

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANA BİLİM DALI

ENROFLOKSASİN İÇEREN İKİ FARKLI MÜSTAHZARIN
SIĞIRLARDA KAS İÇİ YOLLA UYGULAMA SONRASI
BİYOEŞDEĞERLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

İsmet YILMAZ

Danışman

Prof.Dr. Muammer ELMAS

KONYA-2006

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR BİLGİ.....	2
2.1.Tanımlar.....	2
2.2.Biyoeşdeğerliğin Belirlenmesinde Dikkat Edilecek Temel Kurallar.....	3
2.3.Biyoeşdeğerlik Çalışmalarına İhtiyaç Duyulan Durumlar.....	6
2.3.1.Jenerik olarak tasarılanmamış fakat bilinen bir maddeyi veya yeni bir maddeyi içeren ürünler.....	6
2.3.2.Jenerik olarak tasarılanmış bilinen yeni bir maddeyi içeren ürünler.....	7
2.3.3.Uygulama yollarının karşılaştırılması.....	7
2.4.Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Gerekliliğini Değerlendirme Ölçütleri.....	7
2.4.1.İlaç ürününün farmasötik şekli ve veriliş yolu.....	7
2.4.2.Etkin maddenin terapötik indeksinin genişliği.....	7
2.4.3.Doz-cevap eğrisinin dikliği.....	8
2.4.4.Terapötik konsantrasyon aralığının konsantrasyon–etki eğrisindeki yeri.....	8
2.4.5.Etkin maddenin farmakokinetik özellikleri.....	9
2.4.6.İlacın biyofarmasötik sınıflandırma sistemindeki yeri.....	9
2.5.Biyoeşdeğerlik Çalışmasının Geremediği Durumlar.....	10
2.6.Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri.....	11
2.6.1.İn vitro çalışma.....	12
2.6.2.İn vivo çalışma.....	12
2.6.2.1.Farmakokinetik çalışma.....	12
2.6.2.2.Farmakodinamik çalışma.....	12
2.7.Tek Dozlu İn vivo Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Tasarımı.....	13
2.7.1.Referans ürün.....	13
2.7.2.Referans yol.....	13

2.7.3.Test ve referans ürün için standartlar.....	14
2.7.4.Hayvanlar.....	14
2.7.5.Deneme şartları.....	15
2.7.6.Test edilecek doz.....	16
2.7.7.Örnekleme.....	16
2.7.8.Deneysel dizayn.....	17
2.8.Biyoeşdeğerlik Denemelerinin İstatistiksel Analizi.....	19
2.8.1.Analiz olacak karakteristikler.....	19
2.8.2.Tek dozlu çalışmalar.....	19
2.8.3.Biyoeşdeğerliği belirleme ölçütü (Biyoeşdeğerlik aralığı).....	20
2.8.4.Veri analizi.....	22
2.9.Veteriner sahada kullanılan bazı ilaçlar için gerçekleştirilen biyoeşdeğerlik çalışmaları.....	23
2.10.Enrofloksasin ve Farmakokinetik Özellikleri.....	25
3.MATERYAL ve METOT.....	30
3.1.Materyal.....	30
3.1.1.Hayvanlar.....	30
3.1.2.İlaçlar.....	30
3.1.3.Araç ve gereçler.....	31
3.1.4.Kimyasal madde ve solüsyonlar.....	31
3.1.4.1.Kimyasal madde.....	31
3.1.4.2.Solüsyonlar.....	31
3.2.Metot.....	32
3.2.1.Çalışma tasarımı ve ilaç uygulamaları.....	32
3.2.2.Kan örneklerinin toplanması.....	32
3.2.3.Plazma enrofloksasin düzeyinin belirlenmesi.....	32

3.2.3.1.Enrofloksasinin ekstraksiyonu.....	32
3.2.3.2.HPLC parametreleri.....	33
3.2.4.Farmakokinetik hesaplamalar.....	33
3.2.5.İstatistiksel analiz.....	34
3.2.6.Verilerin analizi ve biyoesdeğerlik değerlendirmesi.....	34
4.BULGULAR.....	35
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	38
Sonuç.....	44
6.ÖZET.....	47
7.SUMMARY.....	49
8.KAYNAKLAR.....	50-56
9.ÖZGEÇMİŞ.....	57
10.TEŞEKKÜR.....	58
Ek-1(Etik Kurul Kararı).....	59

TABLO LİSTESİ

Grafik 2.1 Konsantrasyonda meydana gelen sabit bir değişimin, etkide yaptığı değişimin boyutlarının, konsantrasyon-etki eğrisinin eğiminin değişmesine göre farklı olması (Kayaalp 2001).....	8
Grafik 2.2 Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun artması sonucu etki şiddetinde meydana gelen değişimleri gösteren konsantrasyon-etki eğrisi (etki şiddeti maksimum etkinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (Kayaalp 2001)	9
Tablo 2.1 Bazı araştırmacılar tarafından değişik hayvan türlerinde farklı ürün/ürünler kullanılarak yapılan biyoşdeğerlik çalışma sonuçları.....	24
Tablo 2.2 Biyoşdeğerlik çalışmalarına ait sonuçlarının değerlendirilmesinde doğru ve yanlış kararın önemini vurgulayan tablo.....	25
Grafik 4.1 Enrofloksasin içeren iki ürünün ürünlerin düvelere kas içi yolla tek doz uygulanması sonrasında elde edilen yarı logaritmik konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)-zaman(saat) eğrisi (n=6).....	35
Tablo 4.1 Enrofloksasin içeren iki ürünün düvelere kas içi yolla tek doz uygulanması sonrasında elde edilen farmakokinetik parametrelerinin logaritmik dönüşüm öncesi karşılaştırılması (n=6).....	36
Tablo 4.2 Enrofloksasin içeren iki ürünün düvelere kas içi yolla tek doz uygulama sonrasında elde edilen farmakokinetik parametrelerinin logaritmik dönüşüm sonrası karşılaştırılması (n=6).....	37
Tablo 5.1 Bazı hayvan türlerinde yapılan biyoşdeğerlik çalışmalarının genel dizaynı ve sonuçları.....	40

1. GİRİŞ

Veteriner Hekimliğinde kullanılan ilaçlara ait biyoeşdeğerlik (biyolojik eşdeğerlik) çalışmalarına Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği ülkelerinde yaklaşık yirmi yıl önce başlanmış, geçen zaman içerisinde yapılan çalışma verilerinden ilaçların biyoeşdeğerliklerinin değerlendirilmesinde kullanılacak önemli parametreler ve izlenebilecek yol haritaları belirlenmiştir.

Biyoeşdeğerliğin önemi, hekimin aynı etkin maddeyi aynı miktarda içeren ve aynı ticari formülasyona sahip iki farklı üründen birini diğerinin yerine belli bir endikasyonda kullanmak zorunda kaldığı zaman ortaya çıkar. Hekim bu tür durumlarda “muadil gerçekten muadil midir?” sorusuna cevap ararken, tercihini eğer varsa bilimsel metotlarla gerçekleştirilmiş biyoeşdeğerlik çalışması sonuçlarına göre yapmalıdır.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarının temel amaçları, hekime ve hayvan sahibine daha ucuz olanı kullanmak ve kaliteli ilaç üreten firmaya hakkı olan emeğinin karşılığını alma fırsatını vermek şeklinde özetlenebilir.

Enrofloksasin, veteriner sahada yaygın olarak kullanılan antibakteriyel bir ilaçtır. Ülkemizde aynı aktif maddeyi eşit miktarda içerdikleri için benzer endikasyon alanlarında birbirlerinin yerine kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış birçok muadil ürün mevcuttur. Fakat bu müstahzarlar arasında ruhsatlandırma aşaması ve sonrasında biyoeşdeğerlik çalışması zorunlu olmadığı için farmasötik eşdeğerlilik ölçütü olarak alınmaktadır.

Bu çalışma ile enrofloksasin içeren iki farklı müstahzarın düvelerde kas içi yolla uygulama sonrasında çizilecek konsantrasyon-zaman eğrileri ve ilgili farmakokinetik verileri karşılaştırılarak biyoeşdeğerliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1.Tanımlar

Biyoeşdeğerlik çalışmaları ilaçların etkinlik, güvenlik ve kalitesini belirlemeye yönelik olarak uygulanan bir kalite kontrol testidir. Biyoeşdeğerlik testleri, aynı aktif maddeyi ihtiva eden farklı ticari müstahzarların karşılaştırılmasında kullanılan bilimsel metotlardır. Bu testlerin amacı iki ürünün sistemik etkisinin etkinlik ve güvenlik yönünden benzer olup olmadığını belirlemektir. Bunun için iki ürünün yeterli derecede benzer plazma yoğunluğu oluşturması gerekliliğini göstermek, yani herhangi bir etkin maddenin aynı alanda kullanılan müstahzarları arasında bilimsel verilere göre tercih yapabilmeyi sağlamaktır (Traş ve Elmas 2005, Traş 2005).

Farmasötik olarak eşdeğer iki ürünün (test ve referans) aynı molar dozda hedef türdeki canlıya uygun yolla verilmişinden sonra biyoyararlanımlarının ve böylece terapötik etkilerinin hem etkinlik, hem de güvenlik bakımından aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasına **biyolojik eşdeğerlik** veya **biyoeşdeğerlik** denir (Kaya 2000, Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

Biyoyararlanım ise “damar içi hariç diğer uygulama yollarından herhangi biri ile verilen bir ilacın aktif maddesinin sistemik dolaşıma katılma hız ve derecesidir” şeklinde tanımlanır ve tüm kaynaklarda F veya f simgesiyle gösterilir (Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

Biyoeşdeğerlik esas olarak aynı etkin maddeyi içeren, aynı ticari formülasyona sahip ürünler arasında söz konusudur. Biyoeşdeğerlik belirli bir denek topluluğunda ölçülmüş farklı biyoyararlanım veri ortalamalarının uygun istatistiksel bir model ile karşılaştırılmasıyla belirlenir. Biyoeşdeğerlik denemeleri bazı biyoyararlanım

parametrelerini kullandığı halde, biyoyararlanım denemelerinden farklıdır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

Biyoeşdeğerliğin ön şartı ilaçlar arasındaki farmasötik eşdeğerliktir. İki farklı ürün aynı etkin madde/maddeleri aynı miktar(lar)da veya karşılaştırılabilir standartlara uygun farmasötik şekiller halinde içeriyorlarsa **farmasötik eşdeğer** olarak kabul edilir (Kaya 2000, Kayaalp 2001a, Traş ve Yazar 2002). Aynı etkin madde/maddelerin aynı molar miktarının iki ürün içinde de eşit olarak bulunmasına **kimyasal eşdeğerlik** denir (Kaya 2000, Kayaalp 2001a). Bir müstahzar etkinliği ve güvenliği daha önceden tespit edilmiş bir başka müstahzar ile aynı etkin maddeyi veya terapötik molekül kısmını içermekte, aynı etkinlik ve güvenliği klinik olarak göstermekteyse, bunlar arasında **terapötik eşdeğerliğin** varlığından kesin olarak söz edilebilir (Kaya 2000, Kayaalp 2001a).

Ayrıca biyoeşdeğerlik, uygulama yolları arasında bir karşılaştırma yapmak ya da benzer formülasyonun yığınları arasında terapötik yetersizliğin nedenlerinin tespitine yönelik kullanılacak önemli bir araçtır (Toutain ve Koritz 1997, Brown ve ark 2000). Hayvanlardaki biyoyararlanım denemelerinde tür içi ya da türler arasındaki farklılıkları veya gıda ile ilaç etkileşimlerinin belirlenmesinde de en geçerli test biyoeşdeğerliktir (Toutain ve Koritz 1997, Traş ve Yazar 2002, Traş ve ark 2005).

2.2.Biyoeşdeğerliğin Belirlenmesinde Dikkat Edilecek Temel Kurallar

Biyoeşdeğerlik denemeleri birincisi klinik (uygulama) diğeri de gerekli analizlerin yapıldığı (biyoanalitik) olmak üzere iki dönem halinde yürütülür. Her ikisi aynı yerde yapılabileceği gibi farklı yerlerde de yapılabilir (Kayaalp 2001a, Traş ve Yazar 2002).

Biyoeşdeğerliği test etmek için kandaki aktif madde yoğunluğu seyrinin zamana bağlı olarak çizilmesi ilk tavsiye edilen metottur. Bir veteriner ürününün biyoeşdeğerliği sistemik dolaşıma katılarak etki yer(ler)inde yararlanılabilir olan aktif maddenin hız ve

miktariyla tarif edilir. Hız ve miktarı belirleyen en belirgin parametreler **EAA (eğrinin altındaki alan)**, **C_{doruk} (doruk konsantrasyon)** ve **t_{doruk} (doruk konsantrasyon zamanı)**'tur (Toutain ve Koritz 1997, EMEA 2001, Kayaalp 2001a,b, Traş 2005).

EAA aynı zamanda uygulanan ilaçtan emilen ve dolayısıyla sistemik dolaşıma giren yani yararlanılabilir miktarın bir göstergesi olup emilme hızından bağımsızdır. C_{doruk} ve t_{doruk} ise melez parametrelerdir ve ilacın hem emilme hem de eliminasyon hızı ile çok sıkı bir ilişkisi vardır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a,b, Traş ve ark 2005). EAA'nın hesaplanmasında lineer veya logaritmik trapezoidal metotlar kullanılır. Uygulama sonrasında ilacın kanda ilk tespit edildiği zaman noktasından (EAA_0) ilacın kanda son ölçülebildiği zaman noktası (EAA_{son}) arasındaki toplam alanın tamamı $EAA_{(0-\text{son})}$ olarak tanımlanmakta ve kullanılmaktadır. Eğrinin dış bükey kısmının alanının hesaplanmasında genellikle lineer trapezoidal metot kullanılırken, eğrinin iç bükey kısmında logaritmik bir azalma sözkonusu olduğundan bu alanının hesaplanmasında genellikle logaritmik trapezoidal metot kullanılır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

C_{doruk} ve t_{doruk} genellikle her bir denek için çizilen plazma ilaç konsantrasyonu-zaman verilerinin direkt bakışı ile belirlenebilir. Bu durumda C_{doruk} ve t_{doruk} ilaç örnekleme zaman planına çok sıkı biçimde bağımlılık gösterir. Eğer bir ürün için en uygun t_{doruk} biliniyorsa veya elde bir pilot çalışma ya da deneme varsa t_{doruk} 'a yakın noktalarda çoğaltılmış örnekleme sıklığıyla yapılan bir biyoeşdeğerlik çalışması, C_{doruk} ve t_{doruk} 'un önemini artırır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a). Plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi çoklu doruk sergiliyorsa veya eğri düz ve uzun biçimde ise C_{doruk} ve t_{doruk} 'u belirlemek zor olacağından, ilaç emilme hızıyla ilgili parametreleri belirlemek de zor olabilir (Toutain ve Koritz 1997).

Bilim otoritelerince genel kabul görmese de emilme hızının göstergesi olarak C_{doruk}/EAA ve $C_{\text{doruk}}/t_{\text{doruk}}$ gibi oranlamaları önerenler de vardır (Kayaalp 2001a, Martinez

ve ark 2002). C_{doruk}/EAA oranı tek doz çalışmalarında C_{doruk} 'un yerine önerilmektedir. C_{doruk}/EAA , emilmenin ilk geçiş hız sabitesinin bir bileşkesi gibidir ve C_{doruk} 'tan daha az değişkendir. Bununla birlikte F değerinin düşük olduğu ya da dalgalı bir farmakokinetiğin sergilendiği durumlarda C_{doruk}/EAA ilaç emilme hızlarındaki farklılıkların belirlenmesinde daha fazla bir istatistiksel güce sahiptir (Toutain ve Koritz 1997).

İki ürünün kullanımı sonrası sistemik emilim oluşuyor ve kantite olarak bu etkiler belirleniyor fakat analitik olarak ortaya konamıyorsa, bu ürünler arasındaki biyoeşdeğerlik farmakodinamik veriler üzerinden değerlendirilebilir. Öte yandan sistemik emilim sonrası farmakodinamik etkide eşitlik, plazma ilaç konsantrasyonu-cevap arasındaki diğer etkilerdeki farklılığı ve/veya benzerliği garanti edemez. Bu nedenle farmakodinamik etkiler üzerinden yapılacak biyoeşdeğerlik denemelerine ait prensiplerin otoriteler tarafından çok titiz olarak önceden protokolda belirlenmesi önemlidir (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a,b, Traş ve ark 2005).

İki formülasyonun farmakodinamik denemeleri üzerinden biyoeşdeğerlik değerlendirilmesi durumunda, diğer etkilerdeki farklılıkların çok titiz olarak tespiti gereklidir. Biyoeşdeğerlik çalışmasında ölçülen farmakodinamik etki direkt, hızlı ve geri dönüşümlü (antihipertansif ilaç için kan basıncı düşüşü, diüretik ilaç için idrar akış hızı gibi) olmalıdır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a). İlaçların sistemik etkiden bağımsız yerel etki (mastitiste meme içi veya mide-barsak parazitleri için antiparaziter, ya da enteritiste enterik antibiyotiklerin kullanılması) amacıyla uygulanması durumlarında meme içi uygulamalar için süt, antiparaziter ve diğer uygulama için barsak içeriği uygun bir materyaldir ve bunlardaki analizler üzerinden biyoeşdeğerlik kararına varılmalıdır. Alternatif olarak bir farmakodinamik deneme de gerekebilir (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a).

Eğer ana ilahtan ziyade birinci derecede inaktif metabolitlerin ölçümüne elverişli bir metot mevcutsa ve/veya ürün ön ilaç formunda olup hızla aktif bir metabolite dönüştürülüyorsa, metabolit verileri üzerinden karar vermek daha uygundur (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a, Traş 2005). Hayvanlarda bakampisilin'in oral verilmesini müteakip ampisilin (Kaya 1997) veya suksibuzonun verilmesini takiben oksifenbutazon ve fenilbutazon (Jaraiz ve ark 1999) yoğunluğu üzerinden biyoeşdeğerlik çalışmasının yapılması bu konuya güzel bir örnek teşkil eder.

Bazen iki formülasyonun biyoeşdeğerliğinin belirlenmesinde aynı istatistiksel ölçütler kullanılarak söz konusu bu iki formülasyonun metabolit verileri üzerinden biyoeşdeğer, esas etkin madde verileri üzerinden biyoeşdeğer olmadığı gibi bir sonuçla da karşılaşılabılır (Toutain ve Koritz 1997).

Kan veya plazma verileri üzerinden ölçüm yapılması için uygun herhangi bir analitik metodun olmadığı veya mevcut metodun duyarlılığının düşük olduğu durumlarda ise idrardaki ana ilaç veya metabolitinin ölçümü temel alınarak biyoeşdeğerlik değerlendirmesi yapılabilir. Burada örnek alma süresi önemlidir ve bu süre kullanılan ilacın eliminasyon yarılanma ömrünün en az beş katı olmalıdır. Fakat bu tür durumlarda analizde kullanılacak metodun hem ilaç hem de metabolitinin tespitine olanak verecek nitelikte olmasına dikkat edilmeli ve atılmanın idrar dışında başka yollardan da gerçekleşebileceği unutulmamalıdır (Toutain ve Koritz 1997, Kayaalp 2001a,b).

2.3.Biyoeşdeğerlik Çalışmalarına İhtiyaç Duyulan Durumlar

2.3.1.Jenerik olarak tasarılanmamış fakat bilinen bir maddeyi veya yeni bir maddeyi içeren ürünler

Bir ilacın dozaj şeklinin özelliklerinde, bileşiminde veya imalat işlemlerinde bir değişiklik yapıldığında yeni ürünün yürütülen klinik denemelerde verilen referans ürüne

göre etkinlik ve/veya güvenlik bağlamında biyoeşdeğer olduğu gösterilmelidir (EMEA 2001). İmalat işlemlerinde firma tarafından gerçekleştirilen değişikliklerin uygunluğu eğer *in vitro* çalışmalarla doğrulanabilirse yalnızca *in vitro* biyoeşdeğerlik istenir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.3.2.Jenerik olarak tasarılanmış bilinen yeni bir maddeyi içeren ürünler

Referans etkinlik ve/veya güvenlik anlamında onaylanmış bir ürün ise biyoeşdeğerliği de gösterilmelidir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.3.3.Uygulama yollarının karşılaştırılması

Uygulamanın her iki yoluna ait plazma konsantrasyon profilleri istatistiksel olarak benzer olduğunda uygulama yolları biyoeşdeğerdir. Bazı durumlarda diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyon profilleri plazma konsantrasyon profillerinden daha uygun olabilir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.4.Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Gerekliliğini Değerlendirme Ölçütleri

2.4.1.İlacın farmasötik şekli ve veriliş yolu

Farmasötik bakımdan oral verilmeye uygun katı farmasötik şekiller başta gelir. Bunları sistemik etki için rektal yoldan kullanılanlar, transdermal uygulananlar, parenteral ve yerel uygulanan ürünler izler. Oral süspansiyonlar öncelik sıralamasında geride kalır, oral solüsyonlar ise en geridedirler ve çoğu zaman *in vivo* çalışmalardan muaftır (Kayaalp 2001a).

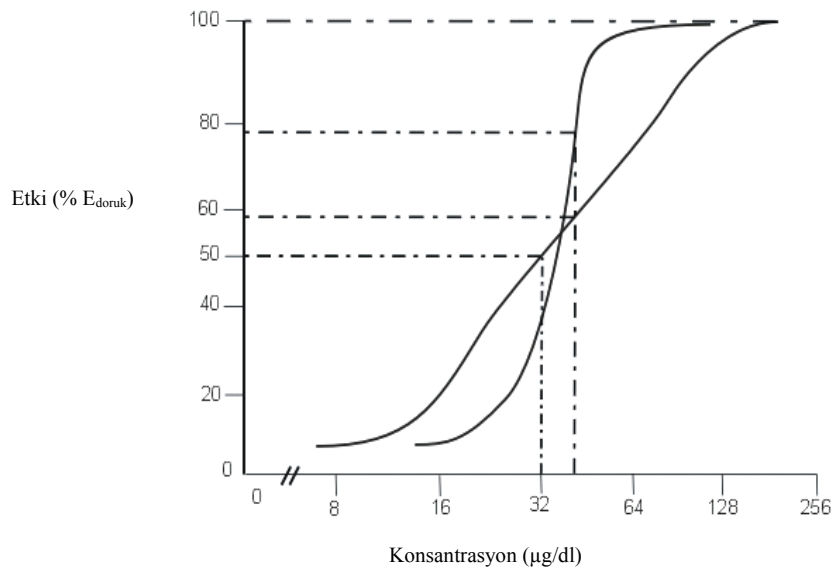
2.4.2.Etkin maddenin terapötik indeksinin genişliği

İlaçlar bu açıdan en dar terapötik indeksli olan dijital glikozidleri (indeksi yaklaşık 2) ile en geniş terapötik indeksli olan penisilinler arasında yer alır. Kinidin, prokainamid,

aminoglikozid antibiyotikler ve siklosporin, terapötik indeksi dar olan ilaçlar grubunda yer alırlar (Kayaalp 2001a).

2.4.3. Doz-cevap eğrisinin dikliği

Bir önceki konu ile çok yakından ilişkilidir. Konsantrasyondaki belirli bir değişimin ($\pm\%20$ 'lik) etkideki değişime yansımaları konsantrasyon-etki ilişkisinin dik veya yatık olmasına göre büyük fark gösterir (Grafik 2.1). Bu nokta biyoeşdeğerliğin her zaman terapötik eşdeğerlik anlamına gelemeyeceğini gösteren somut örneklerden biridir (Kayaalp 2001a).

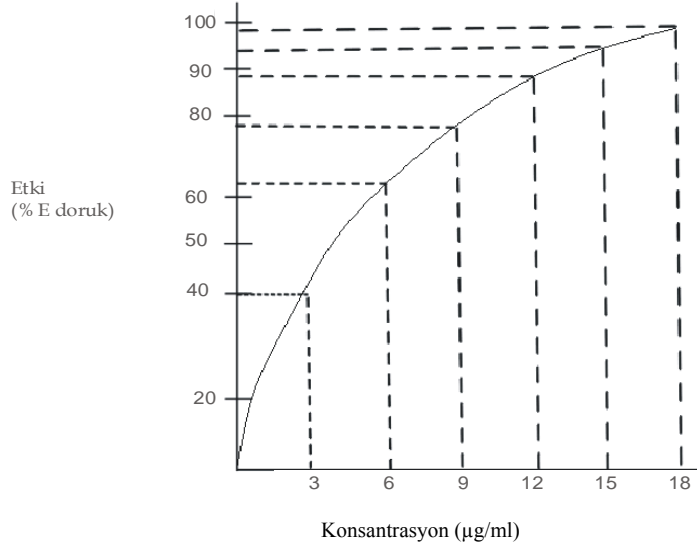


Grafik 2.1 Konsantrasyonda meydana gelen sabit bir değişimin, etkide yaptığı değişimin boyutlarının, konsantrasyon-etki eğrisinin eğiminin değişmesine göre farklı olması (Kayaalp 2001a).

2.4.4. Terapötik konsantrasyon aralığının konsantrasyon-etki eğrisindeki yeri

Doz-cevap aralığında eğrinin aralık kısmı, eğrinin etki maksimumuna yakın kısmına uyuyorsa konsantrasyonda biyoeşdeğersizlik sonucu meydana gelebilecek oldukça fazla değişimler etkide çok az bir farka neden olacaktır. Çünkü konsantrasyonun artması veya azalması ile etki şiddeti arasındaki ilişki çoğu ilaç için doğrusal değil hiperbolik bir matematiksel fonksiyona uyar (Kayaalp 2001a). E_{doruk} 'a (doruk etki noktası) yakın

konsantrasyon aralığında konsantrasyonun 18 µg/ml'den 12 µg/ml'ye düşmesi yani %33 azalması etkide yaklaşık 0.98 E_{doruk}'tan 0.88 E_{doruk}'a düşmeye yani yaklaşık %10'luk bir azalmaya yol açar (Grafik 2.2). Bu şartlarda, C_{doruk} değeri referans ürüne göre oldukça fazla (%33) düşük olan bir test ürünü referans ürünle biyoeşdeğer olmamasına rağmen pratik olarak terapötik eşdeğer olabilir (Kayaalp 2001a).



Grafik 2.2 Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun artması sonucu etki şiddetinde meydana gelen değişimleri gösteren konsantrasyon-etki eğrisi (etki şiddeti maksimum etkinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (Kayaalp 2001a).

2.4.5.Etkin maddenin farmakokinetik özellikleri

İlacın terapötik doz aralığı içinde non-lineer (doza-bağımlı) kinetik göstermesi, presistemik eliminasyonunun %70'den fazla olması, emilme oranının %70'den az olması, elverişsiz fizikokimyasal özelliklerinin bulunması (çözünürlüğünün %0.1'den az olması) emilme ve eliminasyon hızlarında denekler arasında değişkenliğin fazla olması gibi durumlar sayılabilir (Kayaalp 2001a).

2.4.6.İlacın biyofarmasötik sınıflandırma sistemindeki yeri

Bu sınıflandırma sisteminde ilaçlar suda çözünürlüklerine ve barsak permeabilitelerine göre dört gruba ayrılırlar:

- ✓ Yüksek çözünürlük/yüksek permeabiliteli ilaçlar,
- ✓ Düşük çözünürlük/yüksek permeabiliteli ilaçlar,
- ✓ Yüksek çözünürlük/düşük permeabiliteli ilaçlar ve
- ✓ Düşük çözünürlük/düşük permeabiliteli ilaçlar (CDER 2000, Kayaalp 2001a).

2.5.Biyoeşdeğerlik Çalışmasının Gerekemediği Durumlar

Eğer ürün aşağıdaki şartların bir veya birçoğunu yerine getiriyorsa biyoeşdeğerlik çalışmaları genellikle gereksizdir:

- ✓ Ürün sadece damar içi uygulamalar için tasarlanmış ve hedef türlerde kullanmak için onaylanmış bir damar içi solüsyonla aynı aktif madde veya terapötik bileşiği içeriyorsa,
- ✓ Ürün parenteral veya oral olarak uygulanan bir solüsyon şeklinde kullanılıyor ve hedef türlerde kullanılmak üzere yakın zamanda onaylanmış bir veteriner ürünüyle aynı aktif madde/maddeleri ve taşıyıcıları aynı konsantrasyonda içeriyorsa,
- ✓ Biyoyararlanımı hedef türlerde gösterilmiş referans ürünle aynı formülasyona (aynı etkin madde, inaktif ve fizikokimyasal özelliklere) sahipse (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002).
- ✓ Ürün emilmesi istenmeyen bir oral dozaj şekli olarak tasarlanmış (antiasit veya radioopak madde) ise,
- ✓ Ürün; şurup ve benzeri çözünebilir oral solüsyon ise, aktif madde veya terapötik bileşiği hedef türlerde kullanılmak üzere onaylanmış bir ürünle aynı terapötik kısım ve aktif maddeyi içeriyorsa veya aktif madde veya terapötik bileşiğin emilmesini belirgin derecede etkileyebilecek her hangi bir inaktif madde içermiyorsa,

- ✓ Ürün orijinal üreticiler tarafından yeniden formüle edildiğinde renklendirici veya tatlandırıcı ajanlar ya da koruyucular gibi biyoyararlanımda etkiye sahip olmadığı bilinenler hariç tutulduğunda orijinal ürünle özdeşse,
- ✓ Solunum yoluyla kullanılan uçucu anesteziik solüsyonlardan ise,
- ✓ Gıda üretiminde kullanılmayan hayvanlara özgü yerel etki için tasarlanan ilaçlardan ise (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002).

2.6.Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri

Biyoeşdeğerlik çalışmaları *in vivo* veya uygun özelleştirilmiş şartlarda *in vitro* olarak yapılır (Toutain ve Koritz 1997, EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Biyoeşdeğerlik çalışması, yeni ilaç araştırmaları ya da araştırılması tamamlanmış (innovatör) ürünün ruhsatlandırılması süreçlerinde;

- ✓ Klinik denemelerin erken ve son dönemlerinde kullanılan formülasyonları arasında,
- ✓ Klinik denemelerde kullanılan formülasyonlar ile pazarlanacak formülasyonlar arasında ve
- ✓ Stabilite çalışmaları ile klinik denemeler sırasında kullanılan formülasyonlar arasında karşılaştırma yapmak ve aralarında bağlantı kurmak için gerekir (Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

Avrupa Birliği Rehberlik notuna göre (EMEA 2001/CVMP/016/00-corr-FINAL) biyoeşdeğerlik çalışmaları veteriner ilaçlarının dozaj şekillerinin özellikleri değiştirildiğinde, yeni dozaj şekliyle ürün arasındaki benzerlik veya farklılığın gösterimi durumunda verilen referansın etkinlik ve/veya güvenliği anlamında klinik denemeler yapılmalıdır (Groen ve ark 1996, Traş ve ark 2005).

2.6.1.İn vitro çalışma

In vitro biyoeşdeğerlik çalışmaları aşağıdaki durumlarda *in vivo* biyoeşdeğerliğin belirlenmesine katkıda bulunabilir; *In vivo* biyoeşdeğerliği en yüksek dozaj için gösterilen ürünün en küçük dozaj formülasyonunun biyoeşdeğerliğini desteklemede, referans ürünün ve onun oral yolla uygulanabilen jenerik ürününün karşılaştırılabilirliğini belirlemede, onaylanmış bir üründe küçük bir formülasyon değişikliği yapıldığında ve bir ürünün farklı zamanlarda üretilen yığınları (batch) arasındaki tutarlılıktan emin olmak istendiğinde, *in vitro* biyoeşdeğerlik çalışmaları yeterlidir. (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.6.2.İn vivo çalışma

In vivo biyoeşdeğerlik testi en doğru, hassas ve tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılmasıyla farmakokinetik ve/veya farmakodinamik çalışma olarak planlanmalı ve yürütülmelidir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.6.2.1.Farmakokinetik çalışma

In-vivo testlerde hedef türde aktif madde veya terapötik bileşenin ya da onun göstergesi durumunda olan metabolit(ler)inin kan, plazma, serum veya diğer biyolojik sıvı ya da uygun dokudaki konsantrasyonlarının zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanan farmakokinetik verileri üzerinden değerlendirme yapılır. Burada biyolojik sıvı veya dokulardan yeterli düzeylerde ilaç yoğunluğunun ölçülebilmesi gereklidir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.6.2.2.Farmakodinamik çalışma

Bu yaklaşım uygun fizyolojik materyallerde ilaç konsantrasyonunu belirleyebilecek duyarlı bir analitik metot olmadığında kullanılabilir. Bu testte hedef türlerde zamanın bir fonksiyonu olarak aktif madde veya terapötik bileşiğin ya da metabolit(ler)inin akut farmakolojik etkilerinin uygun şekilde ölçülmesi gereklidir. Bu yaklaşımda doz-cevap

ilişkinin ortaya konması zorunludur. Yerel etki elde etmek için hazırlanmış veteriner ürünlerinde biyoeşdeğerliğin gösterimi için bu en uygun metottur (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.7.Tek Dozlu *In vivo* Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Tasarımı

2.7.1.Referans ürün

Sponsor firma referans ürün seçiminde kendi tercihini belirtme hakkına sahip olmakla birlikte, en uygun referans ürün dünyada ilk ruhsatlandırılan ürün veya orijinal moleküldür. Referans ürün aynı aktif madde bileşimini yeni bir formülasyon, yeni bir dozaj şekli veya yeni bir tuzu şeklinde içeren onaylanmış bir ürünün güncel yığınları (batch) arasından alınmalıdır. Aynı terapötik bileşimin değişik esterleri farklı ürünler olarak göz önünde bulundurulmalıdır (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Farklı talep, özellik veya etiketlerde hazırlanmış birkaç onaylanmış ürün mevcut olduğunda biyoeşdeğerlik testi jenerik ürün gibi tasarımlanmış ama aynı kullanıma yönelik olarak onaylanmış ürün ile yürütülmelidir. Aynı aktif maddeyi farklı konsantrasyonlarda içeren birçok onaylanmış ürün mevcut olduğunda kimyasal eşdeğeri olan ürünün seçilmesi en akılcı yoldur. Orijinal ürünün onaylanmış birden çok formülasyonu mevcut olduğunda (farklı türler/farklı amaçlar için) biyoeşdeğerlik çalışmaları her tür ve amaç için ayrı ayrı yürütülmelidir (Guidance for Industry 2002). Referans formülasyon olarak ele alınan bir A ürününün (A ilk onaylanan ürün) B ürününe (ilk jenerik ürün) biyoeşdeğer olduğu belirlendikten sonra, B'nin de (ilk jenerik ürün) C'ye (ikinci jenerik ürün) biyoeşdeğer olması C'nin A'ya biyoeşdeğer olduğunu garanti edemez (Toutain ve Koritz 1997).

2.7.2.Referans yol

Biyoeşdeğerlik değerlendirilmesinde referans uygulama yolu olarak klinik ve toksikolojik denemelerde kullanılan yol tercih edilmelidir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Parenteral kullanılan enjektabl solüsyonların biyoeşdeğerliği çalışmalarında, enjekte edilen ilacın hacmi ve bölgenin yüzey alanı, enjekte edilen ilacın dokuya yayılma kabiliyeti (penetrasyon katsayısı), çözelti içindekilerin hareket hızı ve buna bağlı olarak çözünmemiş kısmın çözünme hızı (çözünme işlemi sırasında merkezdeki çözünmemiş kısımdan çözünme hızı etraftaki çözünen kısmın yoğunluğu ile yakından ilgilidir), enjeksiyon bölgesinin anatomik yapısı (kan ve lenf dolaşımı yönünden) ve pH'sı (özellikle yangılı durumlarda) ile ısı, formülasyonun yağda veya suda çözünürlük durumu, hazırlanma şekli ve yoğunluğu, kullanılan ürün veya metabolitlerinin proteinlere bağlanma veya hücre içi ya da hücreler arası bölgeye taşınma ile buralarda etkili faktörler ve benzeri hususlar göz önünde bulundurulmalıdır (Toutain ve Koritz 1997, Traş ve ark 2005).

2.7.3. Test ve referans ürün için standartlar

Test ve referans olacak ürünlerin özdeşlik, dayanıklılık, nitelik ve saflık yönünden diğer kabul edilebilir standartları bütün yönleriyle karşıladığı gösterilmelidir. Test ürün içindeki ilaç miktarı referans üründeki miktardan $\pm\%5$ den fazla fark göstermemelidir (EMEA 2001, Kayaalp 2001a). Kaliteli bir ürün, biyoeşdeğerliğini ve dolayısıyla biyoyararlanım ölçümlerindeki performansını bütün raf ömrü boyunca korumalıdır (Kayaalp 2001a, Traş ve ark 2005).

2.7.4. Hayvanlar

Ürün veya uygulama yollarının karşılaştırılmasının yapılacağı *in vivo* tek doz biyoeşdeğerlik çalışmaları mümkünse ilacın kullanılmasının düşünüldüğü hedef türlerde ayrı ayrı yürütülmelidir (Toutain ve Koritz 1997, EMEA 2001). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak hayvanlar yaş, cinsiyet, ağırlık, ırk, hormon ve beslenme durumu ile verim seviyeleri yönünden bir örnek olmalıdır. Ayrıca cinsiyet ile ürünler

arasında etkileşime dair herhangi bir bilgi yoksa çalışmanın bir cinsiyetle sınırlandırılmaması önerilir (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Bir çalışma içerisinde tüm hayvanların homojenliğini sağlamak zor olduğunda (atlarda olduğu gibi) yaş, ağırlık, cinsiyet gerekirse her tedavi grubu içindeki hayvanların dikkatlice ayrımıyla elde edilen homojen olmayan grubun kullanılması kabul edilebilir. Burada sınırlandırmayla ilgili olan engelleyici faktör(ler)e göre grup seçimi rast gele yapılmalıdır (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Bir biyoeşdeğerlik çalışmasında, büyük denek içi değişkenliğe sahip olan ürün(ler) az sayıda hayvanla (n=6 gibi) çalışıldığında gerçekte formülasyonlar arasında var olan farklılık kullanılan istatistiksel metodun yetersizliğinden dolayı belirlenemeyebilir. Aksi durumda ise denek içi değişkenliği küçük olan formülasyonlar çok sayıda hayvanla (n=24) çalışılırsa tedaviler arasındaki farklılıktan emin olunabilir ama bu küçük ve tedavide anlamı olmayan bir belirleme olacaktır (Toutain ve Koritz 1997).

Uygun hayvan sayısı dikkatlice belirlenmelidir. Biyoeşdeğerlik çalışmasında kullanılacak hayvan sayısı belirlenirken tüketici riski (alfa ya da tip bir hata), üretici riski (beta ya da tip iki hata), biyoeşdeğerlik aralığı (delta) ve son olarak da test edilen biyoeşdeğerlik parametrelerindeki denek içi değişkenlik veya hatalar (sigma hatası) yeterli hayvan sayısının belirlenmesi için temel öğelerdir (Toutain ve Koritz 1997).

2.7.5.Deneme şartları

Biyoeşdeğerlik çalışmaları “İyi Laboratuvar Pratiği” (GLP) çerçevesinde yürütülmelidir. Oral yol başta olmak üzere, uygulama yolu için aktif maddenin durumunu etkileyebileceği düşünülen faktörlere özel önem verilmelidir. Beslenme ilaç ve formülasyonun özelliklerine bağlı olarak ilaç emilmesinin hız ve derecesinde denek içi ve denekler arası değişkenliği de artırabilir. Herhangi bir biyoeşdeğerlik çalışmasının verimli

bir şekilde yürütülmesi için açlık veya tokluk şartları da protokolda belirtilmelidir. Referans ürünün etiketi ürünün açlık veya tokluk durumlarında uygulanmasına bir sınırlama getiriyorsa, biyoeşdeğerlik çalışması bu durum dikkate alınarak yürütülmelidir (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002).

2.7.6. Test edilecek doz

Genellikle doğrusal (lineer) farmakokinetik gösterilmemiş ise onaylanmış doz dikkate alınmalıdır. Referans ürün olarak birkaç onaylanmış doz mevcut olduğunda, biyoeşdeğerlik testi en yüksek doz ile yürütülmelidir. Bununla da doruk plazma yoğunluğu elde edilemiyor ise doz aşımı (overdoz) ile çalışma sürdürülmelidir. Ancak burada toksikolojik yönden de çalışmaya ayrı bir önem verilmelidir. Farklı farmakolojik etkileri de olabilecek şekilde tasarlanmış (ürünün terapötik talebine karşı) bir ürün için eğer doğrusallık gösterilmemişse farklı dozlarda çoklu biyoeşdeğerlik çalışmaları gereklidir (Toutain ve Koritz 1997, EMEA 2001).

İki formülasyonu karşılaştırmada, eğer aynı etkin maddeye sahip bir ürünün yeni formülasyonu sistemik yararlanımda belirgin bir ilerleme gösteriyorsa bu durum doz seçiminde önemli bir problem olarak öne çıkar ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında bu tür durumların olması da muhtemeldir (Toutain ve Koritz 1997). Özellikle büyük hayvanlarda biyoeşdeğerlik çalışmalarında doz ayarlaması yapılırken, hayvanların canlı ağırlıklarının dikkatli takibinin EAA, C_{dorum} ve t_{dorum} değerlerinde meydana gelebilecek olası farklılıkları gidermesi bakımından önemi unutulmamalıdır (Toutain ve Koritz 1997, Martinez ve ark 2001).

2.7.7. Örneklemeye

Aktif madde ve/veya metabolitlerinin kan, serum veya plazma ya da idrardaki konsantrasyonları duyarlı bir analiz yöntemiyle ölçülür (Guidance for Industry 2002,

EMEA 2001). Örnekleme zamanları eliminasyon ve emilme derecesi ile plato veya doruk konsantrasyon ve zamanının doğru olarak belirlenmesine mümkün olduğunca izin vermelidir. Konsantrasyon-zaman eğrisinin eliminasyon döneminin doğru bir şekilde çizilebilmesi için, t_{doruk} 'tan sonra en az üç tercihen beş eliminasyon yarı ömrü kadar bir sürede uygun aralıklarla örnekleme yapılmalıdır. Her şeye rağmen bu örnekleme zamanı oral yolla uygulanan, hızlı elimine edilen veya uzun eliminasyon yarı ömürlü dozaj şekilleri için elverişli olmayabilir. Bu durumlarda biyoeşdeğerlik çalışması yapılırken en az beş eliminasyon yarı ömrü kadar bir süre, örnekleme zamanı olarak göz önünde bulundurulmalıdır (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001).

En etkili örnekleme zamanının elde edilmesinde konsantrasyon-zaman eğrisinin biçimi ve konsantrasyon değerlerindeki benzeri değişikliklerin ayrımının yapılabilmesi için pilot bir çalışmanın verilerine müracaat edilmesi gerekebilmektedir (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001).

2.7.8.Deneysel dizayn

Farmakokinetik çalışmalarda, denek içi değişkenlik denekler arası değişkenlikten genellikle daha küçük olduğundan biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde hayvanlar arası farmakokinetik farklılıkların etkisini azaltmak için tek doz çapraz tasarım seçilmelidir (Toutain ve Koritz 1997, Guidance for Industry 2002).

Birinci çalışma ile ikinci çalışma arasında bekleme süresi olarak aktif madde/maddeler veya metabolit(ler)in yarılanma ömrünün on katı bir zaman dikkate alınmalıdır. Ancak özellikle gelişmekte olan hayvanlarda eliminasyon süresi uzun ürün(ler)le yapılacak biyoeşdeğerlik çalışmalarında mikrozomal enzimlerin uyarılması ihtimaline karşı ilave bir zamana ihtiyaç duyulabilir (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak ürünlerin etkin maddesi avermektinler

gibi yağ dokuya affinitesi yüksek bileşikler içeriyorsa, iki çalışma arasındaki temizlenme süresi etkin madde/maddelerin eliminasyon yarılanma ömrünün en az on katı olmalıdır (Toutain ve Koritz 1997).

Test ve referans ürünle önceden yapılan çalışma sonuçları ile arzu edilen istatistiksel anlamlılık düzeyi ve gücü grup büyüklüğünün belirlenmesinde önemli faktörlerdir. Bu yönlerden çapraz çalışma tasarımı avantajlıdır (EMEA 2001). İki dönemli çapraz tasarım dağılım hacmi (V_d), klirens(CI), ilacın emilme hızındaki denekler arası farklılıklar gibi çalışmada değişkenliğe neden olabilecek bir dizi faktörleri elimine eder. İki dönemli çapraz tasarımda deneklerin eşit sayıda olması kaydıyla rast gele A ve B döngüsü seçilerek deneme yürütülür. Eğer bir ardışıklık etkisi belirlenmiş ise, çapraz tasarımın birinci periyodu paralel bir tasarım gibi analiz edilmelidir (Guidance for Industry 2002, Traş ve ark 2005).

Aşağıdaki durumlar söz konusu olduğunda çapraz yerine paralel tasarım tercih edilmelidir:

- ✓ İlacın hayvanda bazı fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları (koenzimleri) değiştirmesi ile ilacın klirensi ve biyoyararlanımında ikinci dönem için değişikliğin muhtemel olduğu durumlarda,
- ✓ Eliminasyon yarı ömrü çok uzun olan ilaçların biyoeşdeğerlik değerlendirmesinde,
- ✓ İki dönemli çapraz çalışma düzeninde bekleme süresinin çok uzun olması nedeniyle deneklerde belirgin yapı değişikliğinin ortaya çıkabileceği durumlarda,
- ✓ İlaç geciktirilmiş veya uzatılmış emilim (flip-flop kinetiği) gösterdiğinde (EMEA 2001).

2.8.Biyoeşdeğerlik Denemelerinin İstatistiksel Analizi

2.8.1.Analiz olacak karakteristikler

Kan serumu ya da plazma örneklerinin konsantrasyon-zaman eğrilerinden çıkarılan farmakokinetik parametreler analiz edilmelidir. Olası önyargılardan sakınmak için asıl parametre karşılaştırmaları, uyarlanmış verilerin yerine gözlemlenilen veriler üzerinden yapılmalıdır (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002).

2.8.2.Tek dozlu çalışmalar

Ölçüt olarak dikkate alınacak parametreler önceden belirlenmeli ve klinik ve/veya toksikolojik etkilere uygun olmalıdır (EMEA 2001). Biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde asıl parametreler ilacın biyoyararlanım derecesini gösteren konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan (EAA) ile kısmen biyoyararlanımın derece ve hızı ile ilaca maruz kalma maksimumuna işaret eden doruk konsantrasyon (C_{dorum})'dur. Diğer bazı çalışmalarda dikkate alınabilen (McKellar ve ark 1999, Sumano ve ark 2001b) ve değerlendirmede kullanılan doruk konsantrasyona ulaşma süresi (t_{dorum}), ortalama kalış zamanı (OKZ), Moment Eğrisi Altındaki Alan (MEAA) gibi parametreler de vardır (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002).

$EAA_{(0-\infty)}$ lineer trapezoidal yöntemle hesaplanmalıdır. Eğer eliminasyon fazındaki örnekleme aralıkları yeterli ise logaritmik trapezoidal yol veya diğer metotlar da kullanılabilir (EMEA 2001, Zintzaras ve ark 2002). EAA'nın hesaplanma metodu önceden belirlenmeli ve ekstrapolasyondan tercihen sakınılmalıdır. Uygun durumlarda ekstrapolere edilen EAA kısmı, toplam EAA'nın %20'sinden daha fazla olduğu bütün durumlarda $EAA_{(0-\infty)}$ 'un kullanılması mümkün değildir. Benzer teknikler Moment Eğrisi Altındaki Alan (MEAA) ve Ortalama Kalış Zamanı (OKZ) için de geçerlidir (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002, Zintzaras ve ark 2002).

C_{doruk} ve t_{doruk} karakteristikleri eğer doruk konsantrasyon açıkça belirlenmiş ve doruk bölgesindeki uygun örnekleme zamanları doğru bir biçimde tespit edilmişse anlamlıdır (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002, Zintzaras ve ark 2002).

OKZ ise sadece aynı hayvanlarda damar içi (d.i.) uygulama sonrasında OKZ belirlenmiş olduğu zaman kullanılabilir (EMEA 2001). Plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisinden elde edilen OKZ, emilme hızlarındaki farklılıkları belirlemede t_{doruk} 'a bir alternatif veya onunla karşılaştırılabilir bir değer olarak önerilmektedir. Eliminasyon yarılanma süresi beş saatten az ve emilim hızı eliminasyon hızından yüksek formülasyonlarda test ve referans formülasyonların OKZ değerleri arasındaki fark, emilme hızlarındaki farklılıkların belirlenmesinde en güçlü parametre olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte eğer eliminasyon yarılanma süresi beş saati aşıyorsa, OKZ'daki farklılıklar için %90 güven aralığı biyodeşdeğerlik testinde genellikle çok geniştir (Toutain ve Koritz 1997, EMEA 2001).

2.8.3. Biyodeşdeğerliği belirleme ölçütü (Biyodeşdeğerlik aralığı)

İki veya daha çok ürünün biyodeşdeğer olduklarının kararını verirken sadece sayısal değerlerin istatistiksel önemi değil, denek içi ve denekler arası değişkenlerin tıbbi önemi de dikkate alınmalıdır. Bazı ürünler için biyoyararlanımdaki daha büyük değişkenlik, terapötik kullanım amacı veya ürünün geniş terapötik indeksi nedeniyle çok titiz dozaj rejimi gerektirmemesi hallerinde göz ardı edilebilir (EMEA 2001, Zintzaras ve ark 2002).

Yüksek derecede değişken (ANOVA testi ile belirlenen özne içi varyasyon katsayısı %30'dan fazla olan) ilaçlar ile ilaç olarak kullanılan endojen etkin maddeler ve eliminasyon yarılanma ömrü çok uzun ya da kiral maddeler içeren ürünlerin biyodeşdeğerliğinin değerlendirilmesinde kabul aralığı veya diğer ölçütler açısından var olan sorunların çözümü için bu sınırların biraz daha genişletilmesi bazı otoriteler

tarafından tavsiye edilmektedir. Yüksek derecede değişken ilaçlar ile yapılan biyoeşdeğerlik çalışmalarında fazla sayıda denek kullanılması gerekmektedir. Bir diğer husus, yüksek derecede değişken ilaçlar ayrıca terapötik indeksi dar ilaçlardan ise bu ilaçlarla yapılacak biyoeşdeğerlik çalışmalarında kabul aralığı 'kale'nin genişletilmesinin yanında kararlı durum çalışması yapılması da önemlidir (Kayaalp 2001a).

Biyoeşdeğerlik verilerinin yorumlanmasında %90 güven aralığı daima kullanılmaktadır. Genel kural olarak EAA için iki uygulama ortalaması karşılaştırıldığında bu aralığın %80–125 sınırları içinde olması gerekir. Ancak geniş güvenlik aralığına sahip bileşikler ya da geniş terapötik indekse sahip bileşikler için bu sınırların daha da genişletilmesi tavsiye edilmektedir (Toutain ve Koritz 1997). Eğer ilacın etkisi kademeli doz-cevap özelliğinde ise %20'lik bir fark kabul edilmeyebilir (EMEA 2001, Traş ve Yazar 2002). C_{doruk} için de bu %90 güven sınırı %80-125'dir. Fakat bu parametre özellikle örneklemeye bağımlı olarak çok büyük bir değişkenlik sergiliyorsa %70-143'lük sınırlar kabul edilebilir (Guidance for Industry 2002, EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

Bu önemli iki parametrenin (EAA ve C_{doruk}) %90 güven sınırlarının (0.8–1.25) karşılaştırılmasıyla farmasötik olarak eşdeğer olmayan ama aynı etkin maddeyi içeren ürünler için biyoeşdeğer olarak karar verilebilir (Traş ve Yazar 2002).

Zamana bağlı t_{doruk} gibi parametreler için (eğer kullanılması gerekiyorsa) değişkenliğin izafî bir aralığı seçilmelidir, burada 10 dakikalık t_{doruk} 'un %20 değişkenliği 120 dakikalık t_{doruk} 'un %20 değişkenliği ile aynı anlamda olamaz. Bu parametre için biyoeşdeğerlik aralığı dikkatlice tarif edilmeli ve doğrulanmalıdır (EMEA 2001, Traş ve ark 2005).

2.8.4. Veri analizi

Veri analizi ayrıntılı olarak yapılmalıdır. Bir varyans analizi (formülasyon, dönem, sıklık, sıklık içindeki hayvanlar ve uygun olduğunda cinsiyet ve cinsiyet formülasyon etkileşimleri dahil) güven aralığının hesaplanmasında kullanılacak değişkenlik hatasının belirlenmesinde gereklidir (EMEA 2001). EAA ve C_{doruk} için varyans analizi yapmadan önce verilerin logaritmaya dönüştürülmesi tavsiye edilir. Buradaki temel amaç;

- ✓ Değişkenleri kararlı duruma getirmek,
- ✓ Parametre dağılımını normalleştirmek,
- ✓ Kullanılan istatistiksel modelin katkısından emin olmak ve
- ✓ Biyoedeğerlik aralığını bir oran veya yüzde (%) olarak gösterebilmektir (Toutain ve Koritz 1997).

Zamana bağlı parametrelerin değerlendirilmesinde bu dönüşüm uygun olmadığından non-parametrik bir yaklaşımla istatistiğe sokulması düşünülmelidir (EMEA 2001, Zintzaras ve ark 2002).

Genellikle parametrik ve non-parametrik metotlar çok benzer kabul sınırlarının hesaplanmasına rehberlik ederler. Sponsorlar kendilerine ait ürünlerin biyoedeğerliğinin belirlenmesinde düzenleme otoriteleriyle temas kurarak, non-parametrik yaklaşımın kullanılmasını öncelikle tavsiye ederler (Toutain ve Koritz 1997).

Biyoedeğerlik kararını verebilmek için ANOVA tablosunda bulunan belirlenmiş hata değişkenliği ile hesaplanan güven aralıkları, alt ve üst sınırları önceden belirlenmiş sınırlarla karşılaştırılmalıdır. Logaritmaya dönüşümü yapılmış veriler için %80–%125 veya %70–%143, dönüşümü yapılmamış değerler içinse %80–%120 veya %70–%130 sınırları dikkate alınır. Aynı şekilde terapötik indeksi dar olan ilaçlarda, EAA üzerinden biyoedeğerlik kararını verirken sınırların daraltılması (logaritmaya dönüşümü yapılmamış

veriler için 0.9–1.10 ve dönüşümü yapılmış veriler için 0.9–1.11) gereklidir (Toutain ve Koritz 1997). EAA parametresine göre yapılan biyoeşdeğerlik incelemelerinde, biyoeşdeğer olduğu belirlenen ürünler hakkında diğer bütün parametrelere göre ürünler biyoeşdeğer olmasa dahi, olumsuz tüm hipotezler reddedilerek biyoeşdeğerlik lehinde karar verilebilir (EMEA 2001).

2.9.Veteriner Sahada Kullanılan Bazı İlaçlar İçin Gerçekleştirilen Biyoeşdeğerlik Çalışmaları

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği ülkelerinde gerekli kanuni düzenlemelerin yapılmasını takiben veteriner hekimlikte kullanılan bazı ilaçlar için biyoeşdeğerlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu alanda yapılacak biyoeşdeğerlik çalışmalarına planlama, gerçekleştirme ve diğer kriterler açısından örnek teşkil edecek çalışma sonuçları özet olarak sunulmuştur (Tablo2.1).

Tablo 2.1 Bazı araştırıcılar tarafından değişik hayvan türlerinde farklı ürün/ürünler kullanılarak yapılan biyoeşdeğerlik çalışma sonuçları

Kullanılan Ürün	Çalışmanın amacı	Hayvan türü	Uygulama yolu	Araştırıcı ve yıl	Biyoeşdeğerlik çalışma tipi	Değerlendirme Parametreleri	Biyoeşdeğerlik aralığı	KARAR
İvermektin	İVM Test ve İV Kont.'un biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Domuz	Deri altı	Lifschitz ve ark 1999	Farmakokinetik	C_{doruk} , $EAA_{0-20gün}$ ve EAA_{top}	0.8-1.25	Biyoeşdeğer
İvermektin	İVM Test ve İV Kont.'un biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Sığır	Deri altı	Lifschitz ve ark 1999	Farmakokinetik	C_{doruk} , $EAA_{0-20gün}$ ve EAA_{top}	0.8-1.25	Biyoeşdeğer
Seftiofur sodyum	Deri altı ve kas içi uygulama yolunun biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Sığır	Deri altı ve kasiçi	Brown ve ark 2000	Farmakokinetik	EAA_{0-last} , $EAA_{0-∞}$, C_{doruk} , t_{doruk} ve $t_{>0,2}$	0.8-1.25	Biyoeşdeğer
Enrofloksasin	Baytril %10 oral ile üç müstahzarın biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Piliç	Oral	Sumano ve ark 2001a	Farmakokinetik	C_{doruk} ve EAA	0.8-1.25	Biyoeşdeğer değil
Enrofloksasin	Baytril %10 oral ile 9 ticari müstahzarın biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Sığır	Kas içi	Sumano ve ark 2001b	Farmakokinetik	EAA, C_{doruk} , $t_{1/2β}$	0.8-1.25	Biyoeşdeğer değil
Enrofloksasin	Enrofloksacyna % 10'un, Baytril %10'a biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Piliç	Oral	Posyniak ve ark 2001	Farmakokinetik	C_{doruk} , t_{doruk} ve EAA	0.8-1.25	Biyoeşdeğer
Suksibuzon	Pasta ve granül şekillerinin biyoeşdeğerliğinin araştırılması	At	Oral	Jaraiz ve ark 1999	Farmakokinetik	EAA_{0-last} , C_{doruk} ve MRT(OKZ)	0.8-1.25	Biyoeşdeğer
Karprofen	Deri altı ve oral uygulama yolunun biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Köpek	Oral ve deri altı	Clark ve ark 2003	Farmakokinetik	C_{doruk} ve EAA	-20% ve +25% (0.8-1.25)	Biyoeşdeğer
Deltametrin	İki ürünün farmakodinamik biyoeşdeğerliğinin araştırılması.	Koyun	Oral	Cadiergues ve ark 2004	Farmakodinamik	Uygulama sonrası 7. ve 14. günlerde artropot sayımı	Direk bakı	Biyoeşdeğer

Tablo 2.2 Biyoedeğerlik çalışmalarına ait sonuçlarının değerlendirilmesinde doğru ve yanlış kararın önemini vurgulayan tablo.

		GERÇEK	
		Biyoedeğer	Biyoedeğer değil
KARAR	Biyoedeğer	Doğru karar herkes kazanır	Yanlış karar tüketici kaybeder
	Biyoedeğer değil	Yanlış karar destekleyen kaybeder	Doğru karar tüketici kazanır

Biyoedeğerlik çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde verilen kararın doğru veya yanlış olması (Tablo 2.2) üretici, tüketici ve ülke ekonomisi açısından oldukça önemlidir (Öner 1994).

2.10. Enrofloksasin ve Farmakokinetik Özellikleri

Enrofloksasin (1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7[4-etil-1-piperazinil]-3 kuinolin karboksilik asit), sadece veteriner hekimliği alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş, florokinolonlar grubunda yer alan, bakterisid etkili antimikrobiyel bir ilaçtır. Enrofloksasin, aminoglikozidler, β -laktamlar, tetrasiklinler, folik asit antagonistleri ve makrolidler gibi antimikrobiyel ilaçlara dirençli mikroorganizmalara da etkilidir (Scheer 1987, Paton ve Reeves 1988, Flammer ve ark 1991, Walker ve ark 1992, Anadon ve ark 1995). İlacın EKEY (MİK=En Küçük Engelleiyici Yoğunluk)'u hakkında farklı değerler bildirilmektedir (0.008–0.75 $\mu\text{g/ml}$ Scheer 1987, 0.01–0.5 $\mu\text{g/ml}$ Flammer ve ark 1991, 0.03–0.75 $\mu\text{g/ml}$ Vancutsem ve ark 1990). Fakat bu değer *P.auroginosa* için 2.04 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar çıkabilmektedir (Vancutsem ve ark 1990). İlacın, 2.5–5 mg/kg dozunda oral veya parenteral günde bir defa hayvanlara verilmesi, veteriner hekimliği uygulamasında kabul edilen ve önerilen dozaj rejimidir (Vancutsem ve ark 1990, Kaya 1997, Appelbaum ve Hunter 2000).

DNA jiraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek etkilerini gösterirler. Memeli hücreleri bu enzimlerden yoksun olduğu için bu ilaçlar sadece bakteri hücrelerini seçici bir şekilde etkilerler. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu, DNA kalıbı çıkamadığı için bölünme oluşmaz ve bakteriler normal olmayan biçimde uzayarak ölürlere (Kaya 1997, Elmas ve Traş 1999).

Enrofloksasinin eliminasyon yarı ömrü, uygulama yolu ve hayvan türüne göre değişmekle beraber uzun (2–9 saat) olması nedeniyle belirtilen dozlarda günlük tek veya iki kez yapılan ilaç uygulamalarının sağaltım için yeterli olduğu bildirilmektedir (Cabanes ve ark 1992, Mengozzi ve ark 1996, Kaartinen ve ark 1997a, Elmas ve ark 2000, 2001). Enrofloksasin, d.a. (deri altı) ve k.i. (kas içi) uygulamaları takiben 1–4 saat içinde serum doruk konsantrasyonlarına ulaşmaktadır (Scheer 1987, Broome ve ark 1991, Walser ve ark 1993, Kaartinen ve ark 1995, Mengozzi ve ark 1996, Kaartinen ve ark 1997a, Elmas ve ark 2001). Sistemik dolaşımında elde edilen ortalama doruk yoğunluğu ise yine uygulama yolu, dozu ve hayvan türüne göre değişmekle beraber 0.8–3 µg/ml arasındadır (Cabanes ve ark 1992, Mengozzi ve ark 1996, Kaartinen ve ark 1997b, Elmas ve ark 2000, 2001).

Uygulama yerinden çok hızlı ve yüksek oranda emilen enrofloksasinin vücudun tüm doku ve organlarına dağılım oranı çok yüksektir. Dağılım hacmi (V_d) ise ortalama 0.6–3 L/kg arasındadır (Davidson ve ark 1986, Vancutsem ve ark 1990, Cabanes ve ark 1992, Mengozzi ve ark 1996). Değişik hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda enrofloksasinin dokulara (Scheer 1987, Anadon ve ark 1995, Intorre ve ark 1997) ve doku sıvısının göstergesi durumundaki lenf (Elmas ve Traş 1999) ve bronkoalveolar lavaj (Hawkins ve ark 1998, McKellar ve ark 1999) sıvılarına, EKEY ve plazma/serum düzeylerinin üstünde geçtiği belirtilmektedir.

Enrofloksasin, %20–55 oranında karaciğerde mikrozomal enzimlerce de-etilasyon tepkimesi sonucu, kendisi gibi güçlü antibakteriyel etkinliğe sahip ana metaboliti olan

siprofloksasine dönüştürülür (Küng ve ark 1993, Kaartinen ve ark 1995, 1997a, Mengozzi ve ark 1996, Intorre ve ark 1997, Cester ve Toutain 1997, McKellar ve ark 1999). Enrofloksasinin, siprofloksasinden başka metabolitleri de vardır (Kaartinen ve ark 1995). Koyunda enrofloksasinin d.i. uygulama sonrası siprofloksasine dönüşüm oranında k.i. uygulamaya göre (%35) d.i. uygulama sonrası (%55) belirgin bir farklılık tespit edilmiş olup bu farklılığın d.i. uygulama sonrası hızlı ve geniş bir dağılım hacminin gerçekleşmesinden kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır (Mengozzi ve ark 1996, Traş ve Elmas 2005).

Hatta enrofloksasinin bir ön ilaç (prodrug) olduğu ve bakterilere karşı oluşturulan etkinliğin önemli bir kısmının ana metabolit olan siprofloksasin tarafından meydana getirildiğinin belirtilmesinin yanı sıra (Küng ve ark 1993, Cester ve Toutain 1997), bazı hayvan türlerinde ve gençlerde siprofloksasin dönüşümünün önemsiz olması (Fraile ve ark 1997, Intorre ve ark 1997), enrofloksasinin kendisinin de etkili olabildiğini göstermektedir.

Enrofloksasinin siprofloksasine dönüşüm oranları kullanım yolu ve hayvan türlerine göre değişmektedir. Bu oranlar kedide oral yolla kullanım sonrası 13. dakikada %20'den fazla, köpekte %40, ördekte %10, atda %20–35, lamada %36, papağanda %3–78, domuzda %10, koyunda %35–55 ve sığırlarda 5 mg/kg dozunda damar içi uygulama sonrası %35 oranında dönüştüğü belirlenmiştir (Traş ve Elmas 2005).

Enrofloksasin, vücuttan başlıca böbrek, ikincil olarak da safra ile atılır (Vancutsem ve ark 1990, Kaya 1997). Glomerüler filtrasyon ve probenaside duyarlı tubüler sekresyon sayesinde idrarda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek yetmezliklerinde atılım azalacağından, hastaların durumu gözden geçirilerek gerekli doz ayarlaması yapılmalıdır. Safra ile atılma oranları türlere göre değişmektedir (Vancutsem ve ark 1990).

Çok yüksek dozlarda kullanıldıklarında yavru ve genç hayvanlarda kıkırdak dokusu ve eklemlerde hasara neden olduğundan köpek ve atlar başta olmak üzere, büyümekte olan hayvanlarda florokinolonların kullanılmasının sakıncalı olduğu bildirilmiştir (Mengozi ve ark 1996).

Florokinolonların en fazla lipofilik olanı enrofloksasindir. Yavruların toplam vücut yağ oranları erişkinlerden daha az olduğundan dokulara toplam ilaç dağılımı azalmakta ve buna bağlı olarak da ilacın yarılanma ömründe azalma oluşmaktadır (Seguin ve ark 2004).

Bazı florokinolonlar bakterilerin büyüme dönemindeki durağan fazda bile yüksek derecede bakterisit etkinliği sürdürürler, bundan dolayı da daha geniş bir doz aralığının sağlanması haliyle tedavide önem arz eder (Bermingham ve ark 2000).

Florokinolonların oral yolla demir, alüminyum, magnezyum, kalsiyum gibi iki veya üç değerli maddelerle birlikte verilmesi hayvanlarda emilimi azaltabilmektedir. Bu nedenle bu tür maddelerden 1–1.5 saat önce veya sonra verilmelidir (Traş ve Elmas 2005).

Enrofloksasin, sığırlarda da benzer farmakokinetik özellikler göstermektedir (Kaartinen ve ark 1995). Sağmal sığırlarda k.i. yolla 5 mg/kg dozda uygulanan enrofloksasinin 4–8. saatler arasında sütte 1.3–2.5 µg/ml'lik C_{doruk} sağladığı, geniş bir dağılım hacmine ($V_d=1$ L/kg) ve 5.9 saat gibi uzun bir yarılanma ömrüne ($t_{1/2\beta}$) sahip olduğu tespit edilmiştir (Kaartinen ve ark 1995). Aynı çalışmada, enrofloksasinin d.i. yolla uyguladıktan sonra sütte 0.7–1.3 saatler arasında doruk konsantrasyon sağladığı ve temel bazı farmakokinetik parametrelerin ($t_{1/2\beta}$ ve OKZ) d.a. ve k.i. yolla uygulamalarda benzerlik gösterdiği, fakat d.i. uygulama bu iki yolla karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) olduğu belirlenmiş ve uygulama yoluna bakılmaksızın uygulanan toplam enrofloksasinin yaklaşık %0.2 gibi bir miktarı ilk 24 saatte sütte tespit edilebildiği, serumdaki antibakteriyel aktivitenin d.a. uygulamada k.i. uygulamaya göre belirgin biçimde yüksek olduğu ama bu uygulama yollarına ait C_{doruk} değerlerinin belirgin bir

farklılık arz etmediği tespit edilmiştir. Ortalama Emilme Zamanı (OEZ) (MAT) yönünden karşılaştırma yapıldığında 6.2 saat k.i. ve 6.9 saat d.a. olarak, OKZ (MRT) değerleri d.i., k.i. ve d.a. sırasıyla; 1.80, 7.98 ve 8.40 saat olarak belirlenmiştir (Kaartinen ve ark 1995).

Sığırlarda yapılan çalışmalarda örneklerin toplanmasıyla ölçüm yapılması arasında geçen sürenin (örnek depolama süresi) plazma ve/veya serum içerisindeki enrofloksasinin siprofloksasine dönüşümünde belirgin bir etkisi söz konusudur (Kaartinen ve ark 1995).

Enrofloksasin sağladığı geniş etki spektrumu, geniş dağılım hacmi, uzun yarılanma ömrü, oluşan metabolitin de (siprofloksasin) antibakteriyel etkiye sahip olması, bakteriyel direnç gelişiminin en az olması, birçok mikroorganizma için düşük EKEY (MIC) değerine sahip olması, d.a. ve k.i. uygulama sonrası yüksek biyoyararlanım sergilemesi ve plazma proteinlerine bağlanma oranının düşük olması gibi üstünlüklerinden dolayı veteriner ilaçları arasında öncelikli olarak tercih edilmekte ve geniş uygulama alanı bulmaktadır.

Ülkemizde aynı miktarda enrofloksasin (%10) içeren ve farmasötik eşdeğer oldukları için muadil olarak ruhsatlandırılan 16 adet ürün mevcuttur. Bu çalışmada A (referans) ürünü ile B (test) ürününün sığırlarda k.i. yolla 2.5 mg/kg dozda uygulaması sonrasında biyoeşdeğerliği araştırılmıştır

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın tüm aşamaları ülkemizde benzer bir yönetmelik olmadığı için Avrupa Birliği “**Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Biyoeşdeğerlik Çalışmaları**”nın bilimsel kural ve değerlendirme esaslarını içeren yönetmelik (EMEA 2001/CVMP/016/00-corr-FINAL) temel alınarak yürütüldü.

3.1.1. Hayvanlar

Çalışma 6 adet 12–18 aylık İsviçre esmeri (ortalama 360–400 kg) düveler üzerinde gerçekleştirildi. Hayvanlar 15 gün önceden aynı ortama alınarak herhangi bir ilaç uygulanması engellendi, ikinci uygulama tamamlanıncaya kadar bu duruma titiz biçimde devam edildi. Hayvanlar ilaç uygulamalarından bir gün önce doz ayarlamasının dikkatli olarak belirlenebilmesi için tartıldı. Yem olarak günde 3 defa kaliteli mısır silajı, su *ad libitum* olarak verildi. Bu çalışmanın klinik safhası 22.07.2004 ve 06.08.2004 tarihlerinde Malatya Sultansuyu Tarım İşletmesine ait Yeniköy inekhanesinde, analizlerin yapıldığı biyoanalitik safhası ise 2005 yılı Nisan ayında İstanbul Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde tamamlandı. Denemelere başlamadan önce S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrasında tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin Etik Kurul Yönergesi’ne uygunluğuna dair rapor (no=2004/12) alındı (Ek-1).

3.1.2. İlaçlar

Çalışmada ülkemizde satışı sunulan ve enrofloksasin içeren (biri biyoeşdeğerlik çalışmalarındaki referans ürün tanımına uygun molekül ve diğeri ise bir yerli ürün) iki farklı müstahzarın farmakokinetik profilleri karşılaştırıldı. Bunlar A ve B ürünü olarak belirlendi. Ürünler ile ilgili detaylı bilgi ülkemizde yürürlükte olan herhangi bir yönetmelik

olmaması nedeniyle verilememiştir. Çalışmada kullanılan ilaçlar araştırmacı tarafından muadil ürünlerin sahadaki güncel yığınları içinden rast gele örneklenerek toplandı.

3.1.3.Araç ve gereçler

1. Vakumlu cam tüp (10 ml EDTA'lı) (200 adet),
2. Santrifüj (SİGMA, 3 K18, Almanya),
3. Plastik tüp (10 ml),
- 4.Vorteks (Thermolyne, Type 37600 mixer, Barstead/Thermolyne, Amerika Birleşik Devletleri),
5. Viyal 0.5 ml (200 adet),
6. Buzdolabı (Bosch) 2001 model,
7. Derin dondurucu -86 C° (Thermo Forma, ULT Freezer, Amerika Birleşik Devletleri),
8. Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi (HPLC) (Thermo Finnigan, Surveyor Autosampler, PDA-Detector, LC Pump, Model SRVYR-PDA5, İngiltere),
9. pH metre, (HANİVA instruments, HI 931401, Microprocessor, Portekiz).

3.1.4.Kimyasal madde ve solüsyonlar

3.1.4.1.Kimyasal maddeler

Diklormetan (GPR™ BDH prod28096 6F), Asetonitril (J.T.Baker İnc.), disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄, Merck), sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄, Merck), sodyum hidroksit (NaOH, Merck), orthofosforik asit (H₃PO₄, Merck), enrofloksasin % 98> (BioChemika/Fluka, 17849), trietilamin (J.T.Baker İnc.), su olarak ultra saf su 18.2 kullanıldı.

3.1.4.2.Solüsyonlar

Stok çalışma solüsyonları: Enrofloksasinin saf şeklinden 10 mg tartılarak, 100 ml 0.5M sodyum hidroksitte çözdürüldü.

3.2.Metot

3.2.1.Çalışma tasarımı ve ilaç uygulamaları

Çalışma iki dönemli tek dozlu çapraz (cross-over) tasarıma göre gerçekleştirildi. Çalışmada denek olarak kullanılan 6 hayvandan yarısına B ürününden diğer yarısına A ürününden önerilen dozda (2.5 mg/kg) kas içi (*M.semitendinosus* ile *M. Semimembranosus* arasına) yolla uygulandı. İki haftalık temizlenme süresinden sonra aynı işlem çapraz olarak tekrarlandı.

3.2.2.Kan örneklerinin toplanması

Hayvanlardan uygulama öncesi 0. ve ilaç uygulamalarını takiben 10., 20., 30., 45., 60., 90. dakikalar ile 2., 3., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde *V. jugularis*'ten katater yardımıyla toplanan 10 ml kan örnekleri anında steril 10 ml'lik EDTA'lı vakumlu tüplere alındı, 2500 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüje edilerek elde edilen plazma örnekleri saklama tüplerine aktararak, ekstraksiyon ve analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

3.2.3.Plazma enrofloksasin düzeyinin belirlenmesi

Anadon ve ark (1995) tarafından bildirilen metota uygun olarak plazmalardan ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstraktlardaki enrofloksasin düzeyi yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC)'de ölçüldü.

3.2.3.1.Enrofloksasin ekstraksiyonu

Anadon ve ark (1995)'nin kullandıkları metot modifiye edilerek uygulandı. 2 ml örnek üzerine 3 katı oranında diklormetan ve 1 ml 0.05 M Na-fosfat buffer solüsyonu (pH:7.5) ilave edilerek vortekste karıştırıldıktan sonra 2500 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Diklormetan kısmı alınarak üzerine 0.5 ml 0.5 M NaOH solüsyonu ilave edildi, vortekste karıştırıldı ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sulu kısmın 0,5 ml'si viyallere alındı ve 10 µl'si HPLC analizi için kullanıldı.

3.2.3.2. HPLC parametreleri

HPLC : Thermo Finnigan, Surveyor Autosampler, PDA-Detector, LC Pump, Model SRVYR-PDA5, İngiltere

Mobil faz : Acetonitril (A): 0.025 M Ortofosforik asit (B) (triethylaminle pH:3'e ayarlandı).

Pompa programı : % 20 A % 80 B

Dedektör : Diode array dedector (DAD)

Kolon : C₁₈ Thermo-Hypersil-Keystone 250x4.6mm 5µ Hypersil® BDS

Dalga boyu : 278 nm

Akış hızı : 1ml/dakika

3.2.4.Farmakokinetik hesaplamalar

Biyoeşdeğerlik değerlendirmesine esas oluşturacak iki müstahzara ait farmakokinetik değişkenlerin belirlenmesinde Wagner (1975) ve Shumaker (1986) tarafından bildirilen eşitliklere göre hesaplama yapan iki paket bilgisayar programı kullanıldı. Enrofloksasinin sığırlara kas içi uygulanmasından sonra elde edilen farmakokinetik özellikleri iki kompartmanlı açık modele uygunluk gösterdi. Her bir hayvanın plazma konsantrasyonu-

zaman eğrileri çizildikten sonra aşağıdaki temel eşitlik üzerinden farmakokinetik değişkenler hesaplandı.

$$C=A_1e^{-\alpha t}+A_2 e^{-\beta t}-A_3 e^{-k_a t}$$

Bu formülde C plazma konsantrasyonu, A_1 , A_2 ve A_3 matematik katsayıları, α dağılım dönemindeki eğrinin eğimi veya hız sabitesini, β atılma dönemindeki eğrinin eğimi veya hız sabitesini, k_a ise merkezi bölmeye birinci derece emilme hız sabitesini, t zamanı ifade eder.

Kas içi uygulamadan sonra elde edilen eğrinin altındaki alan (EAA_{0-24} ve EAA_{toplam}) logaritmik trapezoid metoduna göre hesaplandı. t_{doruk} ve C_{doruk} ise çizilen eğrilerin direkt bakışı ile elde edildi. Farmakokinetik değişkenlerden eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2\beta}$) ve (OKZ) ise Wagner (1975) tarafından bildirilen eşitlikler yardımıyla hesaplandı.

3.2.5. İstatistiksel analiz

İlaçların parenteral uygulamayı takip eden örnekleme zamanlarındaki plazma konsantrasyonları ile farmakokinetik hesaplamalar sonucu elde edilen eliminasyon yarılanma ömürleri ve eğrinin altındaki alan değerlerine her ilacın kendi içinde, Minitab Release 9.2 (1993) yardımıyla "iki yönlü t testi" uygulanarak önem kontrolü yapıldı. Biyodeşdeğerlik sonucuna ulaşabilmek için ANOVA tablosunda bulunan belirlenmiş hata değişkenliği ile hesaplanan güven aralıklarının alt ve üst sınırları önceden belirlenmiş sınırlarla karşılaştırıldı.

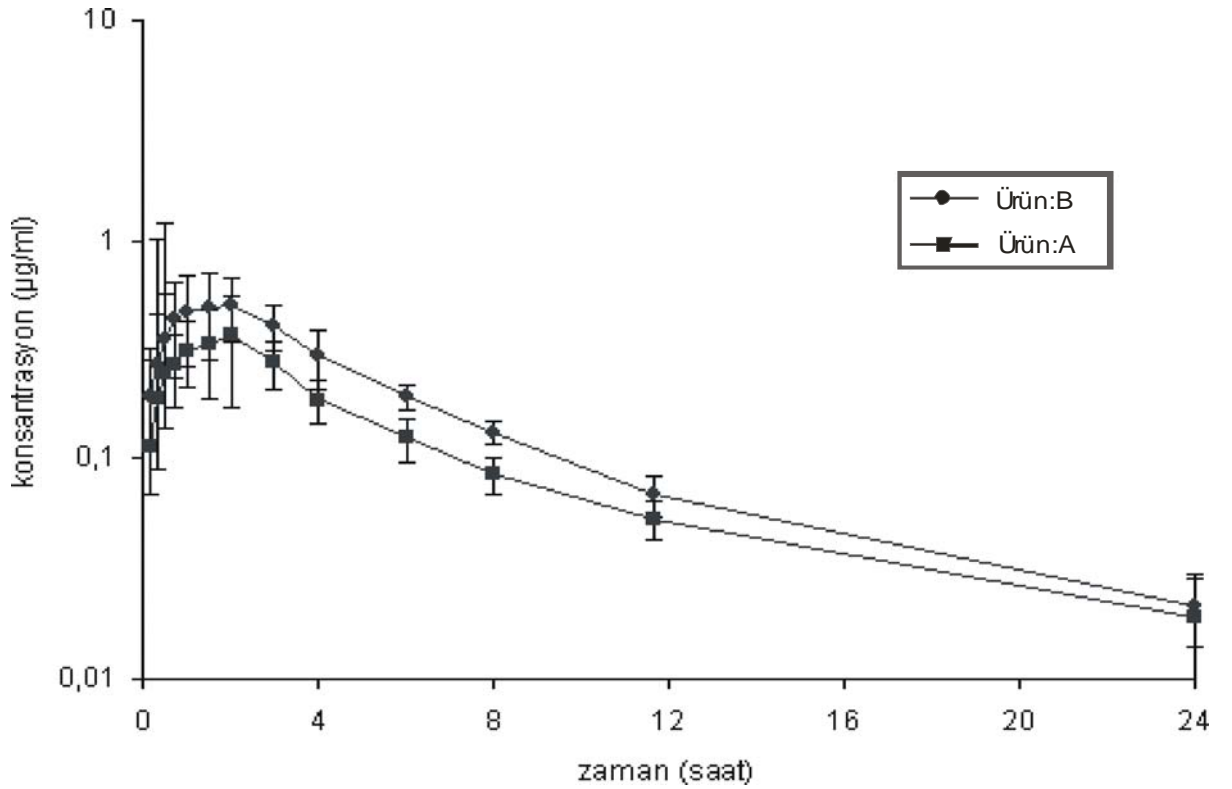
3.2.6. Verilerin analizi ve biyodeşdeğerlik değerlendirmesi

EAA ve C_{doruk} için logaritmik dönüşüm yapıldıktan sonra biyodeşdeğerlik için %90 güvenle olması gereken 0.7–1.43 aralığı göz önüne alınarak karar verildi. Zamana bağlı bir parametre olup ikinci derecede önemli kabul edilen t_{doruk} için ise logaritmik dönüşüm yapılmadığı için 0.8–1.25 aralığı dikkate alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada A[®] (referans ürün) ve B[®] (test ürün) ürünlerde kalite kontrol amacıyla yapılan ölçümlerde pH değeri sırasıyla 10.910 ve 11.145, etkin madde miktarı ise 95.7 mg/ml ve 106 mg/ml olarak tespit edildi. Saf enrofloksasinden hazırlanan 400, 600, 1200, 2400, 3600 ng/ml'lik standart çözeltilerle ölçümlerde kalibrasyon eğrisi ($r^2 = 0.9776$) çizildi.

Enrofloksasin içeren A (referans ürün) ve B (test ürün) ürünlerinden kas içi yolla tek doz (2.5 mg/kg) uygulama sonrasında elde edilen değerler yardımıyla konsantrasyon-zaman eğrileri çizildi (Grafik 4.1).



Grafik 4.1 Enrofloksasin içeren ürünlerin düvelere kas içi yolla tek doz 2.5 mg/kg uygulanması sonrasında elde edilen yarı logaritmik ortalama (±SEM) konsantrasyon-zaman eğrileri (n=6).

Bu eğrilerin direkt bakışı ve farmakokinetik hesaplamalarla belirlenen sonuçlara göre her iki üründe de enrofloksasinin belirtilen yol ve dozda uygulama sonrasında elde edilen farmakokinetik özelliklerinin iki kompartmanlı dışa açık modele uygunluğu belirlendikten sonra farmakokinetik parametreler hesaplandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Enrofloksasin içeren iki ürünün düvelere kas içi yolla tek doz 2.5 mg/kg uygulanması sonrasında elde edilen ortalama (\pm SEM) farmakokinetik parametreleri (n=6).

Farmakokinetik Parametreler	Ürün (B)	Ürün (A)	P-Değeri
	Ortalama \pm SEM(min-maks)	Ortalama \pm SEM(min-maks)	
C_{doruk} (ng/ml)	548\pm74.0 (392–801)	433\pm74.0 (211–728)	0.326
T_{doruk} (saat)	1.75	1.50	1.000
EAA_{0-24} (μ g/ml/saat)	3.379\pm0.232 (2.833–4.180)	2.487\pm0.194 (2.097–3.035)	0.004
EAA_{top} (μ g/ml/saat)	3.469\pm0.224 (3.095–4.327)	2.687\pm0.176 (2.196–3.141)	0.007
$t_{1/2\beta}$ (saat)	6.430\pm1.136 (4.147–11.378)	8.363\pm1.906 (5.189–17.693)	0.404
OKZ (saat)	6.349\pm0.616 (4.527–8.235)	7.656\pm1.422 (5.105–14.594)	0.419

C_{doruk} : Doruk konsantrasyon miktarı, t_{doruk} : Doruk konsantrasyona ulaşma zamanı, **EAA**: Eğrinin altındaki alan, $t_{1/2\beta}$: Eliminasyon yarılanma ömrü, **OKZ**: Ortalama kalış zamanı.

Biyoeşdeğerlik değerlendirilmesinde temel alınacak parametrelerden sadece EAA_{0-24} ve EAA_{top} değerlerinin logaritmik dönüşümü yapılmadan önce birbirleriyle istatistiksel olarak farklı oldukları tespit edildi ($P<0.05$) (Tablo 4.1). Değerlendirmede dikkate alınacak t_{doruk} dışındaki tüm parametrelerin logaritmik dönüşümü yapıldıktan sonra her iki ürünün parametreleri birbirlerine oranlanarak (μ_B/μ_A) % 90 güven aralığına göre biyoeşdeğerlik için gerekli olan 0.7–1.43 aralığına uygunluğu tartışıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Enrofloksasin içeren iki ürünün düvelere kas içi yolla tek doz 2.5 mg/kg uygulama sonrasında elde edilen ortalama (\pm SEM) logaritmik farmakokinetik parametreleri (n=6).

Farmakokinetik	Ürün (B)	Ürün (A)	Oran
Parametreler	Ortalama \pmSEM(min-maks)	Ortalama \pmSEM(min-maks)	μ_B/μ_A
C_{doruk} (ng/ml)	2.739\pm0.056 (2.593–2.904)	2.636\pm0.085 (2.324–2.862)	1.04
T_{doruk} (saat)	1.75	1.50	1.17
EAA_{0-24} (μ g/ml/saat)	0.525\pm0.029 (0.452–0.621)	0.391\pm0.033 (0.322–0.482)	1.34
EAA_{top} (μ g/ml/saat)	0.549\pm0.025 (0.491–0.636)	0.425\pm0.029 (0.342–0.497)	1.29
$t_{1/2\beta}$ (saat)	0.779\pm0.069 (0.618–1.056)	0.865\pm0.080 (0.715–1.248)	0.90
OKZ (saat)	0.793\pm0.042 (0.656–0.916)	0.798\pm0.022 (0.708–0.875)	0.99

C_{doruk} : Doruk konsantrasyon miktarı, t_{doruk} : Doruk konsantrasyona ulaşma zamanı, **EAA**: Eğrinin altındaki alan, $t_{1/2\beta}$: Eliminasyon yarılanma ömrü, **OKZ**: Ortalama kalış zamanı.

Buna göre EAA ve C_{doruk} parametreleri için ürün B/ürün A (μ_B/μ_A) oranlarının biyoeşdeğerlik için kabul edilen %90 güvenle 0.7–1.43 aralığında olduğu tespit edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan A ve B müstahzarlarında etkin madde tayini ve kalite kontrol amacıyla yapılan ölçümlerde pH değeri sırasıyla 10.910 ve 11.145 olup farklılık %1'in altındadır. Etkin madde miktarı ise A ürünü için 95.7 mg/ml ve B ürünü için 106 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Müstahzarlardaki etkin madde miktarı yönünden ölçülen bu farkın, biyoşdeğerlik çalışmalarında önemli olan $\pm\%5$ sınırları içinde olduğu gözlemlendi (Kayaalp 2001b). Bu $\pm\%5$ 'lik farklılığın müstahzarların üretimi sırasındaki teknik şartlardan ve/veya bu çalışmada yeterli sayıda ölçümün yapılmaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu durum piyasaya muadil olarak sunulan ürünlerde belirli aralıklarla en azından pH ve etkin madde miktarının ölçülmesi gibi kalite kontrol testlerinin yapılması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Tarafımızdan yapılan araştırmada ülkemizde enrofloksasin içeren (%10'luk, 100 mg/ml, enjektabl solüsyon) ve yerli veya yabancı firmalar tarafından üretilen toplam 16 adet ürünün veteriner ilaç piyasasında mevcut olduğu bilinmektedir. Söz konusu müstahzarların eşit miktarda etkin madde içermekte oldukları ruhsatlarından anlaşılmakta ve bunlar farmasötik olarak eşdeğer ürünler olarak kabul edilmektedirler. Bunlar alfabetik sırala; Baytril %10 (ithal, Bayer Türk), Baytril %10 (yerli Bayer Türk), Enrocure (Teknovet), Enrofilin %10 (Arma), Enrolen %10 (Alke), Enrosol (Akvet), Enrotech (Aves Biyolojik Ürün San.), Enroxil (Provet), Enroxilacin (Aksu), Floksin %10 (Galenka), Gloxirem %10 (Remka), Kinoloks (Etkin), Kloxacin %10 (Bavet), Menafloks %10 (İ.E.Veteriner), Vetril %10 (Vetaş) ve Vil-floks (Vilsan) dur. Bu ürünlerin hepsi muadil olarak kabul görmeleri ve bu şekilde sahada rekabet içinde olmalarına rağmen hiç birinin orijinal moleküle göre biyoşdeğerlik testlerine tabi tutulmadıkları tahmin edilmektedir.

Hayvanlarda enrofloksasin içeren ürünlerin biyoşdeğerlik ya da farmakokinetiğinin belirlendiği çalışmalarda tür, uygulama yolu ve diğer bazı faktörlere göre kompartmanlı

(Birmingham ve ark 1991, Ahangar ve Srivastava 2000, Elmas ve ark 2000, 2001, Haritova ve ark 2002) ve/veya kompartmansız (Seguin ve ark 2004, De Lucas ve ark 2004) matematik modeller kullanılmıştır. Ayrıca genel lineer karışık model (Frazier ve ark 2000) k.i. uygulamada bir kompartmanlı açık model, d.i. uygulamada iki kompartmanlı açık model (Elsheikh ve ark 2002), bir, iki ve üç kompartmanlı açık modellerden (Cabanès ve ark 1992) birinin tercih edildiği görülmektedir. Bazı çalışmalarda (Seguin ve ark 2004, De Lucas ve ark 2004) ise değişik parametreler için farklı hesaplama eşitliklerinden yararlanıldığı belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada da olduğu gibi enrofloksasin farmakokinetiğinin k.i. yolla uygulama sonrası çoğunlukla iki kompartmanlı dışa açık modele daha uygun olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur (Broome ve ark 1991, Ahangar ve Srivastava 2000, Elmas ve ark 2000, 2001, Haritova ve ark 2002).

Mevcut çalışmada periyotlar arasında tercih edilen ilaçtan arınma süresi onbeş gün olarak belirlenmiş ve uygulanmıştır. Diğer farmakokinetik araştırmalarda ise, sığırdada bir hafta (Kaartinen ve ark 1995), tavşandada beş gün (Cabanès ve ark 1992) ve ondört gün (Broome ve ark 1991), tayda yedi gün (Birmingham ve ark 2000), evcil devekuşunda iki hafta (De Lucas ve ark 2004), köpekte üç hafta (Cester ve Toutain 1997, Frazier ve ark 2000), koyun ve keçide onbeş gündür (Mengozi ve ark 1996, Elmas ve ark 2000).

Bu çalışma enrofloksasin içeren iki ürünün 2.5 mg/kg dozunda sığırlarda k.i. yolla uygulama sonrasında aralarındaki biyoeşdeğerliğin değerlendirilmesi amacıyla, tek doz iki dönemli çapraz (cross-over) çalışma dizaynına göre 6 düve üzerinde gerçekleştirildi. Tercih edilen doz 2.5 mg/kg ve uygulama yolu (k.i.) sığırlar için tavsiye edilen uygulamalar arasındadır (McKellar ve ark 1999). Mevcut araştırma, hayvan sayısı ve çalışma dizaynı yönünden de benzer çalışmalara (Sumano ve ark 2001b) uygunluk arz etmektedir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 Bazı hayvan türlerinde yapılan biyoeşdeğerlik çalışmalarının dizaynı ve sonuçları.

Kullanılan ilaç	Çalışma dizaynı	Hayvan türü ve sayısı	Araştırmacı ve yıl	Sonuç
Enrofloksasin	Paralel	Sığır, 4'erli 10 grup	Sumano ve ark 2001b	biyoeşdeğer değil
Enrofloksasin	Paralel	Piliç, 10'arlı 2 grup	Posyniak ve ark 2001	biyoeşdeğer
Enrofloksasin	Paralel	Piliç, 60'şarlı 4 grup	Sumano ve ark 2001a	biyoeşdeğer değil
Seftiofur sodyum	Çapraz (3 periyotlu iki tedavili)	Sığır, 12 karışık ırk	Brown ve ark 2000	biyoeşdeğer
Suksibuzon	Çapraz (iki yollu)	At, 6 adet	Jaraiz ve ark 1999	biyoeşdeğer
İvermektin	Paralel	Domuz, 8'erli 2 grup	Lifschitz ve ark 1999	biyoeşdeğer
İvermektin	Paralel	Buzağı, 8'erli 2 grup	Lifschitz ve ark 1999	biyoeşdeğer

Farklı hayvan türlerinde gerçekleştirilen farmakokinetik çalışmalarda, vücut sıvılarındaki aktif madde düzeyinin belirlenmesinde analitik metot olarak genellikle kromatografik yöntemlerin (Cabanés ve ark 1992, Mengozzi ve ark 1996, Frazier ve ark 2000, Elmas ve ark 2000, 2001) tercih edildiği yapılan literatür araştırmalarında tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise ana ilaç ve metabolitinin toplam antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesine olanak vermesi ve ekstraksiyona ihtiyaç göstermemesi nedeniyle mikrobiyolojik yöntemlerin kullanıldığı bilinmektedir (Kaartinen ve ark 1995).

Çalışmamızda aktif maddenin plazmadaki düzeyinin belirlenmesi için yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC)'den faydalandı. Yöntemin 400 ng/ml–3600 ng/ml arasında lineer olduğu ($r^2=0.9776$) en düşük tespit edilebilir limitinin (LOD) 0.01 µg/ml, ölçümde kullanılan standartların gün içi ve günler arası varyansının %2–3 olduğu tespit edildi. Geri kazanımı %75 olarak belirlenen yöntemin biyoeşdeğerlik değerlendirmesinde tercih edilecek analitik yöntem için yeterli şartları sağladığı görüldü.

Yapılan hesaplamalar sonrasında elde edilen veriler incelendiğinde (Tablo 4.1) klinik olarak önemli farmakokinetik parametrelerden $t_{1/2\beta}$ ve V_d 'nin de genel olarak sığır (Kaartinen ve ark 1995, Sumano ve ark 2001b) ve diğer türlerdeki çalışma (Cabanés ve

ark 1992, Mengozzi ve ark 1996, Frazier ve ark 2000, Elmas ve ark 2000, 2001) sonuçlarına benzediği rahatça görülmektedir. Enrofloksasin uzun yarılanma ömrü (1–7 saat) ve geniş dağılım hacmine (0.6-3 L/kg) sahip olduğundan, vücutta tüm dokulara ulaşabilme ve yeteri kadar vücutta kalabilme yeteneğine sahip kendine duyarlı mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlarda etkin kullanılabilecek ideal bir antibakteriyel ajandır.

Veteriner ürünlerde yapılan biyoeşdeğerlik çalışmalarında farklı karar parametreleri kullanılmaktadır. Biyoeşdeğerlik çalışmalarında EAA birinci derecede önemli bir parametre olarak göz önünde bulundurulmaktadır. EAA'a ilave olarak C_{doruk} ve t_{doruk} ise ikinci derecede önemli parametreler olarak kullanılmıştır (Toutain ve Koritz 1997, Kaya 2000, EMEA 2001, Posyniak ve ark 2001, Guidance for Industry 2002). Farklı metotlarla hesaplanan EAA ve C_{doruk} (Posyniak ve ark 2001, Brown ve ark 2000, Jaraiz ve ark 1999, Lifschitz ve ark 1999, Martinez ve ark 2001) tüm çalışmalarda ortak parametre olarak göze çarparken, bazı çalışmalarda ilave olarak t_{doruk} (Posyniak ve ark 2001, Jaraiz ve ark 1999), MRT (Jaraiz ve ark 1999), $t_{1/2\beta}$ (Sumano ve ark 2001b) ve $t_{>0.2}$ (Brown ve ark 2000) verileri de biyoeşdeğerlik değerlendirmelerinde dikkate alınmıştır (Tablo 2.1). Bu çalışmada ise EAA_{top} ve EAA_{0-24} , C_{doruk} ve t_{doruk} değerlendirmede kriter olarak belirlendi.

Çalışmada EAA_{0-24} ve EAA_{top} olarak iki farklı şekilde hesaplanan EAA değerlerinin, biyoeşdeğerlik değerlendirmesi için logaritmik dönüşüm yapılmadan önceki değerlerinin (Tablo 4.1) birbirlerinden önemli derecede ($P<0.007$ ve $P<0.004$) farklı olmalarına rağmen, logaritmik dönüşüm sonrası μ_B/μ_A oranlarının sırasıyla 1.34–1.29 oldukları gözlemlendi (Tablo 4.2). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında birinci derecede önemli hatta çoğu zaman değerlendirme için tek başına yeterli görülen A ve B ürününün EAA değerlerinin birbirine oranının biyoeşdeğerlik değerlendirme esaslarına göre logaritmik dönüşüm sonrası kabul gören (0.7–1.43) sınırları içinde olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada hesaplanan EAA

değerinin sığırlara k.i. yolla aynı dozda enrofloksasin uygulaması sonrasında elde edilen diğer çalışma sonuçlarına (McKellar ve ark 1999) göre biraz düşük çıkması hayvan ırkı, yaşı, cinsiyeti ile ilişkilendirilebilir.

C_{doruk} ikinci derecede önemli bir biyoeşdeğerlik parametresidir. Bu parametre damar içi ilaç kullanımı hariç tüm biyoeşdeğerlik çalışmalarında EAA'dan sonra dikkate alınmaktadır (Toutain ve Koritz 1997, Lifschitz ve ark 1999, Posyniak ve ark 2001, Sumano ve ark 2001b).

Bu çalışmada, enrofloksasinin k.i. yolla sığırlara aynı dozda (2.5 mg/kg) (McKellar ve ark 1999) uygulaması sonrasında belirlenen C_{doruk} değeri çalışmamızdaki A ve B ürünlerinin C_{doruk} değeri ile benzerdi (Tablo 4.1). A ve B ürünlerinin C_{doruk} değerleri arasında logaritmik dönüşüm sonrasında hesaplanan μ_B/μ_A oranının (1.05) biyoeşdeğerlik için kabul gören sınırlar içinde olması EAA üzerinden verilen biyoeşdeğer kararını desteklemektedir. Birçok çalışmada olduğu gibi, pilot çalışmaların incelenmesi ve bu inceleme sonucuna göre çalışma öncesinde zaman planlamasının en yüksek konsantrasyonun (C_{doruk}) isabetli olarak belirlenmesinde önemli olduğu unutulmamalıdır (Toutain ve Koritz 1997). Bu çalışmada da C_{doruk} ve t_{doruk} parametreleri konsantrasyon-zaman eğrisinden doğrudan elde edildi.

Zamana bağlı bir parametre olan t_{doruk} 'da C_{doruk} gibi ikinci derecede önemli bir biyoeşdeğerlik parametresidir (Toutain ve Koritz 1997, Lifschitz ve ark 1999, Posyniak ve ark 2001, Sumano ve ark 2001). Zamana bağımlı bir parametre olduğu için logaritmik dönüşümü yapılmayan t_{doruk} için hesaplanan μ_B/μ_A oranının (1.17) (Tablo 4.2) kabul sınırları 0.8–1.25 içinde olması bu çalışmadaki biyoeşdeğerlik kararını güçlendirir niteliktedir (Tablo 4.2). Her iki ürün için hesaplanan t_{doruk} değerleri (A ürünü 1.5 saat ve B ürünü 1.75 saat) aynı tür hayvanlarda yapılan farmakokinetik çalışma sonuçlarına

(Kaartinen ve ark 1995, McKellar ve ark 1999, Sumano ve ark 2001b) benzer olduğu söylenebilir.

Diğer antibakteriyel ilaçlarda da olduğu gibi enrofloksasinin d.i. kullanımı tedavi etkinliğini artırır. Bu uygulama daha yüksek serum konsantrasyonu ve buna bağlı olarak da doku konsantrasyonu sağlar. Enrofloksasin kas içi uygulandığında da mümkün olan en yüksek C_{doruk} değerine ulaşılması esastır, yüksek serum konsantrasyonunun sağlanması etki noktasında en uygun antibakteriyel ilaç konsantrasyonu için önemlidir. Bu bağlamda enrofloksasin içeren farklı preparatların C_{doruk} ve t_{doruk} değerleri açısından da referans ürüne biyoeşdeğer olmaları beklenir (Sumano ve ark 2001b). Bu çalışmada A ve B ürünü için C_{doruk} ve t_{doruk} değerlerinin istatistiksel olarak ($P>0.05$) benzer çıkması, etki noktasında etkili ilaç konsantrasyonunun sağlanması noktasında farklılığın en aza indirilmesi için oldukça önemlidir (Sumano ve ark 2001b).

Ortalama kalış zamanı (OKZ) değeri biyoeşdeğerlik parametresi olarak kullanılmaktan ziyade daha çok karşılaştırılan ürünler ve/veya uygulama yolları arasındaki uygulama sonrası etkin madde/maddelerin emilme ve eliminasyonu bakımından muhtemel bir farklılığın belirlenmesinde ve değerlendirilmesinde önem arz eder (Toutain ve Koritz 1997, Lifschitz ve ark1999, Sumano ve ark 2001b). Bu çalışmada elde edilen OKZ değerleri A ve B ürünü için sırasıyla 6.35 ve 7.66 saat olarak bulundu. Bu değerlerin 7,98 saat (Kaartinen ve ark 1995) ile karşılaştırıldığında belirgin bir farklılığın olmadığı tespit edildi.

Çalışmamızda muadil ürünlerin düvelere k.i. yolla uygulanması sonrasında elde edilen $t_{1/2\beta}$ değerleri sırasıyla 6.43 ve 8.36 saat olarak hesaplanmış ve oran 0.90 olarak bulunmuştur. ($P>0.05$),(Tablo 4.1) ve aynı tür hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen diğer çalışma 5.68 saat (Sumano ve ark 2001b), 5.9 saat (Kaartinen ve ark 1995) ile karşılaştırıldığında benzerlik arz etmektedir. $t_{1/2\beta}$ değeri biyoeşdeğerlik çalışmalarında

birincil ve ikincil parametrelere ilave olarak kullanılmaktadır (Toutain ve Koritz 1997, Sumano ve ark 2001b). Tablo 4.2’de de görüldüğü gibi, $t_{1/2\beta}$ üzerinden yapılan B/A oranının (μ_B/μ_A) 0.93 tespit edilmesi bu parametrenin de biyoeşdeğerlik kararını güçlendirici bir veri olduğunu göstermektedir.

Biyoeşdeğerlik değerlendirilirken hayvan sağlığı öncelikli olarak göz önünde bulundurulmalıdır. EAA, C_{doruk} , t_{doruk} , $t_{1/2\beta}$, ve EKEY (MİC) gibi parametreler ürün karşılaştırmalarında genellikle yeterlidir. Çalışmada her iki ürün içinde benzer sonuçların elde edilmesi hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı açısından farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmayabilir. Ancak farklı ürünlerde bu parametreler için farklılıkların ortaya çıkması kesim öncesi bekleme süresi ve haliyle insan gıdası güvenliği yönünden önemlidir (Sumano ve ark 2001b).

Sonuç:

1-Biyoeşdeğerlik değerlendirmesinde birincil ve ikincil parametreler olarak ele alınan EAA, C_{doruk} ve t_{doruk} parametreleri üzerinden yapılan karşılaştırmaya göre, bu iki muadil ürüne ait μ_B/μ_A oranları %90 güvenle 0.7-1.43 sınırları içinde olup, ürünlerin birbirlerine biyoeşdeğer olduğu,

2-Biyoeşdeğerlik çalışmalarında tali parametreler bölümünde incelenen $t_{1/2\beta}$ ve MRT (OKZ) gibi veriler üzerinden yapılan değerlendirmede de bu iki ürünün biyoeşdeğerlik kararının desteklendiği,

3-İnsan sağlığı açısından önem arz eden kesim öncesi bekleme süresinin belirlenmesinde temel alınan $t_{1/2\beta}$ değerlerinin her iki ürün için de istatistiksel olarak benzer olduğu,

4-Yerli firmalar tarafından üretilen veteriner ilaçlarında benzeri orijinal moleküller ve/veya ithal edilenlerle eşdeğer bir kaliteye sahip olabileceklerinin memnuniyetle müşahede edildiği,

5-Biyoeşdeğerlik çalışmalarına başlamadan önce ürünlerdeki etkin madde miktarı ve pH gibi ön şart olan farmasötik eşdeğerlilik parametrelerinin dikkate alınmasının, *in vivo* biyoeşdeğerlik çalışmaları öncesinde ve sonuçların yorumlanmasında çok önemli olduğu görüldü.

Öneriler;

Ülkemizde ilgili bakanlık tarafından hazırlanıp yürürlüğe konulan “Veteriner İlaçlarında Biyoeşdeğerlik Yönetmeliği” olmadığı için günümüze kadar yapılan bilimsel çalışmalar ve Avrupa Birliği direktifleri ile uygunluk içerisinde planlanıp yürütülen ve ülkemizde bir ilk olan bu proje kanuni zorunlulukları nedeniyle tam olarak hedefine ulaşamamıştır. Ancak ülkemizdeki tüm ilaç firmaları tarafından üretilen muadil ürünlerin (orijinal molekül ve/veya jenerik) birbirleriyle biyoeşdeğer olabileceklerinin bu çalışma sonucunda görülmüş olması, üzerinde öncelikle durulması gereken bir sonuçtur.

Ayrıca tüm yerli ilaç firmalarımızın AR-GE çalışmalarıyla birlikte biyoeşdeğerlik çalışmalarına da önem vermeleri ve kaynak aktarmaları ekonomik olarak uzun vadede karlarını artıracaktır. Onaylanmış veya jenerik ürünlerle yapılacak biyoeşdeğerlik çalışmalarında mutlak surette insan gıdası güvenliği açısından da standartlar getirilmelidir. İki ürünün belirlenen parametreler bağlanımda biyoeşdeğer olmalarıyla yetinilmemeli “Doku Kalıntı Miktarı” gibi hususlarının da araştırmaya eklenmesinin 21. yüzyılda insan sağlığı ve gıda güvenliği yönünden kafalardaki bir dizi soru işaretlerinin bertaraf edilmesi açısından önemli olduğu unutulmamalıdır. Bu bilgiler ve görüşler doğrultusunda, kamu ve özel sektördeki ilgili kurum ve kuruluşların ülkemizde hayvanlarda kullanılacak ilaçlarda

biyoeşdeğerlik yönetmeliğinin çıkarılması için yoğun bir işbirliği yapması gerekliliği ön plana çıkmaktadır.

Bu tür çalışmaların ülkemizde de rahatlıkla yapılıyor olması ve oluşan fikir birliği veteriner ilaç piyasasındaki durumlar ve/veya olumsuz tüm haksız rekabetin ortadan kaldırılması, kaliteli üretim yapan ilaç firmasının işini doğru yaptığı halde mağdur olmaması, seçeceği ilaç muadili hakkında fazla bilgi sahibi olmayan veteriner hekimin bilgilendirilmesi, olayın ekonomik yönünü çeken üretici ve dışarıya bağımlı ekonomimiz için gerekli kanuni düzenlemeler ile referans laboratuvarların bir an önce oluşturulmasını kaçınılmaz hale getirmiştir.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji-Toksikoloji (VET) Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA–2006

Hazırlayanın adı soyadı

İsmet YILMAZ

Danışman

Prof. Dr. Muammer ELMAS

Enrofloksasin içeren iki farklı müstahzarın sığırlarda kas içi yolla uygulanması sonrasında biyoeşdeğerliğinin belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı, enrofloksasin içeren ve ülkemizde %10'luk enjektabl şeklinde satışa sunulan ürünlerden ikisinin sığırlarda tek doz (2.5 mg/kg.) olarak kas içi uygulama sonrası biyoeşdeğerliğini değerlendirmektir.

Çalışma 6 adet sağlıklı (12–18 aylık 360-400kg c.a.) İsviçre esmeri düveler üzerinde yapıldı. Çalışma tek doz çapraz dizaynı esasına göre gerçekleştirildi. İlaç uygulaması öncesinde 0. dakika ve sonrasında kan örnekleri 10., 20., 30., 45., 60., 90. dakikalar ile 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde toplandı. Plazma enrofloksasin düzeyleri yüksek performanslı likit kromatografisinde (HPLC) ölçüldü. Her hayvan için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-zaman grafikleri iki kompartmanlı dışa açık modele uygunluk gösterdi ve tüm farmakokinetik parametreler bu esasa göre hesaplandı.

Biyoeşdeğerlik değerlendirmesinde temel alınacak parametrelerden sadece EAA_{0-24} ve EAA_{top} değerlerinin birbirlerinden istatistiksel olarak farklı ($P<0.05$) oldukları tespit edildi. Verilerden t_{doruk} dışındakilerin hepsi logaritmik dönüşüm yapıldıktan sonra her iki ürünün değerleri birbirlerine oranlanarak μ_B/μ_A % 90 güvenle biyoeşdeğerlik için gerekli

olan 0.7-1.43 aralığında olduğu görüldü. Logaritmik dönüşüm yapılmayan t_{doruk} değerinin ise 0.8-1.25 sınırlar içinde olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışma sonuçlarına göre iki ürünün biyoeşdeğer oldukları, endike oldukları alanlarda birbirlerinin yerine kullanılacakları söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Biyoeşdeğerlik, düve, enrofloksasin.

7. SUMMARY

The bioequivalence determination of two different formulations of enrofloxacin in heifers following intramuscular administration.

The aim of this study was to evaluate of the bioequivalence of two enrofloxacin formulations, which have been also marketed as % 10 enjectabl solution in our country, after the intramuscular injection (i.m.) at a single dose of 2.5 mg/kg of b.w in the heifers.

In the present study 6 Brown-Swis (12–18 monthly and 360–400 kg b.w.) healthy heifers were used. This study was carried out on the based a single dose cross-over design. Blood samples were taken into sterilized tubes just before and 10, 20, 30, 45, 60 and 90th minutes and 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24th hours following injections. The plasma concentrations of enrofloxacin were measured by high performance liquid chormatography (HPLC) following the extraction process. The plasma concentration-time curves for each animals showed that both products distributed according two-compartment open model.

The based pharmacokinetic parameters at the present bioequivalence study were only AUC_{0-24} and $AUC_{0-\infty}$, were statistically significant ($P < 0.05$) before log transformed. Logaritmically transformed AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} parameters and observed t_{max} were used in bioequivalence evaluation. Minimum, maximum and mean AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} for A and B products were found in the acceptable ranges (%70–143).

As a results it is concluded that both products could be used instead of each other as an “inter-changeability drugs”.

Key words: Bioequivalence, heifer, enrofloxacin.

8. KAYNAKLAR

- Ahangar AH and Srivastava AK (2000)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin in febrile cross-bred bovine calves*. Indian J Pharmacol, 32, 305–308.
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ, Bringas P, Martinez MA and Fernandez-Cruz ML (1995)** *Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens*. Am J Vet Res, 56, 501–505.
- Appelbaum PC and Hunter PA (2000)** *The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives*. Int J Antimicrob Agents, 16, 5–15.
- Bermingham EC, Papich MG and Vivrette SL (2000)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin administered intravenously and orally to foals*. Am J Vet Res, 61,706-709.
- Broome RLC, Brooks DL, Babish JG, Copeland DD and Conzelman GM (1991)** *Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits*. Am J Vet Res, 52, 1835-1841.
- Brown SA, Chester ST, Speedy AK, Hubbard VL, Callahan JK, Hamlow PJ, Hibbard B and Robb EJ (2000)** *Comparison of plasma pharmacokinetics and bioequivalence of ceftiofur sodium in cattle after a single intramuscular or subcutaneous injection*. J Vet Pharmacol Ther, 23, 273–280.
- Cabanes A, Arboix M, Anton JMG and Reig F (1992)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits*. Am J Vet Res, 53, 2090–2093.
- Cadiergues MC, Laguerre C, Roques M and Franc M (2004)** *Evaluation of the bioequivalence of two formulations of deltamethrin for treatment of sheep with psoroptic mange*. Am J Vet Res, 65, 151-154.

- CDER (Center for Drug Evaluation and Research) (2000)** *Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system* [<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.ht>] Erişim tarihi:17.08.2002
- Cester CC and Toutain PL (1997)** *A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog.* J Pharm Sci, 86, 1148-1155.
- Clark TP, Chieffo C, Huhn JC, Nimz EL, Wang C and Boy MG (2003)** *The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs.* J Vet Pharmacol Ther, 26, 187–192.
- De Lucas JJ, Rodriguez C, Waxman S, Gonzalez F, De Vicente ML and San Anders MI (2004)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous and intramuscular administration in young domestic ostrich (Struthio camelus).* J Vet Pharmacol Ther, 27, 119–122.
- Davidson JN, Conzelman GM and Baggot JD (1986)** *Pharmacokinetics of (1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7[4-ethyl-1-piperazinyl]-3quinoline-carboxylic acid (CFPQ) in preruminant and ruminant calves.* Proc West Pharmacol Soc, 29,129–132.
- Elmas M ve Traş B (1999)** *Bazı antimikrobiyel ilaçların plazma ve lenf sıvısındaki farmakokinetik profillerinin karşılaştırılması.* Türk Vet Hay Der, 23, 591–599.
- Elmas M, Yazar E, Traş B, Baş AL and Eryavuz A (2000)** *Pharmacokinetics and oral bioavailability of enrofloxacin in faunated and defaunated Angora goats.* Rev Med Vet, 151, 6, 507–510.

Elmas M, Traş B, Kaya S, Baş AL, Yazar E and Yarsan E (2001) *Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats.* Can J Vet Res, 65, 64–67.

Elsheikh HA, Taha AA W, Khalfallah AI and Osman IAM (2002) *Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular injection using a microbiological assay.* Res Vet Sci, 73, 125-129.

EMEA (2001) *Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products*,1-11 [<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/ewp/001600en.pdf>]

Erişim tarihi:30.12.2002

Flammer K, Ancoïn DP and Whitt DA (1991) *Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in African grey parrots following single and multiple doses.* J Vet Pharmacol Ther,14, 359-366.

Fraile LJ, Martinez C, Aramayona JJ, Abadia AR, Bregante MA and Garcia MA (1997) *Limited capacity of neonatal rabbits to eliminate enrofloxacin and ciprofloxacin.* Vet Q, 1, 162-167.

Frazier DL, Thompson L, Trettien A and Evans EI (2000) *Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin and difloxacin in dogs.* J Vet Pharmacol Ther, 23, 293–302.

Groen K, Pereboom-De Fauw DPKH, Van Veen-Rutgers A, Vulto AG and De Neeling AJ (1996) *Bioavailability in the rabbit of penicillin and dihydrostreptomycin from three commercial penicillin/aminoglycoside fixed combination products for intramuscular injection.* J Vet Pharmacol Ther, 19, 364–369.

Guidance for Industry (2002) *Bioequivalence guidance.* : Erişim tarihi 12.12.2002. [http://www.fda.gov/cvm/guidance/bioequivalence_Oct02.pdf]

- Haritova A, Lashev L and Pashov D (2003)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep.* Res Vet Sci, 74, 241–245.
- Hawkins EC, Boothe DM, Guinn A, Aucoin BP and Ngyuen J (1998)** *Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs.* J Vet Pharm Ther, 21, 18-23.
- Intorre L, Mengozzi G, Bertini M, Bagliacca M, Luchetti E and Soldani G (1997)** *The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in muscowy duck.* Vet Res Commun, 21,127-136.
- Jaraiz V, Rodriguez C, San Andres MD, Gonzalez F and San Andres MI (1999)** *Pharmacokinetics and bioequivalence of two suxibuzone oral dosage forms in horses.* J Vet Pharmacol Ther, 22, 247–254.
- Kaartinen L, Salonen M, Älli L and Pyörälä S (1995)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows.* J Vet Pharmacol Ther, 18, 357-362.
- Kaartinen L, Panu S and Pyorala S (1997a)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration.* Equine Vet J, 29, 378-381.
- Kaartinen L, Pyorala S, Moilanen M and Raisanen S (1997b)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves.* J Vet Pharmacol Ther, 20, 479-482.
- Kaya S (1997)** Antibiyotikler. *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji.* Editörler: Kaya S, Pirinçci İ ve Bilgili A, 2.cilt, 267–420, Medisan, Ankara.
- Kaya S (2000)** *Farmakokinetik, Veteriner Uygulamalı Farmakoloji.* ED; Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A, 1.cilt, 62–67, Medisan, Ankara.

- Kayaalp SO (2001a)** *Klinik farmakolojinin esasları ve temel düzenlemeler*. Genişletilmiş 2. Baskı Hacettepe TAŞ, H. Üniversitesi, Ankara, 305–347.
- Kayaalp SO (2001b)** *Tıbbi farmakoloji*. 9.Baskı 1.Cilt Hacettepe TAŞ, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 15–80.
- Küng K, Riond JL and Wanner M (1993)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs*. J Vet Pharmacol Ther, 16, 462–468.
- Lifschitz A, Pis A, Alvarez L, Virkel G, Sanchez S, Sallovitz J, Kujanek R and Lanusse C (1999)** *Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle*. J Vet Pharmacol Ther, 22, 27–34.
- Martinez MN, Pedersoli WM, Ravis WR, Jackson JD and Cullison R (2001)** *Feasibility of interspecies extrapolation in determining the bioequivalence of animal products intended for intramuscular administration*. J Vet Pharmacol Ther, 24,125–135.
- Martinez M, Langston C, Martin T and Conner D (2002)** *Challenges associated with the evaluation of veterinary products bioequivalence: an AAVPT perspective*. J Vet Pharmacol Ther, 25, 201–220.
- McKellar Q, Gibson I, Monteiro A and Bregante M (1999)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous, administration*. Antimicrob Agent Chemother, 43, 1988-1992.
- Mengozi G, Intorre L, Bertini S and Soldani MD (1996)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep*. Am J Vet Res, 57, 1040-1043.

- Öner L (1994)** *Biyoyaralanım ve biyoeşdeğerlik tayininde çalışma tasarımı ve istatistiksel kriterler* 1.Ulusal biyoyaralanım ve biyoeşdeğerlik simpozyumu, 9–10 Mayıs 1994, Ankara, 137–153.
- Paton JH and Reeves DS (1988)** *Fluoroquinolone antibiotics;microbiology, pharmacokinetics and clinical use.* Drugs, 36, 193-228.
- Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J and Biernacki B (2001)** *Bioequivalence study of two formulations of enrofloxacin following oral administration in chickens.* B Vet I Pulawy, 45, 353–358.
- Scheer M (1987)** *Studies on antimicrobial activity of Baytril.* Vet Med Rev, 2, 90-93.
- Seguin MA, Papich MG, Sigle KJ, Gibson NM, Levy JK (2004)** *Pharmacokinetics of enrofloxacin in the neonatal kittens.* Am J Vet Res, 65, 3-11.
- Shumaker RC 1986 PKCALC: A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data.** Drug Metab Rev, 17, 331–348.
- Sumano LH, Gutierrez OL and Zamora MA (2001a)** *Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry.* J Vet Pharmacol Ther, 24, 309–313.
- Sumano LH, Ocampo CL and Gutierrez OL (2001b)** *Non-bioequivalence of various trade-marks of enrofloxacin and Baytril® in cows.* Dtsch Tierarztl Wochenschr, 108, 281–320.
- Toutain PL and Koritz GD (1997)** *Veterinary drug bioequivalence determination.* J Vet Pharmacol Ther, 20, 79–90.
- Traş B ve Yazar E (2002)** *İlaçlarda kalite, etkinlik ve güvenlik testi olarak biyoeşdeğerlik.* Türk Vet Hek Bir Der. 2, 3–4.

- Traş B (2005)** *Biyoeşdeğerlik*. Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 22–24 Eylül, Ankara, 25–32.
- Traş B ve Elmas M (2005)** *Klinik farmakokinetik*. S.Ü. Basımevi, Konya, 137–140.
- Traş B, Yazar E ve Elmas M (2005)** *Veteriner hekimliğinde ilaç kullanımına pratik ve akılcı yaklaşım*. S. Ü. Basımevi, Konya, 123–145
- Vancutsem PM, Babish JG and Schwark WS (1990)** *The flouroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity*. Cornell Vet, 80, 173-186.
- Wagner JG (1975)** *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. Drug Intelligence Pub Inc, Illinois, 1, USA.
- Walker RD, Stein GE, Hauptman JG and McDonald, KH (1992)** *Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs*. Am J Vet Res, 53, 2315-2319.
- Walser RD, Stein GE, Hauptman JG and McDonald KH (1993)** *Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs*. Am J Vet Res, 53, 2315-2319.
- Zintzaras E, Bouka P and Kowald A (2002)** *Biometrical evaluation of bioequivalence trails using a bootstrap individual direct curve comparison method*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 27, 11–16.

9. ÖZGEÇMİŞ





1965 yılında Malatya İli Darende İlçesi Irmaklı köyünde doğdu. İlköğrenimini köyünde, orta ve lise öğrenimini 1982 yılında Darende Lisesinde tamamladı ve aynı yıl Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdi. 22.06.1987'de mezun oldu ve 01.12.1987–31.03.1989 tarihleri arasında askerlik görevini tamamladı. 1989 yılında Et ve Balık Kurumu Malatya Et kombinasında göreve başladı, halen Malatya Tarım İl Müdürlüğünde Veteriner Hekimi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.

10. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Muammer ELMAS'a, S.Ü.Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ ve Öğretim Üyeleri Prof.Dr. A.Levent BAŞ, Prof.Dr. Halis OĞUZ, Doç.Dr. Enver YAZAR ve Arş. Gör. Kamil ÜNEY'e, Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden Dr.İlyas TÜMER'e, uygulama sırasındaki emek ve ilgilerinden dolayı meslektaşlarım Engin KARDEŞ, Cengiz Topel YURTSEVEN, Abdullah KOYUN ve Mustafa AVCI'ya, Veteriner Sağlık Teknikeri M.Yılmaz ÖZGÜR'e, ölçümlerdeki maddi desteklerinden dolayı PROVET İLAÇ FIRMASINA, uygulama safhasındaki emeklerinden dolayı yeğenim Tamer YILMAZ ve kızım Ayşenur YILMAZ'a teşekkür ederim.

Bu Doktora tezi merhum babam, büyük insan Ziya YILMAZ'ın aziz hatırasına saygıyla ithaf olunur, Ruhü Şad Olsun.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ
Etik Kurul Kararları

Karar Sayısı: 2004 / 012	Toplantı Tarihi: 25 / 05 / 2004	
<p>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından sunulan "Enroflaksasin İçeren İki Farklı Müstahzarın Kas İçi Yolla Uygulama Sonrası Biyoeşdeğerliliğinin Değerlendirilmesi" başlıklı proje değerlendirilmiştir.</p> <p>Araştırmada materyal olarak 10 adet 12-18 aylık Motafon ırkı düve kullanılacaktır.</p> <p>"Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 13üncü Maddesinde belirtilen "etik kurallara uygunluk esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Yönergede belirtilen "Araştırmacıların Sorumlulukları" ve "Hayvan Deneyleri ile ilgili İlkeler" başlıkları altındaki etik kurallar saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi" ilkelerine uyulduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.</p>		
 Prof. Dr. Şeref İNAL Başkan	 Prof. Dr. Zafer DURGUN Başkan Yardımcısı	 Doç. Dr. Mehmet MADEN Üye
Doç. Dr. Mustafa ARICAN Üye	 Doç. Dr. Aşkın YAŞAR Raportör	