zaman geçirmeden 3000 g/dk'da 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar -18°C'de saklandı. Metoda uygun şekilde plazmalardan 500 µl kullanıldı.

2.2.2.1. *Lactococcus garvieae*'nin LD50 dozunun hesaplanması, alabalıkların enfekte edilmesi ve bakterinin geri izole edilmesi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalından temin edilen *L. garvieae* ATCC 43921 suşu Nutrient Broth içerisinde 30°C'de 18 saat çalkalamalı inkubatörde çoğaltıldı ve steril Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS) solüsyonuyla besi yerinden ayrıldı. PBS'le sulandırılmış bakterinin farklı dilüsyonlarda, Triptik Soy Agarda (TSA) sayımı yapılarak koloni oluşturan birim (cfu) hesaplandı (Türe, 2015). LD50 değerini belirlemek için; 3×10^5 , $1,1 \times 10^6$, $9,5 \times 10^6$ cfu dozlarında *L. garvieae* ile 10'ar balıkta enfeksiyon yapılarak Behrens Karber metoduna göre belirlenen LD50 dozu ile (1×10^6 cfu/0.1 ml) alabalıklar intraperitoneal enfekte edildi. Balıklarda 48 saatlik inkubasyonu takiben 10 mg/kg dozunda kas içi (Şekil 2.3) ve gavaj (Şekil 2.4) florfenikol uygulamalarına geçildi.

Bakterinin geri izole edilmesi amacıyla enfekte gruplarda inkubasyon periyodu esnasında ölen balıklardan böbrek ve karaciğerlerinden, TSA'ya ekimleri yapılmış aerobik şartlarda 25-30°C'de 24-48 saat inkube edilmiştir. Oksidaz testi için TSA'da üreyen bakterilerden steril öze yardımı ile saf koloni alınarak serum fizyolojik ile ıslatılmış test kağıtlarına yayılmış kağıt yüzeyinde renk değişimine bakılmıştır. Katalaz testi için TSA'da üremiş taze koloniden bakteri temiz bir lam üzerine damlatılmış bir damla %3'lük hidrojen peroksit üzerine yayılarak gerçekleştirilmiştir (Türe, 2015).



Şekil 2.3. Kas içi FF uygulaması



Şekil 2.4. Gavajla FF uygulaması



Şekil 2.5. Alabalıktan kan alımı

2.2.3. Plazmadan FF ekstraksiyonu

Plazma ekstraksiyonu ve mobil faz için Anadon ve ark. (2008) ile Van de Riet ve ark (2003)'nın metodu çeşitli modifikasyonlarla kullanıldı. FF analizi için 0.5 ml kan plazması alınarak %0.1 asetik asitle hacim, cam tüpte 1 ml'ye tamamlandı. Üzerine 1 ml 0.1 M fosfatlı tampon çözeltisi (pH:7) eklendi. Bunu da üzerine 4 ml etil asetat eklendi. 10 dakika boyunca yüksek hızda çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra üstteki 3 ml hacimdeki süpernatant başka bir cam tüpe ayrıldı. Geri kalan kısmın üzerine 2 ml daha etil asetat eklenerek işlemler tekrarlandı. 2 ml hacimdeki süpernatant alınarak daha önceden ayrılmış olan süpernantanta eklendi. Cam tüpteki 5 ml etil asetat 40°C azot evaporatörde uçuruldu (Şekil 2.6). Üzerine 1 ml mobil faz (725 ml ultra saf su, 265 ml asetonitril, 4 ml %10'luk asetik asit) eklenerek çözdürüldü. Viyallere konuldu ve YBSK cihazında 20 µl hacimde, 0.8 ml/dakika akış hızında, 25°C'de okutuldu.



Şekil 2.6. Azot evaporatör

2.2.4. Patolojik İncelemeler

Sağlıklı ve enfekte olmuş alabalıklardan alınan örnekler %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular 3-4 mm kalınlığında küçültüldü. Doku takip cihazında alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoxilen-Eosin (HE) ile boyandı. Hazırlanan preperatlar ışık mikroskopunda incelendi (Yücel ve Özkul, 2016).

2.2.5. Farmakokinetik Hesaplamalar ve İstatistik

Farmakokinetik hesaplamalar kompartımsız metoda göre, win-nonlin programı (Version 5.2, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel hesaplamalarda SPSS 15 for Windows paket programı kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrelerde gruplar arası karşılaştırmada student t testi, normal dağılmayanlarda Mann Whitney U non

parametrik testi kullanıldı. Buna göre hem gavaj içi hemde kas içi uygulamaların 12. saati normal dağılım göstermediğinden bu gruplarda Mann Whitney U non parametrik testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verildi.



3. BULGULAR

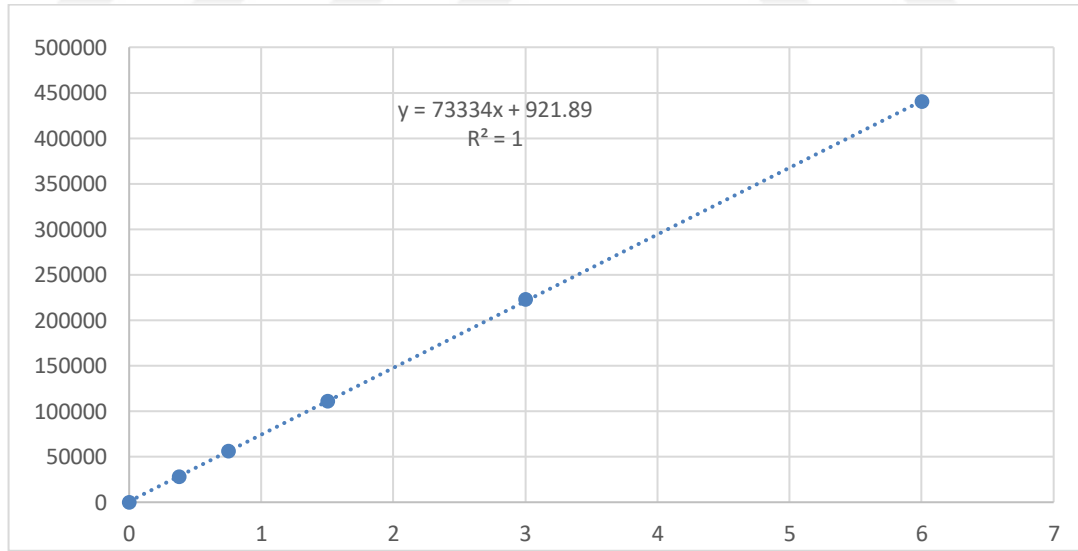
3.1. Validasyon Çalışma Bulguları

3.1.1. Standart FF kalibrasyon eğrisi bulgusu

Ana FF stok standardından 0.375, 0.75, 1.5, 3 ve 6 µg/ml yoğunlukta %0.1 asetik asit ile ara standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar 20 µl hacimde YBSK cihazında okutuldu. Farklı dozlarda cihazda elde edilen alanlar doğrultusunda kalibrasyon eğrisi çizdirildi (Şekil 3.1). Regresyon formülü ve katsayısı hesaplanarak Çizelge 3.1’de gösterildi.

Çizelge 3.1. FF standart regresyon formülü ve katsayısı

	Regresyon formülü	r^2
FF standart	$y = 73334x + 921,89$	1



Şekil 3.1. FF Standart kalibrasyon eğrisi

3.2.1. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluk ve kesinliği üç farklı yoğunlukta (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) FF standardının plazmaya katılarak hesaplanan geri kazanım sonuçları ve yüzdeleri Çizelge 3.2’de gösterildi.

Çizelge 3.2. Plazma FF validasyon çalışması doğruluk ve kesinlik sonuçları

Florfenikol	Konsantrasyon (µg/ml)	Geri kazanım ortalama (µg/ml) (n:3)	Geri kazanım (%)	Göreceli standart sapma RSD (%)
Alabalık plazma	0.75	0.65±0.09	87.32	14.05
	1.5	1.23±0.31	81.76	25.55
	3	2.52±0.42	84.00	16.84

3.2.2. Tekrar Üretilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışmaları farklı günlerde üç farklı yoğunlukta (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) belirlendi sonuçlar Çizelge 3.3’de gösterildi.

Çizelge 3.3. Plazma FF validasyon çalışması tekrar üretilebilirlik sonuçları

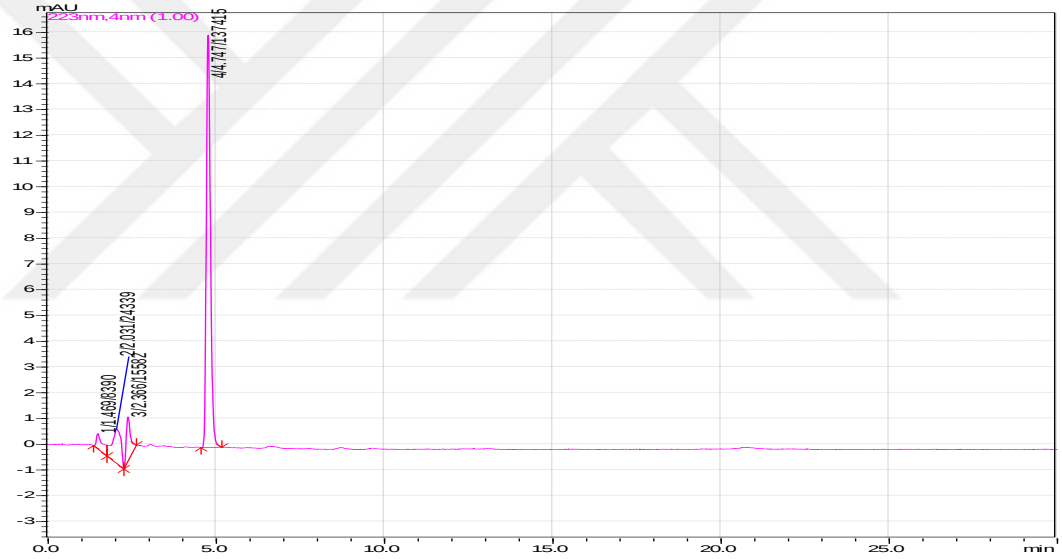
Florfenikol	Konsantrasyon (µg/ml)	Göreceli standart sapma RSD (%)
Alabalık plazma	0.75	5.99
	1.5	1.39
	3	4.97

3.2.3. Duyarlılık

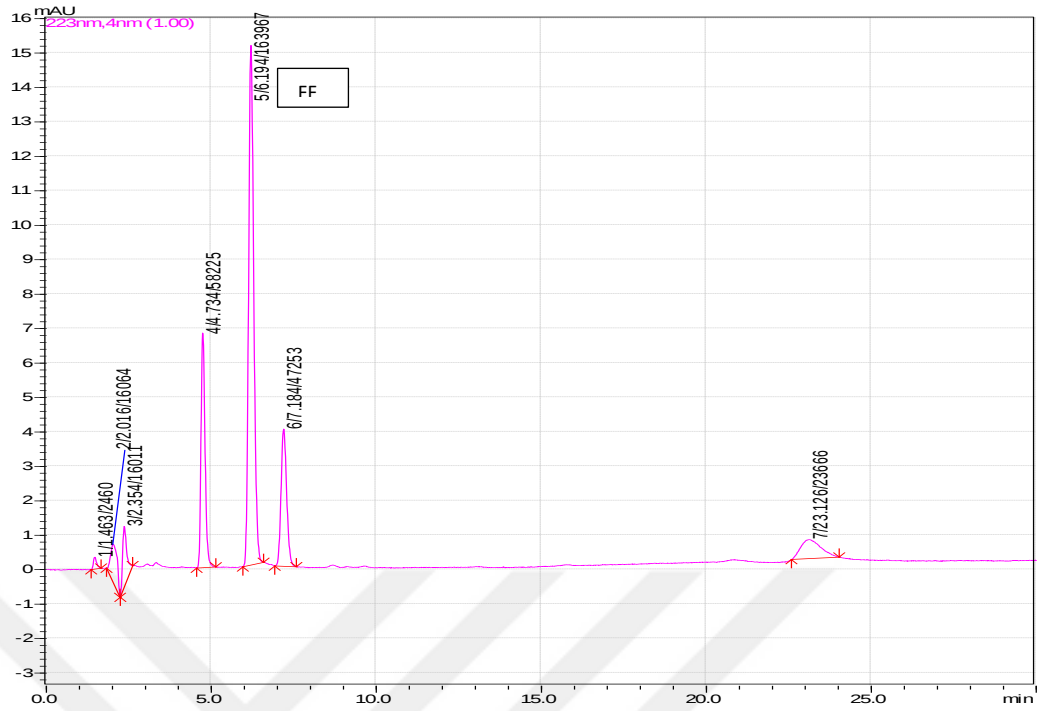
Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), alabalık plazmasında (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) 3 farklı dozda eğrileri çizdirilerek belirlenen LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.4’de verilmiştir. Kör plazma örneği kromatogramı Şekil 3.2’de, kör plazma örneğine 3 µg/ml’lik FF eklenmiş kromatogram Şekil 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Plazma validasyon çalışması FF tespit ve tayin limitleri

Florfenikol	Alabalık plazma	
	LOD (µg/ml)	0.0040
	LOQ (µg/ml)	0.0123



Şekil 3.2. FF eklenmemiş kör alabalık plazma örneğine ait kromatogram



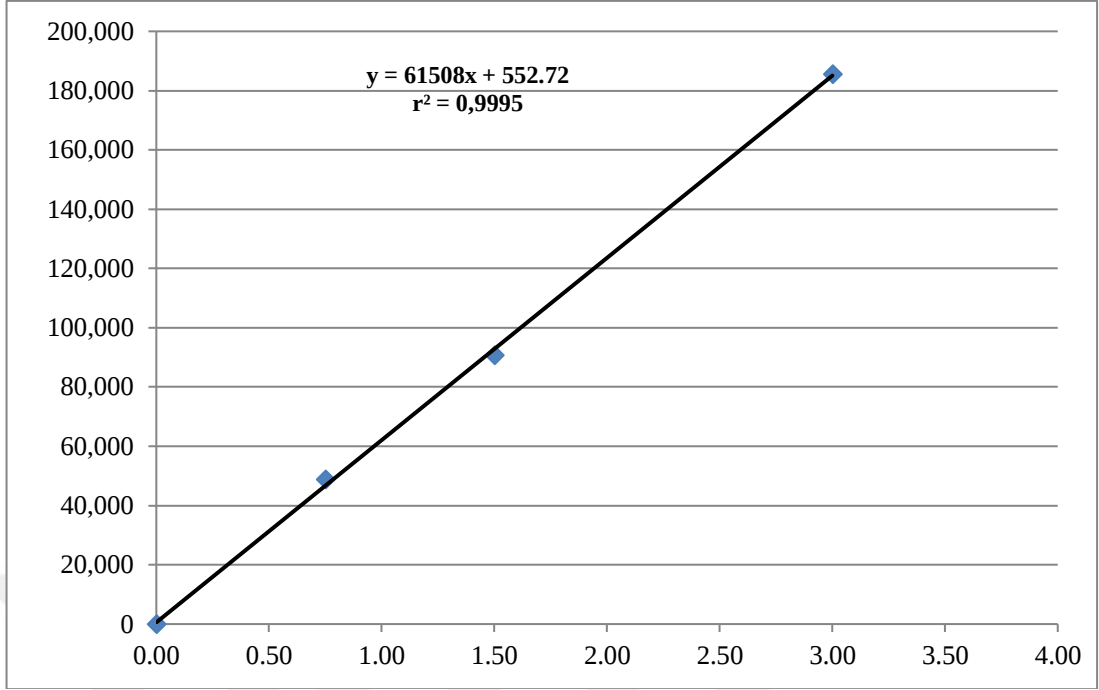
Şekil 3.3. FF (3 µg/ml) eklenmiş alabalık plazma örneğine ait kromatogram

3.2.4. Doğrusallık

Lineer regresyon metoduna göre kalibrasyon eğrisi ve regresyon doğrusu formülü, alabalık plazmasında FF üç farklı yoğunluğunda yüklenmesiyle (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) hesaplandı. Çizelge 3.5’de regresyon formülü ve regresyon katsayısı, geri kazanım eğrisi ise Şekil 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Plazma validasyon çalışması regresyon formülü ve katsayısı

	Regresyon formülü	r^2
Alabalık plazma	$y = 61508x + 552.72$	0.9995



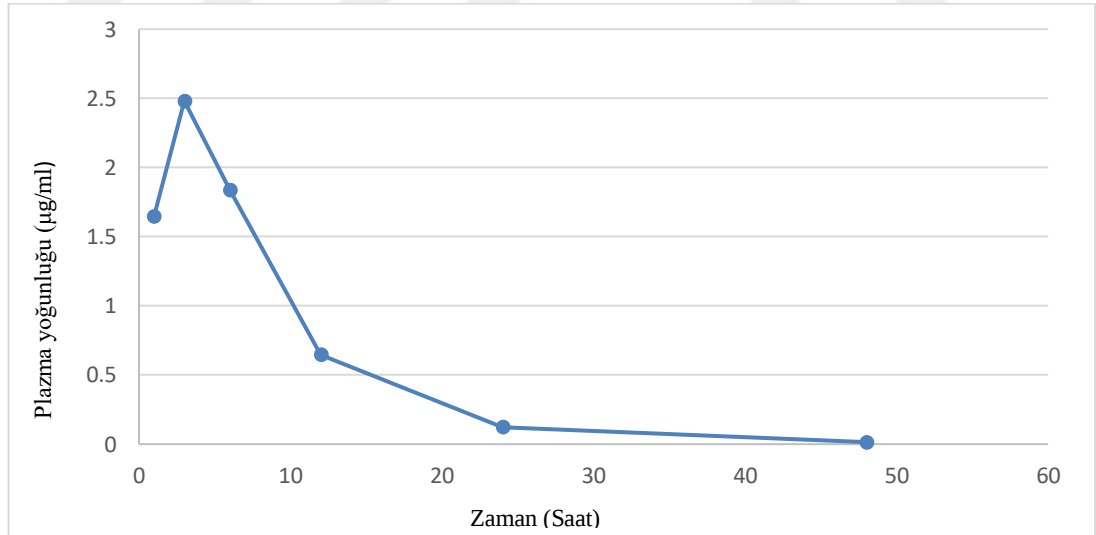
Şekil 3.4. Plazma FF geri kazanım eğrisi

3.3. Florfenikol plazma yoğunluk bulguları

FF uygulanan alabalık deney gruplarına ait zaman-yoğunluk değerleri Çizelge 3.6., 3.7., 3.8., 3.9’da, zamana bağlı değişim eğrileri ise Şekil 3.5., 3.6., 3.7., 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.6 Sağlıklı alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)

Zaman (Saat)	Plazma örnekleri FF yoğunlukları (n:5)					Ortalama	Standart Sapma
	1	2	3	4	5		
1	1.448	1.806	1.503	1.546	1.937	1.648	0.212
3	2.471	4.947	2.495	1.169	1.319	2.480	1.512
6	2.898	2.380	1.101	1.707	1.102	1.838	0.793
12	0.587	0.390	0.618	1.293	0.346	0.647	0.380
24	0.177	0.069	<LOD	<LOD	<LOD	0.123	0.076
48	0.013	0.015	<LOD	<LOD	<LOD	0.014	0.001

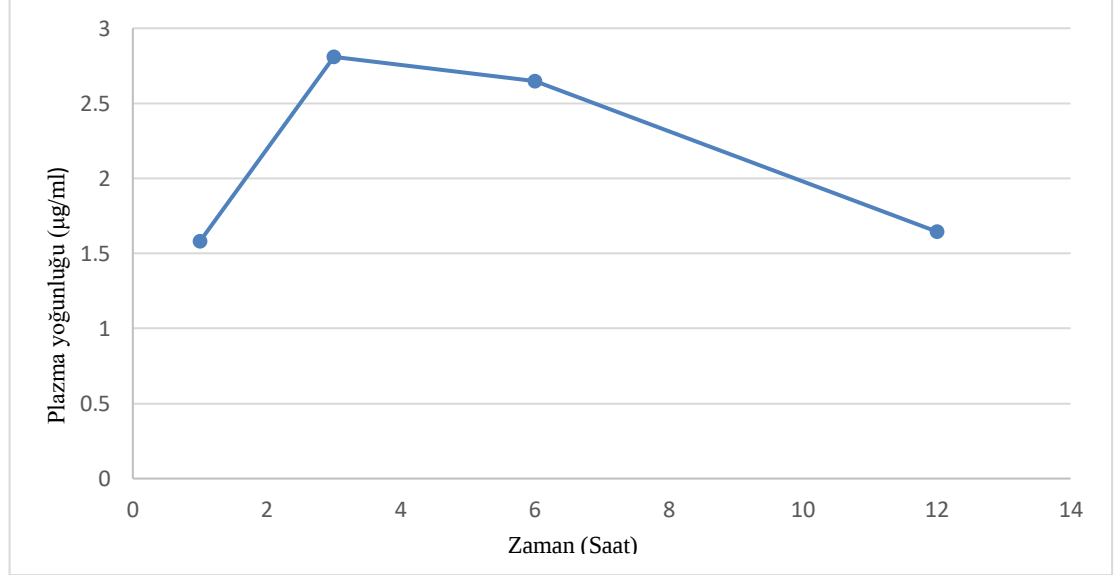


Şekil 3.5. Sağlıklı alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi

Çizelge 3.7. Enfekte alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)

Zaman (Saat)	Plazma örnekleri FF yoğunlukları (n:5)					Ortalama	Standart Sapma
	1	2	3	4	5		
1	0.716	2.161	2.304	0.980	1.735	1.579	0.705
3	3.599	2.709	2.384	2.286	3.0658	2.809	0.537
6	2.243	3.328	2.282	1.904	3.471	2.646	0.705
12	1.616	1.476	1.492	1.555	2.085	1.645	0.252
24*							
48*							

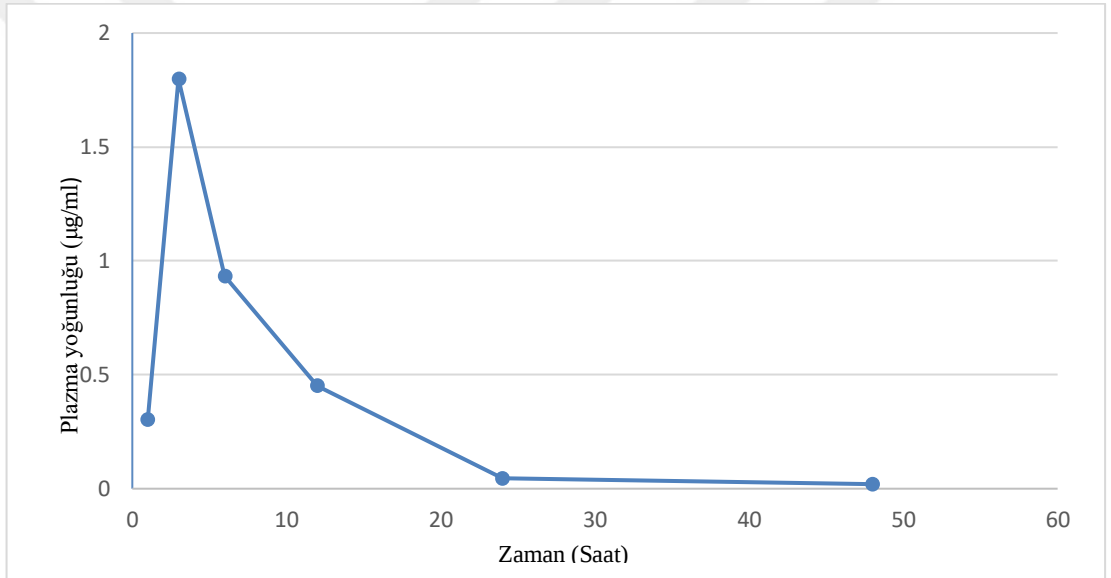
*24 ve 48. saatlerde <LOD



Şekil 3.6. Enfekte alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi

Çizelge 3.8. Sağlıklı alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulanması sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)

Zaman (Saat)	Plazma örnekleri FF yoğunlukları (n:5)					Ortalama	Standart Sapma
	1	2	3	4	5		
1	0.113	0.1792	0.612	<LOD	<LOD	0.301	0.270
3	1.304	1.900	1.432	1.738	1.686	1.612	0.240
6	0.633	0.872	0.357	1.154	1.649	0.933	0.496
12	0.502	0.394	0.391	0.335	0.634	0.451	0.118
24	0.024	0.032	0.063	0.031	0.071	0.044	0.021
48	<LOD	<LOD	0.019	<LOD	<LOD	0.019	

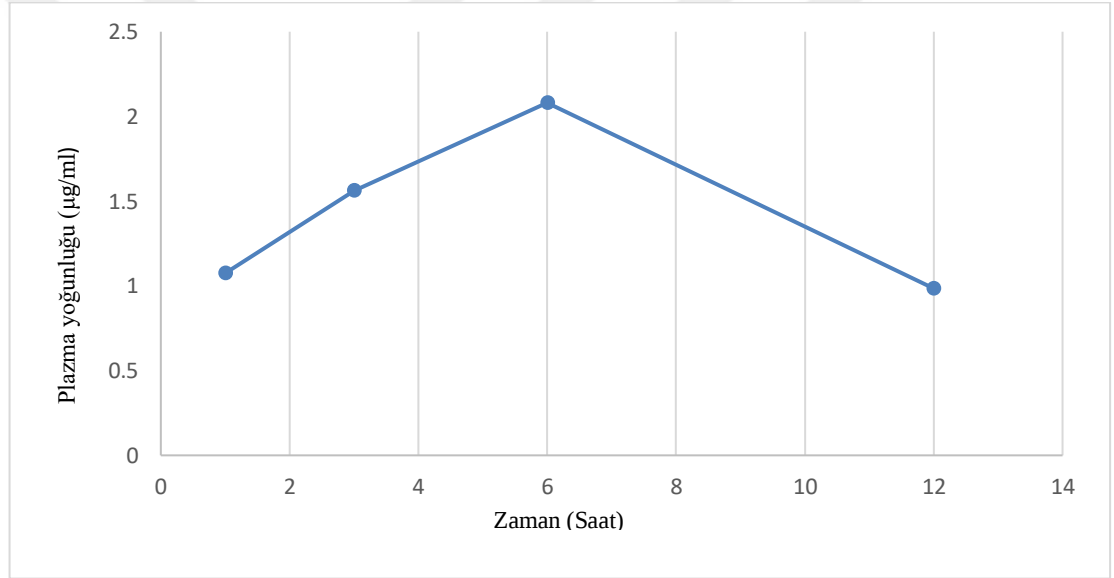


Şekil 3.7. Sağlıklı alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi (µg/ml)

Çizelge 3.9. Enfekte alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası farklı zaman dilimlerinde alınan plazma örneklerinde belirlenen FF yoğunlukları (µg/ml)

Zaman (Saat)	Plazma örnekleri FF yoğunlukları (n:5)					Ortalama	Standart Sapma
	1	2	3	4	5		
1	1.043	2.193	0.595	1.363	0.184	1.076	0.767
3	1.054	2.201	1.623	1.521	1.410	1.562	0.416
6	3.371	2.626	1.384	2.271	0.747	2.080	1.032
12	0.527	0.581	1.485	1.189	1.139	0.984	0.414
24*							
48*							

*24 ve 48. saatlerde <LOD



Şekil 3.8. Enfekte alabalıklarda gavaj 10 mg/kg dozunda FF uygulama sonrası alınan örneklerde ortalama plazma yoğunluğu-zaman eğrisi (µg/ml)

Kas içi ve gavajla 10 mg/kg dozunda FF uygulanan sağlıklı ve enfekte alabalık gruplarının plazma yoğunluğu-zaman değerlerinin ($\mu\text{g/ml}$) istatistiki karşılaştırılma sonuçları Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11’de verilmiştir. Her iki grupta 24. ve 48.saatlerde yeterli veri olmadığı için istatistiki değerlendirme yapılamadı.

Çizelge 3.10. Kas içi 10 mg/kg dozunda FF uygulama yapılan sağlıklı ve enfekte alabalık plazma yoğunluğu-zaman değerleri ($\mu\text{g/ml}$) istatistik karşılaştırması

	1.saat	3.saat	6.saat	12.saat
Sağlıklı alabalık FF değerleri	1.65±0.95	2.48±0.68	1.84±0.36	0.65±0.17
Enfekte alabalık FF değerleri	1.58±0.31	2.81±0.24	2.64±0.32	1.65±0.11**

** P<0.01. Aynı sütundaki gruplar arasındaki fark önemlidir.

Sağlıklı ve enfekte kas içi FF alabalık plazma yoğunluk-zaman değerleri 1., 3., 6. saatler arasında (P<0.05) benzer, 12. saatte ise önemli (P<0.01) fark gösterdi.

Çizelge 3.11. Gavaj yoluyla 10 mg/kg dozunda FF uygulama yapılan sağlıklı ve enfekte alabalık plazma yoğunluğu-zaman değerleri ($\mu\text{g/ml}$) istatistik karşılaştırması

	1.saat	3.saat	6.saat	12.saat
Sağlıklı alabalık FF değeri	0.30±0.16	1.61±0.11	0.93±0.22	0,45±0,05
Enfekte alabalık FF değeri	1.08±0.34	1.56±0.19	2.08±0.46	0.99±0.19*

* P<0.05. Aynı sütundaki gruplar arasındaki fark önemlidir.

Sağlıklı ve enfekte gavaj FF alabalık plazma yoğunluk-zaman değerleri 1., 3., saatlerde (P<0.05) benzer, 6. saatte P=0.055, 12. saatteki fark ise önemli (P<0.05) bulundu.

3.4. Farmakokinetik bulgular

Sağlıklı ve enfekte alabalık plazma örneklerinin win-nonlin (Version 5.2, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) programı kullanılarak hesaplanan FF'ye ait farmakokinetik parametre sonuçları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Sağlıklı ve enfekte alabalıklarda kas içi ve gavaj 10 mg/kg dozda uygulanan FF'ye ait farmakokinetik parametreler (n:5)

	Sağlıklı (İM)	Enfekte (İM)	Sağlıklı (Gavaj)	Enfekte(Gavaj)
T_{max} (s)	3	3	3	6
C_{max} (mg/L)	2.480	2.809	1.612	2.080
T_{last} (s)	48	12	48	12
C_{last} (mg/L)	0.014	1.645	0.019	0.984
AUC_{last} (mg.s/L))	25.170	26.235	13.792	17.836
AUC_{all} (mg.s/L)	25.170	26.235	13.792	17.836
V_zF_{obs} (L)	3.433	3.049	7.1842	3.117
Cl_F_{obs} (L/saat)	0.395	0.189	0.7146	0.388
Cl_F_{pred} (L/saat)	0.395	0.187	0.7186	0.388
MRT_{last}(s)	8.041	5.874	8.5062	5.884
F (%)			55 (%)	68 (%)

AUC_{all} : Dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan
AUC_{last} : Dozlama zamanından son ölçülebilir konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan
Cl_F_{obs} : Ekstravasküler uygulama için gözlenen toplam vücut klirensi (F=emilen doz kısmı)
Cl_F_{pred} : Ekstravasküler uygulama için tahmin edilen toplam vücut klirensi (F=emilen doz kısmı)
C_{last} : Son ölçülebilir konsantrasyon
C_{max} : Maksimum konsantrasyon
F : Nispi biyoyararlanım
MRT_{last} :Dozlama zamanından ölçülebilir son konsantrasyona kadar olan ortalama kalış süresi.
T_{last} :Son ölçülebilir konsantrasyon zamanı
T_{max} :Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi
V_zF_{obs} :Terminal fazda belirlenen dağılım hacmi (F= emilen doz kısmı)

Sağlıklı ve enfekte alabalıklarda kas içi 10 mg/kg dozda uygulanan FF'ün, maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (T_{max}) 3. saat olarak bulundu. Maksimum yoğunluk (C_{max}) sağlıklı alabalıklarda 2.480 µg/ml, enfekte alabalıklarda 2.809 µg/ml bulundu. Sağlıklı alabalıklarda son konsantrasyon (T_{last}) 48.saatte, enfekte alabalıklarda ise 12. saatte ölçüldü. Sağlıklı alabalıklarda ölçülebilen son konsantrasyon (C_{last}) 0.014 µg/ml, enfekte alabalıklarda 1.645 µg/ml olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, dozlama zamanından son ölçülebilir konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan AUC_{last} mg.s/L ve dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan AUC_{all} 25.170 mg.s/L, enfekte grupta ise 26.235 mg.s/L olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, terminal fazda gözlenen dağılım hacmi (Vz_F_{obs}) 3.433 L, enfekte alabalıklarda ise 3.049 L olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, ekstravasküler uygulama için gözlenen toplam vücut klirensi (Cl_F_{obs}) 0.395 L/saat, enfekte alabalıklarda ise 0.189 L/saat olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, ekstravasküler uygulama için tahmin edilen toplam vücut klirensi (Cl_F_{pred}) 0.395 L/saat, enfekte alabalıklarda ise 0.187 L/saat olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, dozlama zamanından ölçülebilir son konsantrasyona kadar olan ortalama kalış süresi (MRT_{last}) 8.041 saat, enfekte alabalıklarda ise 5.874 saat olarak bulundu.

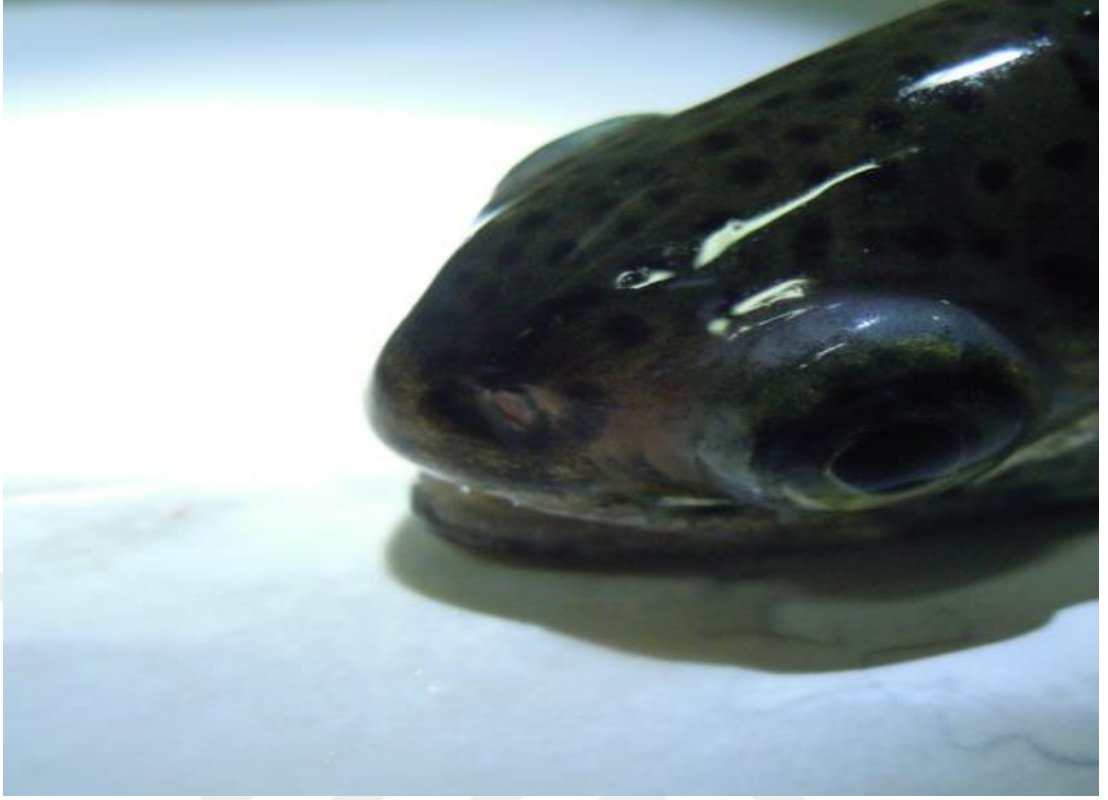
Sağlıklı ve enfekte alabalıklarda gavaj ile 10 mg/kg dozda uygulanan FF'ün, maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (T_{max}) sırasıyla 3. saat ve 6. saat olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, maksimum yoğunluk (C_{max}) 1.6124 µg/ml, enfekte alabalıklarda 2.0805 µg/ml, bulundu. Sağlıklı alabalıklarda son konsantrasyon (T_{last}) 48.saatte, enfekte alabalıklarda ise 12. saatte ölçüldü. Sağlıklı alabalıklarda ölçülebilen son konsantrasyon (C_{last}) 0.0199 µg/ml, enfekte alabalıklarda 0.984 µg/ml olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, dozlama zamanından son ölçülebilir konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan (AUC_{last}) mg.s/L ve dozlama zamanından gözlenen son konsantrasyona kadar eğri altında kalan alan (AUC_{all}) 13.792 mg.s/L, enfekte alabalıklarda ise 17.836 mg.s/L olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, terminal fazda gözlenen dağılım hacmi (Vz_F_{obs}) 7.1842 L, enfekte alabalıklarda ise 3.117 L olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, ekstravasküler uygulama için gözlenen toplam vücut klirensi (Cl_F_{obs}) 0.7146 L/saat, enfekte

alabalıklarda ise 0.388 L/saat olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, ekstravasküler uygulama için tahmin edilen toplam vücut klirensi (Cl_{F_pred}) 0.7186 L/saat, enfekte alabalıklarda ise 0.388 L/saat olarak bulundu. Sağlıklı alabalıklarda, dozlama zamanından ölçülebilir son konsantrasyona kadar olan ortalama kalış süresi (MRT_{last}) 8.5062 saat, enfekte alabalıklarda ise 5.884 saat olarak bulundu. Nispi biyoyararlanım (F) sağlıklı ve enfekte gruplarda sırasıyla %55 ve %68 olarak bulundu.

3.5. Patolojik ve mikrobiyolojik bulgular

3.5.1. Patolojik Bulgular

Enfekte gruplarda inkubasyon periyodunda ve uygulamalar esnasında, durgunluk, düzensiz yüzme, periorbital hemoraji, ekzoftalmus, renk değişikliği, ascites, kornea ülseri gibi klinik semptomlar gözlemlendi (Şekil 3.9., 3.10). Yapılan nekropsilerde karaciğerde lokal kanamalar ve asites gözlemlenmiştir (Şekil 3.11., 3.12.). Histopatolojik incelemeler amacıyla sağlıklı ve enfekte gruplardan alınan karaciğer, böbrek, bağırsak ve solungaç numuneleri %10'luk formaldehit ile tespit edilerek Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'na getirilerek incelendi. Yapılan incelemelerde sağlıklı ve enfekte grubun solungaç, karaciğer, dalak, böbrek, bağırsaklarında histopatolojik olarak herhangi bir fark gözlemlenmedi (Şekil 3.13).



Şekil 3.9. Gözlerde ekzoftalmus



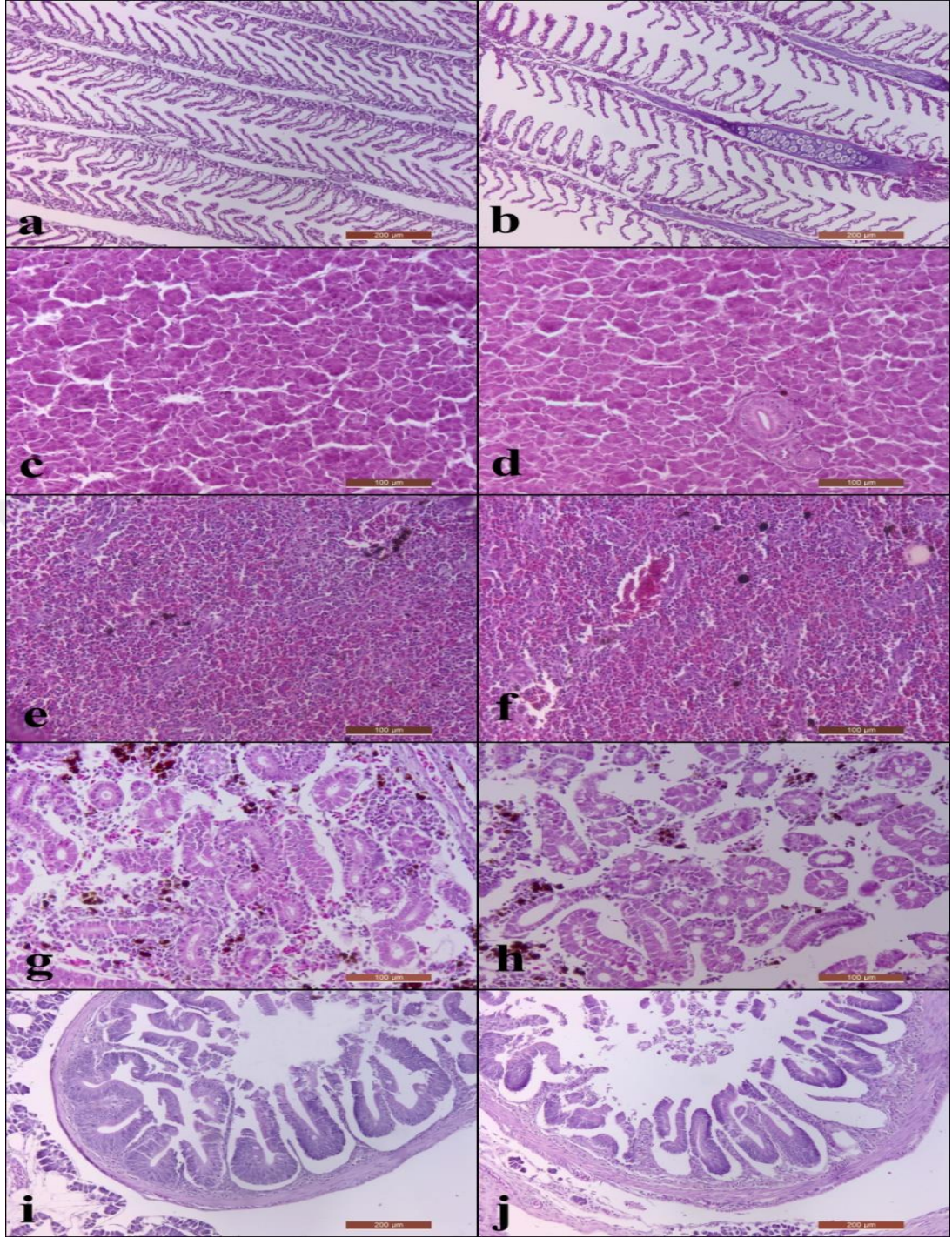
Şekil 3.10. Gözlerde periorbital kanama



Şekil 3.11. Karaciğerde kanamalar



Şekil 3.12. Karın boşluğunda sıvı



Şekil 3.13. Histolojik bulgular (Enfekte edilmeyen balığa ait solungaç (a), karaciğer (c), dalak (e), böbrek (g), bağırsak (i) histolojik görünümü; Enfekte edilen balığa ait solungaç (b), karaciğer (d), dalak (f), böbrek (h), bağırsak (j) histolojik görünümü)

3.5.2. Mikrobiyolojik Bulgular

Triptik Soy Agar'da üreyen kolonilerin toplu iğne başı büyüklüğünde düzgün kenarlı olduğu görülmüştür (Şekil 3.14). Kolonilerle yapılan biyokimyasal testlerde Oksidaz ve Katalaz negatif olarak bulundu. Klinik belirtiler ve biyokimyasal test sonuçları izole edilen bakterinin *L.garvieae* olduğunu doğruladı.



Şekil 3.14. TSA'da üreyen koloniler

4. TARTIŞMA

Enfeksiyonların sağaltımında ilaçların uygun doz ve sürede kullanılması, ilaçtan beklenen tam etkinin görülmesi için önemlidir. Sağaltım antibakteriyellerin uygun doz ve sürede kullanım, hem tedavi başarısı hem de antibakteriyel direnç gelişiminin önlenmesi yönünden önemlidir. İlaçlar için uygun doz ve uygulama sürelerinin belirlenmesi farmakokinetik çalışmalarla mümkün olabilmektedir. İlaçların farmakokinetik çalışmaları çoğunlukla sağlıklı bireylerde yapılmakta, ancak uygulamalar hastalarda gerçekleştirilmektedir (Riviere ve Papich, 2009).

İlacın vücuttaki kinetiği çok sayıdaki organın normal fonksiyonuna bağlı, emilme, dağılma, metabolize edilme ve atılmadan oluşan bütünsel bir olaydır. Bu organların herhangi birindeki patolojik değişiklik sadece o organla ilgili ilaç kinetiğini değil, diğer organlardakini de etkiler. Organlarda işlev bozukluğuna neden olabilecek nitelikteki enfeksiyonların (kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrek vb) ilaçların farmakokinetiğine etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, organlardaki patolojik bozuklukların ilacın emilme düzeyi, görünür dağılım hacmi, plazma proteinlerine bağlanma oranı, plazma yarı ömrü, plazma ve karaciğer klirensi gibi faktörlerde değişikliklere neden olabildiği kaydedilmiştir (Wilson ve Bromberg, 1981).

Ağızdan uygulanan ilaçlarda sindirim sisteminden, özellikle de bağırsaklardan emilme, ilacın ilk farmakokinetik aşamasını oluşturur. Sindirim sisteminden ilacın emilim düzeyini ilacın partikül büyüklüğü, çözünürlüğü, lipofilitesi, iyonizasyon durumu ve dissosiasyon hız sabiti gibi ilaçla ilgili faktörler etkileyebileceği gibi, sindirim sistemi pH'sı, bölgesel kan akış miktarı, emilme yüzey alanı, bağırsak motilitesi, boşluk/doluluk gibi canlının sindirim sistemine ilişkin faktörler de önemli ölçüde etkiler (Smith ve ark., 2012).

Evcil hayvanlarda enfeksiyonların sağaltımında doğru doz ve sũrede ilaç kullanımı sadece sağaltımın etkinliği açısından değil, halk sağlığı yũnũnden, oluşabilecek ilaç kalıntıların ønlenmesi ve vũcuttan ilacın atılması için gereken sũrenin (İlaç Kalıntı Arınma Sũresi-İKAS) doğru şekilde tespit edilmesi açısından da ønemidir. Oysa hayvanlarda da ilaç kullanım doz ve sũreleri, ilaç prospektũslerinde verilen ve sağlıklı hayvanlarda yapılanalışmalardan elde edilen veriler uzerindendir. Enfeksiyonlarda değişen ilaç farmakokinetik profilinin belirlenmesi, doğru doz, uygulama sũresi ve sıklığının tespiti yanında, doğru İKAS değerinin belirlenmesi için de ønemlidir. Bu durum, ilaç farmakokinetiğinin yaşadıkları ortamın ısısına bağlı olarak değişim gøsterdiđi poikiloterm canlılarda (balık gibi) daha da ønemlidir (Ocenda ve ark., 2016). Belirtilen nedenle balık gibi su hayvanlarında hem yaşadıkları su ortamına ve hem de enfeksiyona gøre ilaçların farmakokinetiğinin belirlenmesi, doğru bir tedavi için elzemdir. Bu kapsamda, alabalıklarda ciddi kayıplara neden olan başta *Lactococcus garvieae* enfeksiyonları olmak uzeri, balık enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan florfenikolũn farmakokinetik profilinin hastalık durumlarında ortaya konulması, Minimal İnhibitør Konsantrasyonun (MİK) uzerinde plazma ilaç yoğunluğuna ulaşma ve zamana bağlı olarak bu konsantrasyonu sũrdũrmesinin sağlanması tedavi başarısı ve direnç gelişiminin engellenmesi açısından oldukça ønemlidir (Zhao ve ark., 2011).

L. garvieae ile enfekte alabalıklarda FF'ũn farmakokinetik profilini belirlemek amacıyla yapılan bualışmada, plazmadan FF analizi için yararlanılan Anadon ve ark. (2008) ile Van De Riet ve ark. (2003)'na ait metotlar valide edilerek kullanılmıştır. Alabalık plazmasından FF analizinin metot validasyonu için yapılanalışmasında doğruluk ve kesinlik, tekrar uzerilebilirlik, duyarlılık ve doğrusallık yũnũndenalıřma sonuçları metodun spesifik, geçerli ve geri kazanım bakımındanalışılan u konsantrasyonda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) yũksek olarak (sırasıyla %87.32, 81.76 ve 84) bulunmuştur (izelge 3.2). Alabalık plazmasından lineer regresyon metoduna gøre kalibrasyon eğrisi ve regresyon doğrusu formũlũnũn hazırlanması için alabalık plazmasına katılan FF'ũn u farklı (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) konsantrasyonunun verdiği eğrinin r^2 değerı 0.9995 olarak bulundu (izelge 3.5).

Metodun laboratuvar koşullarında plazmadan FF analizi için tespit (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 0.0040 ve 0.0123 µg/ml olarak bulundu. Benzer diğer çalışmalarda LOQ değeri 0.03µg/ml (Feng ve ark., 2008); 0,05 µg/ml (Lim ve ark., 2010); 0.02 µg/ml (Anadon ve ark., 2008); 0.39 µg/ml (Lewbart ve ark., 2005); 0.03 µg/ml (Pourmolaie ve ark., 2015) ve 0.015 µg/ml (Yang ve ark., 2013) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada belirlenen FF için LOQ değeri (0.0123 µg/ml) yönünden metodun benzer çalışmalardan elde edilenlere göre daha hassas olduğu görülmüştür. Geriye kazanım değerlerinin ise Feng ve ark. (2008) (%89.16–96.13); Pourmolaie ve ark. (2015) (%92.3-98.1); Yang ve ark. (2013) (%81.4-89.0) tarafından yapılan çalışmalardan elde edilenlere benzerlik (%81.76-87.32) gösterdiği gözlenmiştir.

Deneyisel çalışmada, ilaç uygulamadan önce deney grubunda bulunan ve intraperitoneal yolla *L. garvieae* ile enfekte edilen balıklar ile pozitif kontrol grubunda 48 saatlik bekleme süresinin sonunda yapılan gözlemde, enfekte balıklarda tek veya iki taraflı ekzoftalmus, düzensiz yüzmeye, deride renk değişikliği, karın boşluğunda sıvı toplanması, karaciğerde peteşiyel kanamalar makroskopik bulgular ve balıklardan alınan örneklerde yapılan bakteriyolojik analizlerde etkenin izolasyonu ile enfeksiyon geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 3.9., Şekil 3.10., Şekil 3.11., Şekil 3.12., Şekil 3.13). Makroskopik bulgular Avcı ve ark. (2013)'nın yaptığı araştırmanın bulgularına benzerlik göstermiştir.

Çalışmada farmakokinetik hesaplamalar kompartımsız metoda göre yapılmıştır. Araştırmanın ilaç plazma yoğunluğu-zaman değerleri ile farmakokinetik analiz sonuçları *L.garvieae* ile enfekte alabalıklarda FF'ün farmakokinetik profilinin enfeksiyona bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir (Çizelge 3.12). Sağlıklı alabalık kas içi 10 mg/kg uygulanan FF'ün bazı plazma değerlerine bakıldığında (Çizelge 3.6) ortalama değerler bakımından en yüksek düzeyin 3. saatte görüldüğü, bu saatten sonra düzeyin düştüğü, düşüşün özellikle 12. saatten itibaren daha belirgin olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Bireysel değerlere göre, 24. ve 48. saatte 3 balıkta, plazma FF değeri < LOD bulunmuştur. Bu durum ağırlıklı olarak sağlıklı balıklarda FF'ün 12. saatte önemli ölçüde atıldığını göstermektedir. Kas içi 10 mg/kg FF uygulanan enfekte alabalık değerlerine bakıldığında ise (Çizelge 3.7) ortalama

değerler bakımından yine en yüksek konsantrasyonun 3. saatte olduğu, fakat 6. saate kadar hemen hemen bu düzeyin korunduğu (platoya yakın) (Şekil 3.7), 12. saate ise yaklaşık yarı yarıya düştüğü görülmektedir. Enfekte grupta sağlıklı gruptan farklı olarak 12. saatten sonra >LOD değer alınamamıştır. Fakat genel anlamda gerek sağlıklı ve gerekse enfekte kas içi grubunda ilacın (>LOD) atılımı 12. saate gerçekleşmektedir.

Sağlıklı alabalıklara gavaj yoluyla 10 mg/kg uygulanan FF'ün plazma değerlerine bakıldığında (Çizelge 3.8) ortalama değerler bakımından en yüksek ilaç düzeyine sağlıklı ve enfekte kas içi grubunda olduğu şekilde 3. saatte ulaşıldığı, bu saatten itibaren ilacın plazmada azaldığı, en belirgin düşüşün yine 12. saate olduğu görülmüştür. Ancak, ilacın < LOD değerlere ulaşması 48. saate olmuş, yani atılma süresi uzamıştır (Şekil 3.8). Bu durum gavaj ile uygulanan ilacın, kas içine göre sindirim sisteminde parçalanma, çözülme, emilme gibi aşamalara uğramasından kaynaklanmıştır (Riviere ve Papich, 2009).

Enfekte alabalıklara gavaj yoluyla 10 mg/kg uygulanan FF'ün plazma değerlerine bakıldığında ortalama değerler bakımından ilacın 1 ve 3. saatler arasında yakın konsantrasyon gösterdiği (platoya yakın), en yüksek ilaç düzeyine 6. saate ulaşıldığı, 12. saatten sonra da değerlerin < LOD olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9). Sonuç olarak kas içi ve gavaj yoluyla 10 mg/kg dozda uygulanan FF'ün plazma yoğunluğu-zaman eğrisi genel anlamda enfekte alabalık gruplarında sağlıklılara göre bir artış göstermiş, ancak bu artış özellikle 12. saate anlamlı ($P<0.01$) (Çizelge 3.10) bulunmuştur.

Balık farmakokinetik çalışmalarında, özellikle küçük balıklarda, gelişmiş deney hayvanlarında olduğu şekilde tüm zaman dilimleri için aynı hayvandan tekrarlı kan alma şansı olmadığından istatistik analizler gerçekleştirilememektedir. Belirtilen nedenle istatistik değerlendirme yapılamayan bu çalışmanın farmakokinetik analiz sonuçlarına göre (Çizelge 3.12) kas içi FF uygulanan sağlıklı ve enfekte alabalık gruplarının T_{max} (s), C_{max} (mg/L), T_{last} (s), C_{last} (mg/L), AUC_{last}

(mg.s/L), $V_z F_{obs}$ (L), Cl_F_{obs} (L/saat) ve MRT_{last} (s) farmakokinetik parametre değerleri sırasıyla 3, 3; 2.480, 2.809; 48, 12; 0.014, 1.645; 25.170, 26.235; 3.433, 3.049; 0.395, 0.189 ve 8.041, 5.874 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında C_{max} ve T_{max} değerleri her iki grupta birbirine yakın çıkmıştır. Bu durum FF'ün kas içi emilmesi yönünden sağlıklı ve enfekte gruplar arasında belirgin bir farkın olmadığını, bunun muhtemel nedeninin ise ilacın kas içi uygulamasıyla ilk geçiş etkisine uğramamasından ileri geldiği düşünülmektedir. Buna karşılık T_{last} ve C_{last} değerlerine bakıldığında sağlıklı grupta ilacın 48. saate kadar atıldığı, enfeksiyon grubunda ise bu sürenin neredeyse yarı yarıya olacak şekilde kısaldığı görülmektedir. Bu durum (Smith ve ark., 2012)'ninde bildirildiği şekilde muhtemelen enfeksiyona bağlı olarak ilacın kanda bağlandığı plazma proteinlerinin miktarındaki azalmadan ve/veya bağlanma ilgisindeki azalmadan ileri gelmektedir. Kas içi sağlıklı ve enfekte FF grubunun Cl_F_{obs} ve $V_z F_{obs}$ değerlerine bakıldığında enfekte grupta klirensin ve dağılım hacminin düştüğü, düşüşün özellikle klirens bakımından sağlıklı grubun değerinin yarısı düzeyinde ve daha belirgin şekilde olduğu görülmektedir. Enfekte gruptaki klirenste azalma, organ patolojik değerlendirmelerinde görünür bulgular elde edilemese de enfeksiyona bağlı böbrekteki herhangi bir etkilenmeden ve buna bağlı ilacın böbrekler yoluyla atılmasındaki yavaşlamadan kaynaklanmış olabilir.

Literatür taramalarda FF'ün farmakokinetiğine yönelik olarak tuzlu suda yetiştirilen sağlıklı ve enfekte alabalıklarda Pinault ve ark. (1997)'nin yaptığı biyoyararlanım ve kalıntı çalışmasının dışında, alabalıklarda, özellikle enfekte alabalıklarda FF'ün farmakokinetiğine ilişkin yapılmış bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak, FF'ün diğer tür sağlıklı balıklarda farmakokinetiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Feng ve ark., 2008; Yang ve ark., 2013).

Enfekte alabalıklarda böbrek klirens değeri düşüktür. Nitekim yapılan pek çok çalışmada, böbreklerde *L. garvieae* ile enfeksiyona bağlı, vasküler değişiklikler, epitelyal dejenerasyon (Eldar ve Ghittino 1999; Algöet ve ark., 2009), melanomakrofaj merkezde artış şeklinde böbreklerde hasar olduğu bildirilmiştir (Avcı ve ark., 2013). Bu çalışmada hasarın daha belirgin şekilde gözlenememesi muhtemelen enfeksiyon gözlenir gözlenmez ilaç uygulamasına başlanmış

olmasından ve kullanılan metotlarındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Zira bu çalışmada ölümcül etki değil, saha çalışmasına uygun şekilde enfeksiyonlarda klinik bulgular başlar başlamaz ilaç uygulaması yapılmasına yönelik kinetik çalışma hedeflenmiştir. Sonuç olarak enfekte kas içi FF uygulama grubunda gerek klirens ve gerekse dağılım hacmindeki azalma ilacın AUC_{last} değerinin yükselmesine neden olmuştur.

Araştırmada gavaj yoluyla FF uygulanan sağlıklı ve enfekte grubunun T_{max} (s), C_{max} (mg/L), T_{last} (s), C_{last} (mg/L), AUC_{last} (mg.s/L), $Vz_{F_{obs}}$ (L), $Cl_{F_{obs}}$ (L/saat), MRT_{last} (s) ve F (%) farmakokinetik değerlerine bakıldığında (Çizelge 3.12) sırasıyla, 3, 6; 1.6124, 2.080; 48, 12; 0.0199, 0.984; 13.792, 17.836; 7.1842, 3.117; 0.7146, 0.388; 8.5062, 5.884 ve %55, %68 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar T_{max} ve C_{max} değerleriyle ilacın sindirim sisteminden emilmesi bakımından sağlıklı ve enfekte grup arasında belirgin bir fark olduğunu göstermiştir. Enfekte grubunda ilacın emilme süresi uzamış, fakat mukozalardan/biyolojik membranlardan geçen ilaç miktarında artış söz konusu olmuştur. Emilmedeki uzama muhtemelen enfeksiyona bağlı sindirim sistemi florası, pH'sı ve/veya enzimatik etkinliklerdeki değişmeye bağlı olarak ilacın dağılması ve çözünmesindeki gecikmeden ve/veya bağırsak hareketlerindeki yavaşlamadan kaynaklanmış olabilir. Buna karşılık bağırsak patolojik sonuçlarında görünür bulgu olmasa da muhtemelen mukozalardaki dejenerasyon ise emilen miktarı artırmıştır. Nitekim, enfekte edilen gruptaki ilacın nispi biyoyararlanımındaki artış da bunu doğrulamaktadır (Çizelge 3.12). Smith ve ark. (2012)'nin yaptığı çalışmaya göre bağırsak motilitesindeki azalmanın ilacın C_{max} ' e ulaşma süresini kısalttığı ve AUC değerini azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada enfekte gavaj grubunda AUC değerindeki artış, muhtemelen kas içi grubunda olduğu şekilde klirensdeki azalma, plazma proteinlerine bağlanma ilgisinde artış ve buna bağlı dağılım hacmindeki azalmadan ileri gelmektedir. Smith ve ark (2012)'nin çalışmasında da plazma proteinlerine bağlanmanın dağılım hacmini ve serbest ilaç miktarını düşürdüğü vurgulanmıştır. Enfekte gavaj grubunda, enfekte kas içi grubunda olduğu gibi ilacın T_{last} değerinin 12 saat olması, ilaç hangi yoldan verilirse verilsin muhtemelen plazma protein düzeyindeki bozulma ve bağlanma ilgisindeki değişiklikten dolayı ilacın benzer şekilde atıldığını göstermektedir.

Tatlı suda 25°C de 10 mg/kg dozunda kırmızı pacu balığına kas içi olarak tek doz florfenikol uygulanmasıyla, alınan kan numunelerinde 3. saat plazma konsantrasyonu 1.09 µg/ml, atılma yarı ömrü $t_{1/2}$ 4.25 saat olarak ölçülmüştür. T_{max} ve C_{max} değeri salmonoid balıkların deney protokolünü temel alması nedeniyle saptanamamıştır. Çalışmada florfenikolün *Aeromonas* ve *Vibrio* türlerinin MİK konsantrasyonunun üstünde plazma yoğunluğunun sağlayabilmesi için 30 mg/kg dozunda 24 saatte bir kas içi uygulama yapılması gerektiği bildirilmiştir (Lewbart ve ark., 2005).

25°C'de florfenikolün gavajla 10 mg/kg tek doz sarı kedi balıklarında kullanıldığında V_{dss} değeri 2.52 L/kg, T_{max} değeri plazma 7.25 saat, $t_{1/2\beta}$ 21.66 saat, FF ve FFA'nın deri ve kaslarda toplam miktarının sırasıyla 1., 3. ve 5. günlerde 3.39, 0.5, ve 0.062 µg/g olarak belirlenmiştir. Çalışmada florfenikolün hızlı emildiği geniş emilim hacmine sahip olduğu ve yavaşça atıldığı tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2013).

Kore kedi balığına $23.5 \pm 1.7^\circ\text{C}$ de florfenikol 20 mg/kg dozunda damar içi ve oral verilmiş, oral olarak $t_{1/2}$, C_{max} , T_{max} ve oral biyoyararlanım (F) sırasıyla, 15.69 ± 2.59 saat, 9.59 ± 0.36 µg/ml, 8 saat ve 92.61 ± 10.1 bulunmuştur. Çoğu balık patojeni için MİK değeri 0.5-2.0 µg/ml olarak düşünüldüğünde, çalışma ile tek doz 20 mg/kg dozunda florfenikolün uygulanması ile istenilen plazma, 0.5 µg/ml'lik MİK değerinin 3.5 gün kadar üstünde seyrettiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile kore kedi balığında florfenikolün iyi emildiği ve yavaş atıldığı anlaşılmıştır. Florfenikolaminin ise florfenikole nazaran daha yavaş atıldığı bildirilmiştir (Park ve ark., 2006). Yapılan bu araştırmada T_{max} tüm ilaç gruplarında oldukça kısa, C_{max} 'da daha düşük bulunmuştur. Yine bu durum çalışılan balık ve ortam farklılıklarına bağlanmaktadır.

Tatlı suda 25.4°C de tek doz damar içi ve yemle kanal kedi balığına uygulanan 10 mg/kg dozunda FF'ün T_{max} ve C_{max} 'ı sırasıyla, 0.23 ± 0.14 ve 9.20 ± 2.53 saat; 22.31 ± 6.42 µg/ml ve 7.61 ± 0.87 µg/ml olarak bulunmuştur. Damar içi grup iki

bölmeli modele uygun oral grup ise tek bölmeli modele uygun bulunmuştur. Florfenikolün zamana bağımlı bir antibiyotik olması nedeniyle, doz zaman aralığındaki kandaki konsantrasyonun bakteri MİK değerinden fazla olması gerektiği bildirilmiştir. Yapılan çalışma ile 10 mg/kg dozunda yemle verilen florfenikolün plazma ortalama yoğunluğunu kademeli olarak 36 saat sonra 1 µg/ml altına düştüğü belirlenmiş ve belirtilen dozda günlük tedavinin plazmada istenilen konsantrasyona ulaşarak MİK değerinin üstünde olacağı anlaşılmıştır (Gaunt ve ark., 2012). Kanal kedi balığına 24.7 ve 25.9°C’de tekrarlayan dozlarla 10 gün boyunca 10 mg/kg dozunda gavajla verilen florfenikolün istenilen MİK seviyesini sağladığı gözlemlenmiştir (Gaunt ve ark., 2013).

Tuzlu suda bulunan pisi balığında arka arkaya üç gün peros. yolla 20 mg/kg dozunda uygulanan florfenikolün T_{max} 4.00±0.00 saat, C_{max} 12.18±3.21 µg/ml, biyoyararlanım %43.00 ± 5.71, olarak belirlenmiştir (Lim ve ark., 2010). T_{max} değeri yapılan bu çalışmanın kas içi sağlıklı ve enfekte ile gavaj sağlıklı grubunun T_{max} değerlerine yaklaşmakla birlikte, C_{max} değerleri oldukça düşüktür. Bu durum hem uygulanan dozun yarı yarıya düşük olmasına, hem de çalışılan balık türü ve koşullarının farklı olmasına bağlanmaktadır.

24-25°C’de tatlı suda sazan balığı ve *Trichogaster trichopterus* balıklarının oral 50 mg/kg ve kas içi 25 mg/kg florfenikol uygulamalarında, koi balığında; klirens, dağılım hacmi ve atılma yarı ömrü sırasıyla 0.05 L. h-1.kg-1, 1.0 L/kg ve 16 saat bulunmuş. *Trichogaster trichopterus*’de ise aynı parametre değerleri sırasıyla 0.32 L.h-1 · kg-1, 2.0L/kg ve 4 saat bulunmuştur. İki balık arasındaki farmakokinetik farklılıkların mide yapıları ve uyumlu oldukları su sıcaklıkları yanısıra anatomik ve fizyolojik yapılarından kaynaklandığı belirtilmiştir. *Trichogastertrichopterus* de görülen hızlı klirens ve kısa atılma yarı ömrü istenilen MİK değerinin yakalanması için 12 saatte bir verilmesini gerektirmektedir (Yanong ve ark., 2005). Bu çalışmada florfenikolün uygulama yolu ve dozu, suyun sıcaklığı ve tuzluluğu balıkların fizyolojik farklılıkları, ağırlıkları, enfeksiyonla gelişen patolojik bulgular nedeniyle elde edilen değerler arasında farklılıklar oluştuğu düşünülmektedir.

Tatlı suda, 25°C’de 260 gr ortalama canlı ağırlıkta *Carassius auratus cuvieri* ile yapılan farmakokinetik çalışmada 40 mg/kg dozunda kas içi verilen florfenikolün sırasıyla, C_{max} ve T_{max} değerleri 16.82 µg/ml ve 1.5 saat olarak bulunmuştur. Aynı parametreler gavajla uygulamada sırasıyla 29.32 µg/ml 1.61 saat olarak bulunmuştur. Çalışmada kas içi ve gavajla uygulamada 24. ve 72. saate kadar florfenikolün 2 µg/ml’nin üzerindeki konsantrasyonda olduğu bulunmuştur. Florfenikol için bu konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyon üstündeki plazma konsantrasyon süresi ($T > MİK$) enfeksiyonların tedavisi için gerekli en önemli PK/PD parametresidir. Florfenikolün metaboliti olan FFA düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olması ve tedavide kayda değer etkisi olmaması nedeniyle belirlenmemiştir (Zhao ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada ise sağlıklı ve enfekte alabalıklarda kas içi ve gavaj uygulamasında 12. saatten sonra florfenikolün tedavi edici yoğunluğunun düştüğü görülmektedir. Bu durum alabalıkların ağırlığının düşük, metabolizmasının hızlı olması ve Karadeniz suyunun tuz oranının atılımı hızlandırmasıyla açıklanabilir.

Tatlı suda yapılan bir diğer çalışmada ortalama canlı ağırlığı 140 gr olan alabalıklarda 14-15°C’de, 10 mg/kg dozunda yemle ve gavajla verilen florfenikolün plazmada sırasıyla T_{max} ve C_{max} düzeyleri 9 saat, 6.1 µg/ml; 12 saat ve 4.68 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmayla ilaçlı yemin gavaj uygulamasına nazaran hızlı bir şekilde emildiği ve yüksek konsantrasyona ulaştığı görülmüştür ve bu durumun yemin ilaç emilimini artırdığı şekilde yorumlanmıştır. İki uygulamada 48.saate kadar florfenikolün konsantrasyonunun 0.5 µg/ml den aşağı düşmediği görülmüştür (Pourmolaie ve ark. 2015). Bu çalışmada sağlıklı ve enfekte alabalıklarda da florfenikol konsantrasyonunun 0.5 µg/ml den aşağı 24. saaten önce düşmesi ortalama canlı ağırlıklarının düşük, fizyolojik farklılıklar, suyun tuzluluğu ve sıcaklığın farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Tatlı suda 22°C’de 10 mg/kg tek doz oral florfenikol uygulanan Tilapia’larda farmakokinetik parametreler; C_{max} 4.46 µg/ml, T_{max} 12 saat olarak tespit edilmiştir. Tuzlu suda, tatlı suda bulunan tilapialara nazaran ilaçların daha hızlı atıldıkları tespit edilmiştir (Feng, ve ark., 2009). Bu çalışmada oral olarak 10 mg/kg dozunda

florfenikol uygulanan alabalıkların kontrol ve deney gruplarında C_{max} 'e ulaşma süreleri sırasıyla 3. ve 6. saatlerdir. Bu durum Feng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre erken gerçekleşmiştir. Bu durum suyun tuzlu olması ve balıkların ağırlık farkından kaynaklanabileceği ile açıklanabilir.

Vibrio anguillarum ile enfekte ve sağlıklı ayu balıklarında oksitetrasiklinin intravenöz olarak 25 mg/kg, oral 100 mg/kg dozunda uygulanması sonucu enfekte ayu balığında maksimum serum ve doku düzeylerin sağlıklı balıklara göre düşük olduğu, oral kullanımda oksitetrasiklinin biyoyararlanımının sağlıklı balıklara göre %60 oranında düştüğü belirlenmiştir. Bu durumun bakteri ve toksinler ile zarar gören bağırsak duvarının emilim kapasitesinin düşmesi olabileceği düşünülmektedir (Uno, 1996). Çalışmamızda nispi biyoyararlanımda %12 civarında artış gözlenmiştir. Bu durumun ise mutlak biyoyararlanıma bakılmadığı için anlamlı olmadığı düşünülmektedir.

Sağlıklı ve vibrio ile enfekte *Pseudosciaenacrocea*'ya 20 mg/kg dozunda florfenikolün, $25 \pm 3.21^{\circ}\text{C}$ 'de oral yemle birlikte verilmesi ile enfekte grupta florfenikolün absorpsiyonunun azaldığı, maksimum konsantrasyona ulaşma zamanının geciktiği, maksimum konsantrasyonun miktarının azaldığı, total vücut klirensinin azaldığı bildirilmiştir. Wang ve ark. (2015)'nın bu çalışmasına benzer şekilde, yaptığımız çalışmada enfekte grupta maksimum konsantrasyona ulaşma zamanının gecikmiş ve klirens düşmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zoonotik karakter gösteren *L. garvieae* hayvancılık sektörü ve özellikle balıkçılık yönünden önemli ekonomik kayıplara neden olan bir patojendir. Hayvan yetiştiriciliğinde az girdi ile fazla verim elde etmek esastır. Gıda değeri olan hayvan yetiştiriciliğinde konunun ekonomik yönüne ilave olarak, çevre ve halk sağlığı boyutunun da göz önünde tutulması gerekmektedir. Yanlış doz ve sıklıkta ilaç kullanımı gereksiz para kaybı yanı sıra, hayvanın sağaltılamamasından kaynaklı ölümlere, bakterilerde direnç gelişimine ve/veya hayvansal ürünlerde ilaç kalıntılarına neden olabilmektedir. Hayvanlarda ilaç kullanımında tür faktörü, bundan kaynaklı fizyolojik, genetik ve yaşamsal koşullarına bağlı farklılıklar oldukça önemli ve göz önünde tutulması gereken konulardır. Özellikle balıklarda, balığın cinsine bağlı olarak yaşam koşulları değiştiğinden bir parametredeki en ufak oynama ilacın kinetiğini de önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Balıklardaki bu kadar değişkenlik enfeksiyonların devreye girmesiyle daha da karmaşık hal almaktadır. Zira, enfeksiyonların ilaç kinetiğini değiştirdiği yapılan bu araştırma sonucunda da gösterildiği gibi pek çok araştırmada gösterilmiştir. Belirtilen nedenle, pratikte ilaçların çoğunlukla yemle karıştırılarak hazırlanmış özel peletler şeklinde, suya atılarak sürü uygulaması şeklinde yapıldığı balık çiftliklerinde doğru ilaç tedavisi hayvan ve çevre sağlığı yönünden ayrı bir öneme sahiptir. Kısaca, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde farmakokinetik parametreler tedavi başarısı ve direnç gelişiminin önlenmesi açısından önemlidir.

Yapılan bu çalışma ile;

1. Enfekte alabalıklarda enfeksiyona bağlı patolojik bozukluklar tespit edilemese de muhtemel yapısal ve dokusal hasara bağlı florfenikolün farmakokinetik parametrelerinin değiştiği,
2. Enfekte gruplarda dağılım hacmi ve klirensin sağlıklı gruplara nazaran düşük olduğu,

3. Maksimum konsantrasyona ulaşma zamanının, enfekte gavaj grubunda 3 saat geciktiği,
4. Bulunan bazı farmakokinetik değerlerin daha önce yapılan balık araştırmalarından farklı olması yetiştirme ortamının değişken özelliklerinden (pH, su sıcaklığı, tuz oranı, oksijen miktarı gibi) kaynaklanabileceği, dolayısı ile farklı dozlarda enfekte balıklarda yapılacak çalışmalarla rasyonel ilaç rejiminin belirlenmesinde yeni araştırmalara gerek olduğu,

Bütün bu açıklamalar çerçevesinde enfekte balıklarda ilaç kinetiğinin değişebildiği gerçeğinden hareketle, bakteriyel enfeksiyonlara yönelik yeni ilaç uygulama programlarının gerçekleştirilmesi gerekliliği hem toksikasyon, hem de etkili sağaltım yapılabilmesi adına önem taşımaktadır. Belirtilen nedenle, bir ön araştırma niteliği taşıyan bu ve benzeri araştırmaların daha geniş örneklerle tekrarlanması yararlı olacaktır.

ÖZET

Sağlıklı ve *Lactococcus garvieae* ile Enfekte Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Florfenikol'ün Farmakokinetiği

Çalışmada sağlıklı ve *L.garvieae* ile enfekte gökkuşluğu alabalıklarında kas içi ve gavajla uygulanan florfenikolün farmakokinetik parametreleri karşılaştırıldı.

Gökkuşluğu alabalıkları altı gruba ayrıldı, 1. ve 2. gruba kas içi ve gavaj yoluyla florfenikol uygulandı, 3. ve 4. grup *L.garvieae* ile enfekte edildi ve florfenikol kas içi ve gavaj yoluyla verildi, 5. gruba hiçbir tedavi uygulanmadı ve 6. grup *L.garvieae* ile enfekte edildi. FF 10 mg/kg'lık bir dozda uygulandı. Enfeksiyon intraperitoneal olarak 1×10^6 cfu /0.1 ml *L. garvieae* ile oluşturuldu ve 48 saat inkübe edildi. Kan örnekleri 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatte alındı. FF analizi, valide yöntem kullanılarak YBSK ile gerçekleştirildi. Plazma analizleri ile FF'ün zamana bağlı konsantrasyon eğrileri hazırlandı. Farmakokinetik hesaplar kompartımsız metoda göre, win-nonlin programı kullanılarak yapıldı. Metot validasyonu çalışma sonuçları yöntemin, doğruluk ve kesinlik, tekrarlanabilirlik, hassasiyet ve doğrusallık açısından spesifik olduğunu göstermiştir. Üç çalışma konsantrasyonunda (0.75, 1.5 ve 3 µg/ml) geri kazanımın yüksek olduğu saptandı (sırasıyla %87.32, 81.76 ve 84). FF analizi için tespit (LOD) ve tayin limiti (LOQ) ise sırasıyla 0.0040 ve 0.0123 µg/ml olarak bulundu. Sağlıklı ve enfekte kas içi gruplarında en yüksek FF konsantrasyonuna 3.saatte ulaşıldığı, her iki grupta atılımın 12. saatten sonra hızlandığı, ancak enfekte grubunda FF konsantrasyonunun 3 saat süreyle değerini koruduğu gözlemlendi. Gavaj grubunda ise sağlıklı grupta ilacın en yüksek yoğunluğa ulaşması 3 saatte olurken enfekte grupta bu süre uzamış ve 6. saate çıkmıştır. İlaç 1. ve 3. saatler arasında belli kan yoğunluğunu korumuştur. Sağlıklı grupta ilacın plazma <LOD değerlere ulaşması 48. saatte olurken, enfekte grupta 12. saatten sonra hızla < LOD değere ulaşmıştır. Enfekte grupların plazma FF değerleri genel anlamda yüksek, 12. saatte ise anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Farmakokinetik parametreler ise kas içi FF uygulanan sağlıklı ve enfekte alabalık gruplarında T_{max} (s), C_{max} (mg/L), T_{last} (s), C_{last} (mg/L), AUC_{last} (mg.s/L), $Vz_{F_{obs}}$ (L), $Cl_{F_{obs}}$ (L/saat) ve MRT_{last} (s) değerleri sırasıyla 3, 3; 2.480, 2.809; 48, 12; 0.014, 1.645; 25.170, 26.235; 3.433, 3.049; 0.395, 0.189 ve 8.041, 5.874 olarak, gavaj gruplarında ise 3, 6; 1.612, 2.080; 48, 12; 0.019, 0.984; 13.792, 17.836; 7.184, 3.117; 0.714, 0.388; 8.506, 5.884 ve nispi biyoyararlanım sırasıyla %55, %68 olarak belirlenmiştir.

Araştırma sonucu, *L. garviae* ile enfeksiyonun özellikle gavaj gruplarında daha belirgin olmak üzere genel anlamda farmakokinetik profilde değişikliğe neden olduğunu, hayvanlarda klirens değerinin, dağılım hacminin azalıp, plazma FF konsantrasyonunun arttığı, belirtilen nedenle enfekte balıklarda ilaç uygulama rejiminin bu profile göre düzenlenmesinin etkili sağaltım için yararlı olacağını göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Farmakokinetik, Florfenikol, Gökkuşluğu Alabalığı, *Lactococcus garvieae*

SUMMARY

Pharmacokinetics of Florfenicol in Healthy and *Lactococcus garvieae* Infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

In this study, the pharmacokinetic parameters of Florfenicol administered intramuscularly and gavage in healthy and rainbow trout infected with *L. garvieae* were compared.

Rainbow trouts were divided into six groups first and second groups received intramuscular and gavage florfenicol, 3. and group 4 was infected with *L.garvieae* and treated with florfenicol intramuscularly and gavage, no treatment was applied to the 5th group (negative control) and 6th group was infected with *L.garvieae*. FF was administered at a dose of 10 mg/kg. Infection was applied with i.p 1×10^6 cfu/0.1 ml *L. garvieae* and allowed to incubate for 48 hours. Blood samples were taken at 1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours. FF analysis was carried out by HPLC using the validated method. Time-dependent concentration curves of FF were prepared by plasma analyzes. Pharmacokinetic calculations based non-compartmental method was performed using the win-nolin program. Method validation has shown that the study results method is specific in terms of accuracy and precision, reproducibility, precision, and linearity. At three working concentrations (0.75, 1.5 and 3 µg/ml) it was determined that the recovery was high (87.32, 81.76 and 84% respectively). Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for FF were found 0.0040 and 0.0123 (µg/ml) respectively. It was observed that the highest FF concentration in healthy and infected intramuscular groups reached 3 hours, the excretion accelerated after 12 hours in both groups, but the FF concentration in the infected group maintained its value for 3 hours. In the gavage group, the time of reaching the highest concentration of the drug in the healthy group was 3 hours, but in the infected group this time was prolonged and increased to 6 hour. The medication protected a certain concentration of blood between the 1st and 3rd hours. In the healthy group, the plasma reached <LOD values at 48 hours, while the infected reached <LOD values rapidly after 12 hours. Plasma FF values of the infected groups were generally high and at 12th hour were significantly higher. Pharmacokinetic parameters in healthy and infected trout groups applied intramuscular FF; values of Tmax (s), Cmax (mg/L), Tlast (s), Clast (mg/L), AUClast (mg.s/L), Vz_F_obs (L), Cl_F_obs 3, 3 respectively; 2.480, 2.809; 48, 12; 0.014, 1.645; 25.170, 26.235; 3.433, 3.049; 0.395, 0.189, and 8.041, 5.874, in the gavage groups, 3, 6; 1.612, 2.080; 48, 12; 0.019, 0.984; 13.792, 17.836; 7.184, 3.117; 0.714, 0.388; 8.506, 5.884, and the relative bioavailability was determined as 55%, 68%, respectively.

Research has shown that infection with *L. garvieae* causes a change in pharmacokinetic profile in the gavage group, clearance value, reduced distribution volume, increased plasma FF concentration, and for the indicated reason, regulating the drug administration regimen according to this profile in infected fishes would be beneficial for effective treatment.

Key Words: Florfenicol, *Lactococcus garvieae*, Pharmacokinetic, Rainbow Trout

KAYNAKLAR

- ALGÖET M, BAYLEY AE, ROBERTS EG, FEIST SW, WHEELER RW, VERNER-JEFFREYS D W (2009). Susceptibility of selected freshwater fish species to a UK *Lactococcus garvieae* isolate. *Journal Of Fish Diseases*, **32(10)**: 825-834.
- AKŞİT D (2016). Balık Yetiştiriciliğinde Antibakteriyel Direnç ve Önemi. Türkiye Klinikleri *Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, **2(1)**: 47-54.
- ANADÓN A, MARTÍNEZ MA, MARTÍNEZ M, RÍOS A, CABALLERO V, ARES I, MARTÍNEZ- LARRAÑAGA MR (2008). Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. *J Agricultural and Food Chemistry*, **56(22)**: 11049-11056.
- AVCI H, BİRİNCİOĞLU SS, TANRIKUL T.T, EPİKMEN ET, METİN N, AVSEVER ML (2014). Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. *J Fish Diseases*, **37(5)**:481-495.
- BAYDAN E, YURDAKÖK B, AYDIN FG (2012). Balıklarda antibiyotik kullanımı. Türkiye Klinikleri *J Veterinary Sciences*, **3(3)**:45-52.
- BOUCHER BA, WOOD GC, SWANSON JM (2006). Pharmacokinetic changes in critical illness. *Critical Care Clinics*, **22(2)**: 255-271.
- BRUNTON LL, LAZO JS, PARKER KL (2009). Goodman ve Gilman's Tedavinin Farmakolojik Temeli. Çev. Editörü: SÜZER, Ö. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul Baskı.
- CABELLO FC (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, **8(7)**: 1137-1144.
- DAGOGLU G, TUREL I, YILMAZ O, YARSAN E, OTO G, KANKAYA E (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of oxytetracycline in cultured rainbow trout following intramuscular administration. *Indian Vet Journal*, **81(9)**: 989-992.
- DE LA PENA, AM, ESPINOSA-MANSILLA A (2009). Analysis of antibiotics in fish samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*. **395(4)**: 987-1008.
- DIDINEN BI, YARDIMCI B, ONUK EE, METIN, S, YILDIRIM, P (2014). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue de Medecine Veterinaire*, **165(1-2)**: 12-19.

- ELDAR A, GHİTTİNO C (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, **36(3)**: 227-231.
- FENG JB, JIA XP (2009). Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 C. *Aquaculture*, **289(1-2)**: 129-133.
- FENG JB, JIA XP, LI LD (2008). Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 C. *Aquaculture*, **276(1-4)**: 29-35.
- GAUNT PS., LANGSTON, C., WRZESINSKI, C., GAO, D., ADAMS, P., CROUCH, L., SWEENEY D, ENDRIS, R. (2012). Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **35(5)**: 503-507.
- GAUNT PS, LANGSTON C, WRZESINSKI C, GAO D, ADAMS P, CROUCH L, SWEENEY D, ENDRIS R. (2013). Multidose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **36(5)**: 502-506.
- HOWLAND DR, MYCEK JM, HARVEY AR, CHAMPE CP (2009). Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Farmakoloji, Çeviri-Ed; ONAT F, GÖREN Z, KARAALP A, Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı, İstanbul, 255-262.
- KIRDA K. (2016). Dogu Karadeniz Bölgesinde Balıkçılık. *Karadeniz Arastirmalari*, **(52)**: 233.
- KUBİLAY A, ALTUN S, ULUKÖY G, DİLER Ö (2005). *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **1(1)**: 39-48.
- KURTOĞLU İZ, ÇAKMAK E (2007). Karadeniz Bölgesi Kültür Balıkçılığı: Alabalık Yetiştiriciliği. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2007(1).
- LEWBART GA, PAPICH MG, WHITT-SMITH D (2005). Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Piaractus brachypomus*) after single dose intramuscular administration. *J Veterinary Pharmacology And Therapeutics*, **28(3)**: 317-319.
- LİM JH, KIM MS, HWANG YH, SONG IB, PARK BK, YUN H I (2010). Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. *Aquaculture*, **307(1-2)**: 71-74.
- LİU J, FUNG KF, CHEN Z, ZENG Z, ZHANG J (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47(2)**: 820-823.
- MORGAN ET (2009). Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **85(4)**: 434-438.

- OCENDA VR, ALMEIDA-PRÍETO S, LUZARDO-ÁLVAREZ A, BARJA JL, OTERO-ESPÍNAR FJ, BLANCO-MÉNDEZ J (2017). Pharmacokinetic model of florfenicol in turbot (*Scophthalmus maximus*): establishment of optimal dosage and administration in medicated feed. *Journal of fish diseases*, **40(3)**: 411-424.
- PARK BK, LIM JH, KIM MS, YUN HI. (2006). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). *J Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29(1)**: 37-40.
- PINAULT LP, MILLOT LK, SANDERS, PJ. (1997). Absolute oral bioavailability and residues of florfenicol in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20(1)**: 297-298
- POURMOLAIE B, ESHRAGHI HR, HAGHIGHI M, MORTAZAVI SA, ROHANI MS (2015). Pharmacokinetics of florfenicol administrated to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by oral gavages and medicated feed routes. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, **4(4)**: 14-17.
- RIGOS G, NENGAS I, ALEXIS M, TROISI GM (2004). Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, **69(3)**: 281-288.
- RIVIÈRE EJ, PAPICH G M (2009). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* Willey-Blackwell, Ninth Edition
- ROMERO J, FEIJOÓ CG, NAVARRETE P (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In *Health and environment in aquaculture*. InTech. Erişim: [<https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35141.pdf>]
- SEKKIN S, KUM C (2011). Antibacterial drugs in fish farms: application and its effects. In *Recent Advances in Fish Farms*. InTech. Erişim Adresi: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/24081.pdf>
- SERDOZ F, VOINOVICH D, PERISSUTTI B, GRABNAR I, HASA, D, BALLESTRAZZI R, CONI E, PELLEGRINI E. (2011). Development and pharmacokinetic evaluation of erythromycin lipidic formulations for oral administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **78(3)**: 401-407.
- SMITH BS, YOGARATNAM D, LEVASSEUR-FRANKLIN KE, FORNI A, FONG J (2012). Introduction to Drug Pharmacokinetics in the Critically III Patient. *Chest*, **141(5)**: 1327-1336.
- TEKİNAY AA, GÜROY D, ÇEVİK N (2005). Balık Üretiminden Kaynaklanan Kirlilik ve Çözüm Yolları. *E.Ü. Su. Ürün. Der.* **23(1)**: 295-298
- TRAŞ B, ELMAS M (2005) *Biyoyararlanım. Klinik Farmakokinetik* Selçuk Üniversitesi Basımevi. Konya
- TÜRE M, ALTINOK İ, İŞİDAN H, SAVAŞ H, KUTLU İ. (2012). PFGE metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi. TAGEM Proje Sonuç Raporu. Erişim: [<http://docplayer.biz.tr/961238->

Pfge-metodu-kullanilarak-lactococcus-garvieae-nin-genetik-cesitliliginin-ve-yayiliminin-belirlenmesi.html]

- TÜRE M (2015). *Lactococcus garvieae*'nin farklı balık türlerinde patojenitesinin belirlenmesi ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum
- UNO K (1996). Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, **143(1)**: 33-42.
- VAN DE RIET JM, POTTER RA, CHRISTIE-FOUGERE M, BURNS BG (2003). Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC International*, **86(3)**: 510-514.
- VENDRELL D, BALCÁZAR JL, RUÍZ-ZARZUELA I, DE BLAS I, GIRONÉS O, MÚZQUÍZ, JL (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **29(4)**: 177-198.
- VUE C, SCHMİDT LJ, STEHLY GR, GİNGERİCH WH (2002). Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. *Journal of Chromatography B*, **780(1)**: 111-117
- WILSON K, BROMBERG T (1981). The influence of some disease states on drug disposition. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **3(3)**: 189-200.
- YANG Q, XİE L, WU Z, CHEN X, YANG Y, LİU J, ZHANG Q (2013). Pharmacokinetics of florfenicol after oral administration in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **44(4)**: 586-592.
- YANONG RP, CURTİS EW, SİMMONS R, BHATTARAM VA, GOPALAKRİSHNAN M, KETABİ N, NAGARAJA NV, DERENDORF H. (2005). Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment. *Journal of Aquatic Animal Health*, **17(2)**: 129-137.
- YILDIRIM Ö, KORKUT AY (2004). Su ürünleri yemlerinin çevreye etkisi. *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, **21(1-2)**: 167-172.
- YÜCEL G, ÖZKUL İA (2016). Pathomorphological evaluation of toxic effect of cypermethrin and cyphenothrin in common carp. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **63(4)**: 401-406.
- WANG L, HAN, YN, JİN, S, MA, Y, WANG, GL, ZHAO, QS, CHEN, YE. (2015). Pharmacokinetic study of florfenicol in healthy and vibriosis-infected *Pseudosciaena crocea* after oral administration. *Journal of Applied Biological Chemistry*, **58(4)**:363-368.
- ZHAO HY, ZHANG GH, BAI L, ZHU S, SHAN Q, ZENG DP, SUN YX (2011). Pharmacokinetics of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single intramuscular or oral administration. *J Veterinary Pharmacology And Therapeutics*, **34(5)**: 460-463.

EKLER

EK 1



T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK
BAKANLIĞI
Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü -Trabzon



Trabzon 13.06.2014

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2013 Yılı 4. Oturumu
Sayı : ETİK-42208298-040-04-02
Proje Başlığı : Sağlıklı ve *Lactococcus garvieae* ile enfekte Gökkuşaklı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Florfenikol'ün farmakokinetiği ve in vivo etkinliğinin belirlenmesi.
Proje Yürütücüsü : Erkan TAÇBAŞ
Proje Ekibi : Prof.Dr.Emine BAYDAN, Prof.Dr. Ender YARSAN, Doç. Dr. Ertan Emek Onur, Mustafa TÜRE, İlyas KUTLU, Cemil ALTUNTAŞ, Gülzede YÜCEL

Hayvan Çalışması : Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:
İnsan embriyosu ve fıtusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fıtusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Doç. Dr. İlhan AYDIN Başkan		Dr. Bilal AKBULUT Öye-Raporör Balıkçılık Teknolojisi Müh.
Oğuzhan ERGÜL Öye Balıkçılık Teknolojisi Yük. Müh.	Mustafa TÜRE Öye Veteriner Hekim	Hale SAVAS Öye Veteriner Hekim
Eyüp ÇAKMAK Öye Balıkçılık Teknolojisi Müh.	Osman ÖZCAN Öye Su Ürünleri Mühendisi Trabzon Sanayici ve Girişimci İş Adamları Derneği	Hüseyin SALİHOĞLU Öye Ziraat Yük. Mühendisi Trabzon İşsu Yetiştir. Birliği

Adres : Vali Adil Yazar Cad., 14 Kağıtçı, 61250 Yomra, TRABZON
Santral : (0462) 341 10 53-56
Fax : (0462) 341 11 52
Müdürlük : (0462) 341 10 54-55
E-Posta : bilal@sumae.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi: B. AKBULUT
Tel: 341 10 53 - 310
www.sumae.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Erkan

Soaydı: TAÇBAŞ

Doğum yeri ve tarihi: Amasya 25.11.1976

Uyruğu: T.C.

Medeni Durum: Evli

Askerlik Durumu: Yapmış

İletişim Adresi: Münzeviler caddesi 17/7 Yıldız Apartmanı Abidinpaşa/ANKARA

II-Eğitim (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2013-2015 Anadolu Üniversitesi Adalet Ön lisans

1996-2001 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

1990-1993 Ankara Kurtuluş Lisesi

1987-1990 Ankara Kurtuluş Ortaokulu

1982-1987 Ankara Kurtuluş İlkokulu

Yabancı Dil: İngilizce

III-Ünvanları (tarih sırasına göre)

Veteriner Hekim

Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Araştırmaları
Grup Koordinatörü

IV-Mesleki Deneyim

2002-2003 Ross Haymana Ana Damızlık İşletmesi Sorumlu Yönetici

2003-2008 Ardahan Hanak İlçe Tarım Müdürlüğü

200-2009 Ardahan İl Tarım Müdürlüğü Proje İstatistik Şube Müdürlüğü

2009-2011 Kırıkkale İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü

2011- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı
Gıda ve Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği

VI. Bilimsel İlgi Alanları

VII. Bilimsel Etkinlikleri

TAGEM Hayvan Sağlığı Araştırmaları Proje Değerlendirme Toplantıları, Grup Koordinatörlüğü dahil, düzenleme faaliyetleri. (2011-2018)

Seminerler

Taçbaş E (2013). Ülkemiz ve Dünyada Organik Tarıma Üretim Potansiyeli ve Mevzuat Açısından Genel Bakış ve Geleneksel Gıdalarla Kalite, Kalıntı Yönünden Karşılaştırılması.

Taçbaş E (2013). Organik Hayvan Yetiştiriciliğinde Hastalıkların Sağaltımında Kullanılabilecek Maddeler

Yayınlar

BAYDAN E, GÜRBÜZ S, TAÇBAŞ E. (2017). Organik Hayvancılıkta İç Parazit Hastalıklarının Önlenmesi ve Sağaltımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, **3(1)**: 29-37.

Poster Tebliği

Baydan, E., Taçbaş, E : Dünya’da ve Türkiye’de Organik Tarıma Genel Bakış, IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi. 11-14 Eylül 2013 Yer: Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Taçbaş, E: Antiparaziter Bitkilerin Organik Hayvansal Üretimde Kullanımı V. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi.1-4 Eylül 2016 Yer: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi