

ALİ HAYDAR GÜMÜŞBAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017



Adınızı soyadınızı giriniz
← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
← Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**FARKLI SEFTİOFUR PREPARATLARININ SIĞIRLARDA
BİYOEŞDEĞERLİK YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

ALİ HAYDAR GÜMÜŞBAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. TÜLAY BAKİREL**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Farmakoloji ve Toksikoloji Programında Doktora öğrencisi Ali Haydar GÜMÜŞBAŞ tarafından Prof.Dr. Tülay BAKIREL'in danışmanlığında hazırlanan "Farklı Seftiofur Preparatlarının Sığırlarda Biyoeşdeğerlik Yönünden İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 21/03/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Murat YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Abd



Jüri-Danışman

Prof.Dr. Tülay BAKIREL

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Abd

Jüri

Prof.Dr.M. Erman OR

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
İç Hastalıkları Abd



Jüri

Yrd.Doç.Dr. Sevdâ ER

Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Abd

Jüri

Yrd.Doç.Dr. Nurullah ÖZDEMİR

Namık Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Abd

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ali Haydar GÜMÜŞBAŞ



İTHAF

Eşime ve Oğlum'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Öğrenimim süresince benden yardımlarını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen, rehberliği ve bilgisi ile her an yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülay BAKIREL'e,

Doktora eğitimim süresince desteğini ve değerli yardımlarını benden esirgemeyen başta Sayın Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER ve Sayın Prof. Dr. Murat YILDIRIM olmak üzere Dr. Fulya Üstün ALKAN, Dr. Ceren ANLAŞ'a ve İ.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Abd 'nın tüm çalışanlarına,

Çalışmamın hayvan deneyi aşamasında yardım ve imkanlarını esirgemeyen Vet. Hek. M. Turgut TOPALOĞLU, Vet. Hek. Fikret AYDIN ve Ahmet YETKİN'e,

Yüksek Basınçlı Likit Kromatografi (HPLC) metod ve validasyon planlamalarındaki yardımlarından ötürü Kim. Müh. Cem TEKİNAY'a,

Farmakokinetik hesaplamalar için yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Kamil ÜNEY ve istatistiksel hesaplamalardaki yardımlarından ötürü Prof. Dr. Bülent EKİZ'e,

Doktora öğrenimim boyunca daima yanımda olan, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli eşime Özlem GÜMÜŞBAŞ ve oğlum Kuzey GÜMÜŞBAŞ'a,

Beni yetiştiren ve her konuda destekleyen annem Elif GÜMÜŞBAŞ, babam İbrahim GÜMÜŞBAŞ, kardeşim Nihal GÜMÜŞBAŞ ve dedem Ali Tursun ASLAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12157

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	3
BEYAN	4
İTHAF	5
TEŞEKKÜR	6
İÇİNDEKİLER.....	7
TABLolar LİSTESİ	11
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	12
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	13
ÖZET	14
ABSTRACT	15
1. GİRİŞ VE AMAÇ	16
2. GENEL BİLGİLER.....	19
2.1. Seftiofur;.....	19
2.1.1. Tarihçe;.....	19
2.1.2. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri;.....	20
2.1.3. Etki Şekli;.....	22
2.1.4. Antibakteriyel Spektrumu;.....	22
2.1.5. Bakteriyel Direnç;.....	25
2.1.6. Farmakokinetik Özellikleri;.....	27
2.1.7. Farmakodinamik Özellikleri;.....	31
2.1.8. Yan Etkileri;.....	32
2.1.9. Diğer İlaçlar İle Etkileşimleri;.....	33
2.1.10. Kalıntı;.....	33
2.2. Biyoyararlanım;.....	34
2.2.1. Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler;.....	37
2.2.1.1. İlaç ve Müstahzar İle İlgili Faktörler;.....	38
2.2.1.2. Hastaya Bağlı Faktörler;.....	42
2.2.2. Biyoyararlanımın Saptanması;.....	43
2.2.2.1. İn vitro Denemeler;.....	43
2.2.3. Klinik Denemeler;.....	44
2.2.3.1. Plazma Konsantrasyon Profiline Belirlenmesi;.....	45

2.2.3.2. İdrarda Kümülatif İlaç Miktarının Ölçülmesi;	45
2.3. Biyoeşdeğerlik;	46
2.3.1. Biyoeşdeğerliğin Tarihçesi;	46
2.3.2. Biyoeşdeğerlik İle İlgili Tanımlar;	49
2.3.3. Biyoeşdeğerlik İncelemeleri;	51
2.3.4. Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Gerekliliğinin Saptanması;	52
2.3.4.1. İlacın Farmasötik Şekli ve Veriliş Yolu:	52
2.3.4.2. Etkin Maddenin Terapötik İndeksinin Genişliği;	53
2.3.4.3. Doz-Yanıt Eğrisinin Dikliği;	53
2.3.4.4. Etkin Maddenin Farmakokinetik Özellikleri;	53
2.3.5. Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Genellikle Geremediği Durumlar;	53
2.3.6. Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Yürütülmesi;	54
2.3.7. Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri;	54
2.3.7.1. <i>In vitro</i> Biyoeşdeğerlik Çalışmaları;	54
2.3.7.2. <i>In vivo</i> Biyoeşdeğerlik Çalışmaları;	55
2.3.8. Tek Dozlu in-vivo Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Tasarımı;	55
2.3.8.1. Referans Ürün;	56
2.3.8.2. Referans Uygulama Yolu;	56
2.3.8.3. Hayvanlar;	57
2.3.8.4. Deneme Şartları;	57
2.3.8.5. Araştırılacak Karakteristikler;	57
2.3.8.6. Doz Seçimi;	58
2.3.8.7. Örnekleme;	58
2.3.8.8. Örneklerin Analizi;	58
2.3.9. Tek Doz Biyoeşdeğerlik Çalışmalarında Veri Analizi;	61
2.3.10. Biyoeşdeğerlik Değerlendirmesinde Kullanılan Önemli Parametreler;	62
2.3.10.1. AUC (Eğri Altında Kalan Alan);	62
2.3.10.2. AUMC (Birinci Moment Eğrisi Altındaki Alan);	63
2.3.10.3. C_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonu);	64
2.3.10.4. C_z ;	64
2.3.10.5. λ_z (Terminal Hız Sabitesi);	65
2.3.10.6. MAT (Ortalama Emilim Zamanı)	65
2.3.10.7. MRT (Ortalama Kalış Zamanı)	65

2.3.10.8. t_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Zamanı).....	65
2.3.10.9. $t_{1/2}$ (Yarılanma Ömrü)	65
2.3.11. Biyoeşdeğerlilik İçin Karar Verme Kuralları;	65
2.3.11.1. Klasik t-tabanlı Güven Aralığı (%90 güven aralığı) Yöntemi;.....	66
2.3.11.2. Çift-Tek Yönlü (Two-One Sided) Test Yöntemi:.....	66
2.3.11.3. Andersen-Hauck Hipotez Testi;.....	67
2.3.11.4. Logaritmik Dönüştürme ve Sapan Değerler;	67
2.3.11.5. Non-Parametrik Güven Aralıkları;	69
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	71
3.1. Hayvanlar;.....	71
3.2. İlaçlar;	72
3.3. İlaçların Uygulanması;.....	72
3.4. Örneklerin Toplanması;.....	72
3.5. Kimyasal Maddeler;.....	72
3.6. Kullanılan Alet ve Malzemeler;.....	73
3.7. HPLC Sistemi ve Mobil Faz;.....	73
3.8. Deney Prosedürü;.....	73
3.9. Mobil Fazın Hazırlanması;	74
3.9.1. Mobil Faz A;.....	74
3.9.2. Mobil Faz B;	74
3.9.3. Borat Tamponu (pH=9) Hazırlanması;	74
3.9.4. Fosfat Tamponu (pH=7) Hazırlanması;.....	74
3.9.5. Ekstraksiyon Çözeltilisi Hazırlanması;.....	74
3.9.6. İodoasetamit Çözeltilisi Hazırlanması;	74
3.9.7. Stok Çözelti Hazırlanması;.....	74
3.9.8. Ekstraksiyon Yöntemi;	75
3.9.9. Yöntemin Validasyonu;	77
3.9.9.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık (Calibration Curve and Linearity)	77
3.9.9.2. Kesinlik ve Doğruluk (Precision and Accuracy)	77
3.9.9.3. Saptama Limiti (Limit Of Detection) ve Kantitasyon Limiti (Limit of Quantitation)	77
3.9.9.4. Geri Kazanım (Recovery)	77
3.9.9.5. Stabilite	77

3.9.9.6. Farmakokinetik Verilerin Analizi	78
3.9.9.7. İstatistiksel Verilerin Analizi	78
4. BULGULAR	79
4.1. İlaç Etken Madde Miktarına Ait Bulgular	79
4.2. Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular;	79
4.2.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık;	79
4.2.2. Kesinlik ve Doğruluk;.....	79
4.2.3. Saptama ve Kantitasyon Limiti;	81
4.2.4. Geri Kazanım;.....	82
4.2.5. Stabilite;.....	83
4.3. İlaç Uygulaması;.....	83
4.4. Farmakokinetik Veriler;.....	83
5. TARTIŞMA.....	93
KAYNAKLAR.....	105
ETİK KURUL KARARI.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	122

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Seftiofur'un Gram Negatif Bakteriler Üzerine MİK ₉₀ (µg/ml) Değerleri.....	23
Tablo 2-2 Seftiofur ve Desfuroylseftiofur'un Gram Pozitif Bakteriler Üzerine MİK ₉₀ (µg/ml) Değerleri.....	24
Tablo 2-3 Seftiofur'un Anaerob Bakteriler Üzerine MİK ₉₀ (µg/ml) Değerleri	24
Tablo 2-4 EUCAST Seftiofur MİK Dağılımları.....	25
Tablo 2-5 Farklı Hayvan Türlerinde Seftiofur 'un Dağılım Hacmi.....	27
Tablo 2-6 Farklı Türlerde Seftiofur'un Farmakokinetik Verileri	30
Tablo 2-7 Türkiye'de Ruhsatlı Seftiofur Preparatları	31
Tablo 2-8 Seftiofur'un Gıdalardaki MKL Değerleri.....	33
Tablo 2-9 Günlük Kas İçi Seftiofur HCl Enjeksiyonu Sonrasında Farklı Türlerde Farklı Dokulardaki Seftiofur Kalıntı Konsantrasyonları.....	34
Tablo 2-10 Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler.....	37
Tablo 2-11 Besinlerin İlaç Emilimine Etkisi.....	41
Tablo 2-12 Biyoçeşitlilik Risk Potansiyeline Sahip İlaçlar	48
Tablo 2-13 İlaç Uygulama Çizelgesi.....	56
Tablo 2-14 Bazı Ülkelerde Kabul Edilen Biyoçeşitlilik Sınırları.....	70
Tablo 3-1 Gruplara Göre Canlı Ağırlık Dağılımı.....	71
Tablo 4-1 1 µg/ml Konsantrasyonundaki Seftiofur'a Ait Gün İçi ve Günler Arası Değişkenlikler.....	81
Tablo 4-2 Orjinal İlaç Uygulamasından Elde Edilen Plazma Konsantrasyon Değerleri (µg/ml).....	85
Tablo 4-3 Jenerik İlaç Uygulamasından Elde Edilen Plazma Konsantrasyon Değerleri (µg/ml).....	86
Tablo 4-4 Orjinal İlaç Ait Logaritmik Dönüştürme Yapılmamış Değerler.....	88
Tablo 4-5 Orjinal İlaç Ait Logaritmik Dönüştürülmüş Değerler.....	89
Tablo 4-6 Jenerik İlaç Ait Logaritmik Dönüştürme Yapılmamış Değerler.....	90
Tablo 4-7 Jenerik İlaç Ait Logaritmik Dönüştürülmüş Değerler	91
Tablo 4-8 Orjinal ve Jenerik İlaç Ait Değerlerin %90 Güven Aralığında Alt ve Üst Sınırları	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerin Temel Yapı Çekirdeği.....	20
Şekil 2-2 Seftiofur'un Kimyasal Yapısı	21
Şekil 2-3 Desfuroylseftiofur'un kimyasal yapısı	28
Şekil 2-4 Sığırlarda Sefitofur'un Metabolizasyonu	29
Şekil 3-1 Ekstraksiyon İşlemi Akış Şeması.....	76
Şekil 4-1 Seftiofur Standart Soluyonlarından Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık	79
Şekil 4-2 0,6 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram.....	80
Şekil 4-3 1 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram.....	80
Şekil 4-4 10 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram.....	81
Şekil 4-5 Kör Kromotogram.....	82
Şekil 4-6 1 µg/ml Seftiofur eklenmiş kromotogram.....	82
Şekil 4-7 Orjinal ve Jenerik İlaç Plazma Konsantrasyon/Zaman Eğrisi	87
Şekil 4-8 Orjinal İlaç ve Jenerik İlaç Logaritmik Plazma Konsantrasyon/Zaman Eğrisi ...	87

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AİFD:** Araştırmacı İlaç Firmaları Derneği
- AUC:** Eğri Altında Kalan Alan
- AUMC:** Birinci Moment Eğrisi Altındaki Alan
- BRD :** Sığır Solunum Sistemi Hastalığı
- C_{max} :** Maksimum Serum/Plazma Konsantrasyonu
- CGPA:** Kanada Jenerik İlaç Birliği
- DFC:** Desfuroylseftiofur
- EMA:** Avrupa İlaç Ajansı
- EUCAST:** Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılıkları Testi Komitesi
- ESVAC:** Avrupa Veteriner İlaçları Tüketim İzleme Projesi
- FAO:** Gıda Ve Tarım Örgütü
- FDA:** Amerikan İlaç Ve Gıda Ajansı
- GCP:** İyi Klinik Uygulamaları
- GLP:** İyi Laboratuvar Uygulamaları
- GMP:** İyi Üretim Uygulamaları
- GPhA:** Jenerik İlaç Birliği
- HPLC:** Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
- LOD:** Saptama Limiti
- LOQ:** Kantitasyon Limiti
- MCC:** İlaç Kontrol Konseyi
- MIK:** Minimum İnhibitor Konsantrasyon
- MKL:** Maksimum Kalıntı Limiti
- MRT:** Ortalama Kalış Zamanı
- t_{1/2}:** Yarılanma Ömrü
- t_{max}:** Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Zamanı
- NISH:** Ulusal Sağlık Enstitüsü
- PBP:** Pensilin Bağlayan Protein
- TGA:** Teropatik Ürün Yönetim Ajansı
- WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Gümüşbaş A.H. (2017) Farklı Seftiofur Preparatlarının Sığırlarda Biyoeşdeğerlik Yönünden İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2017

Çalışmamızın amacı, Türkiye’de ruhsatlandırılmış seftiofur HCl içeren jenerik bir ilacı sığırlarda 1,1 mg/kg dozunda kas içi yolla uygulanmasını takiben biyoeşdeğerlik yönünden değerlendirmektir. Çalışmada 10 adet Holstein ırkı sığır kullanıldı. Çalışma çapraz dizayn esasına göre gerçekleştirildi. Hayvanlara ilaç uygulaması yapılmadan önce 0. dakika ve uygulama sonrasında 10., 20. ve 30. dakika ile 1.,2.,4.,8.,12. ve 24. saatlerde kan örnekleri lityum heparinli tüpler ile toplandı. Hayvanlara ait plazmalardaki seftiofur düzeyleri ekstraksiyon uygulamasını takiben HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile ölçüldü. Her hayvan için ayrı ayrı plazma konsantrasyon-zaman grafikleri çizildi ve farmakokinetik parametreler non-kompartmanlı modele göre hesaplandı. Biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde Cmax ve AUC (0-24) parametreleri incelendi. Parametrelerin %90 güven aralığı ve biyoeşdeğerlik kabul sınırları arasında (0,80-1,25) olup olmadığı belirlendi. Jenerik /Orijinal ilaç oranı Cmax için 97,31 ve AUC (0-24) için 93,09 olarak saptandı. Elde edilen her iki değer için %90 güven aralığı ve 0,80-1,25 kabul sınırları içinde olduğu görüldü. Bu çalışma sonucunda jenerik ilacın orijinal ilaç ile biyoeşdeğer olduğu ve birbirlerinin yerine kullanabilecekleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler : Biyoeşdeğerlik, Seftiofur, Sığır, Jenerik, HPLC

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12157

ABSTRACT

Gümüşbaş A.H. (2017). The bioequivalence determination of different ceftiofur preparations in cattle. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology and Toxicology. Doctoral Thesis İstanbul 2017.

The aim of our study to evaluate of the bioequivalence of a generic preparatin which was registered in Turkey contain ceftiofur HCl , after intra muscular injection (i.m) at the dose of 1,1 mg/kg in cattle. In the present study 10 holstein cattle were used. This study was carried out on the based a cross-over design. Blood samples were taken into lithium heparin tubes just before and 10, 20 and 30 minutes and 1,2,4,8,12, and 24 hours following injections. The plasma which are taken from animals concentrations of ceftiofur were measured by HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) following extraction process. The plasma concentration-time curves for each animal were showed and pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental model analysis. C_{max} and AUC (0-24) were based for evaluation of bioequivalence. According 90% confidence level, C_{max} and AUC (0-24) parameters was determined whether or not between acceptable limits (0,80-1,25) for bioequivalence. The avarage of generic/orginal ratio was 97,31 for C_{max} and 93,09 for AUC (0-24) . And these values were found into acceptable limits 0,80-1,25 and 90% confidence limits also. As a result of this study it is concluded that generic preparation was bioequivalent to orginal preparation and it can be used instead of orginal preparation.

Key Words: Bioequivalence, Ceftiofur, Cattle, Generic, HPLC

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 12157

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişen ve değişen dünyada insanoğlunun önemli ve değişmez sorunlarının başında yeterli ve dengeli beslenme gelmektedir (TİGEM 2014). Küresel nüfusun 2025 yılında 8 milyar, 2050 yılında ise 9,1 milyara ulaşacağı ve bu artışın neredeyse tamamına yakın bir kısmının (%96) halihazırda beslenme problemi yaşayan ülkelerde olacağı dikkate alındığında günümüzde olduğu gibi gelecekte de gıda maddesi arzının talebin gerisinde kalacağı söylenebilir (TUBİTAK 2003; FAO 2009). Temel gıda gereksinimlerinin tedariginde yaşanan bu problem tekbaşına gıda üretiminin artırılması ile değil, mevcut kaynakların nitelikli olarak daha verimli üretimi ve kullanımı ile çözüme ulaştırılabilecektir (TUBİTAK 2003).

Hayvansal kaynaklı ürünler taşıdıkları biyolojik özellikleri nedeniyle insanoğlunun gıda ihtiyacının karşılanmasında vazgeçilemez konumdadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre sağlıklı bir insanın vücut ağırlığının her kilogramı için günde 1 gr protein tüketmesi ve bununla %42'sinin hayvansal kökenli olması önerilmektedir, fakat ülkemizde tüketilen günlük proteinin %73'ünün bitkisel kökenli gıdalardan geldiği belirtilmektedir (TİGEM 2013). İnsan yaşamı için bu denli önemli olan hayvansal proteinlere duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır, yalnızca dünya genelinde et ihtiyacının 2020 yılında %58'lik bir artış ile 327 milyon tona çıkması beklenmektedir (Speedy 2003; TUBİTAK 2003). Hayvansal proteinlere duyulan bu ihtiyaç doğrultusunda dünya genelinde ve ülkemizde çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda geçtiğimiz son 10 yıl içerisinde dünya genelindeki ruminant sayısındaki artış %15 düzeyinde belirlenirken, ülkemizde bu oran %35 düzeyine ulaşmıştır. (TÜİK 2015; TİGEM 2014). Üretim miktarında yakalanan bu artışın yanında hayvansal gıda ihtiyacının karşılanmasında kaliteli hayvansal ürün üretimi de önemini korumaktadır (Duru ve Şahin 2004). Kaliteli hayvansal ürün üretimi yanında, halihazırda mevcut ürünlerden de azami verimi almak önemli konulardan bir tanesini oluşturmaktadır. Mevcut hayvansal gıda kaynaklarının etkin kullanımı için gıda kaynaklarının kontamine olmasını, kirlenmesini engellemek de artan gıda ihtiyacı olan dünyamızdaki önemli konulardan birisidir.

Hayvansal gıdalardaki kontaminasyon kaynaklarından biri de hastalıkların kontrolü, tedavisi veya verim artışı için uygulanan ilaç ve kimyasal maddelerin metabolitleri ve serbest veya bağlı haldeki kalıntılarıdır. Hayvansal gıdalardaki ilaç kalıntıları insanlar üzerinde allerjiler, ikincil cinsiyet özelliklerinde değişimler, üreme bozuklukları, dirençli suşların

ortaya çıkması, doğal floradaki değişimler, teratojenik ve kanserojenik etkiler gibi sağlık problemlerine neden olurken (Lee ve ark 2001; Temmamoğulları ve Kaya 2010), çiftlik hayvanlarında kullanılan kimi antibiyotiklerin doğada uzun süre kalmasına bağlı çevre kirliliği (Kemper 2008) veya meydana getirdiği ekonomik kayıplar nedeni ile ekonomik problemler de yaratabilmektedir (Temmamoğulları ve Kaya 2010).

Hayvan sağlığında kullanılan ilaçların izin verilen dozlarda ve uygulama yollarında kullanıldıkları taktirde, kalıntı limitleri ve hayvansal dokulardaki kalış süreleri daha önce yapılan bilimsel çalışmalar ile belirlenmiştir. Belirlenen bu veriler toplum sağlığı için bir araya getirilmiş ve insan sağlığına etkili her etken madde için ilaç kalıntı arınma süreleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu kalıntı arınma süreleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yasalar ile kontrol edilmektedir. Bilimsel veriler ışığında belirlenen yasal arınma sürelerine riayet edildiği taktirde hayvansal gıdaların tüketiminde herhangi bir kalıntı problemi yaşanmamaktadır. Hayvansal gıdalarda yaşanabilecek olası kalıntı problemlerinin başlıca nedenleri; ilaç kalıntı süresine dikkat edilmemesi, farmasötik şekil, uygulama yolu, ilaç çeşidi, beşeri ilaç kullanımı ve etiket dışı ilaç kullanımınıdır (Yarsan 2012).

Veteriner hekimler aynı etken maddeyi içeren ilaçların hepsinde aynı terapötik sonucu alamadıkları durumlarda, kullandıkları ilacı prospektüslerinde belirtilen dozlardan daha yüksek dozlarda kullanabilmektedirler (Sarıca ve Liman 2007). Bu durumun önüne geçilebilmesinin en önemli yollarından birisi; farmasötik olarak eşdeğer olan ilaçların biyolojik olarak aynı etkiyi göstermesi yani “Biyoeşdeğer” olması ile mümkündür (İskit 2014, Çelik ve Birdane 2015).

Biyoeşdeğerlik kısaca; orjinal ürün ile jenerik ürünün hem güvenlik hemde etkinlik yönünden benzer olma kriteridir. Teknik olarak ise Biyoeşdeğerlik; farmasötik olarak eşdeğer olan iki ilacın, aynı molar dozda verilmesini takiben biyoyararlanımlarının (hız ve derece) ve böylece etkilerinin (hem etkinlik, hem güvenlik bakımından) benzer olmasını sağlayacak derecede yakın olmasıdır (Birkett 2003; FDA 2003).

Veteriner ilaçlarının etiket dışı kullanımı nedeni ile meydana gelebilecek olası kalıntı problemlerinin engellenmesinde ve halk sağlığında bu denli önem arz eden biyoeşdeğerlik, aynı zamanda ekonomik olarak da toplumlar için büyük önem arz etmektedir. 1988 yılında sadece orijinal ürün yerine jenerik ürün kullanımı ile ABD’de sağlık harcamalarından elde edilen tasarruf miktarı 2 milyar \$ iken (Kanzık 1993), %4250’lik bir artış ile bu rakam 2005 yılında 87 milyar \$, 2014 yılında ise 254 milyar \$’a ulaşmıştır. ABD’de sağlık

harcamalarında orjinal ilaç yerine jenerik ilaç kullanılarak elde edilen ekonomik kazanç 2005-2014 yılları arasında 1,68 trilyon \$'a ulaşmıştır (GPhA 2015). Yine Kanada'da orijinal ilaç yerine jenerik ilaç kullanımı sonucu elde edilen tasarruf miktarı 2014 yılında 15 milyar \$'a ulaşmıştır (CGPA 2016). Görüldüğü gibi jenerik ilaç kullanımı aynı etkinliği sağlayarak maliyet ve ulusal tıbbi harcamaları düşük tutmaktadır (Yalçın 2014).

Hem sağlık hem de ekonomik olarak bu denli önemli olan biyoeşdeğerlik, ülkemizde beşeri ilaçlarda yasalar ile kontrol edilmektedir. Bu amaçla beşeri ilaç üretiminde 27 Mayıs 1994 tarih ve 21942 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan “Farmasötik Müstahzarların Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerliğinin Değerlendirilmesi Hakkındaki Yönetmelik” ile ruhsatlandırma aşamasındaki ilaçlardan biyoyararlanım ve/veya biyoeşdeğerlik çalışmalarının belgelenmesi istenmiştir (Resmi Gazete 1994).

Beşeri ilaç sanayinde 1994 yılında yayımlanan yönetmelik ile yasal çerçeveye konulan biyoeşdeğerlik, veteriner ilaçlarında ise resmi gazetede 2011 yılında yayımlanan “Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik” ile yasal zeminde kendisine yer bulmuştur. Yayımlanan bu yönetmelik ile ülkemizde ilk olarak veteriner tıbbi ürünlerde “Biyoeşdeğerlik” kavramından bahsedilmiştir.. Bu yönetmeliğe göre jenerik ilaç “Aktif maddeler açısından referans ürünle aynı kalitatif ve kantitatif kompozisyona sahip, aynı farmasötik formda ve biyo-eşdeğerliliği uygun biyo-yararlanım testleriyle kanıtlanmış olmak zorundadır” (Resmi Gazete 2011).

Ülkemizde veteriner tıbbi ürün üretimi veya ithalatı yapan toplam 88 firma bulunmaktadır ve bu firmalardan sadece 26 tanesi yerli üretim yapmaktadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2016). Bu firmalar ise jenerik ürün üretimi ile hayvancılık sektöründe yer almışlardır. Veteriner sağlık alanındaki ekonomik yaklaşımlar nedeni ile ülkemizdeki jenerik ilaç üretimi ve kullanımı yaygınlık göstermektedir.

Bu nedenle biyoeşdeğerliği kanıtlanmış jenerik ilaç üretimi ve tüketimi ile ülkemiz ilaç ithalatı, verim kayıpları, etiket dışı ilaç kullanımı, kalıntı problemi ve üretim hataları gibi jenerik ilaç üretimine bağlı ekonomik kayıplarının önüne geçebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde; araştırmamıza konu olan orijinal ve jenerik ilaçların etken maddesi olan seftiofur ile biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik değerlendirmelerine ilişkin genel bilgilere yer verilmiştir.

2.1. Seftiofur;

Seftiofur sadece hayvan sağlığında at, sığır, köpek, koyun ve keçilerde duyarlı patojenlerden ileri gelen sistemik enfeksiyonların sağaltımında kullanılan 3. kuşak sefalosporin grubu antibakteriyeldir. Özellikle sütte ilaç kalıntısı bırakmaması nedeni ile sağmal ineklerde gram (+) ve gram (-) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Plumb 2011).

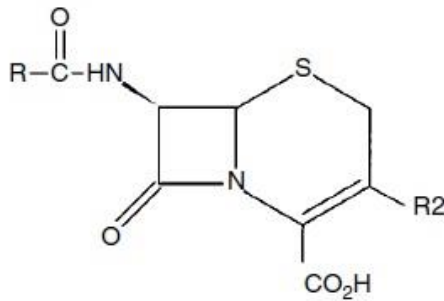
2.1.1. Tarihçe;

Sefalosporinler ilk olarak İtalya'nın Sardunya adasında bulunan Cagliari Üniversitesinden Giuseppe Brotzu tarafından keşfedilmiştir. Brotzu 1945-1948 yılları arasında penisilin gibi doğal bir antibiyotik bulmak için lağım florası üzerinde yürüttüğü çalışmalarında birçok bakteri cinsinin yanısıra *Salmonella typhi*'yi de inhibe eden bir *Cephalosporium* suşu (*C. acremonium*) izole etmiştir. Saflaştırılmamış suş ve kültür filtratları üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar doğrultusunda Edward Abraham ve Guy Newton 1949 yılında bu kültürün sefalosporin P ve N olarak tanımlanan iki farklı antibiyotik sentezlediğini saptamışlardır. Pensilin N olarak adlandırılan sefalosporin N'nin (1952) yeni tip bir penisilin olduğu Sefalosporin P'nin fusidik aside benzer steroid yapıda bir madde olduğu anlaşılmıştır. *Cephalosporium* kültürünün, ham ekstratlarında antibakteriyel test yöntemi ile farkedilmeyecek kadar az miktarda bulunan, ancak saflaştırılmış pensilin N preparatlarında tespit edilebilen bir üçüncü antibakteriyel madde olan "Sefalosporin C" nin sentezi 1955 yılında gerçekleştirilmiş ve bu maddenin antibakteriyel spektrumunun diğerlerinden farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Gerçek anlamda ilk sefalosporin olarak kabul edilen sefalosporin C'nin penisiline dirençli suşlara etkin olmasının önemi 1957'de fark edilmiş ve yapısı 1959'da Edward Abraham tarafından ortaya konmuştur. Sonraki yıllarda intrinsik aktivitesinin düşüklüğü ile ilişkili olarak yüksek dozlarda sınırlı kullanımı bulunan sefalosporin C'nin anti-stafilokokal aktivitesi yan zincirin N asetilasyonu ile artırılmış ve endüstriyel gelişime paralel bir şekilde α -aminoadipoyl yan zincirde modifikasyona bağlı olarak yarı sentetik sefalosporinler geliştirilmiştir (Töreci 1987; Lemke

ve ark 2008; Zaffiri ve ark 2012). Dünya genelinde ilk kullanıma sunulan sefalosporin “Sefalotin” (1964 yılı) olup, sadece parenteral kullanım için tasarlanmıştır. Sefazolin ve sefoksitin 1970’li yıllarda parenteral, sefaleksim ise ilk oral kullanım için üretilmiş sefalosporinlerdir. Yıllar içerisinde potens ve antibakteriyel spektrumu artırma amaçlı çok sayıda farklı yarı sentetik sefalosporin türevleri sentezlenerek üretime girmiştir (Çalangu 2010, Zaffiri ve ark 2012). Bu grup antimikrobiyaller beşeri hekimlikle eş zamanlı olarak veteriner hekimliğinde de kullanılmaya başlanmıştır. Seftiofur ise sütte ilaç kalıntısı bırakmayan ve sadece hayvan sağlığı kullanımına mahsus ilk sefalosporin olarak 1987 yılında üretilerek piyasaya verilmiştir (Yancey ve ark 1987) .

2.1.2. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri;

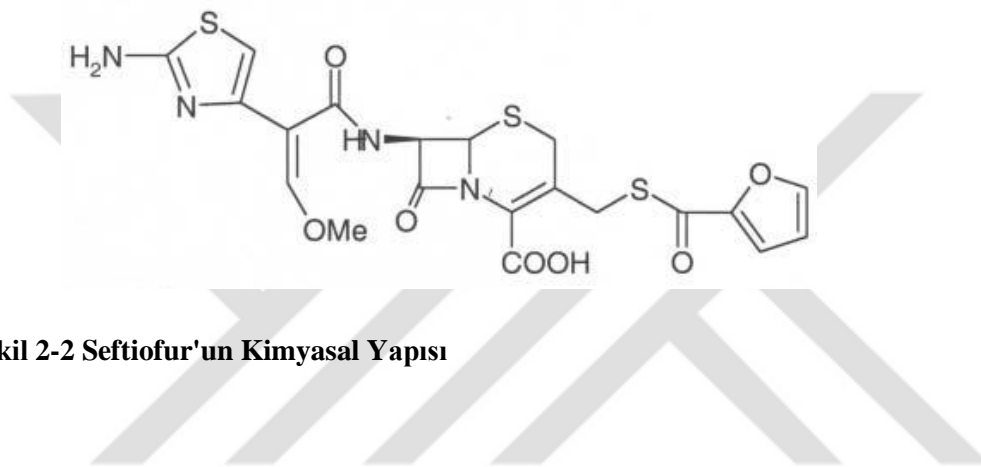
Sefalosporin grubu moleküller, ana çekirdeğini sefam türevi 7-amino-sefalosporanik asidin oluşturduğu β -laktam antibiyotikleridir (Şekil 2-1)(Giguere ve ark 2006). Bu asit çekirdeğine çeşitli R1 ve R2 gruplarının eklenmesi ile doğal sefalosporinlere göre daha yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip ürünlerin oluşması sağlanmıştır (Nemutlu ve Kır 2009)



Şekil 2-1 Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerin Temel Yapı Çekirdeği

Seftiofur at, köpek, domuz, kanatlı ve sığırlarda kullanılmak üzere onaylanmış, geniş spektrumlu 3. kuşak bir sefalosporindir (Jacopson ve ark. 2006; El-Gendy ve ark 2007). Seftiofur’da, 7-amino cephalosporin çekirdeğinin 7- β - amino-acyl yan zinciri olarak oxyimino-aminothiazolyl grubu bulunmaktadır. Bu yan zincir benzer şekilde sefodoksim, seftriakson, sefrazidim yapısında da yer almaktadır. Seftiofur ayrıca 3. nesil sefalosporinlerde olduğu gibi 3. pozisyonunda furoik asit tiyoester içermektedir (Şekil 2-2) (Hornish ve Kotarski 2002). Seftiofurun başlıca metabolitleri olan desfuroylseftiofur (DFC)

ve desfuroylseftiofur dimer (DFC-dimer) 'de seftiofur yapısında bulunan β -laktam halkası ve oxyamino-aminothiazolyl grubu bulunmaktadır. Seftiofurun başlıca metabolitleri desfuroylseftiofur (DFC) ve desfuroylseftiofur dimer seftiofur gibi aynı özelliklere ve etki spektrumuna sahiptir. Özellikle seftiofimin bakteriyel etki mekanizması ile ilgili olarak seftiofur, DFC ve DFC-dimerin *Escherichia coli* için çok önemli olan en az 3 farklı PBP'e (Pensilin Bağlayıcı Protein) bağlandığını ispatlamıştır (Hornish ve Kotarski 2002, USP 2007).



Şekil 2-2 Seftiofur'un Kimyasal Yapısı

Seftiofur Moleküler Formülü; C₁₉H₁₇N₅O₇S₃,

Seftiofur Moleküler Ağırlığı; 523,56 g/mol

Seftiofur CAS No: 80370-57-6

Seftiofur sodyum (Na) CAS No: 104010-37-9

Seftiofur hidroklorür (HCl) CAS No: 103980-44-5

Sistemik Adlandırması: (6R,7R)-7-[[(2Z)-2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)- 2-methoxyiminoacetyl]amino]-3-(furan-2-carbonylsulfanylmethyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid)

Seftiofur 523,56 g/mol moleküler ağırlığa sahip, 1,81 g/cm³ yoğunluğunda su ve metanolde çözünebilen beyazımtırak renkte bir bileşiktir. Seftiofur'un suda çözünürlüğü ile pH arasında ilişki bulunmaktadır. pH 5,5 'de her ml suda 400 mg'dan fazlası çözünebilir. Seftiofur sodyum tuzu şeklinde tamponlu sulu çözeltileri hızla çözünür (Sunkara ve ark 1999).

2.1.3. Etki Şekli;

Sefalosporinler diğer beta-laktam antibiyotiklerde olduğu gibi peptidoglukan sentezinin son aşamasında etkinlik göstererek bakteri hücre duvarının oluşumunu önlemektedirler (Prescott ve ark 2013). Bu etki bakteri hücre duvarının oluşumundan sorumlu transpeptidaz ve glikopeptid polimerlerinin çapraz bağlanmasını katalize eden penisilin bağlayıcı proteinler olarak da bilinen diğer peptidoglukan enzimlerinin (PBP'ler; transpeptidaz, karboksipeptidaz) aktivitesinin inhibisyonu sonucu şekillenmektedir. β -laktamlar sadece gelişmekte olan bakterilerde erimeye neden olarak bakterisidal aktivite gösterirler. PBP'lere karşı ilgileri β -laktam antibiyotikler arasında farklılık göstermektedir. Sefalosporinlerin de etkilediği PBP'ler bakteriden bakteriye değişmekle birlikte 3 ana grup olmak üzere yaklaşık 20 alt grupta sınıflandırılmaktadır. β -laktam antibiyotiklerin PBP'lere affinitelerindeki farklılıklar sefalosporinler arasındaki etki spektrumunun farklılığını açıklamaktadır (Yocum ve ark 1980, USP 2007, Sauvage ve ark 2008).

2.1.4. Antibakteriyel Spektrumu;

Seftiofurun yer aldığı 3. nesil sefalosporinler yüksek antibakteriyel aktiviteleri ve beta laktamazlara karşı geniş ölçekte direnç göstermeleri nedeniyle üstün özelliklere sahiplerdir. Bu grup antimikrobiyallere karşı streptokoklar, diğer çoğu Gram pozitif ve beta laktamaz üretenlerinde dahil olduğu Gram negatif bakteriler (*Actinobacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp.) ile *Clostridium* spp. ve *Fusobacterium* spp. yüksek düzeyde duyarlık (MIK \leq 2 mg/ml) gösteren bakterilerdir. *Staphylococcus aureus*, bazı *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., bazı *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Serratia* spp.'nin orta düzeyde duyarlılık (MIK = 2 mg/ml) gösteren, *Acinetobacter* spp., *Bordetella* spp., bazı *Enterobacter* spp. ve *Serratia* spp., bazı enterokok ve metisilin –dirençli *S. aureus* ve *Staphylococcus pseudintermedius* 'un ise dirençli (MIK \geq 8 mg/ml) bakteri türleri olduğu bildirilmektedir (Prescott ve ark 2013). Gram (+) bakterilerin çoğuna ve streptokoklara karşı oldukça yüksek aktiviteye sahip olan seftiofur *Fusobacterium. necrophorum* ve *Bacteroides. melaninogenicus* *Fusobacterium necrophorum* ve *Bacteroides melaninogenicus* gibi anaerob bakterilerin yanı sıra β -laktamaz üreten suşlara da etki göstermektedir. Ancak *Pseudomonas* türlerine karşı sefalosporinlerin diğer 3. nesil üyelerinden aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. Kimyasal yapı gereği hafif asidik ortamda (pH 6-7) daha güçlü etkinlik gösteren seftiofur *in vivo* olarak DFC'ye hızla metabolize edilir. DFC ise *S.*

aureus'a seftiofur'a göre 4-8 kat daha az etkir. Seftiofur'un bazı metabolitleri *Proteus mirabilis*'e karşı farklı derecelerde duyarlık gösterirler (USP 2007).

Seftiofurun çeşitli hayvan türlerinden elde edilen bakteri izolatları üzerinde etkinliğinin test edildiği çalışmada; başlıca *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *F. necrophorum*, *H. somnus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *B. melaninogenicus*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus sp.*, *Moraxella sp.*, *A. pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysagalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *Klepsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*'ye karşı etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (Salmon ve ark1996).

Seftiofur ve aktif metaboliti Desfuroylseftiofur'un patojen bakteri türlerine karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri Tablo 2-1, Tablo 2-2 ve Tablo 2-3'te gösterilmiştir.

Tablo 2-1 Seftiofur'un Gram Negatif Bakteriler Üzerine MIK₉₀ (µg/ml) Değerleri

Bakteri Türü	Suş Sayısı	Seftiofur	Desfuroylseftiofur	Kaynak
<i>Pasteurella multocida</i>	50	≤0,0039	0,0078	Salmon ve ark 1996
<i>Pasteurella multocida</i>		≤ 0,004		Prescott 2013
<i>Pasteurella multocida</i>	48	≤0,0039	0,0078	Salmon ve ark 1996
<i>Pasteurella haemolytica</i>	42	0,015	0,015	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,03		Prescott 2013
<i>Haemonphilus somnus</i>	59	≤0,0019	≤0,0019	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,03		Prescott 2013
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	50	0,0078	0,015	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,06		Prescott 2013
<i>Salmonella spp.</i>	28	1,0	2,0	Salmon ve ark 1996
		1		Prescott 2013
<i>Escherichia coli</i>	40	0,5		Salmon ve ark 1996
	115	0,25		Soback ve ark 1989
		0,5		Prescott 2013
<i>Morexalla Bovis</i>		0,25		Prescott 2013
<i>Fusobacterium</i>	17	≤0,06		Samitz ve ark 1996

Tablo 2-2 Seftiofur ve Desfuroylseftiofur'un Gram Pozitif Bakteriler Üzerine MIK₉₀ (µg/ml) Değerleri

Bakteri Türü	Suş Sayısı	Seftiofur	Desfuroylseftiofur	Kaynak
<i>Arcanobacterium</i>	1	0,78		Yoshimura 2000
<i>Rhodococcus equi</i>		≤ 1,0		Prescott 2013
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	1,0	8,0	Salmon ve ark 1996
		1,0		Prescott 2013
<i>Staphylococcus hycis</i>	14	1,0	4,0	Salmon ve ark 1996
<i>Staphylococcus spp</i>	11	1,0	8,0	Salmon ve ark 1996
<i>Streptococcus uberis</i>	15	0,03	0,5	Salmon ve ark 1996
		0,03		Prescott 2013
<i>Streptococcus dsygalactiae</i>	15	≤ 0,0039	0,03	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,004		Prescott 2013
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	48	≤ 0,0019	0,03	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,12		Prescott 2013
<i>Streptococcus equi</i>	12	≤ 0,0019	0,03	Salmon ve ark 1996
		≤ 0,004		Prescott 2013
<i>Streptococcus suis</i>	49	0,13	0,25	Salmon ve ark 1996
		0,12		Prescott 2013

Tablo 2-3 Seftiofur'un Anaerob Bakteriler Üzerine MIK₉₀ (µg/ml) Değerleri

Bakteri Türü	Seftiofur MIC ₉₀	Kaynak
<i>Bacteroides fragilis</i>	≥ 16	Prescott 2013
<i>Bacteroides spp.</i>	4	Prescott 2013
<i>Fusobacterium nechrophorum</i>	≤ 0,06	Prescott 2013
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,12	Prescott 2013

Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Komitesi (EUCAST) tarafından güncellenen raporlara göre seftiofurun; *E. coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus* ve *S. hyicus* gibi bakterilere ait MİK değerleri dağılımları ise Tablo 2-4’de verilmiştir (EUCAST 2016)

Tablo 2-4 EUCAST Seftiofur MİK Dağılımları

	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	5	568	1920	236	2	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0	0	0	1	16	1368	973	128	11	2	2
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	4	13	63	43	0	0	0	0
<i>S. hyicus</i>	0	0	0	0	0	1	0	76	132	4	1	0	0

2.1.5. Bakteriyel Direnç;

Sefalosporinlere karşı direnç gelişimi üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır;

- PBP’lerde değişimler,
- Geçirgenlikte azalma,
- β -laktamazlarla yıkımlanma ve ilacın bakteri hücresi dışına atılımında artış

Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki (PBP) Değişimler

İnsan patojenlerine karşı yoğun olarak çalışılmış olan bu direnç tipi hayvan patojenlerinde iyi tanımlanmamıştır. Hayvan patojenlerine karşı iyi tanımlanmasa da metisiline dirençli *S. aureus* veya *Enterococcus faecium* tarafından duyarsız PBP genlerine maruz kalma sonucunda PBP’lerde değişimler gözlenebilir.

β -laktamazlar (sefalosporinazlar)

Sefalosporinlere karşı görülen en önemli direnç mekanizması β -laktamazlarla yıkımlanmadır. β -laktam halkasının bütünlüğünü koruması seftiofur’un antibakteriyel aktivitesi için gereklidir. β -laktam halkasının bakteriler tarafından salgılanan β -laktamaz enzimi tarafından yıkımlanması antibakteriyel aktivitenin kaybolmasına neden olur. Yapılan çalışmalar ile bugüne değin 1000’e yakın β -laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimlerin önemi hem geniş spektrumlu penisilinlerin yaygın kullanımıyla oluşan çok farklı β -

laktamazların ortaya çıkması hem de bu β -laktamazı kodlayan genlerin sıklıkla taşınabilir olmasından kaynaklanmaktadır (Bush ve Fisher 2011, Prescott ve ark 2013). AB’de sefalosporinlere dirençli suşların ortaya çıkmasında, sefalosporinlerin hayvanlarda kullanılması nedeniyle oluşan dirençli suşlara çok sık rastlanılmamaktadır. *Salmonella* spp. ve *E.coli* gibi bakterilerde genişlemiş spektrumlu β -laktamazları (hem penisilinleri hem de sefalosporinleri yıkılmayan) kodlayan genlerin aracılık ettiği direncin ortaya çıkması, sıklıkla veteriner sefalosporinlerle değil, diğer antibakteriyel ajanlarla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Hornish ve Kotarski 2002).

Geçirgenlikte Azalma ve Dışa Atımın Artması

Bakteriler tarafından periplazmik aralığa salgılanan β -laktamaz enzimi nedeniyle bazı durumlarda sefalosporinlere direnç gelişir. Bu gram negatif bakterilerde β -laktamazların penetre olmasını sağlayan porinlerin üretiminde azalma sonucu oluşur. Bakteri tarafından antibiyotiğin alınmasındaki azalma, dışa atım (efflux) mekanizması ile gerçekleşebilir. Bu mekanizma çok geniş spektrumlu çapraz sınıf direncini ortaya çıkarır.

Seftiofura karşı direnç gelişiminin 2007-2011 yılları arasında Çek Cumhuriyetinde çeşitli lokal çiftliklerde solunum yolu enfeksiyonlu sığır ve domuzlardan izole edilen *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *M. haemolytica* ve *E. coli* patojenleri üzerinde değerlendirildiği bir araştırmada; özellikle 2010 yılında seftiofur tüketiminin artmasına rağmen bakterilerin duyarlılık durumlarının değişmediği ve direnç olgularının çok az düzeyde kaldığı belirtilmiştir (Nedbalcova ve ark 2014). Benzer şekilde Avrupa genelindeki altı farklı ülkede de 2002-2004 yılları arasında sığırlardan izole edilen *M. haemolytica* suşlarının antimikrobiyal direnç durumu incelenmiş ve seftiofura direnç gelişiminin oluşmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Hendriksen ve ark 2008). Avrupa genelinde 2009-2011 yılları içinde gerçekleştirilen diğer bir araştırmada ise solunum sistemi hastalığı (Bovine Respiratoric Disase (BRD)) bulunan sığırlardan izole edilen *M. haemolytica*’nın 6 antibakteriyel ilaca karşı direnç durumu incelenmiş ve en düşük direnç gelişiminin seftiofura karşı şekillendiği saptanmıştır (Lubbers ve Hanzlicek 2013). Yine ülkemizde 2001-2012 yılları arasında yürütülen bir çalışmada sığır, koyun, keçi ve tavşan gibi değişik hayvan türlerinden izole edilen *P. multocida* suşlarının hiçbirinde direnç gelişimi olmadığı tespit edilmiştir (Güler ve ark 2013).

2.1.6. Farmakokinetik Özellikleri;

Sefalosporinlerin çoğu oral yolla emilebilme özelliğine sahip olmalarına rağmen seftiofur oral biyoyararlanımı oldukça düşük bir ilaçtır. Bu nedenle parenteral kullanıma uygun enjektabl formlarda üretilmektedir (Kotarski ve ark 2002; J.E. Riviere and MG. Papich, 2009). Seftiofurun kas içi uygulama sonrası sığır ve manda buzağılarında biyoyararlanımının sırasıyla % 89.82 ve % 99.7 olarak saptandığı belirtilmiştir (El-Gendi, 2007).

Sefalosporinler nispeten polar yapıda olan, yağda çözünürlükleri düşük ve hücre içi penetrasyonu zayıf antimikrobiklerdir. Prostat ve merkezi sinir sistemi hariç pek çok doku ve extraselüler sıvıda dağılımları iyi düzeydedir. Dağılım hacimleri genellikle 0,2 ile 0,3 l/kg arasındadır ve nadiren 0,5 l/kg geçer (Riviere ve Papich 2009). Seftiofur'un araştırmacılar tarafından farklı hayvan türlerinde tespit edilen dağılım hacimleri Tablo 2-5'de verilmiştir.

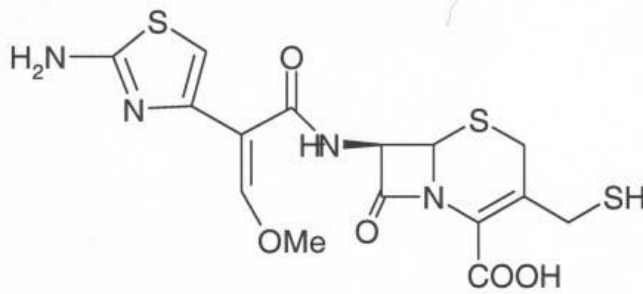
Tablo 2-5 Farklı Hayvan Türlerinde Seftiofur 'un Dağılım Hacmi

Hayvan Türü	Dağılım Hacmi	Kaynak
Sığır Buzağısı	0,21	El-Gendi ve ark 2007
Manda Buzağısı	0,13	El-Gendi ve ark 2007
Keçi	0,31	Courtin ve ark 1997
Deve	0,13	Goudah 2007
Geyik	1,67	Drew ve ark 2004
Fil	0,51	Dumoncaux ve ark 2005

Sefalosporinlerin çeşitli türlerde plazma proteinlerine bağlanma oranlarına ilişkin veriler sınırlı düzeydedir. Pek çok sefalosporinin evcil hayvanlarda proteinlere bağlanma oranının insanlara göre daha düşük düzeyde olduğu bildirilmekle birlikte seftiofurun kas içi uygulama sonrası sığır ve manda buzağılarında proteinlere bağlanma oranının sırasıyla % 39,68 ve % 14,44 olarak saptandığı belirtilmiştir (El-Gendi, 2007).

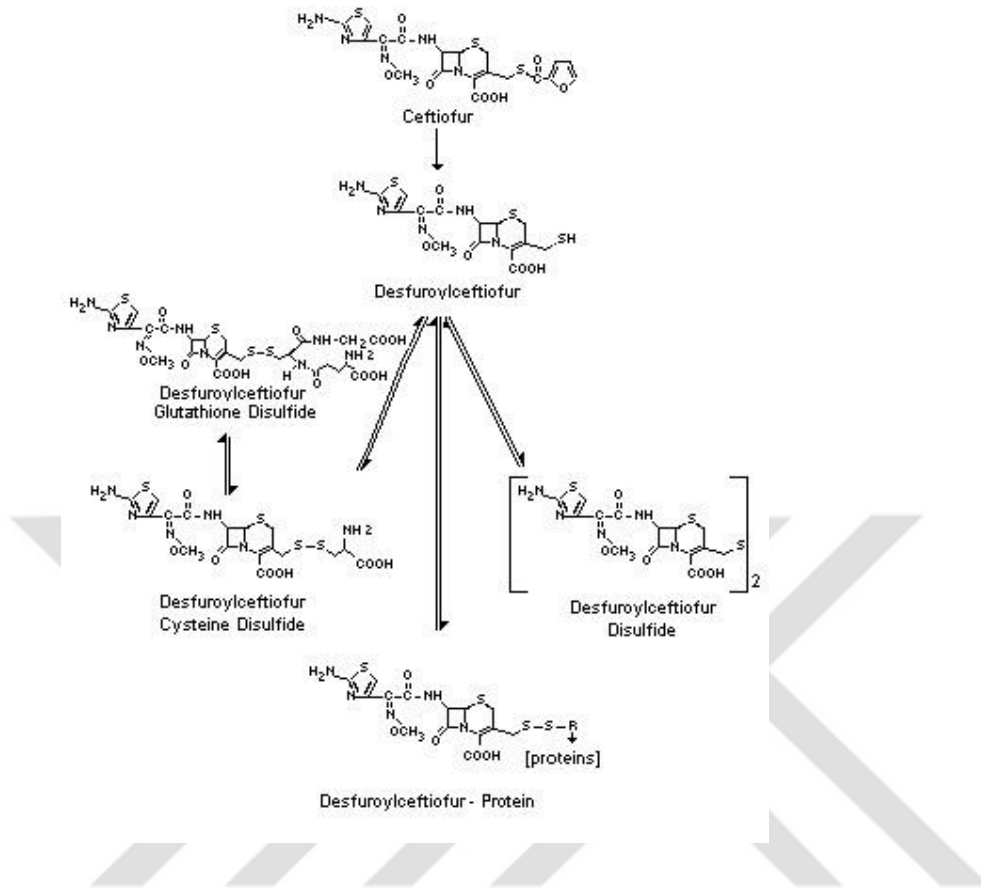
Seftiofur parenteral yolla uygulanması sonrası çoğu hayvan türünde hızla metabolizasyona uğrar ve aktif metaboliti Desfuroylseftiofur (DFC) dir (Şekil 2-3). DFC'de

antimikrobiyel aktivite için zorunlu olan β -laktam halkası bütünlüğü korunmaktadır (Kotarski ve ark 2002). Serbest asit formda da seftiofur hızla emilir ve hızla DFC ve furoik asit'e metabolize edilir. Sistemik yarı ömrü seftiofurdaki tiyoester bağının hızla ayrılmasına bağlı olarak 10 dakika ve ya daha az olduğu belirlenmiştir. DFC'nin yapısında bulunan sülfidril parçası, DFC'nin plazma ve doku proteinlerine bağlanmasından sorumludur. DFC'nin proteinlere bağlanma özelliği karaciğer ve böbrek gibi organlarda eliminasyona karşı korumakta ve aynı zamanda β -laktam halkasının yapısını korumasında yardımcı olmaktadır. Hedef patojenler, in vitro koşullarda seftiofur ve aynı zamanda DFC metabolitlerine karşıda duyarlıdır. Ana metabolit (DFC), yapısında bulunan β -laktam halkasının hidrolizi ile metabolize olur, bu metabolizasyon sonucunda da antimikrobiyel aktivite kaybı şekillenir (Hornish ve Kotarski 2002).



Şekil 2-3 Desfuroylseftiofur'un kimyasal yapısı

Deneysel bir çalışmada; sığır ve ratlara uygulanan radyoaktif madde ile (^{14}C) işaretli seftiofurun tiyoester bağlarının hızla kopması sonucu DFC ve furoik aside dönüştüğü saptanmıştır. Sığırlarda seftiofurun metabolizma yolağı Şekil 2-4'de gösterilmiştir (Ritter ve ark 1996).



Şekil 2-4 Sığırlarda Sefitofur'un Metabolizasyonu

Seftiofurun metabolitleri inaktif formda büyük ölçüde dışkı ve idrar ile atılmaktadır (Wagner ve ark 2011). Ruminantlarda idrarın alkali özelliği nedeniyle idrardaki ana metabolitlerin DFC tiyolakton, Desfuroylseftiofur Sistein Disulfid (DCD) ve 3, 3'-DFC-disülfid dimer (3, 3'-DFD) dir. Yine ratlarda yapılan çalışmalarda ise oral uygulama sonrası idrardaki ana metabolitin seftiofur sülfoksit sistein tiyoester olduğu belirtilmiştir (Jaglan 1989).

Kas içi yolla 2.2 mg/kg dozda seftiofur uygulanan sütçü ve etçi ineklerde, uygulanan dozun yaklaşık % 57-63'ü DFC konjugatlar ve polar metabolitler halinde 24 saat içerisinde idrarla, % 24-35'i de dışkı ile atıldığı saptanmış, dışkıda ana bileşik olan seftiofura ise rastlanmamıştır (Hornish ve Kotarski 2002).

Seftiofurun'un farklı hayvan türlerindeki temel farmakokinetik verileri Tablo 2-6'da gösterilmiştir.

Tablo 2-6 Farklı Türlerde Seftiofur'un Farmakokinetik Verileri

Tür	Farmakokinetik Parametreler					Kaynak
	C _{max} µg/ml	AUC µg. saat /ml	AUMC µg.saatt ² /ml	t _{max} saat	MRT saat	
	5,54	67,71	559,17	3,15	9,05	El-Gendy ve ark 2007
Sığır	2,85	36,52	-	-	-	Okker ve ark 2002
	13,90	112,00	1280,00	0,67	11,30	Brown ve ark 2000
Manda	9,66	34,70	92,94	0,82	2,84	El-Gendy ve ark 2007
Koyun	4,33	1320,00	627,00	6,48	7,85	Craigmill ve ark 1997
Keçi	2,70	695,00	-	1,13	4,48	Courtin ve ark 1997
Domuz	11,80	226,00	4660,00	1,00-4,00	20,30	Brown ve ark 1999
Geyik	3,98	14,4	-	0,54	-	Drew ve ark 2004
Fil	1,63	3,30	8,40	0,55	2,30	Dumanceaux ve ark 2005
Deve	10,34	68,70	-	1,22	5,21	Goudah 2007
İbikli Papağan	5,25	14,70	-	-	2,80	
Amazon Papağanı	10,99	43,80	-	-	7,60	Tell ve ark 1998
Hindi	4,36	23,1	-	0,40	4,68	
Tavuk	1,67	8,96	-	0,48	4,49	

2.1.7. Farmakodinamik Özellikleri;

Sefalosporinler penisilinler gibi β -laktam halkası taşıyan bakterisidal etkili bir antibiyotik grubudur. Optimal antibakteriyel etkinliklerini konsantrasyona değil, zamana bağlı olarak gösterirler. Bu nedenle tedavide dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, uygulanan tedavi boyunca antibiyotiğin etki yerindeki konsantrasyonunun MİK değerinin üzerinde olmasıdır (Toutain ve ark 2002). Sefalosporinler genel olarak duyarlı bakterilerin meydana getirdiği bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Seftiofur başlıca sığırlarda solunum sistemi (Salmon ve ark 1995; Watts ve ark 1994), mastitis, interdigital necrobacillus (Erskine ve ark 1995; Stanek ve ark 1998) ve metritisin tedavisinde (Smith ve ark 1998) olumlu sonuçlar verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ayrıca atlarda *S. zooepidemicus*'tan meydana gelen solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisi ve kontrolünde (De Baere ve ark 2004) ve yine domuz ve kanatlılarda solunum sistemi enfeksiyonlarında da kullanıldığı bildirilmiştir (Jacopson ve ark. 2006).

Yukarıda sayılan endikasyonlarda kullanılmak üzere seftiofur'un sodyum ve hidroklorür tuzu ile kristalinsiz asit formu enjektabl olarak piyasaya sunulmuştur. Ayrıca seftiofur'un meme içi kullanımı da mümkündür (Riviere ve Papich 2009).

Ülkemizde Kasım 2016 itibari ile TC Gıda Tarım ve Hayvancılık bakanlığından ruhsatlı 28 adet seftiofur preparatı bulunmaktadır. Ruhsatlı seftiofur preparatlarının listesi Tablo 2-7 de sunulmuştur (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2016).

Tablo 2-7 Türkiye'de Ruhsatlı Seftiofur Preparatları

ADI	UYGULAMA ŞEKLİ	ETKEN MADDE	RUHSAT SAHİBİ FİRMA
ACTİONİS	Enjeksiyon	50 mg seftiofur HCl	Atmaca İlaç
CEFLOREN	Enjeksiyon	50 mg seftiofur sodyum	Provet
CEFLOREN	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Provet
CEFENİL	Enjeksiyon	50 mg seftiofur sodyum	Etkin
CEFTİON	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Çelikler
CEFTİPHARM	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Aydın İlaç
CEFTİPURE	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Alke
CEFTİSİN	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Teknovet
CEFTİVİL	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Vilsan

CEVAXEL RTU	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Ceva Hayvan Sağlığı
CLINEXIN %5	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Bavet
ECOSEFT	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur sodyum	İ.E. Ulagay İlaç
EFİCUR	Enjeksiyon	50 mg seftiofur HCl	Hipra
EXCEDE	Enjeksiyon	200 mg seftiofur	Zoetis Hayv. Sağ.
EXCENEL	Enjeksiyon	50 mg seftiofur sodyum	Zoetis Hayv. Sağ.
EXCENEL FLOW	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Zoetis Hayv. Sağ.
INOXEL	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Galenka
MEDİSEF	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Ani-med
SEFAKİM	Enjeksiyon	1000 mg seftiofur sodyum	Topkim
SEFAKİM	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Topkim
SEFALİN	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Aksu
SEFANEL	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Arma
SEFANEL	Enjeksiyon	50 mg seftiofur sodyum	Arma
SEFTİVET	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Vetaş
THERACEF	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Biovita
THERACEF T	Enjeksiyon	50 mg seftiofur sodyum	Biovita
VET-EXFO	Enjeksiyon	50 mg (baza eşdeğer) seftiofur HCl	Vet-hek
VİRAMAST	Meme İçi	125 mg seftiofur HCl	Topkim

2.1.8. Yan Etkileri;

Seftiofurun hedef türlerde yan etki insidensi yüksek değildir. Grup olarak sefalosporinlerin sağaltım güvenliği iyi düzeyde kabul edilir. Allerjik ve organik nitelikte bozukluklara yol açabilirler. Uygulama yoluna göre kıl dökülmesi ve kaşıntı ile karakterize deride ilaç reaksiyonu oluşturabilirler. Kas içi yolla uygulandıklarında bazen yerel irkilti ve abse oluşumuna, atlarda sekal floranın etkilenmesi sonucu gastrointestinal bozukluklara neden olabilirler (Giguere 2013). Benzer şekilde ratlarda yapılan kronik toksisite çalışmalarında; seftiofurun mide barsak kanalını hedef aldığı bilgisine yer verilmiştir (Ritter ve ark 1996). Ayrıca seftiofurun yüksek dozlarının uygulandığı köpeklerdeki kronik toksisite çalışmalarında dönüşümlü trombositopeni ve aneminin görüldüğü bildirilmiştir (WHO TRS 1996).

2.1.9. Diğer İlaçlar İle Etkileşimleri;

Sefalosporinlerin aminoglikozitler ve renal sistem üzerine yan etkileri olan diğer ilaçlar ile birlikte kullanımı (amfoterisin B gibi) renal sistem üzerine istenmeyen etkileri artırabilir. Bazı bakteriler üzerinde tedavide aminoglikozid ve penisilinler ile birlikte sinerjist veya additif etki yapabilir. Probenesid diğer sefalosporinlerde olduğu gibi yarışmalı bir şekilde tubuller sekresyonu bloke ederek serum seftiofur seviyesini ve yarılanma ömrünü artırabilir (Plumb 2011).

2.1.10. Kalıntı;

Seftiofur'un yasal arınma süresi, eti için yetiştirilen hayvanlarda 7 gündür, inek sütü için ise yasal arınma süresi "0" gündür. TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 4/5/2012 tarihli ve 28282 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliğine göre hayvansal gıdalarda bulunmasına izin verilen Maksimum Kalıntı Limiti (MKL) limitleri Tablo 2-8 'de belirtilmiştir. (Resmi Gazete 2012) . Yönetmelikte sunulan hayvansal gıdalarda MKL değerleri EMA'nın belirlediği değerlerdir. Hornish ve Kortarski isimli araştırmacılar tarafından farklı türlerde ^{14}C izotopu ile işaretlenen seftiofur'un 3 ve 5 gün süre ile uygulanması sonucu dokularda elde edilen seftiofur konsantrasyonlarına ait değerler Tablo 2-9 da gösterilmiştir (Hornish ve Kotarski 2002).

Tablo 2-8 Seftiofur'un Gıdalardaki MKL Değerleri.

Farmakolojik Aktif Madde	Belirleyici Kalıntı	Hayvan Türü	Maksimum Kalıntı Limiti	Hedef Doku
Seftiofur	Desfuroilseftiofur olarak ifade edilen betalaktam yapısındaki kalıntıların toplamı	Gıda Elde Edilen	1000 µg/kg	Kas
			2000 µg/kg	Yağ
		Hayvan Türleri	2000 µg/kg	Karaciğer
			6000 µg/kg	Böbrek
			100 µg/kg	Süt

Tablo 2-9 Günlük Kas İçi Sefitofur HCl Enjeksiyonu Sonrasında Farklı Türlerde Farklı Dokulardaki Seftiofur Kalıntı Konsantrasyonları

Tür	Günlük Doz ve Uygulama Süresi	Kesim Süresi (Saat)	Toplam ¹⁴ C-Seftiofur Kalıntı			
			Böbrek	Karaciğer	Kas	Yağ
Sığır	2,2 mg /kg 5 gün	8	5,54	1,35	0,23	0,56
Koyun	2,2 mg/kg 5 gün	12	9,02	0,62	0,13	0,63
Domuz	5,2 mg/kg 3 gün	12	4,47	1,55	0,76	1,49
Domuz	3,08 mg/kg 3 gün	12	3,62	1,06	0,44	1,05
		72	1,0	0,36	0,006	0,17
ABD Tolerans Limitleri (Sığır& koyun /Domuz)			8,0	2,0/3,0	1,0/2,0	Tayin
EU Maksimum Kalıntı Limitleri Tüm Türler İçin			6,0	2,0	1,0	2,0

2.2. Biyoyararlanım;

Biyoyararlanım; intra venöz (IV) yol dışında bir uygulama yolu ile verilen bir ilaçtan vücudun yararlanma miktarını gösteren somut bir ölçüdür. Geniş anlamıyla; etkin maddenin veya onun terapötik metabolitlerinin absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçme ve böylece vücuttaki etki yerinde veya onu yansıtan serum veya plazma gibi biyolojik sıvılarda var olma hızı ve derecesidir (Cheresson ve Banakar 1999; Uçar 2009).

Bir ilacın göstermiş olduğu etkisinin bireyler arasında veya aynı bireylerde farklı şiddette olması, temel olarak farmakokinetik veya farmakodinamik değişkenliklere bağlı olarak şekillenebilir. Farmakokinetik değişkenlik "bir etkin maddenin aynı dozda uygulanmasını takiben vücut sıvılarında (kan, plazma, idrar) ölçülen ilaç konsantrasyonlarının farklılık göstermesidir". Farmakodinamik değişkenlik ise "vücut sıvılarında eşit konsantrasyonda bulunmasına rağmen, aynı etkin maddenin etki şiddeti ve süresinin farklılık göstermesi" şeklinde tanımlanır (Kayaalp 2001; Çelik ve Birdane 2015).

Absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım gibi farmakokinetik aşamalarda meydana gelen en ufak bir değişiklik ilacın kandaki konsantrasyonuna yansır. Dolayısıyla kandaki ilaç konsantrasyonunun belirli zaman aralıklarında ölçülmesiyle elde edilen kan konsantrasyonu-zaman eğrisi;

- Yanıt farklılıklarının nedenlerinin saptanması bakımından önemlidir,
- İlacın şiddeti ve etki süresi hakkında bilgi verir,
- Uygulama yapılan hedef türün ilaçtan ne kadar yararlandığını yani biyoyararlanımını gösterir (Chereson ve Banakar 1999).

İV yolla verilen ilaçların biyoyararlanımları %100 dür. Uygulama yolu olarak İV dışındaki yollardan herhangi birisi ile verilen bir ilacın absorpsiyonu ile ilgili iki önemli parametre; absorpsiyon derecesi/oranı ve absorpsiyon hızıdır. Belirtilen bu iki parametre o ilacın “Biyoyararlanımını” belirler. (Kayaalp 2001; Çelik ve Birdane 2015) Biyoyararlanım incelemelerinde ilacın absorpsiyon derecesi/oranı ve absorpsiyon hızının plazma konsantrasyon- zaman eğrisine yansımaları temsil eden 3 parametre üzerinden biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlilik değerlendirilir (Sarıca ve Liman 2008, Şahin 2012). Bu parametreler;

1. C_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonu (Peak Concentration))

İlacın uygulanmasından sonra sistemik dolaşımdaki en yüksek ilaç konsantrasyonunu ifade eder. Farmakolojik etkinin şiddeti ile bağlantı gösterir. Genellikle $\mu\text{g/ml}$ ya da birim/ml olarak ifade edilir. Sistemik dolaşımdaki maksimum ilaç konsantrasyonu (C_{max}), ilacın uygulama sonrası absorpsiyonunun tamamlanması ile artar. Buna benzer şekilde absorpsiyon hızının artması da maksimum ilaç konsantrasyonunu artırır. İlaç sistemik dolaşıma ulaştığında eliminasyon da başlar. İlaç uygulamayı takiben sistemik dolaşıma geçtiğinde ilacın dağılım, biyotransformasyon veya atılım ile dolaşımdan emilimi denge halindedir. Bu nedenle ilaç serum konsantrasyonu- zaman eğrisi doruk noktaya çıkmış kabul edilir. Bir ilacın biyoyararlanımı değerlendirilirken ilacın maksimum serum konsantrasyonunun tek başına değerlendirilmesi dağılım ve eliminasyon bozukluklarında hatalı sonuçlar verebilir (Chereson ve Banakara 1999; Sarıca ve Liman 2008).

2. t_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Zamanı)

İlacın uygulanmasından sonra, sistemik dolaşımdaki ilaç konsantrasyonunun maksimum konsantrasyona ulaşmasına kadar geçen zamandır. t_{max} ile maksimum konsantrasyona ulaşma süresi ve biyolojik yanıtın başlama süresi korelasyon gösterir. Hızlı etki göstermesi beklenen ilaçlar için önemlidir. Birimi saat olarak ifade edilir (Chereson ve Banakara 1999; Kayaalp 2001)

3. AUC (Eğri Altında Kalan Alan (Area Under Curve));

Uygulama sonrasında ilacın sistemik dolaşımdaki miktarının belirli zaman aralıklarında ölçülmesiyle elde edilen kan konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan (AUC), absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarını gösterir. Birimi $\mu\text{g/ml}$ saat olarak ifade edilir. (Chereson ve Banakara 1999; Kayaalp 2001; Şahin 2012). İlacın IV olarak direkt sistemik dolaşıma verildiği durumlarda, biyoyararlanımının %100 olduğu kabul edilir (Kayaalp 1994; EMA 2011a).

Vücutta ilaçtan yararlanılması istenen kısım ilacın etki yeri olan organ ve dokulardır. Biyoyararlanım mutlak ve bağıl olmak üzere iki kısımda incelenebilir:

a) Mutlak Biyoyararlanım; İlacın aynı molar miktarının intravenöz verilmesi ile ölçülen biyoyararlanımının, test edilen formdaki biyoyararlanımına oranıdır (Kayaalp 2001; Uçar 2009).

b) Bağıl Biyoyararlanım; İntravenöz kullanım dışında en yüksek biyoyararlanım elde edilen yoldan veya aynı yoldan verilen, fakat daha yüksek biyoyararlanım sağlayan bir farmasötik şekille biyoyararlanımların kıyaslanması ile bulunan biyoyararlanımdır (Chereson ve Banakar 1999; Uçar 2009).

İntra venöz olarak uygulanmış bir ilaç aynı dozda, fakat farklı bir uygulama yolu ile uygulandığında eğer dozun tamamı sistemik dolaşıma geçiyorsa ve klirens sabitse, alan da aynı olmalıdır. Oysa intra venöz uygulama dışındaki uygulama yollarında ilk geçiş etkisi gibi sistemik dolaşıma geçmeden önce uğrayabileceği kayıplar nedeniyle AUC genellikle intra venöz uygulamaya oranla küçük olur. Böylece AUC değerlerinin karşılaştırarak ilaçların biyoyararlanım oranlarını saptamak mümkündür.

Oral yol ile verilen bir ilacın mutlak biyoyararlanımı şöyle hesaplanır;

$$F(\text{Biyoyararlanım}) = \frac{AUC_{per\ os} \times Doz_{iv}}{AUC_{iv} \times Doz_{per\ os}}$$

Bazı durumlarda intra venöz uygulama ile karşılaştırma imkanı bulunmayabilir veya yürütülen çalışmanın amacı açısından buna gerek görülmeyebilir, bu tip durumlarda bağıl biyoyararlanım saptanır. Bağıl biyoyararlanım hesaplanmasında referans yol olarak olarak biyoyararlanımı en yüksek olduğu bilinen bir veriliş yolu alınır (Kayaalp 1994).

2.2.1. Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler;

Hastaya ve ilaca bağlı olmak üzere iki ana grup altında biyoyararlanımı etkileyen faktörler incelenebilir (Tablo 2-10) (Chereson ve Banakar 1999; Çelik ve Birdane 2015). İlacın farmakokinetik özelliklerine ek olarak ilacın üretilmesinde kullanılan etkin maddeden, ilacın üretimini tamamlanmasına kadar geçen süreçteki tüm faktörler biyoyararlanımı etkileyebilir. Bu nedenle etkin maddenin temin edildiği kaynak, stabilitesi, fizikokimyasal özellikleri ve farmasötik şeklin üretilmesi sırasında kullanılan yardımcı maddeler ve üretim teknikleri de biyoyararlanımı etkileyebilir. Biyoyararlanımdaki bu değişimler bazen ciddi terapötik sonuçlara yol açabilirler.

Biyoyararlanım üzerinde etki eden hastaya bağlı faktörler ise fizyolojik veya patolojik nedenlidir. İlaçların fiziksel olarak etkileşimde bulunabileceği mide-bağırsak gibi vücut bölümlerinin pH, motilite, salgı, boşalma süresi gibi fizyolojik özellikleri veya patolojik nedenlerle bu fonksiyonların değişmesi de biyoyararlanımı etkilemektedir (Kayaalp 1994a; Chereson ve Banakar 1999).

İlaç ve hasta ile ilgili faktörlerden en önemlileri Tablo 2-10'da açıklanmıştır.

Tablo 2-10 Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler.

1. İlaç ve Mustahzar İle İlgili Faktörler	
<ul style="list-style-type: none"> • Veriliş Yolu ve Farmasötik Şekil • Hammadde Kaynağı • Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü • Etkin Maddenin Kristal Şekli • Etkin Maddenin İyonizasyon Durumu 	<ul style="list-style-type: none"> • Etkin Maddenin Farmakokinetik Özellikleri • Besinler ve Alınan Diğer İlaçlar İle Etkileşim • Formulasyondaki Yardımcı Maddeler • İlacın Depolanması, Ambalaj Şekli ve Formülasyonun Dissolusyon Üzerine Etkisi

2. Hastaya Bağlı Faktörler

- Midenin Boşalma Hızı
 - Bağırsak Motilitesi
 - Mide-Bağırsak ve Karaciğer Kan Akımı
 - Mide-Bağırsak Sistemi pH'sı
 - Farmakogenetik Faktörler
 - Hastalıklar (Karaciğer ve Böbrek Hastalıkları, vs)
 - Bireysel Farklılıklar
-

2.2.1.1. İlaç ve Müstahzar İle İlgili Faktörler;

a) Veriliş Yolu ve Farmasötik Şekil,

İlaçların biyoyaralanımları veriliş yolu ve dozaj şekli ile yakından ilgilidir. Etkin maddenin IV gibi direkt sistemik dolaşıma uygulanmadığı durumlarda sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarında bir kayıp olabilir. Bazı ilaçlarda bu kaybı engelleyerek biyoyaralanımı yükseltmek amacıyla parenteral, sublingual veya rektal yoldan uygulanırlar. Örneğin morfin, eritromisin, aspirin, penisilin G gibi ilaçların oral yolla kullanımında eliminasyon çok fazla olduğu için bu etken maddeler oral yolla kullanılmazlar. Buna ek olarak, absorpsiyonun başlayabilmesi için dozaj şeklinin önce dağılması ve çözünmesi gerektiğinden biyoyaralanımda dozaj şeklinin dezentegrasyon ve dissolüsyon özelliklerinin de önemi vardır (Rowland ve Tozer 1995).

b) Hammadde Kaynağı;

Kimyasal maddelerin fiziksel veya kimyasal özellikleri, elde edilme yöntemleri, saflık ve kalite gibi kriterlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. İster etkin madde, ister müstahzarın bileşiminde bulunan yardımcı maddelerin farklı kaynaklardan sağlanması nedeniyle ortaya çıkabilen kalite farklılıkları biyoyaralanım üzerinde önemli problemler yaratabilmektedir (Sarica ve Lima 2007; Çelik ve Birdane 2015).

c) Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü;

İlaçların üretiminde kullanılan etkin maddenin partikül çapındaki değişiklikler dissolüsyon ve dolayısıyla absorpsiyon hızını değiştirebilir. İlaç molekülü ne kadar küçükse o kadar hızlı emilir. Partiküller küçüldükçe yüzey alanı artacağı için çözünme hızı da artar. Aynı durum aksi içinde sözkonusudur. Midenin asit ortamında parçalanarak etkisiz hale gelen ilaçlar ufak çaplı şekillerde verildiklerinde midede parçalanacakları için bu ilaçlarda partikül büyüklüğü önemlidir ve bu durumda biyoyararlanım daha az olabilir (Duncan ve ark 1962; Chereson ve Banakar 1999).

d) Etkin Maddenin Kristal Şekli;

Kimyasal bakımdan farklılık göstermeyen, fakat kristal yapısı olarak birden fazla şekli bulunan (polimorf) bir etkin maddenin sudaki, buna bağlı olarak mide bağırsak sistemindeki çözünürlüğü, kristal yapısına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bunun yanında bazı ilaçlar hem amorf hem de kristalize şekilde bulunabilir. Kristal şekillere nazaran amorf şekiller daha iyi çözünebilmektedirler. Bu nedenle aynı etken maddeye ait farklı bir kristal şeklin veya stabil olmayan bir kristal şeklin kullanılması biyoyararlanımı etkileyebilir (Mullins ve Macek 1960; Kayaalp 2001).

e) Etkin Madde İle Kompleks Oluşması;

Oral yolla alınan bir ilacın gastrointestinal kanalda kompleks oluşturması emilim miktarı ve hızını azaltır. Örneğin incebağırsaklarda bulunan safra tuzları neomisin ve kanamisin gibi bazı aminoglikozitler de dahil olmak üzere geri dönüşümsüz kompleksler oluşturabilir (Faloon ve ark 1966). Tetrasiklin türevlerinin polivalan katyonlarla (örn; alüminyum, kalsiyum, magnezyum içeren antasitler, süt ve süt ürünleri, demir içeren preparatlar) suda çözünmeyen kompleksler oluşturması gibi etkin maddenin besinler veya diğer ilaçlarla etkileşimi sonucu absorpsiyon, dolayısıyla biyoyararlanımları azalabilir. Bazı durumlarda ise suda zor çözündükleri için biyoyararlanım problemi olan ilaçların biyoyararlanımları, diğer ilaçlar veya maddelerle kompleks haline getirilerek artırılabilir. Örn; oral yolla alınan digoksinin biyoyararlanımı hidrokinon ile,

ergotamin tartaratin biyoyararlanımının kafeinle artırılması gibi (Oosterhuis ve Jonkman 1993).

f) Etkin Maddenin İyonizasyon Derecesi;

İlaçların su veya yağ içerisindeki çözünürlüklerini etkileyen faktörlerden birisi de ilacın iyonizasyon oranıdır. Ortam asitleştiği ölçüde zayıf asidik maddelerin iyonize olmayan kısımlarının oranı artar absorpsiyonları kolaylaşır. Zayıf bazik maddelerin ise iyonlaşmaları artar ve absorpsiyon hızları düşer. Ortam alkalileştiğinde ise, zayıf asidik maddelerin iyonlaşmaları teşvik edilir ve emilme hızları düşerken, zayıf bazik maddelerin iyonize olmayan kısımlarının oranı artıp, emilmeleri kolaylaşır . Ortamın pH'sındaki çok küçük değişimler bile bazı ilaçların biyoyararlanımlarını etkileyebilir (Ristchel ve Denson 1991; Sarıca ve Lima 2007).

g) Etkin Maddenin Farmakokinetik Özellikleri;

İlaçların oral uygulama sonrasında karaciğer ve mide bağırsak sisteminden geçişleri esnasında inaktive edilmelerine ilk geçiş etkisi denir. İlk geçiş etkisi sırasında inaktivasyonun yüksek olması, ilacın sistemik dolaşıma geçen miktarının ve bu nedenle biyoyararlanımının etkilenmesine neden olabilir (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001).

h) Besinlerin Biyoyararlanıma Etkisi;

Bağırsakların motilitesini etkileyebilen sıvı ve besinler ilaçların absorpsiyon hızını ve absorpsiyon oranını değiştirebilirler. Örneğin, yağlı besinler ile birlikte alınan griseofulvinin absorpsiyon miktarı artmaktadır. Yine benzer şekilde karaciğerin kan akımını arttıran besinler nedeni ile büyük kısmı doyumluğa ulaşan karaciğer enzimlerinin etkinliği zayıflamakta ve propranolol gibi hepatik ilk geçiş eliminasyonu doyurulabilir olan ilaçların biyoyararlanımları yükselebilmektedir. Besinlerin biyoyararlanıma olan bir diğer etki şekli ise besin maddelerinin biyotransformasyonunda görevli bazı enzimlerin ilaçların metabolizmasında da görevli olmasıdır. Besin maddeleri ve ilaçlar birlikte alındıkları durumlarda enzimlerin doyumluğa ulaşması nedeni ile ilaçlar daha düşük oranda metabolize olur ve biyoyararlanım etkilenebilir. Besinlerin bazı

ilaçların emilimi üzerine etkileri Tablo 2-11'de gösterilmiştir (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001).

Tablo 2-11 Besinlerin İlaç Emilimine Etkisi

Emilimi Azalanlar	Emilimi Gecikenler	Emili Artanlar
Ampisilin	Asetaminofen	Klorotiazide
Aspirin	Aspirin	Diazepam
Atenolol	Sefalosporinler	Griseofulvin
Kaptopril	Diklofenak	Hidralazine
Eritromisin	Digoksin	Labetalol
Etanol	Furosemide	Metoprolol
Hidroklorothiazid	Nitrofurantoin	Nitrofurantoin
Penisilinler	Sulfadiazine	Propranolol
Tetrasiklinler	Sulfisoksazole	Riboflavin

i) Formülasyondaki Yardımcı Maddeler ile Etkileşme;

Farmasötik teknolojinin gereği olarak ürünün yapımı sırasında katı farmasötik şekillere sokulurken farklı yardımcı maddeler kullanılır. Kullanım amacına göre isimlendirilen yardımcı madde türlerinin başlıcaları: dolgu maddeleri (dilüentler, "filler"), kaydırıcılar (lubrikanlar) ve kaplama (coating) maddeleridir. İlaç üretimi esnasında kullanılan bu ve bu tip yardımcı maddeler etkin maddenin dezentegrasyon ve dissolüsyon hızını değiştirebilirler (Sarıca ve Lima 2007; Çelik ve Birdane 2015).

j) İlacın Depolanması, Ambalaj Şekli ve Formülasyonunun Dissolüsyon Üzerine Etkileri,

İlaçların üretiminden tedavide kullanılacağı hastaya uygulanacağı ana kadar geçen süre depolama dönemi olarak adlandırılmaktadır. Bu dönemde farmasötik şeklin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler,

dezentegrasyon ve dissolüsyon hızını değiştirebilirler. Ambalaj materyali, formülasyon, ortamın ve ilacın nem oranı gibi başlıca faktörler sayılabilir (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001).

Laboratuvar ortamında yapılacak eskime (aging) denemeleri ile farmasötik şekilde meydana gelebilecek değişimler incelenebilir. İlacın depolandığı ortamın nem oranı tabletlerin nem oranını değiştirebilir. Ayrıca üretim aşamalarında diluent olarak kalsiyum fosfat içeren tabletler nem oranının düşük olduğu ortamlarda sertleşmezler (Kayaalp 1994).

İlaç ürünlerinin kullanılabilirlik süreleri sınırlıdır. Bu sürelerin belirlenmesinde sadece depolanma sürecinde etkin maddenin kimyasal yapısında ve de intrinsik etkinliğinde şekillenebilecek değişimlere ek olarak dezentegrasyon ve dissolüsyonda meydana gelen değişimler de dikkate alınmalıdır. İlacın kullanılabilirlik süresinin belirlenmesinde söz konusu bozulmaların ve değişimlerin özellikle hızı önemlidir (Kayaalp 2001).

2.2.1.2. Hastaya Bağlı Faktörler;

a) Midenin Boşalma Hızı;

İlaçların absorpsiyonu üzerinde midenin boşalma hızında etkisi bulunmaktadır. Midenin boşalma hızında artış şekillenmesi ince bağırsaktan iyi emilen ilaçların absorpsiyon oranını ve absorpsiyon hızını artırır. Yine asit hidrolizi sonucu mide de parçalanan ilaçlar ise daha yüksek oranda emilirler. Kişiden kişiye değişiklik gösterebilen mide boşalma hızı bu nedenle ilaçların biyoyararlanımında önemlidir. Bireysel farklılıklar dışında ilaçlar, hastalıklar ve besinler midenin boşalma hızını değiştirebilir (Ork ve ark 1994; Çelik ve Birdane 2015).

b) Bağırsak Motilitesi;

Bağırsak motilitesinde meydana gelen azalmalar ilaçların bağırsaklarda geçiş dolayısı ile kalış sürelerini uzatır. Bağırsaklarda çözünmeleri az veya sınırlı olan bazı ilaçların bağırsakta uzun süre kalmaları, çözünürlüklerini artırarak yüksek oranda emilmelerini sağlar. Örneğin nitrofurantoin, propantelin gibi bağırsak motilitesini yavaşlatan bir ilaç ile birlikte verildiğinde daha fazla emilir (Rowland ve Tozer 1995).

c) Gastrointestinal Kanalın Perfüzyonu;

Pasif diffüzyon ile emilen lipofilik ilaçlar için mide bağırsak sistemindeki kan akımı önemlidir. Mide- bağırsak sistemindeki kan akımının hızlanması lipofilik ilaçların emilim hızını artırabilir (Chereson ve Banakar 1999).

d) Gastrointestinal Sistemin pH'sı

İlacın absorbe edildiği ortamın pH'ında meydana gelen değişiklikler iyonizasyon oranının, dolayısıyla lipofilitiyi değiştirerek emilimi etkileyebilir. Bu faktör ilaçların besinlerle ve sindirim sistemi pH'sını değiştiren içecekler veya diğer ilaçlarla birlikte alınmaları sırasında rol oynar. Diğer taraftan mide-bağırsak sistemi pH'sının değişmesi, mide asidine duyarlı ilaçların da emilimini değiştirir . Örneğin Penisilin G için pH 1'de yıkılma yarı ömrü 2 dakikadan az iken pH 2'de ise 9 dakikaya kadar ulaşmaktadır (Gibaldi 1981; Çelik ve Birdane 2015).

e) Bireysel Farklılıklar

İlaçların biyotransformasyonunun her bir basamağında görev yapan enzimler küçük bir genetik değişimde bile ilacın etkisinde bireyler arası değişimlere neden olabilirler (Gibaldi 1981).

2.2.2. Biyoyararlanımın Saptanması;

İlaçların biyoyararlanımları *in vitro* ve *in vivo* denemeler ile belirlenebilir (Kayaalp 1999; EMA 2011a).

2.2.2.1. *In vitro* Denemeler;

In vitro denemeler biyoyararlanım çalışmalarında etkin olarak kullanılan testlerden bir tanesidir. *In vitro* testlerin yalnız katı farmasötik şekillerde uygulanabilmesi ve aynı sonucu veren iki farklı müstahzarın klinik denemelerinde her zaman benzer sonuç vermemesi nedeniyle *in vitro* deneylerin kısıtlı bir öngörülmesi vardır. Bu olumsuzluklarının yanında *in vitro* testlerin daha düşük maliyetli olması , kısa zamanda ve basit teknikler ile sonuç vermesi gibi ekonomik ve pratik önemleri vardır. *In vitro* testler gerçekte biyoyararlanımın bir göstergesini oluşturabilirler (Kayaalp 2001).

Çeşitli ülkelerin farmakopelerinde veya yarı resmi ilaç formüllerlerinde kabul edilmiş bulunan başlıca iki önemli *in-vitro* test vardır;

a) Dezentegrasyon (Dağılma) Testi;

Bu test çiğneme ve yavaş salıveren tabletler dışında kalan tabletler için uygulanan bir testtir. İlgili monograflarda her tablet tipi için uygun dezentegrasyon testi ve dezentegrasyon için gerekli süre belirtilmiştir (Ayanoğlu 1981).

b) Dissolüsyon (Çözünme) Testi;

Katı farmasötik şeklindeki ilacın, pH 1 ile 8 arasında hazırlanan üç farklı tampon solusyon içerisinde ve belirli deney koşulları altında (örn; 37 °C) çözünme hızı saptanır. Bu testin sonucunda genellikle, ilacın farmasötik şekil içinde mevcut miktarının % 50'sinin çözünmesi için gereken süre değerlendirilir (İskit 2014).

İlaç araştırmalarında dissolüsyon testi başlıca dört amaçla kullanılmaktadır (Kayaalp 2001);

- Yeni ilacın farmasötik geliştirme programı çerçevesinde klinik denemelerde kullanılacak en uygun formulasyonunu belirlenmesinde,
- Farmasötik üretim sırasında farklı şarjların üretim kontrollerinin yapılması ve farklı şarjlar arasında kalite kontrolün yapılması,
- *İn vivo* biyoeşdeğerlik çalışmaları yerine referans ürün ile seçilmiş ilaçların farmasötik ürünlerinin karşılaştırılma çalışmalarının yapılması,
- *İn vivo* biyoeşdeğerlilik çalışmalarından önce orjinal ve jenerik ürünlerin biyoyararlanımlarının ön incelemelerinin karşılaştırılmalı olarak yapılması.

2.2.3. Klinik Denemeler;

Klinik denemeler yürütülürken “İyi Laboratuar Pratiği “ (GLP) ve “İyi Klinik Pratiği” (GCP) kurallarına uyulmasına dikkat edilmelidir. Planlanan klinik denemelerde üç farklı hedefe yönelik çalışma yürütülebilmektedir. Bunlar çalışılması planlanan ilacın iki farklı farmasötik şeklinin karşılaştırılması, aynı etken maddenin farklı hayvan türleri üzerindeki biyoyararlanımı yada daha önce biyoyararlanımı ayrıntılı olarak saptanmış standart bir tıbbi ürün ile bir başka tıbbi ürünün karşılaştırılmasıdır. Planlanan karşılaştırmalarda rastgele çapraz (random crossover) inceleme yöntemine göre çalışmanın yapılması tercih edilmelidir. Bu amaçla çalışmada kullanılacak deneklerin rastgele seçilen

yarısına incelenmesi planlanan ilaç ve deneklerin kalan kısmına ise standart ilaç ya da çözelti günün aynı zamanında verilir. İlaç uygulamaları sırasında açlık ve tokluk durumlarının göz önünde bulundurulmasına ve deneklerin tümüne aynı anda ilaç verilmesine dikkat edilmelidir. Deneklere daha önceki uygulamalarda almadıkları ilaçlar her deneğe günün aynı zamanında verilir (EMA 2011a). Klinik denemelerde biyoyaralanım aşağıda belirtilen iki parametreye göre değerlendirilir.

2.2.3.1. Plazma Konsantrasyon Profiline Belirlenmesi;

Çalışması planlanan preparat hasta veya sağlam hayvanlara uygulanır, ilaç uygulamasından sonra belirli aralıklarla kan örnekleri alınarak bu numunelerdeki ilaç konsantrasyonu ölçülür ve ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi çizilir. Tek doz ilaç uygulamalarından sonra numune alınır, kural olarak o ilacın yarılanma ömrünün 5-10 katına kadar devam edilmelidir (EMA 2011a).

Çalışmada incelenen iki müstahzarın C_{max} (Maksimum plazma konsantrasyonu) ve t_{max} (Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi) değerleri eşit ise, bu iki müstahzar emilim hızları bakımından eşdeğer sayılır. Uyku ilaçları ve aneljezik ilaçlar gibi bazı ilaçlarda emilim hızları yönünden eşdeğer olmak özellikle önemlidir. Fakat etkin ilaç konsantrasyonuna ulaşmak için yinelenen verilişlere ihtiyaç duyan ve uzun süreli tedavilerde kullanılan ilaçlar için, emilim hızları bakımından eşdeğer olmaları fazla önemli değildir. Eğer iki müstahzarın C_{max} ve t_{max} parametreleri aynı değil, fakat plazma konsantrasyon eğrilerinin şekli farklı olmakla beraber AUC (Eğri altında kalan) alan eşit ise bunların biyoyaralanımları sadece absorpsiyon derecesi bakımından eşdeğerdir; uzun süreli tedavilerde tekrarlanarak verilen ilaçların bu bakımdan eşdeğer olması yeterli olarak kabul edilebilir. Bu ilaçların emilim miktarlarındaki farklılık bazen tehlikeli zehirlenmelere yol açabilirken emilim hızındaki farklılık ise önemli kabul edilmez. İdeal durum, karşılaştırılan müstahzarların C_{max} , t_{max} ve AUC değerlerinin de birbirine aşağı yukarı eşit olmasıdır. Bu durumda her iki ilacın konsantrasyon zaman eğrisi birbiri üzerine biner (süperimpozisyon) (Kayaalp 1994; Kayaalp 2001).

2.2.3.2. İdrarda Kümülatif İlaç Miktarının Ölçülmesi;

Bu çalışma şeklinde karşılaştırılması yapılacak müstahzarların uygulama sonrası idrar ile atılan ilaç miktarlarının karşılaştırılması tekniğine dayanmaktadır. Bu amaçla ilaç uygulaması sonrasında hayvanlardan belirli aralıklarla idrar örnekleri toplanarak idrarla atılan ilacın kümülatif miktarının zamana göre değişim grafiği çizilir. Karşılaştırılan her iki

ilaca ait maksimum idrar konsantrasyonunda aynı değere ulaşıyorsa, her iki ilaç aynı derecede absorbe ediliyor denilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus, sadece idrar ile değişime uğramadan atılan ilaç miktarı değil aynı zamanda metabolitlerindeki miktar tayinlerinin yapılarak çalışmadaki hesaplamalara dahil edilmesidir (Chereson ve Banakar 1999). Fakat bazı durumlarda karşılaştırma sadece idrardaki değişmemiş ilaç miktarı üzerinden de yapılabilir (Kayaalp 1994; Kayaalp 2001).

Bu yöntemlere ek olarak replikatif çaprazlama (replicate design), stabil izotop tekniği ve ilave denek yöntemi (add-on subject design) biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılmaktadır (Blume ve Midha 1993).

2.3. Biyoeşdeğerlik;

Biyoeşdeğerlik son yıllarda ilaç endüstrisinin gelişimine ve ilaç üreten firma sayısındaki artışa bağlı olarak önem kazanan konulardan bir tanesidir. Genel tanımı ile biyoeşdeğerlik; Farmasötik eşdeğer olan iki müstahzarın (biri test, diğeri referans), aynı molar dozda verilmesinden sonra biyoyararlanımlarının (hız ve derece) ve böylece etkilerinin hem etkinlik hem güvenlik bakımından esas olarak aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasıdır (Birkett 2003; Uçar 2009).

Biyoeşdeğerliliğin bilim insanları nazarında ve ekonomik anlamda bu kadar önem kazanması en iyi şekilde tarihsel gelişimi ile anlatılabilir, anlatılmaktadır,

2.3.1. Biyoeşdeğerliğin Tarihçesi;

FDA ilk olarak 1980 yılında terapötik eşdeğer olarak kabul ettiği ilaçların bir listesini yayınlamasına rağmen jenerik ilaçlar 1984 yılına kadar ABD’de çok fazla ilgi görmemiştir. Bunun nedeni eczacıya hekimin yazdığı ilacın yerine jeneriğini verme hakkı tanımayan “Antisübtitüsyon” yasaları idi. Fakat ilerleyen yıllar da yaş ortalamasındaki ve emekli sayısındaki artış ilaç kullanım miktarını artırmış ve bunun sonucunda sağlık sigortaları ilaç giderleri için büyük bütçeler ayırmak zorunda kalmıştır. Zaman içinde ilaç giderlerinde meydana gelen bu artış tasarruf yapılmasını kaçınılmaz kılmıştır. Yine benzer şekilde özel sektörde sağlık giderleri içinde ilaca ayrılan payın büyüklüğünü farketmiş ve subtitüsyon yasalarını desteklemiştir. Örneğin General Motors ve Ford 1988 yılında bir önceki yıla oranla ilaç giderlerine %20 fazla bütçe ayırdıklarını belirtmişlerdir. Tüm bu gelişmelerin sonucunda ABD’de sağlık sigortaları ve özel sektör tarafından jenerik ilaç uygulamaları desteklenmiştir (Kanzık 1993).

Sağlık sigortaları ve özel sektörden gelen taleplerin sonucu olarak 1984 yılında Amerikan Kongresi tarafından “Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act” olarak bilinen yasa çıkarılmış ve patentli ilaçların jenerik kopyalarına ruhsat verme izni tanınmıştır. Bu yasa ile patent süresi bitmiş, çok kullanılan pek çok ilacın jenerik eşdeğerlerinin pazara girmesi sağlanmış ve bu tarihten sonra ABD’de hızlı bir artış ile iki yıl içerisinde 1000 den fazla jenerik ilaç ruhsat almıştır (Nightingale and Morrison 1987).

FDA tarafından 1980 yılında yayımlanan ve Onaylanmış İlaç Ürünleri (Turuncu Kitap, Orange Book) adındaki kitap 1991 yılına kadar 11 kez basılmıştır. Onaylanmış İlaç Ürünleri isimli kitaptaki 6000 ilacın %80’inden fazlası terapötik eşdeğer olarak saptanmıştır. FDA sadece bu kitapta terapötik eşdeğer olarak yer alan ilaçlar için substitüsyon izni vermektedir. Bu uygulama ile ABD’de sadece 1988 yılında ilaç giderlerinden elde edilen tasarruf miktarı 2 milyar \$ olmuştur (Williams 1986). İlerleyen yıllarda bu rakam katlanarak artmıştır. Sadece 2014 yılında Amerikada sağlık sisteminin jenerik ilaç kullanımı nedeni ile elde ettiği tasarruf miktarı 254 milyar \$ dolara ulaşırken 2005 – 2014 yılları arasındaki tasarruf miktarı ise 1,68 trilyon \$ olarak hesaplanmıştır (GPhA 2015).

Biyoeşdeğerlik çalışmaları kalite, güvenlik ve ekonomi alanlarındaki faydaları nedeniyle pek çok kesim tarafından desteklenmesine rağmen, kimi çevreler tarafından ise eleştirilmektedir.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarına karşı yapılan eleştirilerden ilki, orijinal ilaç yerine jenerik ilaç kullanımına izin verilmesi ile hekimin reçete yazma – tedaviye istediği ilaç ile devam etme özgürlüğünün kısıtlanmasıdır (Hakeri 2007; Şahin 2012).

Biyoeşdeğerlik çalışmalarına hekimin ilaç seçme özgürlüğünün kısıtlanması eleştirisinin yanından, jenerik ilaçların her zaman orijinal ilaç kadar başarılı olmadıklarına dair eleştirilerde bilim insanları tarafından dile getirilmiştir. Örneğin meme kanseri tedavisinde kullanılan seçici östrojen reseptör modülatörü olan tamoksifen’in ruhsatlı jeneriklerinin kullanıldığı durumlarda ağrı olgularının tekrarlayabildiği gözlemlenmiştir (Kanzık 1993). Bunun yanında fenilbutazon, kloramfenikol, fenitoin, tolbutamid ve tiroksin içeren ilaçlar içinde bioeşitsizlik ve terapötik eşdeğersizlik ile ilgili benzer raporlar bildirilmiştir. Amerikan Eczacılar Birliği (American Pharmaceutical Association) tarafından 1973 yılında yayımlanan raporda ilaçlar biyoeşitsizlik ve terapötik eşdeğersizlik riskine göre yüksek, ılımlı ve düşük riskli olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Risk gruplarını gösteren tablo 2-12’de gösterilmiştir (Chereseon ve Banakar 1999).

Orjinal ilaç ile jenerik ilacın hem güvenlik hem de etkinlik yönünden aynı olmasını sağlayacak kadar benzer olma kriteri olan Biyoeşdeğerlik ülkemizde yasalar ile kontrol altına alınmıştır. Bu amaçla beşeri ilaç üretiminde ülkemizde 27 Mayıs 1994 tarih ve 21942 sayılı “Farmasötik Müstahzarların Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerliğinin Değerlendirilmesi Hakkındaki Yönetmelik” Resmi gazetede yayınlanmış ve beşeri ilaçların ruhsatlandırılması için biyoyararlanım ve/veya biyoeşdeğerlik çalışmalarının belgelenmesi istenmiştir. Bu yönetmelikte farmasötik bakımdan eşdeğer olan müstahzarların biyoyararlanımlarının farklılık göstermesi durumunda, tedavinin yetersizliği veya toksite artması sonucu sebep olabileceği sakıncaları önlemek için alınacak tedbirler belirtilmiştir (Resmi Gazete 1994).

Beşeri hekimlikte 1994 yılından yayınlanan bu yönetmelik ile biyoeşdeğerlik zorunlu hale gelmişse de veteriner ilaçlarından bu zorunluluk aynı dönemde yasal olarak yürürlüğe girmemiş ve ancak 24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı Resmi gazetede yayınlanan “Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik” ile sağlanmıştır. Yayınlanan bu yönetmelik ile ülkemizde ilk olarak veteriner tıbbi ürünlerde “Biyoeşdeğerlik” kavramından bahsedilmiştir. Bu yönetmeliğe göre jenerik ilaç “Aktif maddeler açısından referans ürünle aynı kalitatif ve kantitatif kompozisyona sahip, aynı farmasötik formda ve biyoeşdeğerliliği uygun biyoyararlanım testleriyle kanıtlanmış” olmak zorundadır (Resmi Gazete 2011).

Tablo 2-12 Biyoeşitsizlik Risk Potansiyeline Sahip İlaçlar

Risk Potansiyeli Düşük Olanlar	Risk Potansiyeli İlmli Olanlar	Risk Poatansiyeli Yüksek Olanlar
<ul style="list-style-type: none"> • Asetaminofen • Kodein • Demir sulfat • Hidroklorotiazid • İzoniazid • Sulfisokzasol 	<ul style="list-style-type: none"> • Amfetamin • Ampisilin • Kloremfenikol • Klorpromazin • Digitoksin • Eritromisin 	<ul style="list-style-type: none"> • Aminofilin • Aspirin <p>(Yüksek dozlarda)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bishidroksikumarin • Digoksin

-
- | | | |
|----------------|--|------------------------------|
| • Efedrin | • Oksitetrasiklin | • Difenilhidantoin |
| • Meproamat | • Penisilin G
(Tamponlu) | (Feniton) |
| • Penisilin VK | • Pentobarbital | • Paraaminosalisilik
Asit |
| | • Fenilbutazon | • Prednisolon |
| | • Fenasetin | • Prednison |
| | • Potasyum
klorid (Katı
dozaj formu) | • Kinidin |
| | • Salisilamid | • Varfarin |
| | • Secobarbital | |
| | • Sulfadiazin | |
| | • Tetrasiklin | |
| | • Tobutamid | |
-

2.3.2. Biyoşdeğerlik İle İlgili Tanımlar;

Kimyasal Eşdeğerlik: Aynı etkin madde veya maddelerin aynı molar miktarının iki ürün içinde eşit olarak bulunması kimyasal eşdeğerliktir (Yılmaz 2008).

Farmakolojik Eşdeğerlik: İki ayrı farmasötik şeklin içindeki kimyasal olarak farklı ancak vücutta aynı etkin molekülleri ortaya çıkaran ve aynı farmakolojik etkiye yol açan moleküllerin katıldığı durumdur (Sarıca ve Liman 2007).

Farmasötik Alternatifler: Her iki ürün aynı etkin maddeyi içeriyor, fakat kimyasal şekil veya dozaj şekli ya da miktar bakımından farklı ise farmasötik alternatiflerdir (Chereson ve Banakar 1999).

Terapötik Eşdeğerlik: Bir müstahzarın, etkinliği ve güvenilirliği daha önce tespit edilmiş bir başka müstahzar ile aynı etkinlik ve güvenilirliği klinik olarak göstermesidir (Toutain ve Kortiz 1997;Uçar 2009).

Uygulamada farmasötik eşdeğer veya farmasötik alternatif olan ilaç ürünleri arasında terapötik eşdeğerliliği kanıtlamanın en uygun yöntemi genellikle biyoeşdeğer olduklarının gösterilmesidir.

Aşağıda belirtilen kriterleri karşılayan ilaçlar FDA tarafından terapötik eşdeğer olarak kabul edilmektedir (Kayaalp 1994; Chereson ve Banakar 1999).

- Her iki üründe etki ve güvenlik yönünden onaylanmışsa,
- İki ürün farmasötik eşdeğerlerse:
 - a) aynı veriliş yolu ve aynı dozaj formunda, eşit miktarda etkin madde içeriyorsa,
 - b) kalite, aralık ve etki gücü bakımından diğer karşılaştırılabilir standartlarla karşılaştırılabilirlerse,
- *In vivo* veya *in vitro* yapılan testler sonucunda iki ürünün biyoeşdeğerliği gösterilmişse,
- Her iki üründe yeterli etiket bilgisine sahipse,
- Her iki ürününde üretiminde “İyi Üretim Uygulamaları”(GMP Good Manufacturing Practice) kuralları gözetilerek üretim yapılmışsa terapötik eşdeğer olarak kabul edilirler.

Klinik Eşdeğerlik: Aynı canlıya aynı dozda veya doz aralığında verildiğinde aynı tedavi edici etkinliği gösteren, ayrıca farmakolojik, kimyasal yada farmasötik eşdeğer ilaç veya ilaç şekilleridir. (Sarıca ve Liman 2007)

Suprabiyoaralanım;

Bazı durumlarda yeni geliştirilen ürünün biyoaralanımı orjinal üründen daha yüksek olabilir. Bu duruma “Suprabiyoaralanım” denir. Böylesi bir durumda yeni ürünün formülasyonu gözden geçirilmeli formülasyon veya uygulama dozu yeniden belirlenmelidir. Yeni ürün için önerilen dozaj orjinal ürününkünden farklı ise , bu durum klinik çalışmalar ile desteklenmelidir. Bu durumdaki ürün orjinal ürün ile terapötik eşdeğer olarak kabul edilmemelidir. Yeni ürün yeni bir ilaç olarak düşünülebilir (Kayaalp 1994; Chereson ve Banakar 1999).

2.3.3. Biyoşdeğerlik İncelemeleri;

Biyoşdeğerliliğin incelenmesinde; aynı etkin maddeyi içeren farklı ilaçların, aynı ilaçların farklı seri üretimlerinin ve daha geniş olarak farklı veriliş yollarının karşılaştırılmasında bilimsel metotlara dayanan teknikler kullanılmaktadır. Biyoşdeğerlilik çalışmalarının amacı, vücuda verildikten sonra incelenen iki farmasötik ürünün plazma konsantrasyonlarının benzerliğini ortaya koymaktır. Biyoşdeğerlilik teknikleri, ürün verilerinin geliştirilmesi süresince benzer formülasyonların karşılaştırılmasında da kullanılabilir (EMA 2011a).

Biyoşdeğerliliğin belirlenmesinde tavsiye edilen ilk metot, deneklerde uygulanan etkin maddenin zamana göre kan konsantrasyonlarının belirlenmesidir. Aynı araştırma koşullarında etkin maddeye ait biyoyaralanımlar arasındaki fark her iki ilaç için kabul edilebilir sınırlar içindeyse, çalışmada kullanılan iki ilaç veya iki verilme yolu arasında biyoşdeğerlilik mevcuttur (EMA 2011a). Zamana göre kan konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için herhangi bir analitik metodun var olmadığı veya mevcut metod duyarlılıklarının ise düşük olduğu durumlarda kullanılacak diğer bir metod ise idrardaki ana ilaç veya metabolitin miktarının dikkate alınarak biyoşdeğerlik kararının verilmesidir (Toutain ve Koritz 1997).

Dünya genelinde ve ülkemizde ilaç endüstrisinde biyoşdeğerlilik çalışması yaptırılmasının nedeni, jenerik ilaçların ruhsatlandırılması için yapılan başvurularda, jenerik ürünün orijinal ürünle biyoşdeğer olduğunu ispatlamaktır. Orijinal ürün ile jenerik ürün arasındaki biyoşdeğerlik yönünden bir kanıtlama ülkemizde beşeri jenerik ürünlerin ruhsatlandırılması için yapılacak başvurularda Sağlık Bakanlığı tarafından 1994 yılında yayınlanan yönetmelikle zorunlu hale getirilmiş, veteriner jenerik ürünlerin ruhsatlandırılması için yapılacak başvurularda ise Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2011 yılında yayımlanan yönetmelik ile veteriner ilaçlarında biyoşdeğerlilik yasal olarak zorunlu kılınmıştır (Resmi Gazete 2011).

Geliştirilen yeni bir ilacın ruhsat başvurusu sırasında biyoşdeğerlik çalışmaları ilacın aşağıda belirtilen formülasyonları arasında karşılaştırma yapmak ve aralarında bağlantı kurmak için gerekir (Kayaalp 2001).

- Erken ve son dönem klinik denemelerde kullanılan formülasyonlar arasında,
- İlacın pazara verilecek formülasyonu ile klinik denemelerde kullanılan formülasyonlar arasında,
- Klinik denemeler ile stabilite çalışmaları sırasında kullanılan formülasyonlar arasında.

2.3.4. Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Gerekliliğinin Saptanması;

- Jenerik olarak tasarlanmış bilinen yeni bir maddeyi içeren ürünler; referans etkinlik ve/veya güvenlik anlamında onaylanmış ürün ise biyoeşdeğerliği de gösterilmelidir (EMA 2011a) .
- Sahada kullanımda olan bir ilacın dozaj veya veriliş yolu özelliklerinde, üretim prosesinde veya bileşiminde bir değişiklik yapıldığında , yeni üretilen ürün için yapılan klinik çalışmalarda orjinal ürüne karşı etkinlik ve/veya güvenlik için biyoeşdeğerliği gösterilmelidir (EMA 2011a). .
- Mevcut biyoyararlanım çalışmaları biyoeşdeğerliğin gösterilmesinde kullanılmıyorsa (yeni ürünün suprabiyoyaralanım göstermesi gibi) veya endikasyon alanı, veriliş yolu, farmasötik form ve/veya aktif madde de değişiklik yapılmış ise jenerik ürün orijinal ürün ile karşılaştırılmalıdır (EMA 2011a).
- Kullanıma sunulacak yeni aktif madde veya maddeleri içeren mustahzarlar için biyoeşdeğerlik çalışmaları yapılır (EMA 2011a) .

Daha önceden ilgili kuruluşlarca onaylanmış bir mustahzara farmasötik olarak eşdeğer olan yeni bir mustahzarın ruhsatlandırılması isteniyorsa aşağıda belirtilen kriterlere göre değerlendirme yapılır.

2.3.4.1. İlacın Farmasötik Şekli ve Veriliş Yolu:

Biyoeşdeğerlik çalışmalarının planlanmasında oral yol ile verilen ilaçlara öncelikle ele alınmalıdır. Bu kapsamda katı farmasötik şekiller ilk sırada yer alırken, oral suspansiyonlar sıralamanın gerisinde, oral solusyonlar ise en geride yer almakta ve genellikle *in-vivo* çalışmalardan muaftır. Katı farmasötik şekilleri takiben biyoeşdeğerlik incelemelerinin gerektiği diğer uygulama yolları sırası ile rektal yol, transdermal yol , paranteral ve lokal yol ile uygulanan ürünlerdir (Resmi Gazete 1994; Kayaalp 2001).

2.3.4.2. Etkin Maddenin Terapötik İndeksinin Genişliği;

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında terapötik indeksi dar olan ilaçlar öncelikli olarak ele alınır. İlaçlar terapötik indeksin genişliği açısından en dar indeksli olan digital glikozidler (indeksi yaklaşık 2) ile en geniş indeksli pensilinler arasında yer alırlar (Resmi Gazete 1994; Kayaalp 2001).

2.3.4.3. Doz-Yanıt Eğrisinin Dikliği;

Genellikle doz-cevap eğrisi dik olan ilaçlara öncelik verilir (Resmi Gazete 1994).

2.3.4.4. Etkin Maddenin Farmakokinetik Özellikleri;

İlacın terapötik doz aralığı içinde presistemik eliminasyonun %70 den fazla olması, çözünürlüğün %0,1 den az olması veya instabilite gibi uygun olmayan fizikokimyasal özelliklerin bulunması, non-lineer (doza bağımlı) kinetik göstermesi, absorpsiyon veya eliminasyon hızının bireyler arasında fazla değişkenlik göstermesi gibi durumlarda, ürünün biyoeşdeğerlik yönünden incelenmesi gerekliliği artar (Resmi Gazete 1994; Kayaalp 2001).

2.3.5. Biyoeşdeğerlik İncelemelerinin Genellikle Gerekemediği Durumlar;

Aşağıdaki şartların bir veya birçoğunu yerine getiren veteriner ilaçlarda biyoeşdeğerlik çalışmaları genellikle gerekmez (EMA 2011a).

- Sadece intra venöz uygulamalar için tasarlanmış ve hedef türlerde kullanılmak üzere onaylanmış bir intra venöz solüsyon ile aynı etkin madde veya terapötik bileşiği içeriyorsa. Fakat farklı taşıyıcı madde/maddeler içeren ve/veya aynı taşıyıcı madde/maddeleri aynı miktarda içermeyen ürünlerden biyoeşdeğerlik çalışmaları istenir,
- İntramüsküler, subkutan veya sistemik etki elde etmek için topikal yolla uygulanan bir solüsyon şeklinde kullanılıyorsa ve hedef türlerde kullanılmak üzere yakın zamanda onaylanmış bir veteriner ürünüyle aynı etken madde/maddeleri ve taşıyıcıları aynı konsantrasyonda içeriyorsa,
- Ürün; hedef türlerde kullanılmak üzere onaylanmış bir veteriner ürün ile aynı konsantrasyonda aktif madde içeren şurup ve benzeri çözünebilir oral solüsyon ise ve aktif madde veya terapötik bileşiğin emilmesini belirgin derecede etkileyebilecek (sorbitol, mannitol gibi) her hangi bir inaktif madde içermiyorsa,

- Biyoyararlanım hedef türlerde gösterilmiş referans ürün ile aynı formülasyona sahipse,
- Ürün BCS (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi) altında sınıflandırılmış ise,
- Ürün inhalasyon uygulama esnasında gaz formunda ise,
- 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,

Biyoeşdeğerlik çalışmalarına ihtiyaç duyulmaz.

2.3.6. Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Yürütülmesi;

Biyoeşdeğerlik çalışması temelde orijinal ve jenerik veya karşılaştırılacak 2 ürün arasındaki eşdeğerliği saptamak için tasarlanmış biyoyararlanım çalışmasıdır. Biyoeşdeğerlik çalışmalarının panlanması ilaç-ilaç veya besin-ilaç gibi farmakokinetik çalışmalarda populasyon farklılıklarını değerlendirmek veya farmakokinetik parametrelerdeki farklılıkları değerlendirmek için kullanılabilir (EMA 2011a).

2.3.7. Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri;

Biyoeşdeğerlik çalışmaları, uygun şartlarda *in vitro* veya *in vivo* olarak yapılır. (EMA 2011a). Yeni ilaç araştırmaları yada inovatörün (araştırması tamamlamış ürün) ruhsatlandırılması sürecinde; klinik denemelerin erken ve son dönemlerinde kullanılan formülasyonlar arasında, klinik denemelerde kullanılan formülasyonlar ile pazarlanacak formülasyonlar arasında ve stabilite çalışmaları ile klinik denemeler arasında kullanılacak formülasyonlar arasında bağlantı kurmak ve karşılaştırma yapabilmek için biyoeşdeğerlik çalışmaları gereklidir (Yılmaz 2008; Şahin 2012).

2.3.7.1. *In vitro* Biyoeşdeğerlik Çalışmaları;

Bu çalışma türü aşağıdaki durumlarda *in-vivo* biyoeşdeğerliğin belirlenmesine katkıda bulunabilir (Chen ve ark 2001; Palermo-Neto ve Righi 2008).

- *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 serileri (batch) arasındaki tutarlılıktan emin olmak istendiğinde, *in-vitro* biyoeşdeğerlik çalışmaları yeterlidir.

2.3.7.2. *In vivo* Biyoeşdeğerlik Çalışmaları;

Bu tür biyoeşdeğerlik testi en doğru, hassas ve tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılmasıyla farmakokinetik ve/veya farmakodinamik çalışma olarak planlanmalı ve yürütülmelidir (Toutain ve Koritz 1997; Chen ve ark 2001; Palermo-Neto ve Righi 2008).

- a) Farmakokinetik çalışma: *in-vivo* testlerde hedef türde etkin madde veya terapötik bileşenin ya da onun metabolit(ler)inin uygun biyolojik sıvı ya da dokudaki konsantrasyonlarının zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanan farmakokinetik verileri üzerinden değerlendirme yapılır.
- b) Farmakodinamik çalışma: Bu yaklaşım uygun fizyolojik materyallerde ilaç konsantrasyonunu belirleyebilecek duyarlı bir analitik metot olmadığında kullanılabilir. Bu testte hedef türlerde zamanın bir fonksiyonu olarak etkin madde veya terapötik bileşiğin ya da metabolit(ler)inin akut farmakolojik etkilerinin uygun şekilde ölçülmesi gereklidir. Bu yaklaşımda gereç ve yöntem doz-cevap ilişkisinin ortaya konması zorunludur ve yerel etkili ürünlerde biyoeşdeğerliğin gösterilmesi için bu en uygun metottur.

2.3.8. Tek Dozlu *in-vivo* Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Tasarımı;

Çalışmada karşılaştırılacak formülasyonların sayısı iki ise, iki periyotlu – iki ardışıklı çapraz geçişli tasarım en tercih edilen tasarımdır. Bu metod ile aynı zamanda bireyler arası farklılıklarda en aza indirilmiş olunur (Cheresson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001). Denemenin birinci periyodu ile ikinci periyodu arasında bekleme süresi olarak etkin madde/maddeler veya metabolit(ler)in yarılanma ömrünün 5-10 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 (EMA 2011a). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak ürünlerin etkin maddesi avermektinler gibi yağ dokusuna afinitesi yüksek bileşikler içeriyorsa, iki çalışma arasındaki temizlenme süresi etkin madde/maddelerin eliminasyon yarılanma ömrünün en az on katı olmalıdır. (Toutain and Kortiz 1997).

Bu deneysel tasarımda referans ürün ve jenerik ilaç denemesi için 2 grup oluşturulur. Hangi gruba hangi ilacın verileceğine rastgele karar verilir. İlk ilaç uygulaması ve örneklerin alınmasından sonra belirlenen bekleme süresi kadar beklenir ve ilk uygulamanın tersi olarak gruplara ilaç uygulaması yapılır. Buna göre ilaç uygulama çizelgesi Tablo 2-13 de gösterilmiştir (FDA 2006a).

Tablo 2-13 İlaç Uygulama Çizelgesi

	1. Grup	2. Grup
1. Periyod	A	B
Arındırma (Wash-Out) süresi		
2. Periyod	B	A

2.3.8.1. Referans Ürün;

Referans ürün seçiminde aynı endikasyon için ilk geliştirilen ilaç tercih edilmelidir. Eğer ilacı ilk geliştiren firmanın ürünü piyasada yok ise ilacı ilk geliştiren firmanın lisansı ile üretilen bir ürün tercih edilmelidir. Referans ürün seçiminde bir diğer önemli nokta ise güncel seriler arasından seçim yapılmasıdır (Toutain ve Koritz 1997).

Aynı etkin 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 (Yılmaz 2008).

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 ürünündeki miktardan $\pm 5\%$ 'ten fazla fark göstermemelidir (EMA 2011a).

2.3.8.2. Referans Uygulama Yolu;

Biyoeşdeğerlik değerlendirilmesinde referans uygulama yolu olarak klinik ve toksikolojik denemelerde kullanılan yol tercih edilmelidir (Yılmaz 2008). Parenteral yol ile

uygulanan enjektabil çözeltiler üzerinde yürütülen biyoeşdeğerlik çalışmalarında, uygulanacak ilacın hacmi-miktarı ve bölgenin yüzey alanı, uygulanan ilacın penetrasyon katsayısı (dokuya yayılma katsayısı), çözelti içindekilerin hareket hızı, ilacın uygulandığı bölgenin kan ve lenf dolaşımı yönünden anatomik yapısı ve pH'sı (özellikle yangılı durumlarda), formülasyonun yağda veya suda çözünürlük durumu, ilacın hazırlanış şekli ve konsantrasyonu, ilacın ve metabolitlerinin proteinlere bağlanma kapasitesi, intraselüler veya extraselüler dağılımı gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (EMA 2011a).

2.3.8.3. Hayvanlar;

Yürütülecek çalışmada ilacın kullanıldığı hedef türler kullanılmalıdır (Chereson ve Banakar 1999; EMA 2011a; Şahin 2012). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak hayvanlar yaş, cinsiyet, ağırlık, ırk, hormon ve beslenme durumu ile verim yönünden bir örnek olmalıdır. Ayrıca cinsiyet ile ürünler arasında etkileşime dair herhangi bir bilgi yoksa çalışmanın bir cinsiyetle sınırlandırılmaması önerilir (Yılmaz 2008; EMA 2011a).

Denek içi değişkenliğe sahip ürünler ile yürütülen biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan istatistiksel metodun yetersizliğine ek olarak az sayıda denek kullanılması gerçekte formülasyonlar arasında var olan farklılığın belirlenmesine engel olabilir (Toutain and Kortiz 1997).

2.3.8.4. Deneme Şartları;

Biyoeşdeğerlik çalışmaları GLP kuralları çerçevesinde yürütülmelidir. Bir biyoeşdeğerlik çalışmasının verimli bir şekilde yürütülmesi için açlık veya tokluk şartları da protokolde belirtilmeli, referans ürünün etiketi açlık veya tokluk durumlarında uygulanmaya bir sınırlama getiriyorsa, bu durum dikkate alınmalıdır (Kayaalp 2001; Yılmaz 2008).

2.3.8.5. Araştırılacak Karakteristikler;

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kan serumu ya da plazma örneklerinin konsantrasyon-zaman eğrilerinden çıkarılan farmakokinetik parametreler analiz edilmelidir (Kayaalp 2001; Yılmaz 2008; Şahin 2012). Ancak bazı durumlarda, etken madde yerine bir metabolitin de ölçümü gerekebilir (Chereson ve Banakar 1999; Şahin 2012). Özellikle metabolitler, etken maddenin net etkinliğine belirgin derecede katkı sağlıyorsa metabolitin de kan konsantrasyonlarını ölçmek gerekir (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001).

2.3.8.6. Doz Seçimi;

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında doz seçimi yapılırken test ürünü için seçilen doz ile referans ürün için seçilen doz aynı olmalıdır. Referans ürün için ilgili kurumlarca onaylanmış birden fazla doz varsa, yürütülen biyoeşdeğerlik çalışmasında belirtilen en yüksek doz kullanılmalıdır (EMA 2011a; Şahin 2012). 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 and Kortiz 1997; Yılmaz 2008).

2.3.8.7. Örnekleme;

Etkin madde ve/veya metabolit(ler)inin kan, serum veya plazma ya da idrardaki konsantrasyonları duyarlı bir analiz yöntemiyle ölçülür (EMA 2011a). 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_{max} 'tan sonra en az üç tercihen beş eliminasyon yarı ömrü kadar bir sürede uygun aralıklarla örnekleme yapılmalıdır (Toutain and Kortiz 1997; Brown ve Ark 2000; EMA 2011a). Etkili bir örnekleme zamanının belirlenmesinde konsantrasyon-zaman eğrisinin biçimi ve benzeri değişikliklerin ayrımı için bir pilot çalışmanın incelenmesi gerekebilmektedir (EMA 2011a).

2.3.8.8. Örneklerin Analizi;

Biyolojik matrixler içerisinde etken maddeyi tespit etmek için uygulanacak analitik metodla güvenilir ve tatmin edici sonuçlar elde etmek için metodun geçerliliği bilimsel bulgular ile kanıtlanmalı ve belgelendirilmelidir (EMA 2011a, Şahin 2012). Metod validasyonu biyolojik matriksler içerisinde (kan, serum, plazma, idrar veya tükürük vb) bir etken maddenin konsantrasyon değişimlerinin belirlenmesi için uygulanan spesifik bir metodun güvenilirliğini ortaya koymaktır (EMA 2011).

EMA tarafından 2011 yılında yayımlanan Veteriner Medikal Ürünlerin Biyoeşdeğerlik Çalışma Rehberi'nde kimyasal analizlerin metod validasyonları için Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ve Japonya'nın da dahil olduğu Veteriner Tıbbi Ürünlerin Tescili için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Üzerine Uluslar Arası İşbirliği (VICH - International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) rehberindeki GL1 prosedürlerini kabul

edilmektedir (EMA 2011a). Uygulanan metod sonucunda elde edilen verilerin bilimsel olarak güvenli olduğunun kabul edilebilmesi için belirli karakteristiikleri karşılması beklenmektedir.

Bu karakteristikler;

- **Konsantrasyon Aralığı ve Doğrusallık (Concentration Range and Linearity);**

Analitik metodun doğrusallığı matematiksel derişimleri belli , belirli bir sıralama ile verilen veya analiz sonuçlarından elde edilen analitin farklı konsantrasyonlarından elde edilir (Ertaş ve Kayalı 2005). Doğrusallığın sağlanması için standart eğri en az 5- 6 konsantrasyondan elde edilen 5-6 nokta içerecek şekilde oluşturulmalıdır (Şahin 2012).

Bir metodun konsantrasyon aralığının belirlenmesinde, yöntemin doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak belirlenmiş en düşük ve en yüksek değerler arasındaki süreçtir (Ertaş ve Kayalı 2005).

- **Saptama Limiti (Limit of Decetion – LOD);**

Analitin analitik bir metod ile tespit edilecek en düşük konsantrasyonudur (Shah ve ark 1992, Ertaş ve Kayalı 2005). Saptama sınırının belirlenmesi kullanılacak metodun aletli ve aletsiz olmasına göre farklılık gösterir. Uygulanan metod enstrümental ise , tespit edilen en düşük konsantrasyonda analit ihtiva eden numune sonuçlarının kör sonuçları ile karşılaştırılması veya diğer bir tanımlama ile sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Sinyal/gürültü oranı genellikle 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir (Ertaş ve Kayalı 2005, Şahin 2012). Saptama limitinin hesaplanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise; kör numunelerin analitik geri zemin yanıtlarının ölçülmesi ve elde edilen değerlerin standart sapmasının 2 veya 3 gibi faktörle çarpılmasıdır (Ertaş ve Kayalı 2005).

- **Kantitasyon (Niceleme) Limiti (Limit of Quantitation – LOQ);**

Analitik bir metotta analitin kesinlik ve uygun doğruluk ile tespit edilebilecek en düşük miktarıdır (Shah ve ark 1992). Analitin hesaplanan yada bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan çözeltilerinde ölçüm yapılır ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Niceleme sınırı genelde varyasyon

katsayısı ile varyasyon katsayısının %15-20'yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda niceleme sınırı, tespit limitinin iki, üç katıdır (Ertaş ve Kayalı 2005, Şahin 2012).

- **Özgüllük (Specificity);**

Analitik bir metodun sadece hedeflenen aktif madde veya metabolitlerini tespit edebilme yeteneğidir (Green 1996).

- **Doğruluk (Accuracy);**

Analitik metodun doğruluğu, metod ile elde edilen ortalama değerlerin gerçek analitin değerine olan yakınlığıdır (Ertaş ve Kayalı 2005). Bir analitik yöntemin doğruluğu yöntem ve gerçek değer tarafından toplanan test sonuçlarına dayanır (Ertaş ve Kayalı 2005). Doğruluk için gerçek değer bir çok farklı yoldan elde edilebilir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır (Ertaş ve Kayalı 2005). İkinci yol ise; doğruluğun bilinen konsantrasyonlara sahip bir örneğin analiziyle kontrol edilmesidir. Doğruluk, analitin matriksten ayrılmasından ve analitik cihaza verilmesinden sonra elde edilecek cevap ile saf bir çözücü içinde çözünmeyen referans materyalin cevabının karşılaştırılmasına bağlıdır (Rodriguez ve ark 1993). Çünkü bu doğruluk örneğin hazırlanışının etkisini ölçer. Elde edilen değer mümkün olduğunca doğruya yakın olmalıdır. Doğruluk her bir konsantrasyon düzeyinin (kör hariç) en az beş kez tayin ile belirlenir. Kabul edilebilir kriter, doğruluk için nominal değerden \pm % 15'ten fazla sapmanın olmamasıdır (Shah ve ark 1992).

- **Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik (Precision and Repeatability);**

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerın tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir (Rodriguez ve ark 1993; Ertaş ve Kayalı 2005).

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır (Ertaş ve Kayalı 2005). Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir (Gardner ve ark 1993).

- **Geri Kazanım (Recovery);**

Analizi yapılan biyolojik matriks'e bilinen bir miktarda katılan analitin, analiz sonucunda elde edilen değerinin standartlar ile karşılaştırılması ile elde edilen orandır. Geri kazanım miktarı analizde kullanılan metodun ekstraksiyon etkinliği ile ilişkilidir. Uygulanan metodun geri kazanım miktarının %100 olması arzu edilse de, analizde kullanılan metodun geri kazanım oranı en az % 50-60 arasında olmalıdır (Shabir 2003; Şahin 2012). Uygulanan metodun geri kazanım oranı belirlenirken 3 farklı konsantrasyonda (en düşük, orta ve en yüksek) hazırlanan örneklerden elde edilen veriler değerlendirilir.

- **Analitin Stabilitesi;**

Biyolojik matriksde bulunan ilacın stabilitesi klinik ve analitik dönemler arasında olası değişimler/kayıplar yönünden test edilmelidir. Belirlenen iki farklı konsantrasyondaki örnekler iki donma-iki erime'ye tabi tutulmalı ve erime-donma etkisinin örneklere olan etkisi saptanmalıdır. Stabilitenin tespiti için kullanılacak örnekler, asıl numuneler ile aynı şartlarda birlikte saklanmalı ve çalışma örnekleri ile birlikte analiz edilmelidir (Shabir 2003;Şahin 2012).

2.3.9. Tek Doz Biyoşdeğerlik Çalışmalarında Veri Analizi;

Yürütülen biyoşdeğerlik çalışmalarının değerlendirilmelerinde ilk hedef, yapılan analizler sonucunda elde edilen orijinal ve jenerik ürüne ait verilerin değerlendirilmesi ile iki ilacın biyoyararlanımları arasındaki farkları ortaya koymak ve bu farkların klinik olarak önemli olup olmadıklarını saptamaktır (EMA 2011a). Yürütülecek tek dozlu biyoşdeğerlik çalışmalarında değerlendirilecek parametreler önceden belirlenmeli ve klinik ve/veya toksikolojik etkilere uygunluğuna dikkat edilmelidir (EMA 2011a). İncelenen iki ürün arasındaki biyoşdeğerliliğin değerlendirilmesinde ilacın biyoyararlanım derecesini gösteren konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) ile kısmen biyoyararlanımın derece ve hızı ile ilaca maruz kalma şiddetine işaret eden doruk konsantrasyonun (C_{max}) karşılaştırılması ile yapılır (Toutain ve Kortiz 1997; EMA 2011a). Diğer bazı çalışmalarda dikkate alınabilen (McKellar ve ark. 1999, Sumano ve ark. 2001) ve kullanılan doruk konsantrasyona ulaşma süresi (t_{max}), ortalama kalış zamanı (MRT), Moment Eğrisi Altındaki Alan (AUMC) gibi parametrelerin de biyoşdeğerliğin belirlenmesinde kullanıldığı bildirilmektedir.

$AUC_{(0-\infty)}$ lineer trapezoidal yöntemle hesaplanmalı ve üç yarılanma ömrü boyunca örneklerin alınması gerekmektedir. Örneklemenin yapılacağı üç yarılanma ömrü AUC değerinin yaklaşık %87,5'ini temsil eder. Eğer eliminasyon fazındaki örnekleme aralıkları yeterli ise logaritmik trapezoidal yöntem veya diğer metotlar da kullanılabilir (Toutain ve Kortiz 1997; Zintzaror ve ark. 2002; EMA 2011a). AUC'nin hesaplanma metodu önceden belirlenmeli ve ekstrapolasyondan tercihen sakınılmalıdır. Ekstrapolere edilen AUC kısmının, toplam AUC'nin %20'sinden daha fazla olduğu bütün durumlarda $AUC_{(0-\infty)}$ 'un kullanılması mümkün değildir. Benzer teknikler Moment Eğrisi Altındaki Alan (AUMC) ve Ortalama Kalış Zamanı (MRT) için de geçerlidir (Zintzaror ve ark 2002, Yılmaz 2008). C_{max} ve t_{max} parametreleri eğer doruk konsantrasyon açıkça belirlenmiş ve doruk bölgesindeki uygun örnekleme zamanları doğru bir biçimde tespit edilmişse anlamlıdır (Zintzaror ve ark 2002, Yılmaz 2008). MRT ise sadece aynı hayvanlarda damar içi (I.V.) uygulama sonrasında MRT belirlenmiş olduğu zaman kullanılabilir (Yılmaz 2008). Plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisinden elde edilen MRT, emilme hızlarındaki farklılıkları belirlemede t_{max} '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 MRT değerleri arasındaki fark, emilme hızlarındaki farklılıkların belirlenmesinde en güçlü parametre olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte eğer eliminasyon yarılanma süresi beş saati aşıyorsa, MRT'deki farklılıklar için %90 güven aralığı biyoeşdeğerlik testinde genellikle çok geniştir (Toutain ve Koritz 1997).

2.3.10. Biyoeşdeğerlik Değerlendirmesinde Kullanılan Önemli Parametreler;

EMA tarafından 2011 yılında yayınlanan “Veteriner Tıbbı Ürünlere Yönelik Biyoeşdeğerlik Çalışma Rehberinde” tek doz biyoeşdeğerlik çalışmaları için $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} , t_{max} değerlerinin belirlenmesini ve biyoeşdeğerlik kararı verilirken $AUC_{(0-t)}$ ve C_{max} değerleri üzerinden değerlendirme yapılmasını belirtmektedir. Yine aynı rehberde farmakokinetik parametrelerin hesaplanmasında non-kompartman modelin kullanılmasını belirtmektedir (EMA 2011a).

2.3.10.1. AUC (Eğri Altında Kalan Alan);

Sıfır (0.) zaman ile sonsuza kadar ekstrapolasyon yapılmış konsantrasyon-zaman eğrisi altın kalan alan olarak tanımlanır. AUC değeri için test ürün/referans ürün oranının % 90 güven aralığının alt ve üst limitleri 0,8 ve 1,25 aralığı içinde olması gerekir (Kayaalp 2001). FDA'nın biyoeşdeğerlik kriterlerine göre logaritmik dönüştürme yapılmamış

değerler için alt ve üst limit 0.8-1.20, logaritmik dönüştürülmüş değerler için alt ve üst limit 0.8-1.25 arasında olabilir (FDA 2006a).

$AUC = AUC_{(0-t_z)} + AUC_{(t_z-\infty)}$ formülü ile hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001)

$AUC_{(0-t_z)}$: Sıfırcı zamandan en son ölçülebilen konsantrasyon zamanına kadar olan konsantrasyon zaman eğrisi altında kalan alan olarak tanımlanır (Kayaalp 2001)

$$AUC_{(0-t_z)} = \sum_{i=1}^{n-1} AUC_{(t_i+t_{i+1})}$$

formülü ile hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001)

$AUC_{(t_i-t_{i+1})}$ hesaplanması;

- Linear trapezoideal kurala göre $AUC_{(t_i-t_{i+1})} = \frac{1}{2} (C_i + C_{i+1})(t_{i+1} - t_i)$ formülü ile ;

-log-linear trapezoideal kurala göre;

$$AUC_{(t_i-t_{i+1})} = \frac{(C_i + C_{i+1})(t_{i+1} - t_i)}{(\ln C_i - \ln C_{i+1})}$$

formülü ile hesaplanır.

$AUC_{(t_z-\infty)} = C_z/\lambda_z$ formülü ile hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999; Kayaalp 2001)

$AUC_{(t_z-\infty)}$ için elde edilen değer $AUC_{(0-\infty)}$ 'nin %20'sinde fazla olmaması gerekir (Kayaalp 2001; EMA 2011a)

$AUC_{extrap\%}$: t_z 'den t_∞ 'a ekstrapolasyon yapılmış konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alanın toplam AUC'deki %si olarak tanımlanır (Kayaalp 2001).

$$AUC_{extrap\%} = \frac{AUC - AUC_{(0-t_z)}}{AUC} \times 100$$

formülü ile hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999)

2.3.10.2. AUMC (Birinci Moment Eğrisi Altındaki Alan):

$AUMC = AUMC_{(0-t_z)} + AUMC_{(t_z-\infty)}$ formülü ile hesaplanır (Kayaalp 2001).

$AUMC_{(0-t_z)}$: Sıfır zamandan en son ölçülebilen konsantrasyon zamanına kadar olan birinci moment eğrisi altında kalan alan olarak tanımlanır (Kayaalp 2001).

$$AUMC_{(0-t_z)} = \sum_{i=1}^{n-1} AUMC_{(t_i+t_{i+1})}$$

formülü ile hesaplanır.

-Lineer trapezoideal kurala göre;

$AUMC_{(t_i-t_{i+1})} = 1/6(t_{i+1}-t_i)[t_{i+1}(C_i+2C_{i+1})+t_i(2C_i+C_{i+1})]$ formülü ile,

-log-lineer trapezoideal kurala göre;

$$k = \frac{\ln C_i - \ln C_{i+1}}{t_{i+1} - t_i}$$

formülü ile hesaplanır.

$AUMC_{(t_z-\infty)}$: En son ölçülebilen konsantrasyon zamanından sonsuza ekstrapolasyon yapılarak hesaplanan birinci moment eğrisi altında kalan olarak tanımlanır.

$$AUMC_{(t_z-\infty)} = \frac{t_z \cdot C_z}{\lambda_z} + \frac{C_z}{(\lambda)^2}$$

formülü ile hesaplanır.

$AUMC_{extrap\%}$: t_z 'den t_∞ 'a ekstrapolasyon yapılmış moment konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın, toplam AUMC'deki %'si olarak tanımlanır.

$$AUMC_{extrap\%} = \frac{AUMC - AUMC_{(0-t_z)}}{AUMC} \times 100$$

formülü ile hesaplanır.

2.3.10.3. C_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonu)

İlaç uygulamasından sonra plazma veya serumda ölçülen maksimum ilaç konsantrasyonudur. Direkt olarak analitik verilerden saptanır. Karşılaştırma yapılırken test ürün/referans ürün oranının %90 güven aralığının alt ve üst limitleri 0,8 ve 1,25 arasında olması gerekir (EMA 2011a).

2.3.10.4. C_z

Kantitasyon limitinin üzerinde ölçülebilen en son konsantrasyon olarak tanımlanır (Cherson ve Banakar 1999, Kayaalp 1999).

2.3.10.5. λ_z (Terminal Hız Sabitesi)

Kantitasyon limiti ve/veya üzerinde ölçülebilen en son konsantrasyon değerinin lineer regresyonunun negatif eğimi olarak tanımlanır ve aşağıdaki formülle hesaplanır (Kayaalp 1999).

$$\lambda_z = [(\sum t_i \cdot \sum \ln C_i) - (n \cdot \sum t_i \cdot \ln C_i)] / [n \cdot \sum t_i^2 - (\sum t_i)^2]$$

2.3.10.6. MAT (Ortalama Emilim Zamanı)

Uygulanan ilacın vücuttaki ortalama emilim zamanı olarak tanımlanır (Chereson ve Banakar 1999, Kayaalp 1999).

$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}$ formülü ile hesaplanır.

2.3.10.7. MRT (Ortalama Kalış Zamanı)

Uygulanan ilacın vücutta kalma süresi olarak tanımlanır.

$MRT = AUMC / AUC$ formülü ile hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999).

2.3.10.8. t_{max} (Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Zamanı)

İlacın uygulama sonrasında maksimum konsantrasyona ulaşma süresi olarak tanımlanır. Direkt olarak analiz verilerinden elde edilir (Kayaalp 2001; EMA 2011a).

2.3.10.9. $t_{1/2}$ (Yarılanma Ömrü)

İlacın yarılanma ömrü olarak tanımlanır.

$t_{1/2} = \ln 2 / k$ $k = 1 / MRT$ olarak hesaplanır (Chereson ve Banakar 1999, Kayaalp 1999).

2.3.11. Biyodeşğerlilik İçin Karar Verme Kuralları;

Biyodeşğerlilik çalışmalarında karar verilirken elde edilen sayısal verilerin istatistiksel önemi yanında denek içi ve denekler arası değişkenlerin tıbbi önemi de dikkate alınmalıdır. Yürütölen çalışmalarda bazı ürünler için biyoyararlanımdaki daha büyük değişkenlik, ilacın terapotik kullanım amacı veya ürünün geniş terapotik indeksi nedeni ile çok titiz dozaj rejimi gerektirmemesi durumlarında dikkate alınmayabilir (Zintzaras ve ark 2002; Yılmaz 2008).

Biyodeşğerlilik çalışmalarında karar verme yöntemi olarak Klasik t-tabanlı güven aralığı (%90 Güven aralığı) ve Çift-Tek yönlü test yöntemleri kullanılmaktadır (Toutain ve Koritz 1997).

2.3.11.1. Klasik t-tabanlı Güven Aralığı (%90 güven aralığı) Yöntemi;

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan Klasik t-tabanlı güven aralığı yöntemi, orjinal ve jenerik ürünlerin ortalamaları arasında fark olduğunu kabul ederek bu farklılığı belirli bir güvenlikte hesaplamaya dayanan bir yöntemdir (Şahin 2012).

Student- t dağılımı esasına dayanır. Ortalamanın % 90 güven aralığı

$X_{ort} \pm t (0,05S) / \sqrt{N}$ formülünden hesaplanır.

X_{ort} : Numunenin aritmetik ortalaması

$T(0,05)$: N-1 serbestlik derecesinde, 0,05'lik bir α yayılma düzeyinde t tablosundaki değer

S: Standart sapma

N: Veri sayısı

Ortalama değer %90 güven sayesinde bu aralık içindedir.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında; referans formülasyonun biyoyararlanımı BR ve test formülasyonun biyoyararlanımı BT ise (BR-BT) farkının kabul edilebilir sınırlar içinde küçük olduğu gösterilmelidir. Yani % 95 güvenle, test formülasyonu referans formülasyonun % 80-125'i kadar yararlı olmalıdır (Resmi gazete 1994, EMA 2011a).

Bağıl biyoyararlanım için $\% \alpha(1-\alpha)$ güven aralığı (C_{lower} ve C_{upper}) hesaplanır ve biyoeşdeğerlik için kabul edilen aralık ile karşılaştırılır. Eğer hesaplanan değerler güven aralıkları kabul edilebilir sınırları içinde ise karşılaştırılan ürünlerin biyoeşdeğer olduğu söylenir.

2.3.11.2. Çift-Tek Yönlü (Two-One Sided) Test Yöntemi:

Karşılaştırılan test ve referans ürünlerin ortalamaları arasında fark olduğu kabul edilip, ortalamalar arasındaki farklılığı belirli bir güvenlikte hesaplamaya yarayan yöntemdir. %90 güven aralığı yaklaşımına göre her iki formülasyonun AUC ve C_{max} değerlerinin kesinlikle aynı olmadığı kabul edilir (Resmi Gazete 1994).

Genel olarak yasal örneklere göre, ortalamalar arasında %20 veya daha az bir fark olması klinik açıdan önemsiz kabul edilir (Resmi Gazete 1994).

Buna göre istatistiksel tezin varsayımı; test ve referans ortalamalar arasındaki fark, referans formülasyonun %20'sinden fazla değildir şeklinde ifade edilir.

İki ortalama farkının güven aralıkları şu şekilde hesaplanır;

$$X_{ortT} - X_{ortR} \pm t_{0,95}(y) \cdot SD\sqrt{2/N}$$

X_{ortT} : Test formülasyon ortalaması

X_{ortR} : Referans formülasyon ortalaması

Y: Serbestlik derecesi (hata ortalamasının karesi ile ilişkilidir)

$t_{0,95}(y)$: y serbestlik derecesinde, $\alpha=0,05$ yanılma düzeyinde Student-t tablosundaki değer

s: Çapraz tasarım varyans analizinden hesaplanan hata ortalamasının karesinin karekökü

N: Çapraz tasarımda kullanılan gönüllü sayısı

$S\sqrt{2/N}$: Kestirimin standart hatası

Çift-tek yönlü test yöntemi, normal tek yönlü bir test çiftinden oluşur. Her bir tek yönlü testin güven seviyesi $\alpha=0,05$ 'tir. Çift-tek yönlü test yöntemi ile işlem olarak normal $1-2(\alpha)$ (veya %90) güven aralığına eşittir (Resmi Gazete 1994).

2.3.11.3. Andersen-Hauck Hipotez Testi;

Bu testin varsayımına göre iki hipotez söz konusudur.

H_0 Hipotezi: Karşılaştırması yapılan iki ürün arasında biyoeşdeğerliliğin olmadığını savunur. Bu hipoteze göre iki ürün arasında ortalama fark, güven aralıkları limitinin dışındadır.

H_1 Hipotezi: Karşılaştırması yapılan iki ürünün biyoeşdeğer olduğunu savunur. Bu hipoteze göre iki ürün arasındaki ortalama fark, güven aralıkları limiti içerisindedir.

Test sonuçlarına göre H_0 hipotezi red ediyorsa, H_1 hipotezi kabul edilir. Yani iki ürün biyoeşdeğer olarak kabul edilir. H_0 hipotezi reddedilemiyorsa, iki ürün arasında biyoeşdeğerliliğin olmadığına karar verilir (Resmi Gazete 1994).

2.3.11.4. Logaritmik Dönüştürme ve Sapan Değerler;

AUC ve C_{max} değerlerinin normal dağıldığı kabul edilerek dönüştürülmemiş verilere varyans analiz (ANOVA) uygulanır. Alternatif olarak AUC ve C_{max} değerlerinin log-normal dağılım gösterdiği kabul edilerek log- dönüştürülmüş ve verilere de ANOVA uygulanabilir.

Pratikte dönüştürülmemiş verilerin istatistiksel analizinin başvuru dosyasında yer alması istenir. Eğer AUC ve C_{max} değerleri % 90 güven aralığı kriterlerine uymuyorsa üretici firma log-dönüştürülmüş verileri değerlendirebilir (Resmi Gazete 1994).

Eğer dönüştürülmemiş verilerin normal dağılım gösterdiğine karar verilemiyorsa log-dönüştürülmüş verilere göre hesaplanan güven aralıkları otoritelerce dikkate alınır. FDA'a göre dönüştürülmüş veriler ikinci derecede önem taşır (Resmi Gazete 1994).

Dönüştürülmüş veriler için bilimsel esaslar şöyledir (Resmi Gazete 1994)

- a) Klirens ve dağılım hacmi, AUC ve konsantrasyonla ilişkili bu parametreleri çoğaltan ve gönüllülerden kaynaklanan etkilerdir. Log-dönüştürme bu ilişkiyi çoğaltmaktan çok ilave yönündedir. ANOVA'nın uygulanışı ile ilk veriler daha tutarlı hale gelir.
- b) Bazı çalışmalar iki veya daha fazla alt popülasyonu kapsayabilir. Örneğin hızlı ve yavaş asetilatörlerden kaynaklanan bimodal dağılım oluşabilir. Bu durumda tek normal dağılım, verileri tanımlamaz.
- c) Klirens veya dağılım hacminin etkisine bağlı olarak çarpık verilerden veya alt popülasyona ait birkaç gönüllünün verilerinden elde edilen biyoeşdeğerlilik parametrelerinin dağılımı durumunda; log-dönüştürme dağılımında oluşan uzun kuyukları etkiler ve log-normal dağılım oluşur. Normal veya log-normal dağılım kabul edilmeden önce, verilerin log-dönüştürme işlemi yapılmaksızın analizi gerekmektedir. Ayrıca dağılımın normalite testi yapılmalıdır. Biyoeşdeğerlilik çalışmalarında az veri ile doğru karar vermek çok zordur.

Sapan değerler asıl veri dizisinden farklı olan küçük ve büyük değerlerdir. Sapan değerler üç grupta toplanabilir.

- a) Gerçek bir hata sonucu oluşan değerler,
- b) Çarpık bir popülasyondan oluşan değerler,
- c) Bimodal dağılımdan oluşan değerler,

Kimyasal analizlerde yapılan hatalar sapmaların en büyük nedenidir. Elde edilen veri mevcut verilerden farklı ise analiz tekrarlanmalıdır. Bunun yanında analizlerin sık sık tekrarlanması miktar tayin yönteminin valide edilmediğini ve analitik bir problem olduğunu

düşündürmelidir. Tekrarlanan analizler için kriterlerin belirlenmesi doğru değerlerin keyfi seçiminin önlenmesine yardımcı olacaktır (Resmi Gazete 1994).

AUC ve C_{max} 'ta sapan değerler görülebilir. Mevcut klinik raporlar değerlendirilerek uygulama ve doz hataları, veya suppozituarın dışarı atılmasından meydana gelebilecek olası sapmalar elimine edilmelidir. Kimyasal analizde yapılan hatalar veya klinik uygulamaya bağlı hatalar dışında meydana gelen hatalar elimine edilmemelidir. Bu hatalar kompleks parametre dağılımını tanımlarlar (Resmi Gazete 1994)

2.3.11.5. Non-Parametrik Güven Aralıkları;

Bazı çalışmalarda son derece farklı biyoyararlanım verileri elde edilebilir. Bu tür problemlerin varlığında non-parametrik aralıkların kullanımı önerilmektedir. Non-parametrik aralıklar bireysel oranların güven aralıklarının karşılaştırılması içinde kullanılabilir. Bütün olası veri çiftlerinin aritmetik ortalamalarının sıralanması ile hesaplanan non-parametrik güven aralığı sıklık ile kullanılmaktadır. Bir veri takımındaki her bir veri, diğer bir veri ile çiftleştirilir ve ortalama hesaplanır (Resmi Gazete 1994).

$N(N+1)/2$ ortalamaları dizilir ve listenin sonundaki her değer, aralığın son değeri olarak alınır. Non-parametrik aralıklar t-tabanlı aralıktan daha geniştir. Bu, non- parametrik yöntemlerin yetersizliğini gösterir. Bundan dolayı non-parametrik aralıklar ancak aralarında çok fazla sapma gösteren değerlere uygulanabilir (Resmi Gazete 1994)

Bazı ülkeler tarafından kabul edilen biyoeşdeğerlik kriterleri ve sınırları tablo 2-14'de belirtilmiştir (Şahin 2012).

Tablo 2-14 Bazı Ülkelerde Kabul Edilen Biyoeşdeğerlik Sınırları

Ülke	Kurum	AUC Oranı İçin Kabul Edilen	C _{max} İçin Kabul Edilen Aralık	Açıklama
Kanada	Health Kanada	%80-125	%80-125	Jenerik NTI/CD için sınırlar; AUC %90-112 C _{max} %80-125
Avrupa Birliği	EMA	%80-125	%80-125	Jenerik NTI/CD'da bu sınır AUC ve C _{max} için % 80- 125' dir. Gerekli görüldüğünde daraltılabilir
Japonya	NIHS	%80-125	%80-125	NTI/CD için sınırdaki bir değişiklik yoktur ancak dissolüsyon profillerine bakılır.
Güney Afrika	MCC	%80-125	%70-133	Jenerik NTI/CD'da bu sınır AUC ve C _{max} için % 80- 125' dir.
Avustralya	TGA	%80-125	%80-125	EMA kriterleri uygulanmaktadır
Amerika	FDA	%80-120 (non-log) %80-125 (log)	%80-125(log)	%80-125 (log)

NTI/CD; Digoksin, lityum, varfarin gibi farmakodinamik ve terapötik ilaç konsantrasyonu yönünden izlenmesi gereken, terapötik indeksi dar ilaçlar

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar;

Hayvanlara yapılan tüm uygulamalar, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'nun 30.09.2010 tarih ve 152 sayılı kararı ile alınan etik kurul kararı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir

Çalışmada Veteriner Hekim Fikret AYDIN'a ait Bursa ili Karacabey ilçesindeki Aydın Besi Çiftliğinde bulunan 09-13 Ay yaş aralığında, 185-340 kg arası canlı ağırlığa sahip 10 adet Holstein ırkı erkek hayvan kullanıldı. Hayvanlar çalışma süresince temin edildikleri çiftliğin temiz ve dezenfeksiyon yapılmış padoklarında tutuldu ve sığır yetiştirme yemi ile beslendi. Seftiofur preparatlarının enjeksiyonu öncesinde herhangi bir adaptasyon periyoduna maruz bırakılmayan hayvanlara hiçbir ilaç/kimyasal uygulaması yapılmamıştır.

Hayvanlar rastgele seçilerek her grupta 5 erkek sığır olacak şekilde 2 grubu ayrıldı. (Tablo 3-1)

Tablo 3-1 Gruplara Göre Canlı Ağırlık Dağılımı

A Grubu		B Grubu	
Kulak Küpe No	Canlı Ağırlık (kg)	Kulak Küpe No	Canlı Ağırlık (kg)
TR 10 190 2158	185	TR 10 185 9308	220
TR 10 192 0217	290	TR 10 185 8631	205
TR 10 185 8686	250	TR 10 187 2337	190
TR 16 82 5822	310	TR 10 17 94382	310
TR 10 17 93043	330	TR 10 18 18367	340
Ort:227,50		Ort:210,83	

3.2. İlaçlar;

Çalışmada Seftiofur baz'a eşdeğer Seftiofur HCl (50mg/ml) içeren orjinal preparat ile jenerik bir preparat kullanıldı. Ürünler piyasadan satın alınarak temin edildi.

3.3. İlaçların Uygulanması;

İlaçlar EMA ve FDA tarafından onaylanan terapötik dozda (1,1 mg/kg) hayvanlara boyun bölgesinden kas içi yolla ve tek doz olarak uygulandı.

3.4. Örneklerin Toplanması;

Kan örneklerinin toplanması için vakumlanmış 10 ml hacminde Lityum Heparin içeren tüpler (VACUETTE® Heparin Tubes, Greiner Bio-One) kullanıldı. Örnekler V.jugularis'den ilaç uygulaması öncesi (0. zaman) ve sonrasında 10, 20 ve 30 dakikada ve 1., 2., 4., 8., 12., 24. saatlerde yaklaşık 10 ml olarak alındı. Alınan örnekler 1500 devirde 10 dakika santrifuj edildi ve plasmaları ayrıştırıldı. Plazma örnekleri önceden üzerine hayvan grubu, hayvan numarası ve numune alım saati kodlanmış olan ependdorf tüplerine alınarak analiz yapılacağı güne kadar derin dondurucu içerisinde -20 °C'de saklandı (Jacopson ve ark. 2006; El-Gendy ve ark 2007)

3.5. Kimyasal Maddeler;

- Seftiofur HCl, Vetranal Analytical Standart (Fluka, Kod: 32422)
- 1,4-Dithioerythritol, (Sigma –Aldrich, Kod: D8255)
- Sodyum Tetraborat Dekahidrat (Sigma-Aldrich, Kod: 31457)
- Potasyum Klorid Ekstra Saf (Riedel, Kod: SK.R.12636)
- Iodoacetamide, (Sigma-Aldrich, Kod:I6125)
- Potasyum Fosfat mono Basic (Riedel, Kod: SK.R.04243)
- Methanol Ekstra Saf (Riedel, Kod: SK.R.24229)
- Asetik Asit Ekstra Saf %99,5 (Sigma-Aldrich, Kod: 27225)
- Asetonitril HPLC Gradient (Riedel, Kod: SK.R.34851)
- Trifloroasetik Asit (HPLC Grade Sigma-Aldrich, Kod:T6508)
- Tip 1 Su (Ultra Saf Su, HPLC Kalite)

3.6. Kullanılan Alet ve Malzemeler;

- Vorteks (Yellow Line / Heidolph Multireax)
- Otomatik Pipet (Bran /Axygen)
- Hamilton Enjektör (100 µ,1000 µL)
- Ultrasonik Su Banyosu (Bandelin Sonorex)
- Polipropilen tüp (10 ml)
- Kromotografi viali 11,6x32x6 mm-1,5 ml
- Santrifüj (Nüve NF 800R)
- Hassas Terazi (Shimadzu, Libor AEL-40SM)
- Vakum Manifoldu
- Vakum Manifold Pompası (Rotovac, Heidolph)
- SPE (Solid Phase Extraction –Kıta Faz Ekstraksiyon) Kolon, (CHROMABOND columns EASY volume: 3 ml, content of sorbent: 60 mg material: PP)
- Azot Evaporatörü (AR' Lab, AVP-B40)

3.7. HPLC Sistemi ve Mobil Faz;

- HPLC, Shimadzu UFLC
- HPLC Kolon (Zorbax ODS 25 cm x 4,6 mm; 5 µm)
- UV Dedektör; (Knauer, UVD 2.1S)
- Dalga Boyu; 254 nm
- Mobil Faz A; %0,1 TFA Su
- Mobil Faz B; %0,1 TFA Asetonitril
- Enjeksiyon Hacmi; 40 µL

3.8. Deney Prosedürü;

Çalışmamızda Seftiofur HCl içeren iki ilaç analiz edildiği için iki- peryotlu, iki-ardışıklı çapraz geçişli tasarım kullanıldı (El-Gendy ve ark 2007; Şahin 2012) Klinik uygulama kısmı iki dönemde gerçekleştirildi. İlk dönemde A grubuna orjinal ilaç, B grubuna jenerik ilaç uygulandı. 2. dönem geçmeden önce ilaçların vücuttan tamamen arınması için

14 günlük bir arınma (washout) süresi beklendi (Brown ve ark 2000; El-Gendy ve ark 2007).
2. dönemde A grubuna jenerik ilaç, B grubuna ise orjinal ilaç uygulandı.

3.9. Mobil Fazın Hazırlanması;

3.9.1. Mobil Faz A;

1000 ml'lik kalibre balon joje içerisinde yaklaşık 990 ml Tip 1 (Ultra Saf Su) su konuldu, üzerine 1 ml trifloroasetik asit ilave edildi. Daha sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon 15 dakika ultrasonik su banyosunda karıştırıldı.

3.9.2. Mobil Faz B;

1000 ml'lik kalibre balon joje içerisine yaklaşık 990 ml asetonitril konuldu, üzerine 1 ml trifloroasetik asit ilave edildi. Daha sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon 15 dakika ultrasonik su banyosunda karıştırıldı.

3.9.3. Borat Tamponu (pH=9) Hazırlanması;

1000 ml'lik kalibre balon joje içerisine yaklaşık 950 ml Tip 1 su konuldu, bu balon joje içerisine 19 g sodyum borat ve 3,7 g potasyum klorür dikkatlice eklendi ve ultrasonik su banyosunda çözündürüldüler. Hazırlanan solüsyon Tip 1 su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.9.4. Fosfat Tamponu (pH=7) Hazırlanması;

1000 ml'lik kalibre balon joje içerisine yaklaşık 700 ml Tip 1 su konuldu, bu balon joje içerisine 3,4 g potasyum dihidrojen fosfat eklendi ve potasyum hidroksit ile pH 7 'ye ayarlandı. Eklenen kimyasallar ultrasonik su banyosunda çözündürüldüler. Hazırlanan solüsyon Tip 1 su ile 1000ml'ye tamamlandı.

3.9.5. Ekstraksiyon Çözeltisi Hazırlanması;

Borat tamponu içinde %0,4 (w/v) dithioerythritol olacak şekilde hazırlandı. Çözeltiler günlük olarak hazırlandı.

3.9.6. İodoasetamit Çözeltisi Hazırlanması;

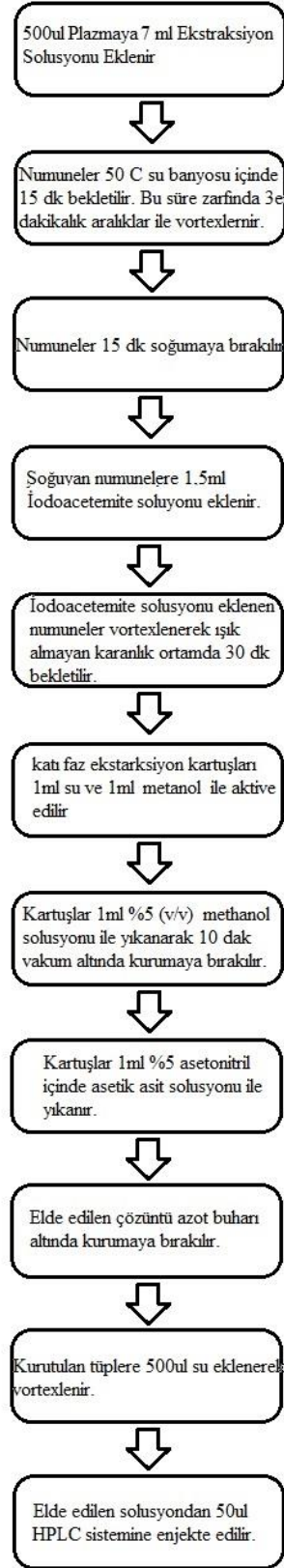
Fosfat tamponu içinde %14 (w/v) iodoasetamit olacak şekilde hazırlandı. Çözeltiler günlük olarak hazırlandı.

3.9.7. Stok Çözelti Hazırlanması;

Seftiofur stok çözeltisi 1 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı. Günlük çalışmalar için gerekli ara derişimler bu stok çözeltilerden hazırlandı.

3.9.8. Ekstraksiyon Yöntemi;

Elde edilen 200 adet plazma numunesinin analizlerinde Jacobson ve ark (Jacobson ve ark 2006), De Baere ve ark (De Baere ve ark 2004) tarafından kullanılan ekstraksiyon metodlarının modifiye edilmesi ile elde edilen metod uygulandı. Buna göre 500 µl plazmaya 7 ml ekstraksiyon çözültisi eklenerek 3 dakika vortexlendi ve numuneler 50 °C su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bekleme süresi boyunca 3 er dakikalık düzenli aralıklar ile vortexlenme işlemi uygulandı ve numuneler tekrar su banyosuna konuldu. Oda ısısında soğumaya bırakılan (15 dk) numunelere 1,5 ml İodoasetmit solusyonu eklendi ve vortexlenerek karanlık, ışık görmeyen bir ortamda 30 dakika beklendi. Bekleme periyodunda katı faz ekstraksiyon kartuşları 1 ml su ve 1 ml methanol ile aktive edildi. Örneklerin 0,5-1,5 ml/dakika akış hızına ayarlanmış vakum altında yavaşça kartuştan geçmesi sağlandı. Daha sonra kartuşlar 1 ml %5 (v/v) methanol solusyonu ile yıkandı ve 10 dakika vakum altında kurumaya bırakıldı. Kartuşlar 1 ml 5% (v/v) asetonitril içindeki asetik asit solusyonu ile yıkandı. Elde edilen çöküntü hafif azot buharı altında 40 °C ± kurutuldu. Kurutulan tüpler 500 µl su ekledi ve 15 saniye vortexlendi. Elde edilen solusyon viallere aktarılarak 50 µl mikarında HPLC-UV sistemine enjekte edildi.



Şekil 3-1 Ekstraksiyon İşlemi Akış Şeması

3.9.9. Yöntemin Validasyonu;

3.9.9.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık (Calibration Curve and Linearity)

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacı ile hazırlanan Sefriofur stok solusyonundan 0.6 , 1 , 2 , 4 , 10 , 20 µg/ml konsantrasyonlarında standart solusyonlar hazırlandı. Bu standart solusyonların analizi sonucu elde edilen verilerle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

3.9.9.2. Kesinlik ve Doğruluk (Precision and Accuracy)

Uygulanan metodun kesinlik ve doğruluğunu saptamak için seftiofur stok solusyonundan 0.6 , 1 , 10 , 16 µg/ml konsantrasyonlarda standart solusyonlar hazırlandı. Kesinliğin saptanabilmesi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (r) kullanıldı. Bu amaçla 0.6 , 1 , 10 µg/ml konsantrasyonlardaki standart solusyonlar günde 5 defa 5 gün süre ile analiz edildi. Bu şekilde ölçümlerin kesinliği araştırıldı.

3.9.9.3. Saptama Limiti (Limit Of Detection) ve Kantitasyon Limiti (Limit of Quantitation)

En düşük miktarda elde edilen sonuçların 7 kere yapılan tekrarlı ölçümlerinde elde edilen standart sapmanın 3 katı ile saptama limiti, 10 katı ile kantitasyon limiti belirlenmiştir. (Şahin 2012).

3.9.9.4. Geri Kazanım (Recovery)

Geri kazanım yüzdesini belirlemek için sıfıncı zamanda alınan 1 ml plazma içerisine 0.6 , 1 , 10 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde seftiofur stok çözeltisi eklendi. Her konsantrasyon için tekrarlı analizler yapıldı.

3.9.9.5. Stabilite

Sıfıncı zamanda alınan plazma örneklerine seftiofur stok çözeltisinden 1 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde eklendi. Üç eritme-dondurma işlemi sonrası geri kazanım yüzdeleri belirlendi.

Ayrıca stok çözeltinin kararlılığının belirlenmesi için 1 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra oda sıcaklığındaki 0 ve 6 saat konsantrasyonları ölçüldü. Aynı işlem 3 gün sonra tekrarlandı.

3.9.9.6. Farmakokinetik Verilerin Analizi

Her hayvan için seftiofur'un plazma konsantrasyon – zaman eğrileri *WinNonLin* (WinNonlin, version 6.3.0.395, software (Phoenix 64, Pharsight, Certara. St. Louis, MO, USA) programı yardımı ile hazırlandı. EMA'nın 11 Nisan 2011 tarihli Veteriner Medikal Ürünler için Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Yürütülmesi Rehberi'ne göre farmakokinetik parametrelerin belirlenmesinde non-kompartmantal model analizi kullanıldı (EMA 2011a).

3.9.9.7. İstatistiksel Verilerin Analizi

Tüm değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Her iki ilaç için değerlendirilen farmakokinetik parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 13.0 istatistik paket programı kullanılarak *T* testi ile değerlendirildi. t_{max} ın istatistiksel değerlendirilmesinde non-parametrik *NPar Mann-Whitney Test* ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

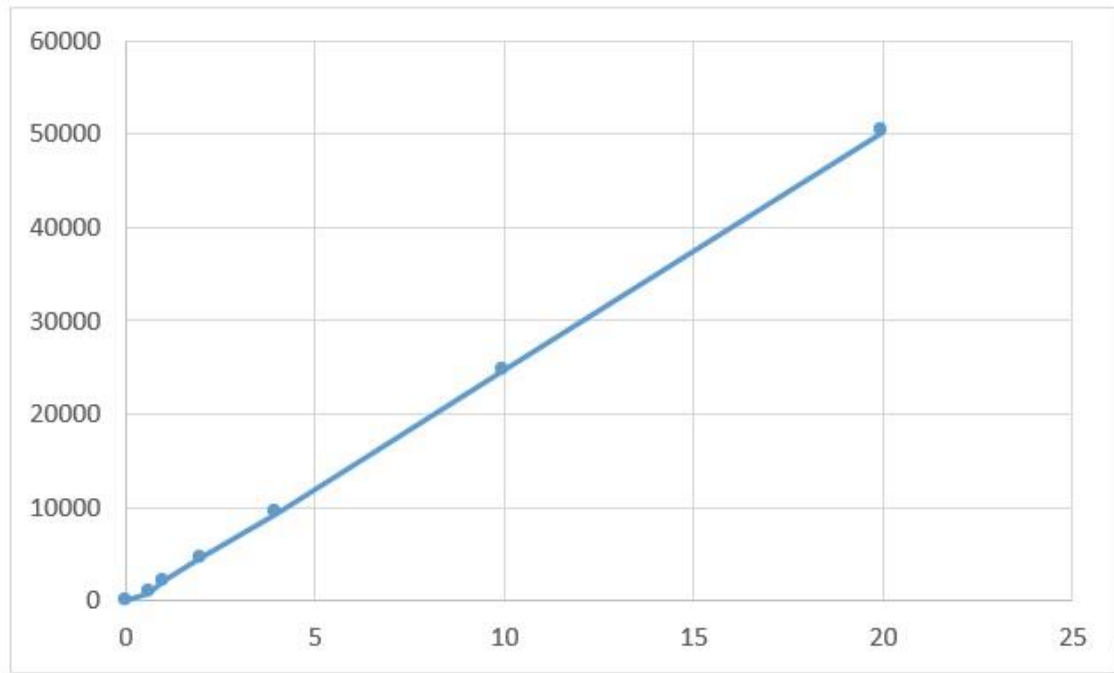
4.1. İlaç Etken Madde Miktarına Ait Bulgular

Çalışmamıza başlamadan önce kalite kontrol amacı ile orjinal ve jenerik ürün etken madde miktarı yönünden incelendi. Yapılan analizlerde orjinal ilaçta etken madde miktarı 53,2 mg/ml, jenerik ilaçta ise 50,65 mg/ml olarak saptandı. Her iki ilaçta da saptanan etken madde değerlerinin prospektüslerinde belirtilen 50 mg/ml miktarını sağladığı ve 2011 yılında EMA tarafından yayımlanan veteriner tıbbi ürünlerin biyodeşdeğerlik çalışma rehberinde belirtildiği gibi orjinal ve jenerik ilacın etken madde miktarları arasındaki farkın %5 den az olduğu görüldü (EMA 2011).

4.2. Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular;

4.2.1. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık;

Seftiofur standart solüsyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinin 0,6-20 µg/ml konsantrasyonlar arasında doğrusal olduğu görüldü ($r^2=0,9947$) (Şekil 4-1).



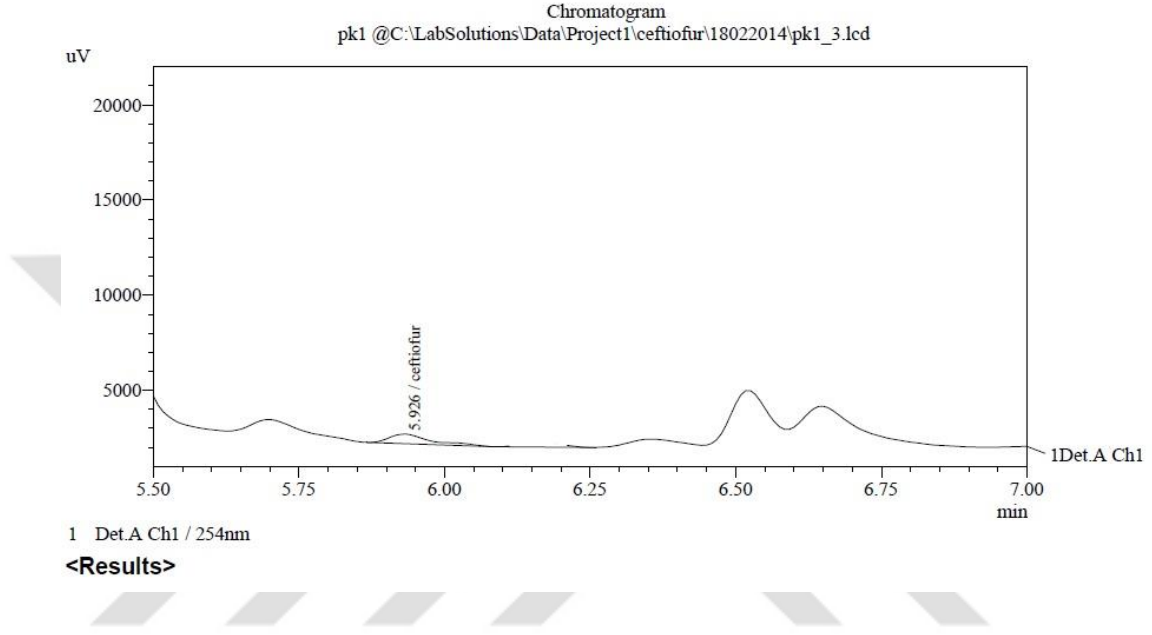
Şekil 4-1 Seftiofur Standart Solüsyonlarından Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

4.2.2. Kesinlik ve Doğruluk;

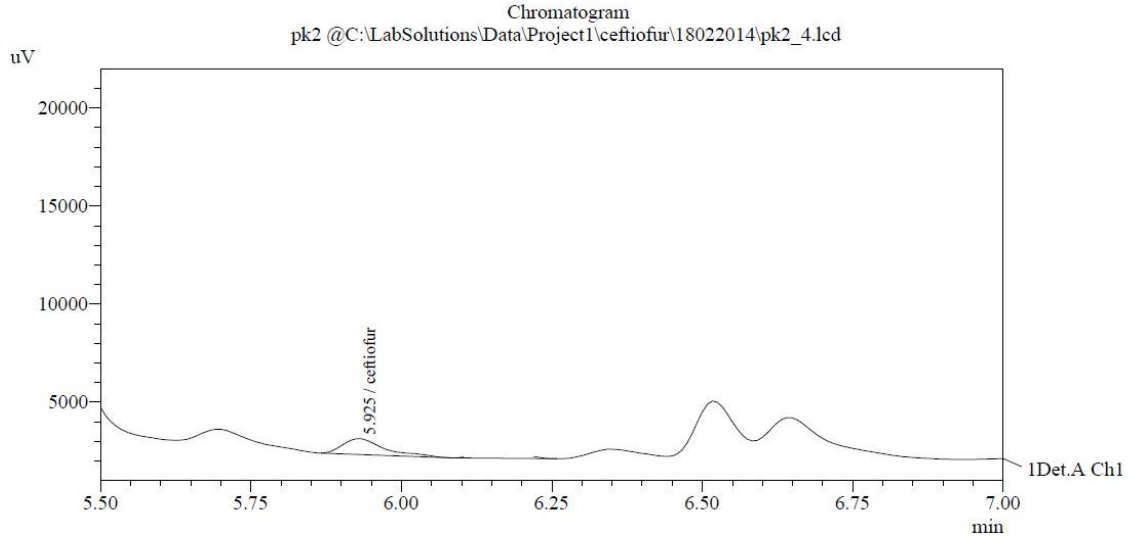
Standart solüsyonların artan konsantrasyonlarına paralel şekilde elde edilen kromotogram alanlarının artış gösterdiği belirlendi. Gün içi ve günler arası değişkenlikleri saptamak için 0,6, 1, 10 µg/ml konsantrasyonlardaki standart solüsyonlardan günde 5 defa 5

gün süre ile yapılan veriler değerlendirildi. 1 µg/ml konsantrasyonlardaki seftiofur'a ait gün içi ve günler arası değişkenlikler tablo 4-1'de gösterilmiştir. Seftiofur'un alıkonma süresi (retention time) 5,9 – 6,3 dakika olarak tespit edildi.

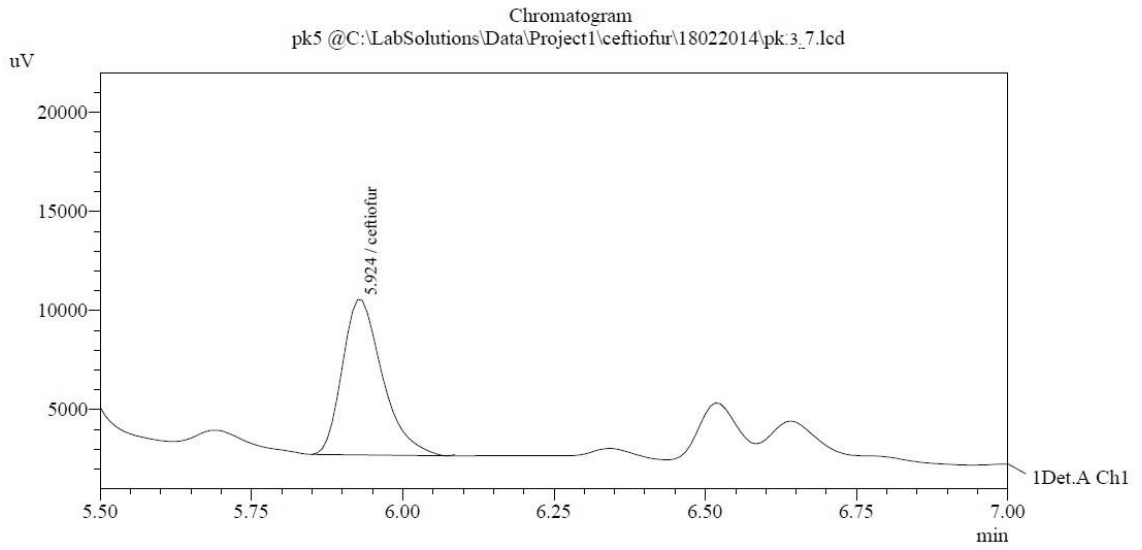
0,6, 1, 10, µg/ml konsantrasyonlardaki seftiofur standartlarının kromotogramları şekil 4-2, şekil 4-3 ve şekil 4-4 'de verilmiştir.



Şekil 4-2 0,6 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram



Şekil 4-3 1 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram



Şekil 4-4 10 µg/ml Seftiofur İçeren Standart Kromotogram

Tablo 4-1 1 µg/ml Konsantrasyonundaki Seftiofur'a Ait Gün İçi ve Günler Arası Değişkenlikler

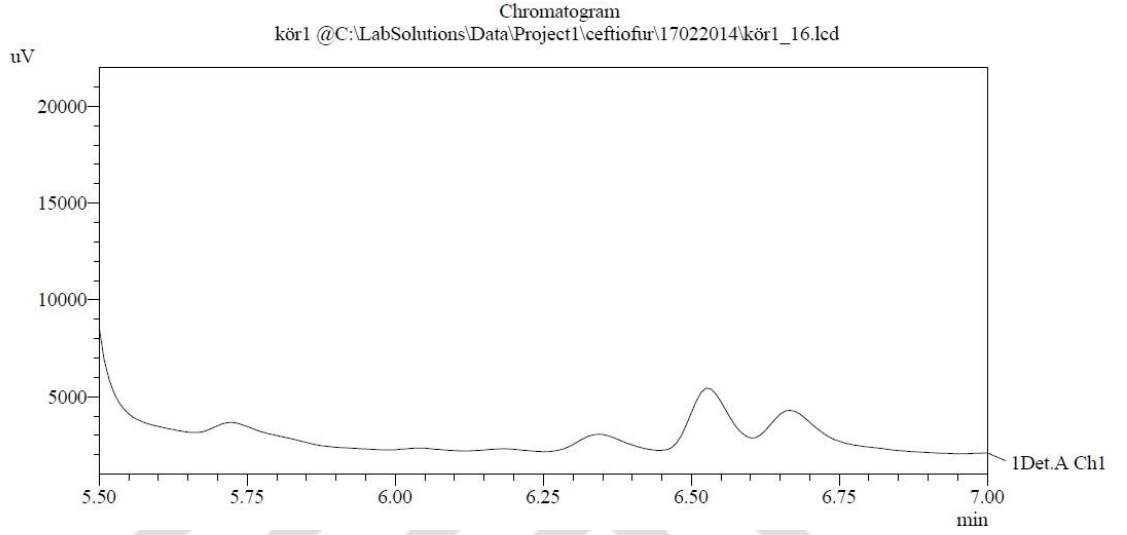
	1. Gün	2. Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	Günler Arası
Ortalama						
Değişim (µg/ml)	0,7944	0,8060	0,7776	0,8011	0,7966	0,7954
Standart Sapma	0,018	0,011	0,008	0,020	0,010	0,013
Varyasyon Katsayısı %	2,265	1,136	1,029	2,490	1,255	1,684

4.2.3. Saptama ve Kantitasyon Limiti;

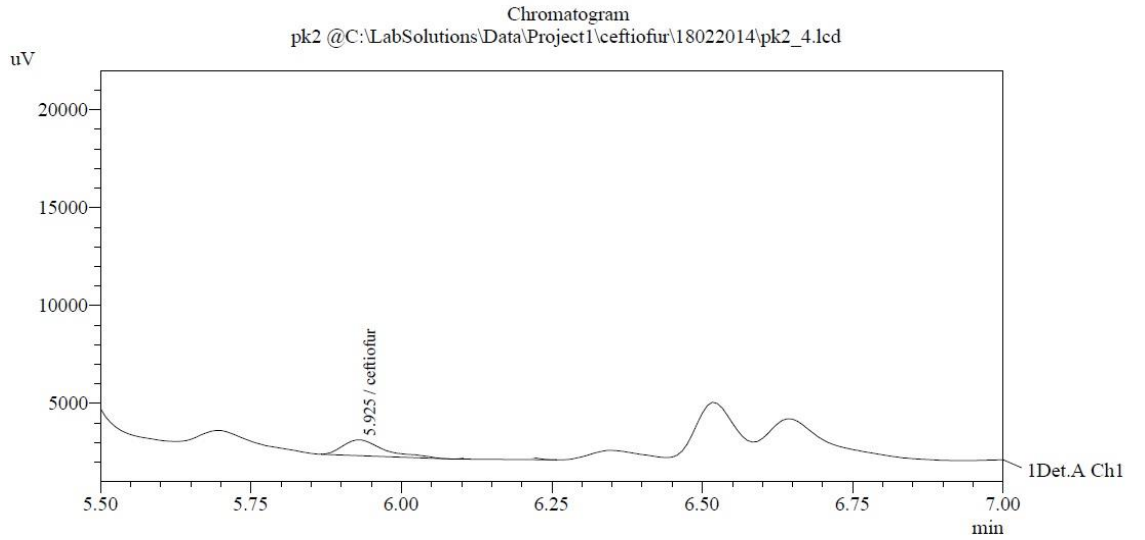
Yöntem'in saptama limiti 0,19 µg/ml, kantitasyon limiti ise 0,58 µg/ml olarak belirlendi.

4.2.4. Geri Kazanım;

Yapılan analizler ile yöntemin geri kazanım yüzdesi %76-83 arasında değişen geri kazanım yüzdesi ortalama %78 olarak belirlendi. Şekil 4-5’de kör kromatogram ve Şekil 4-6’da 1 µg/ml seftiofur standart eklenmiş plazma örneğinden elde edilen kromatogram verilmiştir.



Şekil 4-5 Kör Kromatogram



Şekil 4-6 1 µg/ml Seftiofur eklenmiş kromatogram

4.2.5. Stabilité;

Üç eritme – dondurma işlemi sonrasında seftiofur'un geri kazanım yüzdesinin değişmediği görüldü. Ayrıca stok çözelti kararlılığını tespit etmek için stok çözeltinin oda koşullarında 0 ve 6. saatlerdeki stabilitesinde değişiklik olmadığı görüldü.

4.3. İlaç Uygulaması;

Orjinal ve jenerik ilacın uygulandığı her iki grupta enjeksiyon yerinde enjeksiyon sonrasında herhangi bir patolojik durum gözlemlenmedi. Hayvanların genel klinik durumlarında herhangi bir olumsuzluk saptanmadı.

4.4. Farmakokinetik Veriler;

Yöntem validasyonu tamamlandıktan sonra günde 20 adet örnek ekstraksiyon yapılarak analiz edildi. Validasyon işlemi sonrasında toplam 200 adet örnek duplicate olarak analiz edilmiş ve analizlerden elde edilen ham veriler tablo haline getirilmiştir (Tablo 4-2 ve 4-3).

Orjinal ve jenerik ilaca ait ham verilerden t_{max} ve C_{max} değerleri bulunmuş ve Tablo 4-4 ve 4-6'de gösterilmiştir . Orjinal ilaca ait t_{max} $2,10 \pm 0,30$ saat, C_{max} $1,86 \pm 0,26$ $\mu\text{g/ml}$, jenerik ilaca ait t_{max} $2,00 \pm 0,00$ saat, C_{max} $1,81 \pm 0,35$ $\mu\text{g/ml}$ olarak elde edildi . Orjinal ve jenerik ilaca ait ham verilerden elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri Şekil 4-7 ve Şekil 4-8'de gösterilmiştir.

Lineer trapezoideal kurala göre $AUC_{(0-t)}$ (eğri altında kalan alan) ve $AUMC_{(0-t)}$ değerleri hesaplanmış ve Tablo 4-4 ve 4-6'da gösterilmiştir . Orjinal ilaca ait $AUC_{(0-t)}$ $19,25 \pm 2,69$ $\mu\text{g.saat/ml}$, $AUMC_{(0-t)}$ $164,21 \pm 34,21$ $\mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ ve jenerik ilaca ait $AUC_{(0-t)}$ $17,92 \pm 4,03$ $\mu\text{g.saat/ml}$ $AUMC_{(0-t)}$ $149,48 \pm 37,79$ $\mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ değerleri elde edildi.

Toplam eğri altında kalan alan, $AUC_{(0-\infty)}$ ve toplam moment eğrisi altında kalan $AUMC_{(0-\infty)}$, hesaplanmış ve tablo 4-4 ve 4-6 'da gösterilmiştir. Orjinal ilaca ait $AUC_{(0-\infty)}$ $24,13 \pm 5,04$ $\mu\text{g.saat/ml}$, $AUMC_{(0-\infty)}$ $361,23 \pm 150,95$ $\mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ ve jenerik ilaca ait $AUC_{(0-\infty)}$ $22,55 \pm 3,11$ $\mu\text{g.saat/ml}$, $AUMC_{(0-\infty)}$ $386,02 \pm 237,82$ $\mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ olarak belirlendi.

Her iki ürün için $MRT_{(0-t)}$ ve $MRT_{(0-\infty)}$ değerleri ayrı ayrı hesaplanmış ve tablo 4-4 ve 4-6'de gösterilmiştir. Orjinal ilaç için $MRT_{(0-t)}$ değeri $8,48 \pm 0,79$ saat, $MRT_{(0-\infty)}$ değeri $14,45 \pm 3,01$ saat ve jenerik ilaç için $MRT_{(0-t)}$ değeri $8,29 \pm 0,78$ saat, $MRT_{(0-\infty)}$ değeri $17,48 \pm 11,68$ saat olarak saptandı.

Her iki ilaca ait $t_{1/2}$ değerleri elde edilmiş ve tablo 4-4 ve 4-6'de gösterilmiştir. Orjinal ilaç için $t_{1/2}$ 10,33±2,01 saat ve jenerik ilaç için $t_{1/2}$ 13,38±11,09 saat elde edildi.

Elde edilen tüm verilerin doğal logaritmaları alınmış ve tablo 4-5 ve 4-7'da gösterilmiştir. Orjinal ilaç için $\ln C_{max}$ 0,59±0,15 µg/ml, $\ln AUC_{(0-t)}$ 2,95±0,13 µg.saat/ml, $\ln AUC_{(0-\infty)}$ 3,16±0,19 µg.saat/ml, $\ln AUMC_{(0-t)}$ 5,08±0,19 µg.saat²/ml, $\ln AUMC_{(0-\infty)}$ 5,80±0,38 µg.saat²/ml, $\ln MRT_{(0-t)}$ 2,13±0,10 saat, $\ln MRT_{(0-\infty)}$ 2,64±0,21 saat, $\ln t_{1/2}$ 2,31±0,09 saat olarak belirlendi. Jenerik ilaca ait $\ln C_{max}$ 0,53±0,20 µg/ml, $\ln AUC_{(0-t)}$ 2,84±0,25 µg.saat/ml, $\ln AUC_{(0-\infty)}$ 3,10±0,14 µg.saat/ml, $\ln AUMC_{(0-t)}$ 4,96±0,30 µg.saat²/ml, $\ln AUMC_{(0-\infty)}$ 5,83±0,42 µg.saat²/ml, $\ln MRT_{(0-t)}$ 2,11±0,10 saat, $\ln MRT_{(0-\infty)}$ 2,71±0,43 saat, $\ln t_{1/2}$ 2,38±0,49 saat olarak belirlendi.

Her iki ilaca ait ortalamalar hesaplandıktan sonra çift-tek yönlü test metodu kullanılarak %90 güven aralıkları oluşturulmuş ve sonuçlar tablo 4-8'de gösterilmiştir. Biyodeşdeğerlik yönünden karşılaştırılan ilaçların jenerik /orjinal ilaç ortalamaları ile elde edilen oranının %90 güven aralığı sınırları içerisinde olması ve 0,80-1,25 limitleri içinde kalması biyodeşdeğerlilik kararının verilmesi için kabul edilen kriterleridir.

Orjinal ve jenerik seftiofur preparatları 'na ait t_{max} için jenerik /orjinal oranı 95,23 h, güven aralığı 93,90<95,23<137,68 , C_{max} için jenerik/orjinal oranı 97,31 µg/ml, güven aralığı 73,38<97,31<100,69, $AUC_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 93,09 µg.saat/ml, 81,00<93,09<108,65, $AUC_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 93,45 µg.saat/ml, 92,22<93,45<102,61, $AUMC_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 91,03 µg.saat²/ml, güven aralığı 86,35<91,03<114,31, $AUMC_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 106,86 µg.saat²/ml, güven aralığı 54,21<106,86<130,60, $MRT_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 97,76 saat, güven aralığı 97,76<102,60<111,37, $MRT_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 120,96 saat, güven aralığı 44,60<120,96<138,62, $t_{1/2}$ için jenerik/orjinal oranı 129,53 saat, güven aralığı 29,09<129,53<142,65 olarak elde edildi.

Logaritmik dönüştürülmüş değerler $\ln C_{max}$ için jenerik/orjinal oranı 89,83 µg/ml, güven aralığı 74,03<89,83<100,84, $\ln AUC_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 96,57 µg.saat/ml, 80,85<96,57<114,88, $\ln AUC_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 98,10 µg.saat/ml, 91,96<98,10<102,43, $\ln AUMC_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 97,63 µg.saat²/ml, güven aralığı 85,22<97,63<124,69, $\ln AUMC_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 100,51 µg.saat²/ml, güven aralığı 77,37<100,51<130,07, $\ln MRT_{(0-t)}$ için jenerik/orjinal oranı 99,06 saat, güven aralığı 99,06<102,26<111,89, $\ln MRT_{(0-\infty)}$ için jenerik/orjinal oranı 102,65 saat, güven aralığı

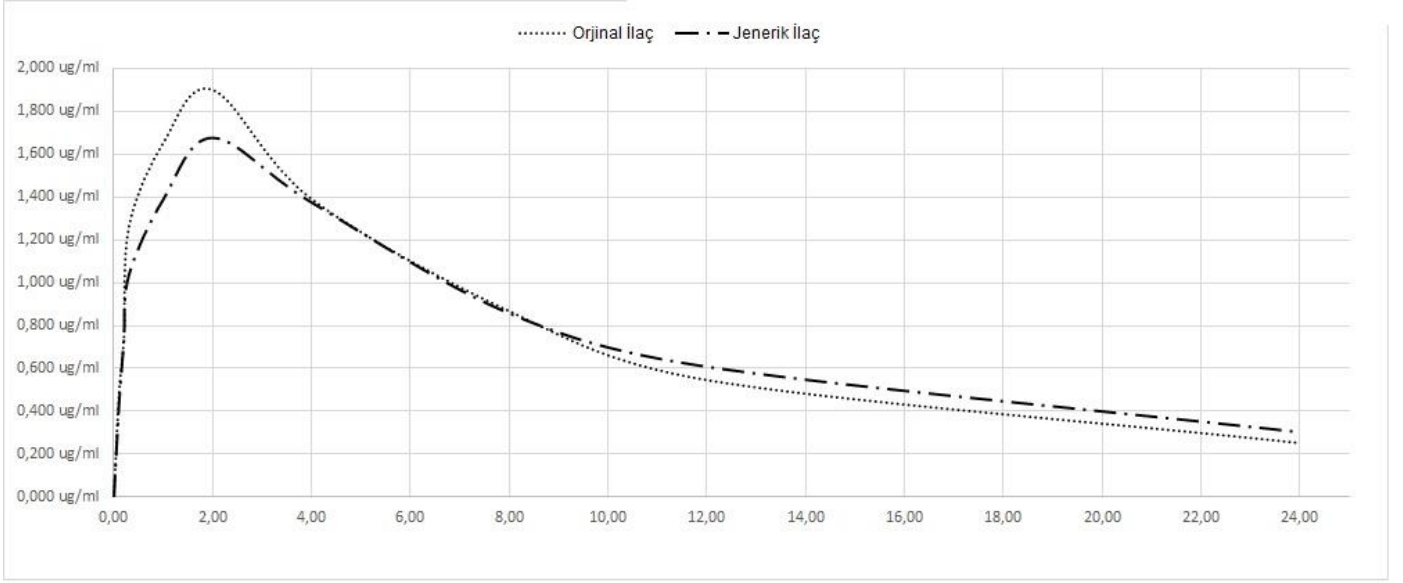
76,07<102,65<140,45, $\ln t_{1/2}$ için jenerik/orjinal oranı 103,03 saat, güven aralığı 73,07<103,03<143,85 olarak elde edildi.

Tablo 4-2 Orjinal İlaç Uygulamasından Elde Edilen Plazma Konsantrasyon Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

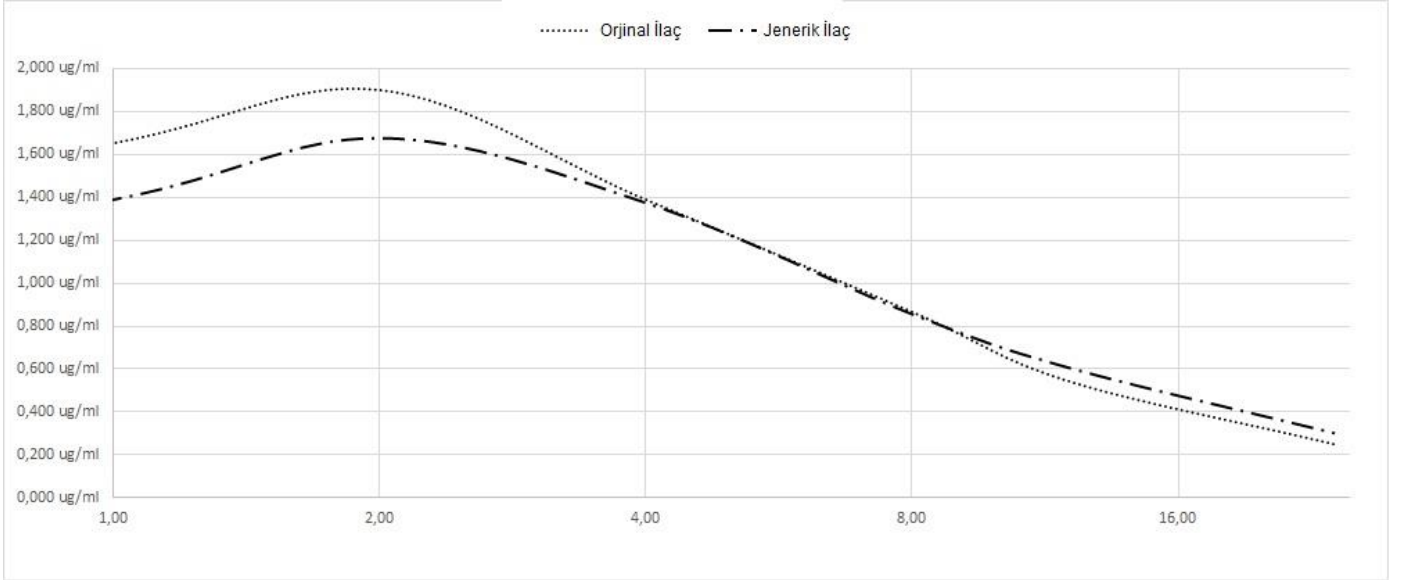
Sıra No	10 dk	20 dk	30 dk	1 saat	2 saat	4 saat	8 saat	12 saat	24 saat
1	0,414	0,474	1,191	1,645	2,094	1,449	0,976	0,472	0,221
2	0,372	0,693	0,953	1,305	1,725	1,182	0,751	0,657	0,235
3	0,665	0,781	1,679	2,300	2,351	1,640	0,901	0,423	0,186
4	0,640	0,734	1,360	1,900	1,996	1,968	1,224	0,767	0,439
5	0,437	0,500	1,256	1,735	2,209	1,528	1,030	0,497	0,233
6	0,622	0,731	1,572	2,153	2,201	1,535	0,843	0,396	0,174
7	0,334	0,588	1,136	1,863	1,638	1,543	1,072	0,681	0,358
8	0,363	0,637	0,847	1,033	1,387	1,221	0,165	0,167	0,229
9	0,352	0,781	1,622	1,735	2,288	1,944	1,234	0,844	0,340
10	0,285	0,633	1,314	1,405	1,853	1,575	0,999	0,683	0,275

Tablo 4-3 Jenerik İlaç Uygulamasından Elde Edilen Plazma Konsantrasyon Değerleri (µg/ml)

Sıra No	10 dak	20 dak	30 dak	1 saat	2 saat	4 saat	8 saat	12 saat	24 saat
1	0,288	0,507	0,871	1,122	1,351	0,967	0,688	0,594	0,284
2	0,713	1,567	1,966	2,021	2,285	1,417	0,893	0,464	0,233
3	0,395	0,582	0,802	1,611	1,852	1,801	0,935	0,681	0,249
4	0,320	0,563	0,966	1,245	1,500	1,073	0,764	0,659	0,315
5	0,266	0,469	0,805	1,038	1,250	0,894	0,636	0,549	0,262
6	0,620	1,363	1,710	1,758	1,988	1,232	0,776	0,404	0,203
7	0,495	0,634	0,877	1,324	1,701	1,560	0,872	0,560	0,317
8	0,323	0,545	0,867	1,493	1,871	1,682	1,185	0,929	0,534
9	0,532	0,682	0,942	1,423	1,828	1,677	0,937	0,602	0,340
10	0,461	0,591	0,817	1,234	1,585	1,454	0,812	0,522	0,295



Şekil 4-7 Orjinal İlaç ve Jenerik İlaç Plazma Konsantrasyon/Zaman Eğrisi



Şekil 4-8 Orjinal İlaç ve Jenerik İlaç Logaritmik Plazma Konsantrasyon/Zaman Eğrisi

Tablo 4-4 Orjinal İlaça Ait Logaritmik Dönüştürme Yapılmamış Değerler

Sıra No	t_{max} (saat)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$AUC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$)	$AUC_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$)	$AUMC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat}^2/\text{ml}$)	$AUMC_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat}^2/\text{ml}$)	$MRT_{(0-t)}$ (saat)	$MRT_{(0-\infty)}$ (saat)	$t_{1/2}$ (saat)
1	2	2,09	17,86	20,43	137,51	229,06	7,70	11,21	8,06
2	2	1,73	16,75	19,86	145,26	260,92	8,67	13,14	9,17
3	2	2,00	24,30	31,62	213,76	511,11	8,80	16,17	11,55
4	2	2,21	18,84	21,54	144,95	241,44	7,70	11,21	8,06
5	2	2,20	17,39	19,28	120,55	186,80	6,93	9,69	7,56
6	2	1,70	18,26	23,58	157,20	374,14	8,61	15,87	11,63
7	3	1,35	17,96	22,35	169,35	337,37	9,43	15,10	9,93
8	2	1,87	24,48	35,39	238,26	722,64	9,73	20,42	14,15
9	2	1,83	19,62	25,31	168,87	400,81	8,61	15,84	11,61
10	2	1,59	17,01	21,96	146,43	348,02	8,61	15,85	11,62
ORT	2,1	1,86	19,25	24,13	164,21	361,23	8,48	14,45	10,33
SD	0,3	0,26	2,69	5,04	34,21	150,95	0,79	3,01	2,01
VK	0,14	0,14	0,14	0,21	0,21	0,42	0,09	0,21	0,19

Tablo 4-5 Orjinal İlaça Ait Logartimik Dönüştürülmüş Değerler

Sıra No	C _{max} (µg/ml)	AUC _(0-t) (µg.saat/ml)	AUC _(0-∞) (µg.saat/ml)	AUMC _(0-t) (µg.saat ² /ml)	AUMC _(0-∞) (µg.saat ² /ml)	MRT _(0-t) (saat)	MRT _(0-∞) (saat)	t _{1/2} (saat)
1	0,74	2,88	3,02	4,92	5,43	2,04	2,42	2,09
2	0,55	2,82	2,99	4,98	5,56	2,16	2,58	2,22
3	0,69	3,19	3,45	5,36	6,24	2,17	2,78	2,45
4	0,79	2,94	3,07	4,98	5,49	2,04	2,42	2,09
5	0,79	2,86	2,96	4,79	5,23	1,94	2,27	2,02
6	0,53	2,90	3,16	5,06	5,92	2,15	2,76	2,45
7	0,30	2,89	3,11	5,13	5,82	2,24	2,71	2,30
8	0,63	3,20	3,57	5,47	6,58	2,28	3,02	2,65
9	0,60	2,98	3,23	5,13	5,99	2,15	2,76	2,45
10	0,46	2,83	3,09	4,99	5,85	2,15	2,76	2,45
GEORT	0,59	2,95	3,16	5,08	5,80	2,13	2,64	2,31
SD	0,15	0,13	0,19	0,19	0,38	0,10	0,21	0,20
VK	0,25	0,04	0,06	0,04	0,07	0,04	0,08	0,09

Tablo 4-6 Jenerik İlaça Ait Logartimik Dönüştürme Yapılmamış Değerler

Sıra No	t _{max} (saat)	C _{max} (µg/ml)	AUC _(0-t) (µg.saat/ml)	AUC _(0-∞) (µg.saat/ml)	AUMC _(0-t) (µg.saat ² /ml)	AUMC _(0-∞) (µg.saat ² /ml)	MRT _(0-t) (saat)	MRT _(0-∞) (saat)	t _{1/2} (saat)
1	2,00	1,35	15,12	20,12	140,96	349,36	9,32	17,36	12,22
2	2,00	2,29	18,51	21,51	136,72	247,01	7,38	11,49	8,90
3	2,00	1,85	19,86	22,86	164,10	272,31	8,26	11,91	8,36
4	2,00	1,25	13,97	18,58	130,22	321,83	9,32	17,32	12,19
5	2,00	1,99	16,11	18,72	118,98	215,30	7,39	11,50	8,92
6	2,00	1,86	20,58	26,08	181,82	398,30	8,84	15,28	10,65
7	2,00	1,39	9,67	20,84	66,67	1082,25	6,90	51,93	46,37
8	2,00	2,29	24,41	28,69	207,33	363,88	8,49	12,68	8,72
9	2,00	1,85	19,76	23,22	167,80	294,30	8,49	12,68	8,72
10	2,00	1,99	21,23	24,93	180,21	315,70	8,49	12,66	8,71
ORT	2,00	1,81	17,92	22,55	149,48	386,02	8,29	17,48	13,38
SD	0,00	0,35	4,03	3,11	37,79	237,82	0,78	11,68	11,09
VK	0,00	0,19	0,22	0,14	0,25	0,62	0,09	0,67	0,83

Tablo 4-7 Jenerik İlaça Ait Logartimik Dönüştürülmüş Değerler

Sıra No	C _{max} (µg/ml)	AUC _(0-t) (µg.saat/ml)	AUC _(0-∞) (µg.saat/ml)	AUMC _(0-t) (µg.saat ² /ml)	AUMC _(0-∞) (µg.saat ² /ml)	MRT _(0-t) (saat)	MRT _(0-∞) (saat)	t _{1/2} (saat)
1	0,30	2,72	3,00	4,95	5,86	2,23	2,85	2,50
2	0,83	2,92	3,07	4,92	5,51	2,00	2,44	2,19
3	0,62	2,99	3,13	5,10	5,61	2,11	2,48	2,12
4	0,22	2,64	2,92	4,87	5,77	2,23	2,85	2,50
5	0,69	2,78	2,93	4,78	5,37	2,00	2,44	2,19
6	0,62	3,02	3,26	5,20	5,99	2,18	2,73	2,37
7	0,33	2,27	3,04	4,20	6,99	1,93	3,95	3,84
8	0,83	3,19	3,36	5,33	5,90	2,14	2,54	2,17
9	0,62	2,98	3,15	5,12	5,68	2,14	2,54	2,17
10	0,69	3,06	3,22	5,19	5,75	2,14	2,54	2,16
GEOORT	0,53	2,84	3,10	4,96	5,83	2,11	2,71	2,38
SD	0,20	0,25	0,14	0,30	0,42	0,10	0,43	0,49
VK	0,39	0,09	0,04	0,06	0,07	0,05	0,16	0,21

Tablo 4-8 Orjinal ve Jenerik İlaça Ait Değerlerin %90 Güven Aralığında Alt ve Üst Sınırları

Farmakokinetik Parametre	Orjinal İlaç Ortalaması±SD	Jenerik İlaç Ortalaması±SD	Jenerik/Orjinal x 100	%90 Güven Aralığı	
				Alt Limit	Üst Limit
AUC_(0-t)	19,25±2,69	17,92±4,03	93,09	81,00	108,65
AUC_(0-∞)	24,13±5,04	22,55±3,11	93,45	92,22	102,61
C_{max}	1,86±0,26	1,81±0,35	97,31	73,38	100,69
t_{max}	2,10±0,30	2,00±0,00	95,23	93,90	137,68
AUMC_(0-t)	164,21±34,21	149,48±37,79	91,03	86,35	114,31
AUMC_(0-∞)	361,23±150,95	386,02±237,82	106,86	54,21	130,60
MRT_(0-t)	8,48±0,79	8,29±0,78	97,76	102,60	111,37
MRT_(0-∞)	14,45±3,01	17,48±11,68	120,96	44,60	138,62
t_{1/2}	10,33±2,01	13,38±11,09	129,53	29,09	142,65
ln AUC_(0-t)	2,94±0,13	2,84±0,25	96,57	80,85	114,88
ln AUC_(0-∞)	3,16±0,19	3,10±0,14	98,10	91,96	102,43
ln C_{max}	0,59±0,15	0,53±0,20	89,83	74,03	100,84
ln AUMC_(0-t)	5,08±0,19	4,96±0,30	97,63	85,22	124,69
ln AUMC_(0-∞)	5,80±0,38	5,83±0,42	100,51	77,37	130,07
ln MRT_(0-t)	2,13±0,10	2,11±0,10	99,06	102,26	111,89
ln MRT_(0-∞)	2,64±0,21	2,71±0,10	102,65	76,07	140,45
ln t_{1/2}	2,31±0,09	2,38±0,49	103,03	73,07	143,85

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde hayvan sağlığı alanında ilaç kullanımını her geçen gün artış göstermekle birlikte bu ilaçların büyük çoğunluğunu antibakteriyel ilaçlar oluşturmaktadır. Hayvan sağlığı hizmetlerinde bakteriyel hastalıkları tedavi etmek, enfeksiyöz hastalıklarla mücadele, bulaşıcı hastalıklarda bakteriyel etkenin yayılmasını önlemek ve zoonotik hastalıkların insanlara bulaşma tehlikesini en aza indirmek için kullanılan antibiyotiklerin (Nadelman ve ark 2001; Kemper 2008) tüketim miktarları sadece ABD’de tıp alanındaki tüketimin 8 katıdır (Yarsan 2015). Avrupa Veteriner İlaçları Tüketim İzleme (ESVAC) projesi kapsamında EMA tarafından yayımlanan raporlarda ise Avrupa Birliği ülkeleri genelindeki veteriner antibiyotik tüketimi 2010 yılında 4802,0 ton iken bu rakam %88 lik bir artış ile 2014 yılında 9009,5 tona ulaşmıştır (ESVAC 2010; ESVAC 2014). Dünya hayvancılık alanında antibiyotik kullanım oranının önümüzdeki yıllarda da artış göstereceği ve bu oranın sadece 2010-2030 yılları arasında % 67 düzeyinde olacağı öngörülmüştür (Colignon ve Voss 2015). Ülkemizdeki resmi tüketim miktarları bilinmemekle birlikte Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre, 2016 yılı itibariyle ruhsatlı veteriner ilaç sayısı yaklaşık 2200 düzeyinde ve bunların da büyük çoğunluğunun (900-1000 arası) antibakteriyel ilaç niteliğinde olduğu bildirilmektedir (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2016).

Son yıllar içinde bu denli büyüyen ve gelecek yıllarda da büyümesi ön görülen pazara dünya genelinde pek çok firma, orjinal veya jenerik ilaç üretimi ile katkı sağlamaktadır. Patent korumasının sona ermesi ile birlikte pazara giren jenerik ilaçların, serbest pazar koşullarında tüketicinin ucuz ilaç tüketimine olanak sağlaması, orijinal ilaçların pazar payının önemli bir oranda erimesine yol açmaktadır. Dolayısıyla birey ve ülke bazında sağlık harcamalarında önemli bütçe tasarruflarının sağlandığı belirlenmiştir (Karakoç 2005). Sadece orijinal ürün yerine jenerik ürün kullanımı ile 1988 yılında ABD’de elde edilen tasarruf miktarı 2 milyar \$ iken, 2005 yılında bu rakam % 4250 oranında artarak 87 milyar \$, 2014 yılında ise 254 milyar \$’a ulaşmıştır (Kanzık 1993). Diğer bir raporda ise 2005-2014 yılları arasında ABD’de orjinal ilaç yerine jenerik ilaç kullanımıyla 1,68 trilyon \$ düzeyinde ekonomik kazanç sağlandığı bildirilmiştir (GPhA 2015). Benzer şekilde, Kanada Jenerik İlaç Birliği tarafından yayımlanan veriler doğrultusunda, 2014 yılında Kanada da jenerik ilaç kullanımı ile elde edilen tasarruf miktarının 15 milyar \$ olarak hesaplandığı belirtilmiştir (CGPA 2016).

İlaç sektöründe orjinal ve jenerik ilaç üreticileri arasındaki rekabet sadece maliyet ve fiyatla sınırlı olmayıp güvenlik, etkinlik ve kalite alanlarında da değerlendirmeleri zorunlu kılmıştır (OECD 2001; Karakoç 2005). Bu doğrultuda bilim insanları ve resmi kurumlar, her iki ilacın etkinlik ve güvenliği ile ilgili karşılaştırmaların yapılabilmesi için biyoeşdeğerlik çalışmaları üzerinde yoğunlaşmaya başlamışlardır (Or ve ark 1994). Sonuçları tüketici, hekim, halk sağlığı, üretici ve uluslar arası ticaret yönüyle de büyük önem taşıyan bu çalışmalar; ABD ve AB'nde, beşeri ilaçlarda olduğu gibi, veteriner hekimliği ilaçlarında da titizlikle uygulanmaktadır (Alp 2009). Ülkemizde, Sağlık Bakanlığı tarafından alınan kararlar gereğince 1994 yılından bu yana jenerik ilaçların ruhsatlandırma başvurularında biyoeşdeğerlik çalışmalarının sunulması zorunlu hale getirilmiştir (Tugay 2013). Bu kapsamda Toprak ve arkadaşları (2015) 2008-2014 yılları arasında klinik çalışmalara dayalı raporlarında; ülkemiz beşeri ilaç alanında 631 biyoeşdeğerlik çalışmasının gerçekleştirildiğini, bu rakamın yıllara göre dağılımının ise kademeli bir artış şeklinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Veteriner müstahzarlarında biyoeşdeğerlik çalışmaları ise 2011 yılından sonra yasal olarak zorunlu kılınmıştır. Ekonomik imal edilip daha ucuza satıldıklarından dolayı veteriner alanda yaygın kullanım potansiyeli bulunan jenerik ilaçların, biyoeşdeğerliğinin kalite, etkinlik ve güvenilirlik boyutunda değerlendirilmesinin hayvan ve halk sağlığı açısından önemi yadsınamaz niteliktedir (Alp 2009; Şahin 2012). Özellikle veteriner hekimlerin daha rasyonel ilaç kullanımlarına olanak sağlayarak, beklenen etkinin açığa çıkmama riskine karşı etiket dışı kullanımları sınırlayabilir. Bu durum hayvan sağlığı ve refahı üzerinde doğrudan, olası kalıntı problemlerinin önlenmesiyle de insan sağlığı açısından dolaylı etki olarak değerlendirilebilir.

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de antibiyotiklerin sahada uygun olmayan şekillerde ve yasal olmayan kullanımları sonucu kalıntı oluşumu, halk sağlığını tehdit potansiyeli olan ciddi bir problem olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda alerjik reaksiyonlara ve fermente gıdaların kalitelerinde düşüşe neden olabilen hayvansal ürünlerdeki antibiyotik kalıntılarının (Yıbar ve Soyutemiz 2013) antibiyotiklere dirençli bakteri suşlarının sayısındaki artıştan doğrudan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Cháfer-Pericás ve ark 2010). Antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımları ile şekillenen bu sorunların en aza indirebilmesi, tarım sektörünün yetkili otoriteleri ile ilaç endüstrisinin koordine bir şekilde çalışması gerektirmektedir. Dolayısıyla kalıntı izleme programlarının yanı sıra ilaçların piyasaya sürülme öncesi ve sonrasında kalite yönünden kontrollerinin sağlanması efektif bir yol olarak görülebilir. Bu yaklaşımla araştırmamızda, dünya genelinde süt sığırları yetiştiriciliğinde

yaygın kullanılan ve sütte kalıntı bırakmayan seftiofur etken maddesini içeren iki farklı ilacın biyoeşdeğerliği incelenerek kalite ve güvenilirliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Ülkemizde TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ruhsatlanmış seftiofur içeren toplam 28 ürün bulunmaktadır. Bu ürünlerin 16 adedi ise ülkemizde üretilmektedir (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2016). Ancak araştırma konumuza ilişkin taramalarda, ülkemizde seftiofur içeren ruhsatlı ürünler ile ilgili yapılmış herhangi biyoeşdeğerlik çalışmasının bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Seftiofur içeren orjinal ürün ile jenerik ürünün hedef hayvan türünde kinetik verilerin karşılaştırılarak biyoeşdeğerlik düzeyinin değerlendirilmesi kapsamında kullanılacak jenerik ürünün seçimi, saha da veteriner hekimlerin tercihleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamızın ilk aşamasında; her iki ilaç kalite kontrol amacı ile etken madde miktarı yönünden incelenmiştir. Orjinal ilaçta etken madde miktarı 53,2 mg/ml, jenerik ilaçta ise 50,65 mg/ml olarak, yoğunlukları ise orjinal ilaçta 0,935 g/cm³, jenerik ilaçta ise 0,931 g/cm³ olarak saptanmıştır. Her iki üründe saptanan etken madde değerlerinin prospektüslerinde belirtilen 50 mg/ml miktarını sağladığı ve 2011 yılında EMA tarafından yayımlanan veteriner tıbbi ürünlerin biyoeşdeğerlik çalışma rehberinde belirtildiği gibi orjinal ve jenerik ilacın etken madde miktarları arasındaki farkın %5'ten az olduğu görülmüştür (EMA 2011).

Seftiofur ilk olarak 1988 yılında Upjohn Firması tarafından Naxcel sodyum tuzu sonrasında daha stabil form olan seftiofur Excenel hidroklorit tuzu şeklinde veteriner sağaltıma sunulmuştur (Hassan ve ark 2016). İlacın sodyum tuzunun 1.1-2.2 mg seftiofura eşdeğer/kg dozlarının (K.İ yolla) sığırların *P. haemolytica*, *P. multocida* ve *H. somnus* ile ilişkili solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (Brown ve ark 2000, FDA 2006). Hidroklorür tuzu ise 1998 yılında sığırların solunum hastalıklarının yanısıra interdiyal nekrobasillozisinin tedavisinde 1.1 - 2.2 mg/kg dozlarda (K.İ. ya da S.K yolla) kullanımı onay almıştır (FDA 1998). İlişkili bir şekilde araştırmamızda kullanılan doz, seftiofurun FDA (1998) ve EMA (1999) tarafından sığırlarda kullanımı önerilen terapötik doz aralığına dayalı bir şekilde seçilmiştir. Ayrıca bu doz, orjinal ve jenerik ilaca ait TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık bakanlığı tarafından onaylanan prospektüslerde belirtilen ve benzeri çalışmalarda kullanılan ile uyumludur (Courtin ve ark 1997; Okker ve ark 2002; Jacobson ve ark 2006). Tek doz iki dönemli ve çapraz geçişli çalışma dizaynı ile

gerçekleştirilen araştırmada; iki ilaç uygulaması arasında plazma veya vücut dokularında olası ilaç kalıntı riskini engellemek ve ölçümsel hataların önüne geçebilmek için iki haftalık vucuttan arınma periyodu bırakılmıştır. EMA tarafından yayımlanan veteriner tıbbi ürünlerin biyoeşdeğerlik çalışma rehberinde (2011a) arınma süresine ilişkin olarak iki uygulama arasında ilacın eliminasyon yarılanma ömrünün en az 5 katı kadar süre beklenmesini önerilirken (EMA 2011a), bu sürenin ilacın eliminasyon yarılanma ömrünün 10 katına kadar uzayabileceği belirtilmektedir (Toutain ve Koritz 1997). Araştırmamızda ise iki haftalık arınma periyodu; seftiofurun farmakokinetik profilinin sığırlarda (Brown ve ark 2000; El-Gendy ve ark 2007), keçilerde (Courtin ve ark 1997), koyunlarda (Craigmill ve ark 1997) ve domuzlarda (Brown ve ark 1999) değerlendirildiği çok sayıdaki araştırmadaki veriler ve EMA klavuzu (2011) dikkate alınarak uygulanmıştır.

Seftiofurun hidroklorür tuzu; sığırlara kas içi ve deri altı yolla uygulanabilen (FDA 2006) bir bileşiktir. İlacın sığırlarda uygulaması sonrasında enjeksiyon bölgesinde şişlik, apse, ölüm şeklinde çok sayıda yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Woodward 2009). Araştırmamızda ise benzer kondüsyona sahip 10 sığıra iki farklı ürün şeklinde terapötik dozlarda uygulanan seftiofur bileşiklerinin enjeksiyon sonrası kan alım periyotları süresince herhangi bir yan etkiye (enjeksiyon yerinde kızarıklık, ishal gibi) neden olmadığı saptanmıştır.

Farmakokinetik çalışmalar, ilaçların belirli zaman diliminde konsantrasyon değişimlerini tanımlamak için kullanılan, matematiksel modellemeye dayalı incelemeleri içermektedir. Bu kapsamda mikrobiyolojik, spektrofotometrik, kromatografik metodlarla ilaçların vücuttaki etkilerinin ölçümü mümkün olabilmektedir (Sudamrao 2015). Biyoeşdeğerlik çalışmalarında, vücut sıvılarında ilaç etken madde düzeylerinin belirlenmesinde kromatografi, sıklıkla tercih edilen duyarlı ve etkin bir analitik yöntem olarak kabul edilmektedir (Aydoğan 2015). Seftiofurun çeşitli vücut ve sıvılarındaki düzeylerinin mikrobiyolojik yöntemlerle izlendiği bazı farmakokinetik çalışmalar (Jaglan et al 1994, El-Gendy ve ark 2007, Daundkar Prashant Sudamrao, 2015) bulunmasına rağmen kullanılan yöntemin duyarlılığına ilişkin yeterli veriye ulaşılamamakla birlikte miktar analizine dayalı verilerin ana bileşikle sınırlı olduğu görülmektedir. Diğer taraftan seftiofur içeren mustahzarların farklı hayvan türlerine uygulanması ile gerçekleştirilen farmakokinetik çalışmalarda da, etken madde ve metabolit miktarlarının genellikle kromatografik metodlar ile analiz edildikleri saptanmıştır (Brown ve ark 2000, Okker ve ark

2002, Jacobson ve ark 2006, Drew ve ark 2004, Courtin ve ark 1997, Dumanceaux ve ark 2005, Goudah 2007).

Orjinal ve jenerik ürünlerin uygulanması sonrası sığır plazmalarındaki seftiofur düzeyleri De Baere ve ark (2004), Jacobson ve ark (2006) tarafından tanımlanan metodların modifikasyonları ile saptanmıştır. Metod ile elde edilen geri kazanımın yüksek (% 78-83) , doğrusal standart eğrinin r^2 değerinin 1' e yakın ($r^2=0,9947$), tesbit ve hesaplanabilir limitlerinin (LOD değeri 0,19 $\mu\text{g/ml}$ ve LOQ değeri 0,58 $\mu\text{g/ml}$) düşük olduğu belirlenmiştir. Ulaşılan bu sonuçların, seftiofurun tayininde kullanılan diğer metodlarla elde edilenlere benzer, EMA ve FDA Biyoanalitik Metod Validasyon Kılavuzuna (EMA 2011a; FDA 2001) uygun nitelik gösterdiği tesbit edilmiştir (Brown ve ark 2000; De Baere ve ark 2004; Jacobson ve ark 2006; Woodrow ve ark, 2015).

Seftiofurun vücut sıvılarındaki düzeylerinin saptanması esasına dayanarak gerçekleştirilen farmakokinetik çalışmalarda; hayvan türü, uygulama yolu ve diğer faktörler dikkate alınarak kompartmansız (Meyer ve ark 2009; Tantituvanont ve ark 2009; Hall ve ark 2011; Woodrow ve ark 2015; Fernandez-Varon ve ark 2016) ve/veya kompartmanlı (Drew ve ark 2004; Liu ve ark 2011; Meegan ve ark 2013; Khalil ve ark 2016) modeller kullanılmıştır. Araştırmamızda ise seftiofur içeren her iki ilacın farmakokinetiğinin hesaplanmasında; EMA tarafından 11 Nisan 2011 tarihinde yayımlanan Veteriner Medikal Ürünler için Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Yürütülmesi Rehberi esas alınmış ve farmakokinetik parametrelerin belirlenmesinde non-kompartman modelin daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Seftiofurun plazmadaki konsantrasyon değerlerine dayalı incelemede; orjinal ve jenerik ilaçların plazma konsantrasyon zaman eğri profillerinin benzer olduğu, farmakokinetik parametrelerinin de istatistiksel yönden farklılık göstermediği saptanmıştır. Sığırlara aynı dozda uygulanan seftiofur bileşiklerinin (orjinal ve jenerik ürün) sırasıyla 2.10 ve 2.00 saatlerde 1.86 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.81 $\mu\text{g/ml}$ ile en yüksek plazma konsantrasyon değerlerine ulaştığı ve 24. saatte plazma düzeylerinin ise 0,269 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,303 $\mu\text{g/ml}$ olduğu belirlenmiştir. Benzer kapsamda gerçekleştirilen diğer araştırmalarda ise seftiofurun maksimum plazma konsantrasyon değerleri sığırlarda; 13,9 $\mu\text{g/ml}$ (Brown ve ark 2000), koyunlarda; 4,33 $\mu\text{g/ml}$ (Craigmill ve ark 1997), keçilerde; 2,70 $\mu\text{g/ml}$ (Courtin ve ark 1997), manda buzağlarında; 9,66 $\mu\text{g/ml}$, friesland buzağlarında; 5,54 $\mu\text{g/ml}$ (El-Gendy ve ark 2007), domuzlarda; 11,8 $\mu\text{g/ml}$ (Brown ve ark 1999), geyiklerde 3,98 $\mu\text{g/ml}$ (Drew ve ark 2004), develerde ise 10,34 $\mu\text{g/ml}$ (Goudah 2007) olarak tesbit edilmiştir.

Araştırmamız sonucunda her iki ilaca ait en yüksek seftiofur plazma konsantrasyon değerlerinin, diğer araştırmacılar tarafından sığır ve diğer türlerde belirlenenlerden yaklaşık 1.5- 7.6 kat daha düşük düzeyde oluşu, seftiofurun farklı dozlarının kullanımıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Keçilerde seftiofur sodyumun iki farklı dozunun (1.1 ve 2.2 mg/kg) uygulanması sonucu saptanan maksimal plazma ilaç konsantrasyon değerinin artan doza bağlı bir şekilde yükseliş (yaklaşık 1.81 kat) göstermesi (Courtin ve ark 1997) bu görüşü destekler niteliktedir. Diğer taraftan, uygulama sonrası emilerek sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarını yansıtan diğer bir kinetik parametre olan $AUC_{(0-24)}$ (EMA 2011a) değerlerinin, incelenen iki ilaç için benzer düzeyde (sırasıyla; 19.25 $\mu\text{g.saat/ml}$ ve 17.92 $\mu\text{g.saat/ml}$) olduğu saptanmıştır. Ancak seftiofurun 2.2 mg/kg dozunun kullanıldığı diğer araştırmacılar tarafından belirlenen bu parametreye ait verilerin sığırlarda; 42.9 $\mu\text{g.saat/ml}$ (FDA 1998), manda buzağlarında; 34.81 $\mu\text{g.saat/ml}$, friesian buzağlarında 75.38 $\mu\text{g.saat/ml}$ (El-Gendy ve ark 2007), keçilerde; 38.17 $\mu\text{g.saat/ml}$ (Fernandez-Varon, 2016), develerde; 68,70 $\mu\text{g.saat/ml}$ (Goudah 2007) ile araştırmamız sonucu elde edilenlerden daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, hayvan modeli olarak sığır dışında farklı türlerin kullanıldığı diğer farmakokinetik çalışmalarda da (Courtin ve ark 1997; Craigmill ve ark 1997; Goudah 2007); seftiofura ait AUMC, MRT gibi diğer parametrelerin çalışmamızda elde edilenlerden daha yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. Bu durumun; türler arasındaki önemli anatomik ve fizyolojik farklılıklardan (Neirinckx ve ark. 2010) ve kullanılan doz miktarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Antimikrobiyal ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine bağlı olarak optimal dozlarda rasyonel kullanımları, bu grup ilaçlardan maksimum bir etkinin sağlanmasına ve patojenik organizmalarda direnç gelişiminin önlenmesine olanak sağlamaktadır (Courtin ve ark 1997; Aboubakr 2013). Araştırmamız kapsamında incelenen bazı farmakokinetik parametrelere (C_{max} ve AUC gibi) ait verilerin diğer araştırmacılar tarafından saptanandan daha düşük düzeyde oluşu, kullanılan dozla ilişkilendirilmiştir. Ancak bu farklılıkların farmakodinamik profile yansımaları; ilacın plazmadaki konsantrasyonunun hedef patojenlere karşı aktivitesi ile değerlendirilebilir. Zamana bağlı aktivite gösteren sefalosporinler gibi β -laktam antibiyotikler, plazmadaki terapötik konsantrasyonlarının MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerinin üzerinde kalma sürelerinin ($T > \text{MİK}$) uzunluğuna bağlı olarak etkinliğinin, doğrusal bir artış gösterebileceği kabul edilmektedir (Yamantürk 2000; Landoni ve Albarellos 2015). Dolayısıyla eşik değerinin altındaki dozajların antibiyotik direncinin gelişimini teşvik edebileceği gerçeği göz ardı

edilmemelidir (Gao ve ark. 2011). Etkinlikleri plazma veya dokulardaki maksimum konsantrasyonları ile yakın ilişki içinde olmayan bu grup antibiyotiklerin etkinlik sınırı, hedef bakteriler için belirlenen MİK değerleridir (Frimodt-Moller ve ark 1986, Kays ve ark 1992). Brown ve arkadaşları (2000); seftiofur için *P. haemolytica* (*Mannheimia* spp), *P. multocida* ve *Haemophilus somnus*'a karşı esas aldıkları MİK değerini (MİK \leq 0.06 μ g/ml) en az % 300 oranında aşan bir eşik değer (0.2 μ g/ml) belirlemişler ve bu değer in sığırlarda görülen çoğu patojenlere karşı klinik etkinlik gösterebilecek bir ölçü olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde, güncel CLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) kılavuzlarında genel olarak MİK < 2 μ g/ml düzeyinde bakteri izolatlarının seftiofura duyarlı olarak kabul edildiği de belirtilmektedir (Hall ve ark, 2011; Woodrow ve ark 2015). Bu yaklaşımla araştırmamızda, ilaç uygulamasını takiben son numune alınımına kadar geçen süre zarfında her iki ilacın plazma ilaç konsantrasyonları incelenerek en düşük değer in orjinal ilaç için 0,26 μ g/ml \pm 0,08, jenerik ilaç için 0,30 μ g/ml \pm 0,08 olduğu hesaplanmıştır. Ulaşılan verilerin Brown ve arkadaşları (2000) tarafından belirlenen eşik değerden (0,2 μ g/ml) ve Salmon ve ark (1996) tarafından *P. multocida*, *H. somnus*, *Fusobacterium Necrophorum*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* için belirlenen MİK₉₀ değerlerinden (sırasıyla 0,0039 μ g/ml, 0,0019 μ g/ml, 0,06 μ g/ml, 0,0078 μ g/ml, 0,03 μ g/ml ve 0,0039 μ g/ml) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan Tantituvanont ve arkadaşları (2009), seftiofurdan maksimum bir etkinin elde edilebilmesi için plazma serbest ilaç konsantrasyonunun en az doz aralığının % 50-70'i kadar bir süre, patojenlerin MİK₉₀ değerinin üzerinde bulunmasının gerekliliğine dikkat çekmişlerdir. Seftiofur'un sığırlardan elde edilen patojen izolatlarına karşı MİK₉₀ değerlerinin belirlendiği ülkemiz sınırları içerisinde gerçekleştirilen bir çalışmaya ulaşılmamasına rağmen, Avrupa Birliği Ülkelerinde 2002-2006 yıllarında *P. multocida* ve *M. haemolytica* için sırasıyla 0.008 μ g/ml ve 0.015 μ g/ml (Jong ve ark,2014), Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada 'da ise 2001-2001 yıllarında *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *Histophilus somni* için sırasıyla < 0.03 , \leq 0.03 ve \leq 0.03 olarak saptanmıştır (Baker 2006). Bu veriler esas alındığında; araştırmamız kapsamında her iki ilacın 24 saat süresince belirlenen plazma konsantrasyon düzeylerinin, birçok sığır patojenin MİK₉₀ değerlerinin oldukça üstünde olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla sığırlara uygulanan her iki ilacın 1.1 mg/kg dozunun, 24 saat süreyle klinik olarak etkin cevap oluşturabilecek ve dirençli suşların görülme olasılığının düşük güvenli doz olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Araştırmamızın son aşamasında, orjinal ve jenerik seftiofur ilaç örneklerinin biyoeşdeğerlik durumları incelenmiştir. Biyoeşdeğerlik çalışmalarında; öncelikle değerlendirilmesi öngörülen parametreler çeşitli kaynaklarda farklılık göstermektedir. Bu kapsamda; Toutain ve Koritz (1997), Posyniak ve arkadaşları (2001) AUC değerini birinci öncelikli parametre olarak kabul ederken, EMA klavuzunda (2011a) AUC ve C_{max} öncelikli parametreler olarak nitelenmektedir. EMA tarafından istatistiksel değerlendirme dışında tutulan (EMA 2011) ve resmi kurumlar tarafından çok sık talep edilmemeyen t_{max} 'in ise yan etkiler veya hızlı salınım söz konusu olduğunda önemle dikkate alınabileceği belirtilmektedir (Toutain ve Koritz 1997, Tugay 2013). Bu parametrelerin yapılan biyoeşdeğerlik çalışmalarında matematiksel olarak nasıl değerlendirileceği, resmi kurumlar tarafından istatistiksel kriterler ile belirlenmiştir. EMA tarafından 2011 yılında yayımlanan kılavuzda AUC ve C_{max} değerleri için jenerik/orjinal oranının 0,80-1,25 sınırları içinde ve %90 güven aralığında olması gerektiği belirtilmiştir (EMA 2011a). Yine FDA yayınladığı klavuzlarda AUC ve C_{max} değerleri için jenerik/orjinal oranını 0,80-1,20 olarak belirlemiş fakat daha sonra olası hataları gidermek ve uyum sağlamak için oranı 0,80-1,25 olarak değiştirmiştir (Steinijans ve ark 1992). Biyoeşdeğerlik kararının verilmesinde ikincil parametre olarak kabul edilen ve örnekleme zamanına göre değişiklik gösteren t_{max} için jenerik/ orjinal oranının ise diğer parametrelerde olduğu gibi 0,8-1,25 sınırları içerisinde olması gerektiği bildirilmiştir (Yılmaz 2008).

Çalışmamızda Seftiofur HCl etken maddesi içeren orjinal ve jenerik ilaçların biyoeşdeğerlik durumlarının değerlendirilmesinde EMA tarafından belirtilen temel parametreler olan AUC_{0-24} ve C_{max} değerleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla AUC_{0-24} ve C_{max} değerleri için jenerik /orjinal oranları hesaplanmış ve elde edilen değerlerin 0,80- 1,25 sınırları içerisinde ve %90 güven aralığı içerisinde karşılaştırılmaları yapılmıştır. Temel parametre olarak değerlendirilen AUC_{0-24} ve C_{max} değerlerine ek olarak çalışmamızda t_{max} , $AUMC_{(0-\infty)}$ ve $MRT_{(0-\infty)}$ değerleride hesaplanarak her iki ürün bu parametreler yönünden de karşılaştırılmıştır.

Yapılan farmakokinetik hesaplamalar sonucunda orijinal ve jenerik ilaçlara ait C_{max} değerleri sırasıyla $1,86 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ ve $1,81 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak, her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuş ve C_{max} için jenerik/orjinal oranı $97,31 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Bu değer için %90 güven aralığı içinde olduğu görülmüştür ($73,38 < 97,31 < 100,69$). Logaritmik dönüşüm sonrası her iki ilaca

ait $\ln C_{max}$ değerleri $0,59 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ (orijinal) ve $0,53 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$ (jenerik) olarak saptanmıştır. Çift-tek yönlü test metodu ile her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuş ve jenerik/orjinal oranı $89,83 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan değerin %90 güven aralığı içinde olduğu grlmştir ($74,03 < 89,83 < 100,84$).

Test ve referans ilaçların biyoeşdeğerlik durumlarının değerlendirildiği bazı araştırmalarda (Sumano ve ark 2001; Rebuelta ve ark 2005; Sarıca ve Liman 2008; Tacca ve ark 2009; Badeci 2011; Ekici 2011), ilacın plazmada ulaştığı maksimum konsantrasyonu ifade eden bu parametrenin, jenerik-orijinal ilaç oranının %90 güven aralığında yer almadığı ve 0,80-1,25 limitlerinden düşük olduğu saptanmıştır. Mestorina ve ark (2016) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise test ürününün C_{max} değerinin referans üründen daha yüksek olduğu, jenerik/orjinal oranınının kabul edilir limitlerin üzerinde olduğu belirlenmiş ve test ürününün supra-biyoyararlanımına dikkat çekilmiştir. C_{max} değerindeki bu değişimlerin ilaçların biyoeşdeğer olmadığının bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve açığa çıkan farklılıkların ilaçların üretimi sırasında kullanılan taşıt maddelere bağlı olarak şekillenebildiği sonucuna ulaşılmıştır. (Tacca 2009).

Araştırmamızda $AUC_{(0-24)}$ değerleri orjinal ilaç için $19,25 \pm 2,69 \mu\text{g.saat/ml}$, jenerik ilaç için ise $17,92 \pm 4,03 \mu\text{g.saat/ml}$ olarak saptanmıştır. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. AUC için jenerik/orjinal oranı $93,09 \mu\text{g.saat/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan değerin %90 güven aralığı içinde olduğu grlmştir ($81 < 93,09 < 108,65$). $AUC_{(0-24)}$ değerinin doğal logartimalleri alınarak orijinal ilaca ait $\ln AUC$ $2,94 \pm 0,13 \mu\text{g.saat/ml}$, jenerik ilaca ait $\ln AUC$ $2,84 \pm 0,25 \mu\text{g.saat/ml}$ olarak saptanmıştır. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. $\ln AUC$ için $\ln AUC$ için jenerik/orjinal oranı $96,57 \mu\text{g.saat/ml}$, bulunan değerin %90 güven aralığı içinde olduğu grlmştir ($80,85 < 96,57 < 114,88$).

Sistemik dolaşıma ulaşan toplam ilaç miktarını yansıtan bu kinetik parametrenin (Jambhekar ve Breen 2009), ilaçların biyoeşdeğerlik düzeylerinin değerlendirildiği bazı çalışmalarda (Sumano ve ark 2001; Rebuelta ve ark 2005; Jermnak ve ark 2008) %90 güven aralığı ve 0,80-1,25 limitleri içerisinde olmadığı belirtilmiştir. AUC değerindeki bu değişimin ise kullanılan taşıt maddelere bağlı olarak etken maddenin yetersiz emiliminden kaynaklandığı ileri srlmştir (Sumano ve ark 2001a).

Elde edilen bulgulara göre toplam moment eğrisi altında kalan $AUMC_{(0-\infty)}$ hesaplanmış ve orjinal ilaca ait $AUMC_{(0-\infty)}$ $361,23 \pm 150,95 \mu\text{g.h}^2/\text{ml}$, jenerik ilaca ait $AUMC_{(0-\infty)}$ $386,02 \pm 237,82 \mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ olarak elde edilmiştir. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. $AUMC$ için jenerik/orjinal oranı $106,86 \mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan değer %90 güven aralığı içinde olduğu görülmüştür ($54,21 < 106,86 < 130,60$). $AUMC_{(0-\infty)}$ değerinin doğal logaritması alınarak $\ln AUMC_{(0-\infty)}$ değeri hesaplanmış ve orjinal ilac için $\ln AUMC$ $5,80 \pm 0,38 \mu\text{g.h}^2/\text{ml}$, jenerik ilaca ait $\ln AUMC$ $5,83 \pm 0,42 \mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ olarak elde edilmiştir. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. $\ln AUMC$ için jenerik / orjinal oranı $100,51 \mu\text{g.saat}^2/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan değer %90 güven aralığı içinde olduğu görülmüştür ($54,21 < 100,51 < 130,60$)

$MRT_{(0-\infty)}$ değerleri ayrı ayrı hesaplanmış orjinal ilaca ait $MRT_{(0-\infty)}$ değeri $14,45 \pm 3,01$ saat, jenerik ilaç için $MRT_{(0-\infty)}$ değeri $17,48 \pm 11,68$ saat olarak elde edilmiştir. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. MRT için jenerik/orjinal oranı $120,96$ saat olarak hesaplanmıştır. Bulunan değer %90 güven aralığı içinde olduğu görülmüştür ($44,60 < 120,96 < 138,62$). $MRT_{(0-\infty)}$ değerinin doğal logaritması alınmış ve $\ln MRT$ değeri hesaplanmış orjinal ilac için $\ln MRT$ $2,64 \pm 0,21$ saat, jenerik ilaca ait $\ln MRT$ $2,71 \pm 0,10$ saat olarak elde edilmiştir. Çift-tek yönlü test metodu kullanılarak her iki ortalamaya göre %90 güven aralığı oluşturulmuştur. $\ln MRT$ için jenerik/orjinal oranı $102,65$ saat olarak hesaplanmıştır. Bulunan değer %90 güven aralığı içinde olduğu görülmüştür ($76,07 < 102,65 < 140,45$).

Plazma ilaç konsantrasyon-zaman eğrisinden elde edilen MRT değeri, eliminasyon yarı ömrü 5 saatten daha kısa olan ve emilimi eliminasyondan daha hızlı olan ilaç formülasyonlarında (test ve referans ürün) MRT değerleri arasındaki fark absorpsiyon oranındaki farklılıkları saptamada kullanılan en güçlü parametredir. Eliminasyon yarı ömrü 5 saatten uzun olan ilaçların MRT değerlerine dayalı bir şekilde biyoeşdeğerliğin % 90 aralığında değerlendirilmesinin pratik bir yaklaşım olmadığı bildirilmektedir (Toutain ve Koritz 1997). Her ne kadar çalışmamızda test ve referans ilaçlara ait MRT değeri %90 güven aralığı ve 0,80-1,25 limitleri içinde olduğu tespit edilmişse de her iki ilacın yarı ömrünün (orjinal ve jenerik ürün için sırasıyla 10,33 saat ve 13,38 saat) 5 saat'ten uzun olduğu

belirlenmiştir. Dolayısıyla ilaçlarımızın biyoeşdeğerlik düzeylerinin incelenmesinde MRT değerleri belirleyici bir parametre olarak değerlendirilmeye alınmamıştır.

Sonuç olarak;

Seftiofur HCl içeren jenerik ve referans ürünün biyoeşdeğerlik yönünden incelendiği çalışmamızda her iki ilaca ait C_{max} ve $AUC_{(0-t)}$ değerleri ana parametre, t_{max} değeri ise ikincil parametre olarak dikkate alındı ve referans ile jenerik ürünler biyoeşdeğerlik yönünden karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde EMA (Avrupa Birliği), FDA (Amerika), Health Canada (Kanada), NIHS (Japonya), MCC (Güney Afrika) ve TGA (Avustralya) gibi resmi otoritelerin kabul kriteri olan 0,80-1,25 ve %90 güven aralığı dikkate alınarak C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ ve t_{max} değerlerine ait jenerik/orjinal oranı hesaplandı. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen sonuçların %90 güven aralığı ve 0,80-1,25 kabul sınırları içinde olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlar itibari ile incelenen jenerik ürünün orjinal ilaç ile biyoeşdeğer olduğu ve orjinal ilacın yerine güvenle kullanabileceği sonucuna varıldı.

Biyoeşdeğerlik kararının verilmesinde bilimsel olarak C_{max} ve $AUC_{(0-t)}$ değerlerinin ana parametre, t_{max} değerinin ise ikincil parametre olarak dikkate alınması önerilmesine rağmen, çalışmamızda AUMC, MRT, $t_{1/2}$ değerleride bu parametrelere ek olarak biyoeşdeğerlik kriterleri yönünden incelendi ve jenerik/orjinal oranının %90 güven aralığı ve 0,80-1,25 kabul sınırları içinde olduğu görüldü. Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızın sonucunda verilen biyoeşdeğerlik kararını desteklemektedir.

Çalışmamızda incelenen seftiofur içeren jenerik ürün ülkemizde pazarlanan 25 jenerik üründen sadece birtanesidir. Bu nedenle çalışmamız dışında kalan diğer 24 adet jenerik ürün ile ilgili biyoeşdeğerlilik durumlarının belirlenmesi yasal veya deneysel biyoeşdeğerlik çalışmaları ile verilebilecektir.

Ülkemizde veteriner ilaçlarına yönelik üretim, ithalat ve pazarlama izinleri TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı resmi gazetede yayımlanan “Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik” ile denetlenmekte ve yürütülmektedir. İlgili yönetmelikte biyoeşdeğerliğin zorunlu bir kriter olmasına rağmen ülkemizde yapılan biyoeşdeğerlik çalışmaları deneysel ve sınırlı sayıda kalmıştır. Yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmasına rağmen; Sarıca ve Liman (2008) ve Ekici (2011) gibi kimi araştırmacılar tarafından yapılan deneysel çalışmalarda incelenen ilaçların biyoeşdeğer

olmadıkları, Bideci (2011) tarafından yapılan çalışmada ise incelenen ürünün C_{max} yönünden biyoeşdeğer olmadığı ortaya konmuştur. Benzer şekilde yurtdışında Sumano ve ark (2001; 2001a), Rebuelte ve ark (2005) ve Jermnak ve ark (2008) gibi bazı bilim insanlarınca yapılan pek çok çalışmada yine incelenen ürünlerin biyoeşdeğer olmadıkları tespit edilmiştir. Ülkemizde ve dünya genelinde yapılan tüm bu çalışmalarda incelenen jenerik ürünlerin yetkili orotiteden ruhsatlı, kimyasal eşdeğer ve sahada kullanılan ilaçlar olduğu düşünüldüğünde biyoeşdeğerlik incelemelerinin zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Jenerik ilaçların orjinal ilaçların ekonomik alternatifleridir (AİFD 2016). Dünya genelinde jenerik ilaç kullanımına bağlı olarak elde edilen tasarruf miktarları milyar dolarlar ile ifade edilmekte ve yıllar içinde kullanımları artmaktadır (GPhA 2015, CGPA 2016). Ülkemizde ise sadece 2016 yılı ilk altı aylık dönemimde jenerik ilaç pazarı %22,6 'lık bir artış göstermiştir (IEIS 2016). Pazar ve üretim alanlarında bu denli hızlı bir büyüme gösteren jenerik ilaçlarda olması gereken dört temel özellikten biri olan "Ekonomik" olma koşulu diğer üç özellik olan "Etkinlik, Kalite ve Güvenilir" olma kriterleri ile desteklenmelidir (İskit 2014). Jenerik ilaçlarda etkinlik, kalite ve güvenilirliğin tespit edilmesinde biyoeşdeğerlik en önemli parametrelerden birisidir. Bu nedenle ulusal ve uluslararası alanlarda ekonomik kazanımların sağlanabilmesi için jenerik ilaçların biyoeşdeğerlik çalışmaları ile desteklenmesi önemli bir konudur.

Veteriner hekimlere güvenli ve ekonomik ilaç alternatifleri sunulması, olası kalıntı risklerinin bertaraf edilmesi ile halk sağlığının korunmasına yardımcı olunması, ülkemizde üretilen jenerik ürünlerin uluslararası kabul görmüş güvenilirlik kriterlerini karşılaması ile rekabet gücünün artırılması, orjinal ilaçlara ekonomik alternatifler sunulabilmesi ile ülke ekonomisi ve hayvancılığının desteklenmesi biyoeşdeğerlilik çalışmalarının yürütülmesi ile sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aboubakr, M. H. (2013). Evaluation of bioequivalence of two enrofloxacin formulations after intramuscular administration in goats. *Korean Journal of Veterinary Research*, **53**(2), 77-82.
- Akkan, A.,G., (2014) Farmakokinetik/Farmakodinamik Temel Tanımlar *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi* **28 (Ek-2)**, 82-85
- Alp, H., (2009) Veteriner Hekimlikte Biyoeşdeğerliğin Önemi ve Değerlendirilmesi *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* **4 (1)**, 69-76
- Altuntaş M., (2015) *Gıda Güvenliği*. Erişim: 06.05.2015
<http://www.tarimsal.com/tarimhaberleri/gidaguvvenligi.htm>
- AIFD (2016) *Orijinal İlaç Nedir?* Erişim: 12.12.2016 http://www.aifd.org.tr/yeni-ilaclar-ve-ar_ge/orijinal-ilac-nedir/
- Ayanoğlu G., (1981) Biyofarmasötik ve Klinik Farmakokinetik *Nazım Terzioğlu Matematik Araştırma Enstitüsü Baskı Atölyesi* 53-55
- Aydoğan H. (2015) *Bazı Antibiyotiklerin Voltametik Davranışların İncelenmesi ve Kantitasyon Koşullarının Belirlenmesi* Erişim Tarihi; 12.02.2017
<http://adutspace.adu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/11607/1526/hasan%20aydogan.pdf>
- Baker, T., Gloria Basse, M. B. A., Galligan, D., Hollenbeak, C., Layfield, M., Saltman, R., & Sorensen, S. (2006) *The value of single-dose extended therapy with EXCEDE® Sterile Suspension*. Erişim Tarihi: 01.02.2017
https://www.zoetisus.com/products/pages/excede_dairy/documents/exd_single-dose_therapy_tb.pdf
- Birkett, D. J. (2003). Generics-equal or not?. *Australian Prescriber*, **26**(4).
- Bideci G.B.Ç (2011) *Parantral olarak kullanılan bazı enroflokasasin müstahzarlarının buzağılarda biyoeşdeğerliliğinin incelenmesi*. Erişim: 19.12.2016
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:CjpkbvQpYYYYJ:acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/28103/tez.pdf+&cd=1&hl=tr&ct=clnk&gl=tr>
- Blume, H. H., Midha, K. K. (1993). Bio-international 92, conference on bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical sciences*, **82**(11), 1186-1189
- Brown,S.A., Chester,S.T., Speedy, A.K., Hubbard, V.L., Callahan, J.K., Hamlow, P.J., ve ark., (2000) Comparison of Plasma Pharmacokinetics and Bioequivalence of Ceftiofur

- Sodium In Cattle After A Single Intra-Muscular or Subcutaneous Injection *Journal of Veterinary Pharmacol and Therapeutics* **23**, 273-280
- Brown S.A., Hanson B.J., Mignot A., Millerioux L., Hamlow P.J., Hubbard V.L., ve ark. (1999) Comparison of plasma pharmacokinetics and bioavailability of ceftiofu sodium and ceftiofur hydrochloride in pigs after a single intramuscular injection *Journal of Veterinary Pharmacol and Therapeutics* **22**, 35-40
- Bush K, Fisher JF. (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **65**,455.
- Bo G. (2000) Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins *Clin Microbiol Infect* **6**, 6-8
- Carrington, C. (2010): Antibacteril sensitivities of the primary respiratory disease (BRD) complex in feedlot cattle in South Africa. *Proceedings of the 26th Congress of World Association for Buiatrics, Nov. 14-18, Santiago de Chile, Chile*
- CBO (1998), “How Increased Competition From Generic Drugs has Affected Prices and Returns in the Pharmaceutical Industry” Erişim: 12.03.2015
<https://www.cbo.gov/sites/default/files/105th-congress-1997-1998/reports/pharm.pdf>
- CGPA (2016) *The Canadian Generic Pharmaceutical Association web sayfası*. Erişim 20.11.2016 <http://www.canadiangenerics.ca/en/index.asp>
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R., Company, B., Miralles, J., & Moreno, A. (2010). Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC–MS/MS. *Aquaculture Research*, **41(9)**, e217-e225.
- Chereson R., Banakar U. (1999) , *Bioavailability, Bioequivalence and Drug Selection* Omaha NE Basic Pharmacokinetics Creighton University Press. 68178
- Chen M., Shah V., Patnaik R., Adams W., Hussain A., Conner D. (2001) Bioavailability and Bioequivalence: An FDA Regulatory Overview. *Pharmaceutical Research*. **18 (12)**, 1645-1650.
- Chong, W., Kim, Y. J., Kim, S. D., Han, S. K., Ryu, P. D. (2002). Lack of bioequivalence of two oxytetracycline formulations in the rabbit. *Journal of veterinary science*, **3(1)**, 25-30.
- Chow S.C., Liu J.P. (1992) *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence studies* NewYork Marcel Dekker Inc .

- Craigmill A.L., Brown S.A., Wetzlich S.E., Gustafson C.R., Arndt T.S. (1997) Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to sheep *J.vet Pharmacol. Therap* **20**, 139-144
- Consuelo C.P., Amquieira A., Puchades R. (2010) Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples *Trends in Analytical Chemistry* **29**:9
- Courtin F., Craigmill A.L., Wetzlich S.E., Gustafson C.R., Arndt T.S. (1997) Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to dairy goats *J.vet Pharmacol. Therap* **20**, 368-373
- Collignon P., Voss A. (2015) China, what antibiotics and what volumes are used in food production animals? *Antimicrob Resist Infect Control* **4**:16
- Çalangu S., (2010) Parenteral Sefalospriner (1986-2010) *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi* **24** (2); 14-18 Erişim Tarihi: 23.02.2015 http://www.ankenderneji.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM_24_EK2_14_18.pdf
- Çelik, G., Birdane, Y.,O., (2015) Biyoyaralanım ve Biyoşdeğerlik *Kocatepe Veteriner Dergisi* **8(1)**,85-94
- De Baere, S., Pille, F., Croubles, S., Ceelen, L., De Backer, P., (2004) High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its active metabolite desfuroylceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous injection of ceftiofur sodium *Analytica Chimica Acta* **512**; 75-84
- Del Tacca, M., Pasqualetti, G., Di Paolo, A., Viridis, A., Massimetti, G., Gori, G., Blandizzi, C. (2009). Lack of pharmacokinetic bioequivalence between generic and branded amoxicillin formulations. A post-marketing clinical study on healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology*, **68(1)**, 34-42.
- De Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., ve ark. (2014). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Veterinary microbiology*, **172(1)**, 202-215.
- Demirbaş, N., Atış, E. (2005) Türkiye Tarımında Gıda Güvenliği Sorununun Buğday Örneğinde İrdelenmesi *Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi* **42(1)**:179-190

- Drew M.L., Waldrup K., Kreeger T., Craigmill A. L., Wetzlich S.E., Mackintosh C. (2004) Pharmacokinetics of ceftiofur in red deer (*Cervus elaphus*) *J.vet Pharmacol. Therap* **27**, 7-11
- Duncan W., MacDonald G., Thornton M.J., (1962) Some factors influencing the absorption of griseofulvin from the gastro-intestinal tract. *J. Pharm. Pharmacol* **14**:217-224
- Dumonceaux G., Isaza R., Koch D.E., Hunter R.P. (2005) Pharmacokinetics and i.m. bioavailability of ceftiofur in Asian elephants *J.vet Pharmacol. Therap* **28**; 441-446
- Duru,M., Şahin,A.,(2004). Türkiye’de Sağlıklı ve Güvenli Hayvansal Üretim Gerekliği. *Hayvansal Üretim*, **45(1)**,36-41
- Ekici H. (2011) *Florfenikol ihtiva eden preparatların broylerlerde biyoeşdeğerliği, farklı saklama şartlarının etkileri ile farmakovijilans taramaları* Erişim: 20.12.2016
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:xQ9tWRR-eeAJ:acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/27884/tez.pdf+&cd=1&hl=tr&ct=clnk&gl=tr>
- El-Gendy A.A.M., Tohamy M.A., Ismail M. (2007) Comparative pharmacokinetics and renal clearance study of ceftiofur in cross breed Friesian and Buffalo calves. *Beni-Suef Veterinary Medical Journal* ; **17(1)**, 69-77
- EMA (2009) *Committee for veterinary medicinal products Ceftiofur*. Londra : EMA/MRL/498/98-FINAL July 1999 Erişim: 01.10.2016
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011905.pdf
- EMA (2011) *Guideline on bioanalytical method validation*. Londra: EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** Erişim 01.03.2015,
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- EMA (2011)a *Guideline On The Conduct of Bioequivalence Studies For Veterinary medicinal products*. Londra: EMA/CVMP/016/00-Rev.2 Erişim 01.03.2015,
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105372.pdf
- Ertuş, Ö.,S., Kayalı,A., (2005) Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* **34(1)**, 41-57
- Erskine, R.J., Wilson, R.C., Tyler, J.W., McClure, K.A., Nelson, R.S., Spears, H.J.,(1995) Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental E. coli-induced mastitis. *Am J Vet Res* ;**56**,481–485.

- Erden F., (1996) Gönüllüler üzerinde ilaç araştırmaları *Klinik Farmakoloji*, Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi Basımevi Yayın No:3
- EUCAST (2016) *Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms* Erişim: 21.11.2016
<http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=358&Specium=-1>
- ESVAC (2010) *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents In 19EU/EEA Countries In 2010* Erişim: 25.11.2016
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2012/10/WC500133532.pdf
- ESVAC (2014) *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents In 29 Countries In 2014* Erişim: 25.11.2016
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2016/10/WC500214217.pdf
- Faloon W.W., Paes I.C., Woolfolk D. (1966) Effect of neomycin and kanamycin on intestinal absorption *Ann N.Y. Acad Sci.* **132(2)**, -879-887
- FAO (2009) *How to Feed the World in 2050* Erişim: 25.12.2016
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- FDA (1998) *Freedom of Information Summary Supplement to NADA 140-890* Erişim: 20.12.2016
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm059122.pdf>
- FDA (2001) *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* Erişim: 21.12.2016
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>
- FDA (2003). *Guidance For Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products—General Considerations*. Food and Drug Administration, Washington, DC. Erişim : 27.12.2016
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/AbbreviatedNewDrugApplicationANDAGenerics/UCM154838.pdf>
- FDA (2006) *Freedom of information summary supplement to NADA 140-338* Erişim: 20.12.2016

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm049847.pdf>

FDA (2006a) *Bioequivalence Guidance* Erişim: 20.12.2016

<https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052363.pdf>

FDA (2014) *Avoiding Unsafe Residue in Human Food* Erişim: 13.05.2016

<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CVM/ucm353711.htm>

Fernández-Varón, E., Cárceles-García, C., Serrano-Rodríguez, J. M., Cárceles-Rodríguez, C. M. (2016). Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of ceftiofur after a single intravenous, subcutaneous and subcutaneous-LA administration in lactating goats. *BMC veterinary research*, **12(1)**, 232.

Frimodt-Møller, N., Rosdahl, V. T., Serensen, G., Hartzen, S. H., Bentzon, M. W. (1986). Relationship between penicillinase production and the in-vitro activity of methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, and cephalothin against strains of *Staphylococcus aureus* of different phage patterns and penicillinase activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **18(1)**, 27-33.

Frimodt-Møller N., Bentzon M.W., Thomsen V.F. (1986) Experimental infections with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with in vivo effect for 14 cephalosporins. *Journal of Infectious Diseases*, **154**, 511–517.

Gardner, J.A., Coleman, S., Farrow, S.G., (1993) Why Worry About Your Analytical Methods *Analytical Proceedings* **30**, 183-185

Gao,P., Nie, X., Zou,M., Shi,Y.,Cheng,G., (2011) Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system *The Journal of Antibiotics*, **64(9)**, 625-634

Gibaldi M., (1981) *Biyofarmasötik e Klinik Farmakokinetik* Ed. Ayanoglu G Terzioğlu N. Ankara : Matematik Araştırma Enstitüsü Baskı Atölyesi Ankara 2-30

Gibaldi M., Perrier D. (1982) *Pharmacokinetics* New York: 2. Ed. Mareel Dekker Inc.

Giguere S., Prescott J.F., Dowling P.M. (2006) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* USA 4th Edition Wiley Blackwell

Giguere S., Lee E.A., Gulbedch K.M., Berghaus L.J. (2012) In vitro synergy, pharmacodynamics, and postantibiotic effect of 11 antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol* **160**, 207-213

- Giguere, S. (2013): Principles of Antimicrobial Drug Selection and Use. . In: Giguère, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M. (eds.) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA
- Goudah A. (2007) Pharmacokinetics of ceftiofur after single intravenous and intramuscular administration in camels (*Camelus dromedarius*) *J.vet Pharmacol. Therap* **30**, 371-374
- GPhA (2015) *Generic Drug Savings in the USA* ; Seventh Annual Edition Erişim: 20.11.2016
http://www.gphaonline.org/media/wysiwyg/PDF/GPhA_Savings_Report_2015.pdf
- Green J.M., (1996) A practical guide to analytical method validation *Anal.Chem May 1*,; 305A/309A
- Güler, L. Gündüz, K., Sarışahin, A. S. (2013): Farklı Hayvan Türlerinden İzole Edilen *Pasteurella multocida* Suşlarının Kapsüller Tiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **19** (5), 843-849
- Haenlein, G.F.W, (2004) Goat milk in human Nutrition *Small Ruminant Research*; **51**(2),155-163
- Hakeri H. (2007) Sağlık Bakanlığı'nın Eşdeğer İlaça İlişkin Genelgesi Hukuka Aykırı. Erişim: 02.01.2017 http://www.tiphukuku.org.tr/article.php?article_id=5
- Hassan, F., Altaf, S., Ijaz, M., Tahir, M. (2016) A Review on Ceftiofur Sodium. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management* **1**; 22-26
- Hall, T. L., Tell, L. A., Wetzlich, S. E., McCormick, J. D., Fowler, L. W., Pusterla, N. (2011). Pharmacokinetics of ceftiofur sodium and ceftiofur crystalline free acid in neonatal foals. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **34**(4), 403-409
- Hendriksen, R.S., Mevius D.J., Schroeter A., Teale C. (2008): Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand.*, **8**,50:28.
- Hornish, R.E., Kotarski, S.F., (2002) Cephalosporins in Veterinary Medicine – Ceftiofur Use in Food Animals *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**,717-731
- Hui W., Wei L., Xiaojun C. (2010) The in vitro antibacterial activities and post-antibiotic effects of the ceftiofur suspension *Scientica Agricultura Sinica* **43**(7),1493-1499
- İEİS (2016) *Türkiye İlaç Pazarı Ocak-Haziran 2016* Erişim: 21.02.2017
<http://www.ieis.org.tr/ieis/assets/media/Raporlar/Turkiye%20Ilac%20Pazarı%20Ocak-Haziran%202016.pdf>
- İskit, A.B., (2014) *Jenerik ve Biyobenzer İlaçlar*. Antalya : 8. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi Kongre Kitapçığı Erişim Tarihi:

13.03.2015 <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/889/jenerik-ve-biyobenzer-ilaclar-alper-b-iskit.pdf>

- Jacopson G.A., Martinod S., Cunningham C.P.(2006), Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**,1249-1252
- Jaglan, P.S., Kubicek, M.F., Arnold, T.S., Cox, B.L., Robins, R.H., Johnson, D.B., Gilbertson, T.J., (1989). Metabolism of ceftiofur. Nature of urinary and plasma metabolites in rats and cattle. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1112–1118
- Jermnak U., Insilp K., Chareonsan A., Poapolathep A., Poapolathep S., Klangkaew N., Kusjarit N., Passadurak W. (2008) *Comparative on bioequivalence of amoxicillin in broiler following oral administration* Erişim: 12.01.2017 <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH2008000616>
- Jambhekar, S. S., & Breen, P. J. (2009). *Basic pharmacokinetics*. Pharmaceutical Press PhP,First Edition. RPS Publishing Grayslake USA 64-78
- Kanzık İ., (1993) *Biyoyararlanım İle İlgili Temel Kavramlar* Erişim: 06.08.2016 http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/5_ecza_kngresi/11.pdf
- Karakoç , H.D. (2005) *İlaç Sektöründe Fiyat Rekabeti* Erişim: 01.03.2015 <http://www.rekabet.gov.tr/File/?path=ROOT/1/Documents/Uzman%C4%B1k+Tezi/tez70.pdf>
- Kayaalp S.O., (1994)a *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbı Farmakoloji* Ankara: Cilt 1, 7 Baskı. Güneş Kitabevi Ltd Şti. 248-253
- Kayaalp S.O., (1994) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbı Farmakoloji* Ankara Cilt 1, 8. Baskı. Güneş Kitabevi Ltd Şti. Ankara 502-512
- Kayaalp, S.O., (2001) *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler*, Ankara : Genişletilmiş 2.Baskı Ankara Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti
- Kaya.S., Pirinçci.İ., Bilgili,A., (2001) *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji* Ankara: Cilt 1, Baskı 2, Ankara Medisan Yayınevi. 64-67
- Kaya.S., Pirinçci.İ., Ünsal.A., Karaer.Z., Traş.B., Bilgili.A., Akar.F., (2007) *Veteriner Farmakoloji* Cilt 2, Baskı 4, Ankara Medisan Yayınevi 371-382
- Kays M.B., White R.L., Friedrich L.V., Del Bene V.E. (1991) Evaluation of cephalosporins:cephamycins with antianaerobic activity by integrating microbiologic and pharmacokinetic properties. *Clinical Therapeutics*, **13**; 596–605.

- Khalil, W. F., Shaheen, H. M., & Abdou, R. H. (2016). Ceftiofur pharmacokinetics in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after intracardiac and intramuscular administrations. *Diseases of Aquatic Organisms*, **121(1)**, 29-35.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, **8(1)**, 1-13
- Landoni, M. F., Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *The Veterinary Journal*, **205(1)**, 21-27.
- Lee, M. H., Lee, H. J., Ryu, P. D. (2001). Public health risks: Chemical and antibiotic residues-review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **14(3)**, 402-413.
- Lemke T., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W., (2008) *Medicinal Chemistry* 6. Baski Lippincott Williams & Wilkins 1028-1082
- Lubbers, B. V., Hanzlicek, G. A. (2013): Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine respiratory disease cases—a three-year (2009– retrospective analysis. *J Vet. Diagn. Invest.*, **25(3)**, 413-417.
- Liu, S., Guo, D., Guo, Y., Zhou, W. (2011). Preparation and pharmacokinetics of ceftiofur sodium liposomes in cows. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **34(1)**, 35-41.
- McKellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A., 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
- Meegan, J., Collard, W. T., Grover, G. S., Pussini, N., Van Bonn, W. G., Gulland, F. M. (2013). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline-free acid (EXCEDE sterile suspension®) administered via intramuscular injection in wild California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **44(3)**, 714-720.
- Mestorino, N., Marchetti, M. L., Lucas, M. F., Modamio, P., Zeinsteger, P., Lastra, C. F., Mariño, E. L. (2016). Bioequivalence study of Two long-acting Formulations of Oxytetracycline Following intramuscular administration in Bovines. *Frontiers in Veterinary Science*, **3**.
- Meyer, S., Giguere, S., Rodriguez, R., Zielinski, R. J., Grover, G. S., & Brown, S. A. (2009). Pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium and concentration in body fluids of foals. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **32(4)**, 309-316.

- Mullins J.D., Macek T.J., (1960) Some pharmaceutical properties of novobiocin *J.Am. Pharm. Assoc.* **49**,245
- Nadelman, R. B., Nowakowski, J., Fish, D., Falco, R. C., Freeman, K., McKenna, D., ... & Wormser, G. P. (2001). Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an Ixodes scapularis tick bite. *New England Journal of Medicine*, **345**(2), 79-84.
- Nedbalcova, K., Nechvatalova K., Pokludova L., Bures J., Kucerova Z., Koutecka L., Hera A. (2014): Resistance to selected β -lactam antibiotics. *Vet. Microbiol* **171** (3-4),328-336
- Neirinckx, E., Vervaeet, C., De Boever, S., Remon, J. P., Gommeren, K., Daminet, S., ... & Croubels, S. (2010). Species comparison of oral bioavailability, first-pass metabolism and pharmacokinetics of acetaminophen. *Research in veterinary science*, **89**(1), 113-119.
- Nemutlu E., Kır S., (2009) Üçüncü ve Dördüncü Kuşaktan Seçilmiş Sefalosporinlerin İnsan Kaynaklı Biyolojik Materyallerden HPLC ile Tayinleri *Hacattepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* **28**(2), 185-207
- Nightingale S.L., Morrison J.C. (1987) Generic Drugs and the Prescribing Physician *JAMA* **258**, 1204
- OECD (2003),“*Regulatory Reform Review of Germany* (DAFFE/COMP/WP2(2003)7)”, Working Party No. 2 on Competition and Regulation, Review of Germany
- Okker H., Schmitt E.J., Vos P.L.A.M., Scherpenisse P., Bergwerfe A.A., Jonker F.H., (2002) Pharmacokinetics of ceftiofur in plasma and uterine secretions and tissues after subcutaneous postpartum administration in lactating dairy cows *J.vet Pharmacol. Therap* **25**, 33-38
- Oosterhuis O, Jonkman JH (1993) .Significanca of the referance product in bioequivalence evaluations with highly variable drugs: Pharmaceutical quality, variability, biopharmaceutical characteristics.In: *Binternational: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics*, Ed; Midha KK, Blume HH, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart. 109
- Or E, Dodurka T, Yılgin C, Tan H. (1994) Biyoyararlanım ve Veteriner Hekimlik Açısından Önemi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 20(2-3):5-11
- Palermo-Neto J., Righi D.A.(2008) Bioequivalence studies: Relevance for veterinary medicine. *Braz.J. vet. Res. Anim. Sci.* **45**, 5-19.
- Peterson L.R., Gerding D.N., Moody J.A., Fasching, C.E. (1984) Comparison of azlocillin, ceftizoxime, cefoxitin, and amikacin alone and in combination against *Pseudomonas*

aeruginosa in a neutropenic-site rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **25**, 545–552

Prescott, J.F., Giguère, S., Dowling, P.M. (eds.) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA

Plumb D.C., (2011) *Veterinary Drug Handbook* 7th Edition, Wisconsin Pharma Vet Inc. 626-642

Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J., Biernacki, B. (2001). Bioequivalence study of two formulations of enrofloxacin following oral administration in chickens. *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy*, **45(2)**, 353-358.

Rebuelto, M., Montoya, L., Kreil, V., Ambros, L., Waxman, S., Albarellos, G., Hallu, R. (2005). Pharmacokinetics of two once-daily parenteral cephalexin formulations in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **28(5)**, 419-423.

Resmi Gazete (2011) 28152 sayılı Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik . Erişim 16.04.2015

<http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.aspx?MevzuatKod=7.5.15651&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=t%C4%B1bbi>

Resmi Gazete (2012) 28282 sayılı Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliğini

Erişim 16.04.2016 <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/02/20160215-2.htm>

Resmi Gazete (1994) 21942 sayılı Farmasötik Müstahzarların Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Yönetmelik. Erişim : 16.04.2015

http://www.tfd.org.tr/uploads/file/Biyoyararlan%C2%A6-m%20biyoe+%C5%9Fde%C2%A6%C5%9Ferlilik%20Y+%C3%82netmeli%C2%A6%C5%9Fi_d350c0d.pdf

Ritter, L., Kirby, G., Cerniglia, C. (1996): Antimicrobial agents, Ceftiofur In: WHO Food Additives Series No:36. Geneva. Erişim: 11.10.2016.

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>

Ristchel W.A. Denson D.D. (1991) *Influence of disease on bioavailability*, Pharmaceutical Bioequivalence, New York 67-116

Riviere J.E., Papich M.G. (2009) *Veterinary pharmacology and therapeutics* Ninth Ed. Wiley-Blackwell Inc USA

- Rodriguez, L.C., Campana, A.M., Linares, C.J., Ceba,M.R., (1993) Estimation of Performance Characteristic of An Analytical Method Using The Data Set Of The Calibration Experiment *Analytical Letters* **26(6)**,1243-1258
- Rowland M., Tozer T.N., (1995) *Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Applications* Third Edition Williams and Wilkins Baltimore USA
- Salmon, S. A., Watts, J. L., Yancey, R. J., (1996) In vitro activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. *J Vet Diagn Invest* **8**; 332-336
- Salmon, S.A., Watts, J.L., Case, C.A., Hoffman, L.J., Wegener, H.C., Yancey, R.J. Jr.,(1995) Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J Clin Microbiol* **33**:24-44.
- Samitz, E.M., Jang, S.S. & Hirsh, D.C. (1996) In vitro susceptibilities of selected obligate anaerobic bacteria obtained from bovine and equine sources to ceftiofur. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 121-123.
- Sarıca, Z.,S., Liman, B.,C., (2007) Veteriner İlaçlarda Biyoeşdeğerlik Kavramı ve Türkiy'deki Yasal Bilimsel Düzenlemeler *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **4(2)**,115-119
- Sarıca, Z.,S., Liman, B.,C., (2008) Kanatlılarda Kullanılan Siprofloksasin İçeren İki Farklı Spesiyalitenin Etçi Piliçlerde Biyoeşdeğerliliklerinin Karşılaştırılması *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* **17(1)**, 23-30
- Sauvage, E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* **32(2)**,234-258
- Shah,V.P., Midha, K., Dighe,S., (1992) Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies *J. Pharma Sci.* **81(3)**, 309-312
- Shabir G.A., (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug administration the US Pharmacopoeia and International Conference on Harmonisation. *J. Chromatog* **987**, 57-66
- Smith, B.I. , Donovan, G.A., Risca, C.A., Littell, R., Young, C., Stanker, L.H.,(1998). Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *J.Dairy Sci.* **81**, 1555-1562

- Soback,S., Ziv, G., Winkler, M., Saran, A. (1989) Pharmacokinetics of ceftiofur administered intravenously and intramuscularly to lactating cows. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **2**, 118-123
- Speedy, AnW., (2003) Global Production and Consumption of Animal Source Foods *Journal of Nutirition* **133 (11)**, 4048S-4053S
- Sudamrao, D. P. (2015). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of ceftiofur in buffalo calves* (Doctoral dissertation, GURU ANGAD DEV VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES UNIVERSITY). Erişim: 12.01.2017
<http://krishikosh.egranth.ac.in/bitstream/1/73095/1/1256.pdf>
- Sumano, L. H., Gutiérrez, O. L., Zamora, M. A. (2001a). Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **24(5)**, 309-313.
- Sumano,L.H., Ocampo, C.L., Gutierrez, O.L., (2001) Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows. *Dtsch Tierarztl Wochenscher* **10**,:281-320
- Sunkara, G., Navarre, C. B., Kompela, U. B. (1999), Influence of pH and Temperature on Kinetics of Ceftiofur Degradation in Aqueous Solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 249–255.
- Stanek, C., Kofler, J.,(1998) Use of sodiu ceftiofur in the combined therapy of complicated septic diseases in cattle *Tierarztliche Praxis. Ausgabe G Grosstiere Nutztiere* **26**,314–317
- Steinijans V., Hauschke D. (1990) Uptade on the statistical analysis of the bioequivalence studies. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology* **28**, 247-253
- Steinijans, V. W., Hauck, W. W., Diletti, E., Hauschke, D., Anderson, S. (1992). Effect of changing the bioequivalence range from (0.80, 1.20) to (0.80, 1.25) on the power and sample size. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*, **30(12)**, 571-575.
- şahin E. (2012) *Farklı Tilmikosin Preparatlarının Koyunlarda Biyoeşdeğerlik Yönünden İncelenmesi*. Erişim. 20.02.2015
<https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- şanlı Y., (2006) *Veteriner Klinik Farmakolojfdi ve İlaçla Sağaltım İlkeleri* Cilt 2, Baskı 4, Ankara Medipres Yayın Evi 903-912

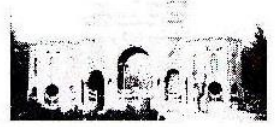
- Tantituvanont, A., Yimprasert, W., Werawatganone, P., Nilubol, D. (2009). Pharmacokinetics of ceftiofur hydrochloride in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **63(2)**, 369-373.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2015) *2014 Faaliyet Raporu*. Ankara: T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Erişim: 16.04.2015
http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Genel/2014_Faaliyet_Raporu.pdf
- TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2016) *Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler Listesi* Ankara TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Erişim : 26.11.2016
<http://www.gkgm.gov.tr/vtu/>
- Tell L., Harrenstein L., Wetzlich S., Needham M., Nappier J., Hoofman G., Caputo J., Raigmill A. (1998) Pharmacokinetics of ceftiofur sodium in exotic and domestic avian species *J.vet Pharmacol. Therap* **21**, 85-91
- Temmamogulları, F., Kaya, S., (2010) Ankara Piyasasında Satılan Sütlerde Bazı Antibiyotik Kalıntılarının İnce Tabaka Kromatografisi ve Biyootografik Yöntemle Saptanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **16(2)**,187-191
- Toprak, S., Evirgen, S., Ilbars, H. (2015). Bioavailability and bioequivalence studies in Turkey: A status report from the national registry of studies between 2008-2014. *Marmara Medical Journal*, **28(2)**.
- Toutain,P.L., Koritz, G.D., (1997) Veterinary Drug Bioequivalence Determination *Journal of Veterinary Pharmacol and Therapeutics* **20(2)**, 79-90
- Toutain, P.L., Del Castillo, J.R.E., Bousquet-Melou, A.(2002): The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*, **73**, 105-114
- Töreci, K., (1987) Sefalosporinler I Tarihçe, Yapı, Etki Mekanizması, Gruplandırma ve Direnç Mekanizmaları *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi* **1 (1)**,90-99
- TUBİTAK (2003) *Vizyon 2023 Bilim ve Teknoloji Öngörüsü Projesi* Erişim: 26.12.2016
https://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/tg/tarimgida_son_surum.pdf
- Tugay D. (2013) *Biyoeşdeğerlik Çalışmaları* Erişim tarihi: 26.12.2016
http://pharmacy.erciyes.edu.tr/ckfinder/userfiles/files/bitirmeler/Deniz_TUGAY_Tez.pdf

- TÜİK (2015) *Hayvansal Üretim Verileri*. Ankara: Türkiye İstatistik Krumu. Erişim: 16.04.2015, <http://www.tuik.gov.tr/PreTabloArama.do>
- Ucar, T. (2009) Biyoeşdeğerlik Çalışma Dosyaları Hazırlanırken Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar *İyi Klinik Uygulamalar Dergisi* **23**,:27-31
- USP (2007) United State Pharmacopeial Convention; *Cephalosporins*. Erişim: 10.08.2016 <http://aavpt.affiniscap.com/associations/12658/files/cephalosporins.pdf>
- VICH (1998) Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. Bruxelles: VICH GL1 Erişim: 01.04.2015 <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/analytical-validation.html>
- Yamantürk, P. (2000). Zaman bağımlı aktivite gösteren antibiyotikler. *ANKEM Derg*, **14(3)**, 244-247.
- Yancey, R.J., Kinney, M.L., Robert, B.J., Goodenough, K.R., Hamel, J.C.& Ford, C.W. (1987) Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice. *American Journal of Veterinary Research*. **48**, 1050–1053.
- Yarsan, E. (2012) *Hayvansal Gıdalarda Kalıntı Sorunu* Erişim: 12.05.2016 http://www.turkvet.biz/yazi/gghs_h_gida_kalinti_sorunu.htm
- Yarsan E. (2015) *Veteriner Hekimlikte Akılcı Antibiyotik Kullanımı* Erişim: 20.12.2016 <http://hayvancilikhaber.com/veteriner-hekimlikte-akilci-antibiyotik-kullanimi/>
- Yalçın A. N., (2014) Jenerik İlaçlar ve Yan Etki *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi* **28**,7-10
- Yıbar, A., Soyutemiz, E. (2013). Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı ve Muhtemel Kalıntı Riski. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **8(1)**.
- Yılmaz, İ., (2008) Veteriner İlaçların Biyoeşdeğerliği *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* **37(3)**, 217-232
- Yocum, R.R., Rasmussen, J.R., Strominger, J.L. (1980): The Mechanism of Action of Penicillin, Penicillin acylates the active site of Bacillus stearothermophilus D-alanine. *J. Biol. Chem.* **255(9)**, 3977-3986.
- Yoshimura, H. (2000) Antimicrobial susceptibility of Arcanobacterium pyogenes isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, **47**,139-143.
- Zaffiri L., Gardner J., Toledo-Pereyra L.H. (2012) History of antibiotics : from salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative surgery* **25(2)**, 67-77

- Zintzaras, E., Bouka,P., Kowald,A. (2002) Biometrical evaluation of bioequivalence trails using a boorstrap individual direct curve comparision method *Euro Journal of Drug Metab and Pharma* **27(1)**, 11-16
- Wagner, R.D. et al. (2011): Bovine Intestinal Bacteria Inactivate and Degrade Ceftiofur and Ceftriaxone with Multiple β -Lactamases, *Antmic. Agent. Chem.*, **55(11)**, 4990–4998
- Watts, J.L., Yancey, R.J. Jr., Salmon, S.A., Case, C.A.,(1994) 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory diseases in North America. *J Clin Microbiol* ;**32**,725–31.
- WHO TRS (1996): Evaluation of Certain Veterinary Drug Residue in Food Fifty report of the Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additives, *Technical Report Series No:864*: 27-32
- Williams R.L. (1986) Generic Drugs Why all the fuss again? *American Pharmacy* **26**,99-121
- Woodward, K. N. (2009). Adverse effects of veterinary pharmaceutical products in animals. *Veterinary Pharmacovigilance*, **393**.
- Woodrow, J. S., Caldwell, M., Cox, S., Hines, M., Credille, B. C. (2015). Comparative plasma pharmacokinetics of ceftiofur sodium and ceftiofur crystalline-free acid in neonatal calves. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: **152**

30/09/2010

Sn. Prof. Dr. Tülay BAKIREL
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No:
Başvuru Tarihi: 01/09/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Doktora Öğrencisi Ali Haydar GÜMÜŞBAŞ'a ait "Farklı Seftiofur Preparatlarının Sığırlarda Biyodeşğerlilik Yönünden İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ
İ. Ü. HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

Prof. Dr. Alper YILMAZ
Üye

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Safiye ALTUN
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye