

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AĞIZDAN KULLANILAN BAZI ENROFLOKSASİN
MÜSTAHZARLARININ ETÇİ PİLİÇLERDE
BİYOEŞDEĞERLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Ayşe KANICI

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sezai KAYA**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞIZDAN KULLANILAN BAZI ENROFLOKSASİN
MÜSTAHZARLARININ ETÇİ PİLİÇLERDE
BİYOEŞDEĞERLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Ayşe KANICI

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**Danışman
Prof. Dr. Sezai KAYA**

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2005 K120140
kod 6-7 nolu Proje numarası ile desteklenmiştir.**

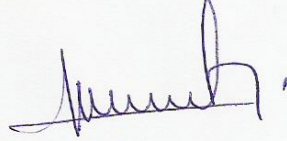
2010-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 28.01.2010



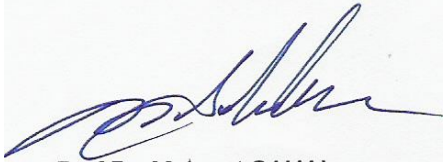
Jüri Başkanı
Prof.Dr. Ferda AKAR
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı



Prof.Dr. Sezai KAYA
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Danışman)



Prof.Dr. Emine BAYDAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı



Prof.Dr. Mehmet ŞAHAL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Prof.Dr. Ender YARSAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Raportör)

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	
1.1. Biyoeşdeğerlik	1
1.1.1. Biyoeşdeğerlik Tanımlamaları	3
1.1.2. Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri	3
1.1.2.1. <i>In Vitro</i> Çalışmalar	4
1.1.2.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	4
1.1.2.2.1. Tek Doz <i>In Vivo</i> Biyoeşdeğerlik Çalışmaları	4
1.1.2.2.2. Tekrarlanan Doz <i>In Vivo</i> Biyoeşdeğerlik Çalışmaları	5
1.1.3. Biyoeşdeğerlik Ölçütlerinin Kabul Sınırları (Biyoeşdeğerlik Aralığı)	5
1.2. Enrofloksasin	6
1.2.1. Özellikler	6
1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	6
1.2.3. Farmakodinamik Özellikleri	8
1.2.4. İstenmeyen Etkileri	8
1.2.5. Kullanılması	9
1.3. Siprofloksasin	10
1.4. Danofloksasin	11
1.5. Çalışmanın Amacı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Gereç	13
2.1.1. Araç ve Cihazlar	13
2.1.2. Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve İlaçlar	13
2.1.3. İlaçlar ve Standartlar	14
2.1.3.1. İlaç	14
2.1.3.2. Standartların Hazırlanması	14
2.1.3.2.1. Stok Standart Çözeltiler	14
2.1.3.2.2. Çalışma Standart Çözeltiler	15
2.1.3.3. Pozitif Numunelerin Hazırlanması	17
2.1.3.4. İlaç Müstahzarları	18
2.1.4. Laboratuvar Malzemeleri	18
2.1.5. Tampon Çözeltiler	19
2.1.6. Mobil Faz	19
2.1.7. Deneme Hayvanları	19
2.2. Yöntem	19
2.2.1. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi	20
2.2.2. Hayvanların Gruplandırılması	20
2.2.3. İlaçların Verilmesi ve Doz	21
2.2.4. Kan Numunelerinin Toplanması	21
2.2.5. Plazmada İlaç Analizi	21
2.2.5.1. Plazmada Enrofloksasin ve Siprofloksasin Yoğunluklarının Ölçülmesi	21
2.2.5.2. Standartların Çıkış Zamanlarının Belirlenmesi	22
2.2.5.3. Duyarlılık Limiti ve Geriye Kazancın Belirlenmesi	22
2.2.6. Farmakokinetik Hesaplamalar	23
2.2.7. İstatistiksel Hesaplamalar	23

2.2.8.	Biyoeşdeğerlik Parametreleri	23
3. BULGULAR		
3.1.	Yöntemin Duyarlılığı, Tekrarlanabilirliği ve Geriye Kazanç	24
3.1.1.	Enrofloksasin, Siprofloksasin ve Danofloksasin'in YBSK'de Çıkış Zamanları	24
3.1.2.	Standart Eğriler ve Geriye Kazanç Denemeleri	26
3.1.3.	Yöntemin Duyarlılığı	30
3.2.	İlaç Müstahzarlarının Etkin Madde Miktarları	30
3.3.	Plazma İlaç Yoğunlukları	32
3.4.	Farmakokinetik Değişkenler	35
4. TARTIŞMA		38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER		44
ÖZET		45
SUMMARY		46
KAYNAKLAR		47
EKLER		
Ek-1 (Etik Kurul Kararı)		53
ÖZGEÇMİŞ		54

ÖNSÖZ

İlaçlarda aranan en önemli özelliklerden biri kullanıldıkları süreler içinde uygulandıkları dozlarda tedavinin gerçekleşmesidir. Etkin maddenin aynı olması sebebi ile bu ürünlerin sağaltıcı etkilerinin de aynı olması beklenir. Bu durumun aksi söz konusu ise, kullanılan ilaçtan beklenen sonuç alınamaz ve hastalıkların sağaltımı genellikle başarısızlıkla sonuçlanır. Sağaltıcı cevabın oluşmaması sonucu dozun artırılması gerekebilir. Sonuçta aşırı ilaç kullanımına bağlı ekonomik kayıplar, hayvansal ürünlerde ilaç kalıntıları nedeniyle halk sağlığının tehlikeye sokulması ve mikroorganizmaların ilaçlara direnç kazanması söz konusu olabilir. Dolayısıyla, hayvanlarda hastalıkları sağaltmak ve korumak amacı ile verilen ilaçlardan beklenen etkinin sağlanabilmesi önemlidir.

İlaçlar aynı veya benzeri formülasyonlar halinde hazırlansalar bile, bu formülasyonlar arasında biyoeşdeğerlik yönünden önemli farklar bulunabilmektedir. Bu da biyoeşdeğerlik kavramının önemini gündeme getirmektedir. Biyoeşdeğerlik testi, aynı etkin maddeyi içeren farklı formülasyonlardaki ilaçların karşılaştırılması için yapılan bir kalite kontrol testidir. Biyoeşdeğerlikte amaç, aynı etkin maddeyi içeren farklı ilaç şekillerinin birbirinin yerine kullanılabilirliğinin ortaya konulmasıdır.

Beşeri ilaçlarda olduğu gibi Veteriner ilaçlarında da biyoeşdeğerlik kavramı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği Ülkelerinde giderek önem kazanmaktadır. Fakat, ülkemizde veteriner hekimliğinde biyoeşdeğerlikle ilgili düzenlemeler ve çalışmalar yoktur. Veteriner ilaçlarında da biyoeşdeğerlikle ilgili düzenlemelerin ve uygulamaların sağlanması ile Türkiye'nin rekabet gücü artacaktır. Bu çalışma biyoeşdeğerlikle ilgili çalışmalarda kaynak teşkil edecektir.

Doktora eğitimi ve çalışmasının gerçekleştirilmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü ile Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na, her zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Sezai KAYA, tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Ender YARSAN ve Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL'a, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Cengiz GÖKBULUT'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışmanın deneysel aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Araş. Gör. Levent ALTINTAŞ ve Araş. Gör. Begüm Yurdakök'e, Kimyager Süreyya KARAASLAN, Vet. Hek. Hakan GÜRELİ'ye, Vet. Hek. Soner MERT'e, Vet. Hek. Feyza BOZKURT'a ve diğer çalışanlara, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Hüsametdin EKİCİ'ye, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan Yard. Doç. Dr. Harun ALP'e, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Tarık ATMACA'ya, manevi desteğinden dolayı Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Nurgül ATMACA'ya, analizlerin ölçülmesinde destek sağlayan Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Muhammet AKSİN'a, ölçümler esnasında büyük yardımlarından dolayı Enstitü Farmakoloji Bölümü Laboratuvar Şefi Dr. İlyas TÜMER ve yardımcısı Veteriner Hekim Güliz ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2005 K120140 kod 6-7 nolu Proje numarası ile desteklenmiştir. Destekten dolayı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Yaşamımın her döneminde sevgi ve destekleri ile hep yanımda ve arkamda olan, hayatımın en değerlileri canım annem Sittika KANICI, babam Hayri Necati KANICI, abim Hasbi KANICI, ablalarım Müzeyyen KANICI KALAK ve Nuran KANICI GÜNEY'e çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACN	: Asetonitril
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
Ar-Ge	: Araştırma-Geliştirme
α	: Plazma ilaç yoğunluğu dağılma dönemi hız sabitesi
β	: Plazma ilaç yoğunluğu atılma dönemi hız sabitesi
c.a.	: Canlı ağırlık
Dİ	: Damar içi
dk	: dakika
EAA	: Plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi altında kalan alan
EMEA	: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
F(%)	: Biyoyararlanım
FDA	: Food Drug Administration
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GABA	: Gama-Amino Bütirik Asit
İEİS	: İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası
İS	: İnternet Standart
k_a	: Emilmeli verilmelerde birinci derece emilme hız sabitesi
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
M	: Molar
ml	: Mililitre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: Disodyum hidrojen fosfat dehidrat
nm	: Nanometre
OKS	: İlacın vücuttan %63,2'sinin atılması için geçen süre
PKCALC	: Pharmacokinetic Calculation
t_{doruk}	: Plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi
$t_{1/2a}$: Ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü
$t_{1/2\alpha}$: Dağılma dönemi yarı ömrü
$t_{1/2\beta}$: Atılma dönemi yarı ömrü
Vd	: Dağılım Hacmi
WHO	: World Health Organisation
Y_{doruk}	: Plazma doruk ilaç yoğunluğu
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.2.1.	Enrofloksasinin kimyasal yapısı.	6
Şekil 3.1.1.1.	NaOH çözeltisinin kromotogramı (%1 çözeltiden 20 µl).	24
Şekil 3.1.1.2.	Enrofloksasin etkin maddesinin kromotogramı (10 µg/ml çözeltiden 20 µl).	25
Şekil 3.1.1.3.	Enrofloksasin etkin maddesinin kromotogramı (40 µg/ml çözeltiden 20 µl).	25
Şekil 3.1.1.4.	İlaç içermeyen temiz plazma kromotogramı.	26
Şekil 3.1.2.1.	1 µg/ml enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının pik ve alanı.	27
Şekil 3.1.2.2.	Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının YBSK'deki pik alanlarından yararlanılarak çizilen standart eğrileri.	27
Şekil 3.1.2.3.	1 µg/ml yoğunluktaki enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının ilaç içermeyen temiz plazmaya katılarak özütleme işlemi yapıldıktan sonra verdiği pik ve alanı.	28
Şekil 3.1.2.4.	Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının ilaç içermeyen temiz plazmaya katılıp özütleme işlemi yapıldıktan sonra YBSK'deki pik alanlarından yararlanılarak çizilen standart eğrileri.	28
Şekil 3.1.2.5.	Referans ilaç verilen çalışma grubundaki 1. hayvanın 2. saatte verdiği pik ve alanı.	29
Şekil 3.1.2.6.	Referans ilaç verilen çalışma grubundaki 1. hayvanın 4. saatte verdiği pik ve alanı.	29
Şekil 3.2.1.	Referans ilaç kromotogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).	30
Şekil 3.2.2.	Test 1 ilaç kromatogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).	31
Şekil 3.2.3.	Test 2 ilaç kromatogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).	31
Şekil 3.3.1.	Enrofloksasinin etkin maddesinin Dİ uygulanması sonucu enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi ile Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucu çizilen enrofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.	34
Şekil 3.3.2.	Enrofloksasin etkin maddesinin Dİ, Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucunda metabolitleri siprofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.	34
Şekil 3.3.3.	Enrofloksasinin etkin maddesinin Dİ uygulanması sonucu enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin logaritmik plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi ile Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucu çizilen enrofloksasinin logaritmik plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.	35

ÇİZELGELER

Çizelge 1.2.5.1.	Türkiye'de ruhsatlı enrofloksasinin ağızdan kullanıma uygun çözeltileri.	10
Çizelge 2.1.3.2.2.1.	Enrofloksasin-siprofloksasin karışım çalışma standartlarının seyreltmeleri.	16
Çizelge 2.1.3.2.2.2.	Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardı seyreltmeleri.	17
Çizelge 2.1.3.3.1.	Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standart çözeltilerinin ilaç içermeyen temiz plazmalara katılan miktarları.	17
Çizelge 2.2.1.1.	Çalışmada hayvanlara yedirilen yemin özellikleri.	20
Çizelge 2.2.2.1.	Plazma ilaç yoğunluğunu belirlemek için kullanılan gruplar.	21
Çizelge 3.1.1.1.	Standartların çıkış zamanları.	26
Çizelge 3.1.2.1.	Enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin geriye kazancı.	28
Çizelge 3.2.1.	Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının etkin madde miktarları.	32
Çizelge 3.3.1.	Dİ enrofloksasin, Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçları ve metaboliti siprofloksasinin zamana göre plazma ilaç yoğunlukları.	33
Çizelge 3.4.1.	Ağızdan kursak içi (Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının), Dİ verilen enrofloksasinin etkin maddesi ve oluşan metaboliti siprofloksasinin farmakokinetik değişkenleri (aritmetik ortalama ± standart hata, enalt-enüst değerleri).	36
Çizelge 3.4.2.	Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının, logaritmik dönüşüm sonucu bazı farmakokinetik değişkenleri.	37
Çizelge 3.4.3.	Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının, enrofloksasin yönünden logaritmik dönüşüm sonucu bazı farmakokinetik değişkenleri ve Test 1 ve Test 2 İlaçlarının biyoeşdeğerlikleri.	37

1. GİRİŞ

1.1. Biyoeşdeğerlik

Biyoeşdeğerlik testi aynı etkin maddeyi içeren, benzer formülasyonların veya müstahzarların biyolojik esaslı kalite kontrol testidir. Burada, genellikle ilk ruhsatlı müstahzar referans olarak seçilir; diğer müstahzar/müstahzarlar (test ürünleri) bununla karşılaştırılır.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarının amacı benzer formülasyondaki iki veya daha fazla sayıdaki müstahzarın birbirinin yerine kullanılabilirliğinin (muadil ilaç) ortaya konulmasıdır (EMEA, 2001; Posyniak ve ark., 2001; Traş ve Yazar., 2002; Hantash ve ark., 2008; Soyer Sarıca ve Liman, 2008; Kayaalp, 2008; Altıntaş ve Yarsan., 2009). Referans ve incelenecek müstahzarlar seçilirken, numunelerin mümkün olduğu kadar yeni ve aynı üretim tarihine sahip olmalarına dikkat edilmelidir (Resmi gazete, 1994).

İlaçların etkinlik, güvenlik, kalite kontrolü ve denetlenmesinde biyoeşdeğerlik çalışmaları da önemlidir. Biyoeşdeğerlik çalışmaları hekim, tüketici (hasta), halk sağlığı, üretici ve uluslararası ticaret yönünden büyük önem arz eder. Bir hastalığın başarılı bir şekilde sağaltımı doğru teşhis ve uygun ilaç kullanımına bağlıdır. İlacın tam olarak farmakolojik etkisinin ortaya çıkması, ihtiva ettiği etkin madde miktarı, kalite ve güvenliğine bağlıdır. Aynı etkin madde, aynı tür, aynı kullanım yolu ve aynı kullanım alanına sahip, değişik firmalara ait birçok müstahzar vardır. Bunu hekim ya da hasta doğru bir şekilde kullanıp da beklenen yarar sağlayamaz ise hasta hakkı korunmamış olur. Hekim ya da hasta hangi müstahzarın kaliteli veya güvenli olduğunu bilemez. Bunun için biyoeşdeğerlik testleri gerekli ve çok önemlidir.

İlacın hazırlanmasında kullanılan taşıyıcı madde/maddeler emilmesini ve plazmadaki miktarını önemli ölçüde etkiler. Özellikle ağızdan kullanılan ve biyoyararlanım sorunu gösteren etkin madde veya farmasötik dozaj şekillerinde terapötik eşdeğerlik için en önemli test bioeşdeğerlik testidir. Yaygın olarak kullanılan farmasötik eşdeğerlik, ilacın etkinliğini göstermede yetersiz kalan bir kavramdır. Bir ilacın etkinliği için farmasötik eşdeğerliğin yanında terapötik eşdeğerliğinin de kanıtlanması gereklidir. Terapötik eşdeğerliği belirlenmiş ilaçlar değiştirilebilir ilaçlardır (Öner, 2003). Ayrıca, aynı etkin maddeyi eşit miktarda içeren aynı farmasötik şekle sahip iki müstahzar, tamamen veya tam olmamakla beraber aynı derecede emiliyor fakat birinde emilme yavaş, diğerinde hızlı ise yavaş emilen ilaç, kan ve

diğer vücut sıvılarında (etki yerinde) daha düşük yoğunlukta bulunur veya etkili yoğunluğa erişemeyebilir. Dolayısıyla, ilacın etkisi daha geç başlar ve zayıf olur. Biyoeşdeğerlik yönünden incelenen ilaçların emilme oranları aynı olsa bile yavaş emilen ilacın etkisi daha geç başlar ve genellikle daha zayıftır. Farmasötik bakımdan eşdeğer olan ilaçların etkin maddelerinin emilmesinin aynı derecede olması; tek başına bunların kalite, etkinlik ve güvenilirlik bakımından eşdeğer olduklarını göstermez; emilim hızının da benzerliği gerekir (Kayaalp, 2008).

Aynı ve uygun deney şartlarında iki müstahzarın biyoyararlanımları kabul edilebilir sınırlar (%80-125) arasında olduğu zaman bu iki müstahzar biyoeşdeğer kabul edilebilir. Farklı firmalara ait iki müstahzarın aynı etkin maddeyi içermeleri, aynı oranda/miktarda etkin madde içermeleri, aynı yoldan verilmeleri iki ürünün aynı farmakolojik etkinliği göstermeleri ya da biyoeşdeğer olmaları için yeterli değildir. Ayrıca, formülasyonların hazırlanmasında kullanılan yardımcı/taşıyıcı maddelerin kalitesi de önemlidir. Örneğin katı şekilde ilaç hazırlanırken kullanılan yardımcı/taşıyıcı madde çeşidi ve oranı, sıkıştırımda kullanılan basınç, ısı ve rutubet; sıvı ilaç hazırlanırken çözücü, pH, taşıyıcının özellikleri, koruyucu madde gibi etkenler de iki ürünün biyoyararlanımlarında farklılığa yol açabilir. Referans müstahzardan emilim hızı bakımından fark gösteren, fakat emilim derecesi bakımından fark göstermeyen bir müstahzar, emilim hızındaki gecikme geçerli bir amaç için kasten yapılmış, bu durum prospektüste belirtilmişse ve emilim hızındaki fark ilacın güvenilirliği ve etkinliği yönünden sakınca teşkil etmiyorsa biyoeşdeğer kabul edilebilir (Resmi Gazete, 1994). Bir ilacın emilim hız ve derecesi Y_{doruk} ve EAA parametreleri ile belirlenir. Y_{doruk} , kısmen emilme hızının göstergesidir. EAA, sistemik dolaşıma ulaşan ilaç miktarını gösterir. Emilim hızının belirlenmesinde t_{doruk} da kullanılabilir.

Veteriner müstahzarlardaki biyoeşdeğerlik uygulamalarına beşeri ilaçlara göre daha geç başlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa Birliği (AB) gibi ülkeler başta olmak üzere çoğu ülke 1990'lı yıllardan itibaren veteriner ilaçlarında da biyoeşdeğerlik çalışmalarına başlamışlar ve yasal düzenlemeler getirmişlerdir. Ülkemizde veteriner müstahzarları için biyoeşdeğerlik çalışmalarının yürütülmesi hakkında Tarım ve Köyşleri Bakanlığı tarafından hazırlanmış bir yönetmelik mevcut değildir.

Benzer farmakolojik ve klinik etkileri olan, benzer plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi gösteren ilaç formülasyonlarının değerlendirilmesinde biyoeşdeğerlik testleri önemli rol oynar (Toutain ve Koritz, 1997). İlaçların ruhsatlandırılması için gerekli belgelerin içinde biyoyararlanım/farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarla ilgili belgelerin bulunması bir gerekliliktir. Özellikle ilacı ilk keşfeden veya ilk üreten firmanın ilacı (referans ilaç) ile jenerik

olarak üretilen ilacın (benzer formülasyonda diğer ilaç) biyoeşdeğer olduğunun kanıtlanması, bu ilacın klinik açıdan diğerinin yerine kullanılabilceğini gösteren en önemli unsurdur.

Dolayısıyla, ilaçların ruhsatlandırılmasında, kalite, etkinlik ve güvenlik kadar, bunların birbiri yerine kullanılabilir olması, özellikle sağaltımın maliyeti ve ekonomi yönünden de son derece önemli olmaktadır. İnsanlarda olduğu gibi bir sağlık veya sigorta sisteminin hayvanlar için de geliştirilmesi (ülkemizde başlamıştır) eşdeğer ilaç uygulamasının yapılmasını ve ödemelerin de buna göre düzenlenmesini beraberinde getirecektir (Tarım Sigortası Kanunu, 5363).

1.1.1. Biyoeşdeğerlik Tanımlamaları

Farmakolojik eşdeğerlik: İki ayrı farmasötik şeklin içine, kimyasal olarak farklı ama vücutta aynı etkin molekülleri ortaya çıkaran ve aynı farmakolojik etkiye yol açan moleküllerin katıldığı durumdur.

Farmasötik eşdeğerlik: Aynı etkin madde veya maddelerin eşit miktarlarının aynı farmasötik şekle (tablet, ampul, kapsül gibi) katılması durumunu ifade eder. Bu farmasötik şekillerde taşıdığı maddelerinin miktarları farklı olsa da, etkin madde miktarları aynı olmalıdır.

Kimyasal eşdeğerlik: Aynı etkin maddeyi aynı miktarda içeren ve aynı dozda kullanılan, değişik farmasötik şekillerdeki (tablet, draje gibi) bir ilacın resmi kaynaklarda bahsedilen fiziko-kimyasal özellikleri taşımasıdır.

Klinik eşdeğerlik: Aynı canlıda aynı doz ve doz aralığında verildiğinde aynı sağaltıcı etkiye yol açan, farmakolojik, kimyasal ve farmasötik olarak eşdeğer ilaçları veya ilaç şekillerini karşılayan bir terimdir (Sumano ve ark., 2001; Kaya ve ark., 2009).

1.1.2. Biyoeşdeğerlik Çalışma Tipleri

İki formülasyonun biyoeşdeğerliğinin incelenmesinde-belgelenmesinde, birisi *in vitro*, diğeri *in vivo* iki tip denemeye başvurulur. Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, 2000), biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan yöntemleri öncelik sırasına göre; farmakokinetik çalışmalar, farmakodinamik çalışmalar, klinik çalışmalar ve *in vitro* çalışmalar olarak sıralamıştır.

1.1.2.1. *İn Vitro* Çalışmalar

In vitro testler, katı ilaç şekilleri üzerinde yürütülür. Çözünme testleridir. Bu testler belirli şartlar altında ve ilgili kurumlarca belirlenmiş aletlerde yapılır. İki temel *in vitro* test vardır:

a. Çözünme hızı testi: İlaç uygulama yerinden çabuk emiliyor, ancak emilim hızı farmasötik şeklin çözünmesi tarafından kısıtlanıyor ise bu test ilacın emilim hızını belirleme yönünden önemli kabul edilebilir.

b. x-ışını kırınım testi: İlacın emilimi yavaş, çözünmesi hızlı ise bu test kullanılır (Traş ve Yazar, 2002). Bazı ilaçların çeşitli kristal şekilleri vardır ve her bir şeklin çözünme hızı farklıdır. Söz konusu test, ilacın kristal yapısını ortaya çıkarmak suretiyle onun çözünme karakteristiğinin dolaylı olarak saptanmasını sağlar (Toutain ve Koritz, 1997; EMEA, 2001; Yılmaz, 2006).

1.1.2.2. *İn Vivo* Çalışmalar

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında en uygun ve birinci derecede önerilen *in vivo* testlerdir (Traş ve Yazar, 2002). *In vivo* biyoeşdeğerlik çalışmaları yapılırken; etkin madde veya metabolitinin ölçümünde kullanılabilecek duyarlı analiz yöntemlerinin olup olmasına, müstahzarın farmakolojik etkisi ile dozu arasındaki ilişkisine, sistemik ya da yerel kullanımına yönelik olarak tasarlanmasına dikkat edilmelidir. Bunlar dikkate alınarak iki şekilde test yapılır. Birincisi, uygun analiz yöntemi mevcut ise, kanda etkin madde yoğunluğunun zamana göre değişimi belirlenir; sonra, eğriden incelenen maddenin/maddelerin emilme hızı (plazmada doruk yoğunluk, Y_{dorum} ; doruk yoğunluğa ulaşma süresi, t_{dorum}) ve vücuda giren ilaç miktarı (eğri altındaki alan, EAA) belirlenir ve değerlendirilir (Toutain ve Koritz, 1997; EMEA, 2001; Traş ve Yazar, 2002; Clark ve ark., 2003). İkincisi, uygun bir analiz yöntemi mevcut değil ise, akut farmakolojik ya da klinik etkinin zamana göre ölçümü ile yapılır. Bu yöntem birincisine göre güvenilir ve uygun değildir. Çünkü, iki müstahzarın klinik etkinliğini değerlendirecek etkili bir istatistiksel yöntem mevcut değildir. *In vivo* biyoeşdeğerlik çalışmaları tek doz ve tekrarlanan doz çalışmaları şeklinde yapılır.

1.1.2.2.1. Tek Doz *İn Vivo* Biyoeşdeğerlik Çalışmaları

Genellikle tek doz çalışmaları biyoeşdeğerlik testleri için yeterlidir. İlaçlarla ilgili yasal düzenlemeler ve ilgili kaynaklar, tek doz biyoeşdeğerlik çalışmalarında aşağıda belirtilen

farmakokinetik ölçütlerin belirlenmesini önerirler (Resmi Gazete, 1994; FDA, 2000; EMEA, 2001; Öner, 2003; Altıntaş ve Yarsan, 2009):

- Sıfırdan t_x zamana kadar EAA (EAA_{0-t_x}).
 - o t_x : ölçülen son yoğunluğa karşılık gelen zamandır.
- Sıfırdan sonsuza kadar EAA ($EAA_{0-\infty}$).
- Plazma doruk ilaç yoğunluğu (Y_{dorum}).
- Plazma doruk ilaç yoğunluğuna ulaşma süresi (t_{dorum}).

1.1.2.2. Tekrarlanan Doz *In Vivo* Biyoeshdeğerlik Çalışmaları

İlaçlarla ilgili yasal düzenlemeler ve ilgili kaynaklar, tekrarlanan doz biyoeshdeğerlik çalışmalarında aşağıda belirtilen farmakokinetik ölçütlerin belirlenmesini önerirler (FDA, 2000; EMEA, 2001; Öner, 2003; Altıntaş ve Yarsan, 2009):

- Kararlı durumda bir dozlama aralığını aşan bir zamana kadar olan EAA.
- Son doz uygulamasından sonra doğrudan gözlem değerinden elde edilen en yüksek ilaç yoğunluğu (Y_{dorum}) ve bu yoğunluğa ulaşabilmesi için geçen süre (t_{dorum}).
- Kararlı durumda her dozlama aralığı sonundaki ilaç yoğunluğu.
- Kararlı durumda ortalama ilaç yoğunluğu.
- Kararlı durumdaki dalgalanma derecesi.

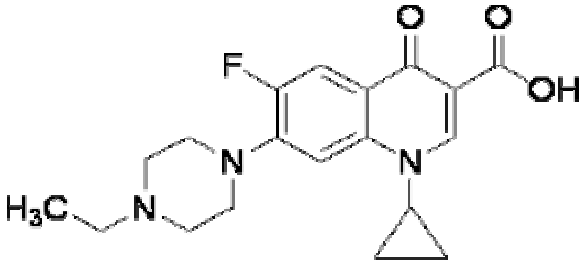
1.1.3. Biyoeshdeğerlik Ölçütlerinin Kabul Sınırları (Biyoeshdeğerlik Aralığı)

İki ilacın biyoeshdeğer olması için, EAA ve Y_{dorum} oranlarının %90 güven aralığında %80-125 (0,80-1,25) sınırları içinde olması gerekir. Sağaltım güvenliği geniş veya sağaltım penceresi büyük ilaçlar için daha geniş sınırlar kabul edilebilir; ancak, sağaltım güvenliği dar ya da dik doz cevap eğrisine sahip ilaçlar için %20'lik bir fark bile kabul edilmeyebilir. Y_{dorum} değeri örnekleme zamanına bağlı olarak geniş değişkenlik gösterdiğinden, güven aralığı %70-143 sınırları arasında kabul edilebilir. t_{dorum} değeri kullanılacağı zaman değişkenin mutlak güven aralığı kabul edilebilir; 10 dakikalık t_{dorum} için \pm %20 değişkenlik ile 120 dakikalık t_{dorum} için \pm %20 değişkenlik aynı anlama gelmez. Bu nedenle t_{dorum} için biyoeshdeğerlik genişliği dikkatli seçilmelidir. İlaç, biyoeshdeğerliğini raf ömrü boyunca korumalıdır (Resmi Gazete, 1994; Colwell ve ark., 1998; FDA, 2000; EMEA, 2001; FDA, 2002; Traş ve Yazar, 2002; Öner, 2003; Anonim, 2004; Hantash ve ark., 2008).

1.2. Enrofloksasin

1.2.1. Özellikler

Florokinolon türevi olan enrofloksasin [1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(4-etil-1-piperazinil)-3-kuinolin karoksilik asit] nalidiksik asit çekirdeğinden türetilen sentetik 6-florokinolonlar veya 4-kinolonlar grubuna aittir (Şekil 1.2.1). Çekirdek yapısı nalidiksik asit ile aynıdır.



Şekil 1.2.1. Enrofloksasinin kimyasal yapısı (Bayer, 1999).

Çekirdek yapısındaki 3- ve 4-pozisyonlarında yer alan karbonil grupları (C=O), genel olarak florokinolonların antimikrobiyel etkinlikleri için gereklidir. Bu gruplar *DNA jiraz'a* bağlanma bölgesini oluştururlar. Altı-pozisyonunda yer alan bir flor atomu, Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkinliği artırırken, Gram pozitif bakterilere karşı etki spektrumunun genişlemesini sağlar. Yedi-pozisyonundaki piperazin halkası pseudomonasları da içine alacak şekilde, antimikrobiyel etkinliği artırır. Piperazin halkasına bitişik durumda bir C₂H₅ grubunun bulunması, dokulara geçişi artırır ve beyinde gama-amino butirik asit (GABA) reseptörlerine bağlanan etkin madde miktarını azaltarak, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki zehirli etkiyi zayıflatır. Karboksilik asit veya daha fazla sayıda amin fonksiyonel grubunun (bazik) bulunması, moleküle amfoterik veya zwitteriyonik özellikler kazandırır. Bundan dolayı, asidik ve bazik fonksiyonel grupları pKa değerlerine bağlı olarak, yağda çözünebilir, doku, irin ve organik artıklara nüfuz edebilir (Altreuther, 1987; Bayer, 1999).

1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Ağızdan verildiklerinde florokinolonlar sindirim kanalından (Plumb, 1991; Parlar ve Kaya, 2005; Mitchell, 2006) ve parenteral yollardan iyi emilir (Anadon ve ark., 1990; Stein, 1991). Ağızdan verilmelerini takiben 1-2-5 saat içerisinde plazmada en yüksek yoğunluğa ulaşırlar (Kaya ve ark., 2007). Tok karnına verilmeleri en yüksek plazma yoğunlukları, EAA ve atılma

yarı ömürlerini pek değiştirmeyiz; ama emilme hızlarını biraz azaltır (Anadon ve ark., 1990). Enrofloksasinin kanatlılarda emilmesi uygulama yoluna göre değişir. Kas içi yolla verildiğinde iyi emilir; bunu deri altı ve ağız yolu izler (Kaya ve ark., 1996; Abd. El-Aziz ve ark., 1997). Enrofloksasin plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır (Neuman, 1988). Enrofloksasin'in dağılım hacmi (Vd) 1-7 L/kg arasında değişir; tavuklarda enrofloksasin için Vd 4.3 L/kg'dır (Broome ve ark., 1991). Enrofloksasinin hayvanlardaki biyolojik yarı ömrü 2-6 saat arasındadır (Scheer, 1987).

Enrofloksasin eklem sıvısı ve prostat da dahil, tüm vücut kesimlerine çok iyi nüfuz etmesi (Brain ve Scully, 1990; Plumb, 1991; Küng ve ark., 1993; Kaya ve ark., 2007), ağızdan ve parenteral uygulama yollarından iyi emilmesi, dağılım hacminin büyük olması, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı geniş etki spektrumuna sahip olması (Neer, 1988; Neuman, 1988; Anadon ve ark., 1990; Scully, 1990; Walker ve ark., 1992; Prescott ve ark., 1993; Anadon ve ark., 1995; Kaya ve ark., 1996; Mitchell, 2006), diğer ilaçlara dirençli bakterilere karşı da etkili olması (Neuman, 1988; Posniyak ve ark., 1999; Antonello ve ark., 1993) ve hastaların tahammülünün son derece iyi olması (Kaya ve ark., 1996; Kaya ve ark., 2007) başlıca üstünlükleridir.

Tükürük ve bronş salgılarındaki doruk ilaç yoğunluğu serumdakinden düşük, ancak akciğer dokusundaki yoğunlukları serumdakinden fazladır (Neuman, 1988). Beyin ve omurilik sıvısına geçebilmesi düşüktür (Anadon ve ark., 1990).

Biyoyararlanımını etkileyen faktörler arasında besinler ve besinlerde bulunan bazı bileşikler yer alır. Bu bileşiklerin başında mağnezyum ve alüminyum gelir. Bunlar, ilaçla şelat oluşturarak, biyoyararlanımını düşürür (Vancutsem ve ark., 1990).

Enrofloksasinin, tavuklarda 10 mg/kg dozda damar içi (Dİ) tek doz enjeksiyonundan sonra farmakokinetiği incelenmiş ve iki-bölmeli dışarıya açık modele uygun olarak dağıldığı tespit edilmiştir (Anadon ve ark., 1995; Abd. El-Aziz ve ark., 1997; Ovando ve ark., 1999).

Enrofloksasin vücutta, kendisi gibi etkili siprofloksasin yanında, birçoğu etkisiz metabolite çevrilir (Kung ve ark., 1993). İlacın %10-50 kadarı değişmemiş halde başlıca idrar (Dimitrova ve ark., 2006) ve safrayla vücutu terk eder. Safrayla sindirim kanalına gelen ilacın bir kısmı buradan geri emilir. İlaç böbreklerden başlıca etkin tübüler salgılama ile atılır (Scully, 1990; Baydan ve ark., 1998; Mitchell, 2006). Atılma yarı ömrü tavuklarda 10 saat, hindilerde 4-6 saat ve köpeklerde 4 saat dolayındadır (Kaya ve ark., 2007).

1.2.3. Farmakodinamik Özellikleri

Enrofloksasin duyarlı bakterilerde *DNA jirazin (topoizomeraz II)* etkinliğini engeller (Anadon ve ark. 1990; Flammer ve ark., 1991; Plumb, 1991; Anadon ve ark., 1995; Kaya ve ark., 1996; Sumano ve ark., 2001; Kaya ve ark., 2007).

Enrofloksasin doğrudan DNA sentezini baskılar. *Topoizomeraz II* ve *Topoizomeraz IV* olarak adlandırılan iki enzimi baskılayarak bakteriyel DNA metabolizmasına etki eder. Memeli hücreleri bu enzimlerden yoksun olduğu için bu ilaç sadece bakteri hücrelerini seçici bir şekilde etkiler. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu, DNA kalıbı çıkamadığı için bölünme gerçekleşmez ve bakteriler normal olmayan biçimde uzayarak ölürler (Hooper ve Wolfson, 1991; Hooper ve Wolfson, 1993; Kaya ve ark., 1997; Elmas ve Traş, 1999). Birçok ülkede kanatlıların bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır (Sumano ve ark., 2001 ve 2004).

Enrofloksasinin etki spektrumu geniştir. Gram negatif, Gram pozitif bakterilere, *mikoplazma*, *Riketsia*, *Ehrlichia* ve *Chlamidia*'lara son derece etkilidir (Breitschwerdt ve ark., 1991; Plumb, 1991; Lindenstruth ve Frost, 1993; Kontos ve Athanasiou, 1998). Geniş etki spektrumu ve antimikrobiyal etkinlik için C6 grubuna bağlanan flor ve C7'de bulunan piperazin halkası esastır (Altreuther, 1987; Chu ve Fernandes, 1989; Anadon ve ark., 1995; Intorre ve ark., 1997; Bayer, 1999).

1.2.4. İstenmeyen Etkileri

Bakteriyel *Topoizomeraz II* üzerinde kinolonların etkisi ökaryotikjirazdaki etkisinden 100-1000 kat daha güçlüdür. Bu nedenle memeli dokularında kinolonların zehirliliği genellikle azdır (Boothe, 1994).

Teratojenik ve mutajenik etkisi yoktur (Altreuther, 1987). Fakat kıkırdak dokunun gelişmesini ve eklemleri bozabilir. Bu sebeple, gelişmesini tamamlamamış hayvanlarda kullanılması tavsiye edilmez (Plumb, 1991; Giguere ve ark., 2006; Kaya ve ark., 2007). Florokinolonların tendo yırtılmalarına neden olduğuna ilişkin ilk bilgiler 1991'de bildirilmiştir. Yetişkin ve yetişkin olmayan ratlarda florokinolonlarla tedavi sonrasında tendositlerde ultrastruktürel değişiklikler görülür. Etkiler aynı zamanda hayvanlara magnezyum içermeyen diyetler verildiğinde de belirgin şekilde ortaya çıkmıştır; bu durum tendopatilerin fizyopatolojisinin kıkırdak dokudaki etkilere benzerlik gösterdiğine işaret etmektedir (Shakibaei ve ark., 2000).

Enrofloksasinin, suyla 1000 mg/L miktarda 3 gün süre ile verilmesi, damızlık tavuk ve hindilerde su tüketimi, dölleme, yumurtlama ve yumurtadan çıkan civciv oranında bir değişikliğe sebep olmaz (Watanabe ve ark., 1992).

İdrarda yüksek yoğunluklara ulaştığında ve asidik pH'da düşük çözünürlük özelliklerinden dolayı üriner kanalda kristalizasyona sebep olabilir (Vancutsem ve ark., 1990).

MSS, mide barsak kanalı (kusma, iştahsızlık) ve lökomotor sistem ile ilgili rahatsızlıklar kinolonların en önemli yan etkilerini oluşturur (Plumb, 1991; Giguere ve ark., 2006). Enrofloksasinin fare ve ratların sinir sisteminde şiddetli etki göstermediği bildirilmiştir (Filazi, 1995). Bununla birlikte, köpek ve kedi sinir sisteminde etkisi yoktur (Altreuther, 1992). Florokinolonlar merkezi sinir sisteminde ve uygulandıkları yerlerdeki deride alerjik tepkimelere neden olabilirler. Nadiren görülen bu etkiler hafif seyrederek ve kendi kendine sona erer (Ball, 1989; Filazi, 1995).

1.2.5. Kullanılması

Florokinolonlar duyarlı bakterilerden ileri gelen sindirim ve solunum sistemi, idrar ve üreme kanalı, karın ve pelvis içi, kemik ve eklem, yumuşak doku, göz kulak ve deri hastalıklarının sağaltımında geniş kullanım alanı bulurlar (Wolfson ve Hooper, 1989; Rutgers ve ark., 1994; Kaya ve ark., 2007; Bertino ve Fish; 2000). İlaçların büyük bir kısmı beşeri hekimlikte kullanılır; bunlardan sadece enrofloksasin, nafloksasin, siprofloksasin, danofloksasin ve flumequin ülkemizde veteriner sağaltımına sokulmuş ve pazarlanmıştır (Kaya ve ark., 2007).

Enrofloksasin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumuna sahiptir (Neer, 1988; Scully, 1990; Posniak ve ark., 1999; Giguere ve ark., 2006). Hayvanlarda özellikle *Mycoplasma* türleri ve *koliiform* bakterilerden ileri gelen hastalıkların sağaltımında başarıyla kullanılır (Bauditz, 1987; Paton ve ark., 1988; Prescott ve ark., 1993; Kaya ve ark., 2007). Plazmada en yüksek yoğunluğa ulaşmak için, enrofloksasinin günlük dozu tek sefer uygulanmalıdır. Tekrarlayan enfeksiyonlarda veya pseudomonas enfeksiyonlarında ilacın günlük dozu ve süresinin artırılması tavsiye edilmiştir (Wetzstein ve DoJong, 1996; Boothe, 1997).

Enrofloksasin, başta kanatlılar olmak üzere, evcil hayvanlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Anadon ve ark., 1990; Flammer ve ark., 1991; Plumb, 1991; Anadon ve ark., 1995; Kaya ve ark., 1996; Sumano ve ark., 2001; Kaya ve ark., 2007). Tavuk, hindi,

ördek, kaz ve civcivlerde 10 mg/kg canlı ağırlık dozunda içme suyuna katılarak 3-5 gün süreyle uygulanır (Bauditz, 1987; Paton ve ark., 1988; Kaya ve ark., 2007). Enrofloksasin alabalıkların *Aeromonas salmonicida* enfeksiyonlarında 10 mg/kg dozda uygulanmaktadır. Tavuk ve hindilerin CRD enfeksiyonlarında ve sığırların mastitislerinin sağaltımında da kullanılmaktadır (İbrahim, 2006).

Türkiye’de çeşitli formülasyonlar halinde 68 enrofloksasin müstahzarı vardır; Ekim 2009 itibari ile bunların 32’si ağızdan kullanıma uygun çözeltilerdir (Çizelge 1.2.5.1); bunlar da ağırlıklı olarak kanatlılarda kullanılmaktadırlar (KKGM, 2009).

Çizelge 1.2.5.1. Türkiye’de ruhsatlı enrofloksasinin ağızdan kullanıma uygun çözeltileri.

Müstahzar ismi	Etkin madde miktarı	Üretici Firma
Baytril %10 çözelti	100 mg/ml	Bayer Türk
Baytril %2,5 çözelti	25 mg/ml	Bayer Türk
Corusun %2,5 çözelti	25 mg/ml	Galenka
Enrocure %10 çözelti	100 mg/ml	Teknovet
Enroxil Çözelti	100 mg/ml	Provet
Enroxlacin çözelti	100 mg/ml	Aksu eczacılık
Enrolen forte %20 çözelti	200mg/ml	Alke
Enrolen çözelti	100 mg/ml	Alke
Floksin %10 çözelti	100 mg/ml	Galenka
Floksin fort çözelti	200mg/ml	Galenka
Hipralona enro-s	100 mg/ml	Hipra
Kinoloks çözelti	100 mg/ml	Etkin
Menafloks çözelti	100 mg/ml	İ.e.veteriner
Mediquinol %10 çözelti	100 mg/ml	Medicavet
Mediquinol %20	200mg/ml	Medicavet
Quinoex %10 çözelti	100 mg/ml	Ceva-dif
Roxanova	100mg/ml	Cyb
Roxanova %20 çözelti	200 mg/ml	Cyb
Salmoflox çözelti	100 mg/ml	Ege-vet
Vetril %10 çözelti	100 mg/ml	Vetaş
Vil-floks	100 mg/ml	Vilsan
Vilfoks forte	200mg/ml	Vilsan
Vienrocin	100 mg/ml	Vimar
Vienrocin %20	200mg/ml	Vimar
Killoxacin %10	100 mg/ml	Bavet
Enofilin %10	100 mg/ml	Arma
Enofilin %20	200mg/ml	Arma
Roxycol	100 mg/ml	Topkim
Enrobay	100 mg/ml	Atabay
Colmyc-e	100 mg/ml	Tempe
Megatril	100 mg/ml	Megavet
Enromis	200mg/ml	Mistav

1.3. Siprofloksasin

Yapı yönünden enrofloksasine çok benzer; tek farkı 7-(etil-1-piperazinil) grubu yerine 7-(1-piperazinil) grubunun bulunmasıdır. Hidroklorür tuzu şeklinde bulunur; sarımsı renkte, suda az çözünen, kristalize tozdur.

Ağızdan verildiğinde sindirim kanalından genellikle değişik oranda emilir; insanlarda biyoyararlanımı %50-60, buzağılarda %50, midilli atlarında %2-10 arındadır. Verilmesini takiben 1-2 saatte plazma doruk yoğunluğa ulaşır. Plazma proteinlerine değişik oranda (buzağılarda %70, domuzlarda %20-25) bağlanır. İlacın %15-50'si değişmemiş halde idrarla çıkarılır; safra ile de atılır. Atılma yarı ömrü köpek, buzağı ve domuzlarda 2,5-8 saat arındadır. Plazmadaki yoğunluğu çoğu bakteri için EKEY₉₀'ın birçok katıdır (Kaya ve ark., 2007).

Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı hem insan hem de veteriner hekimlikte geniş bir kullanım alanı bulur (Hooper ve Wolfson, 1991; Vybiralova ve ark., 2005). İlacın etki spektrumu enrofloksasine benzer. Etkisi hızlı gelişir; duyarlı bakteriler 20-30 dk içinde ölürlr. Özellikle *Aeromonas*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Staph. intermedius*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Ps. aeruginosa*, *Yersinia*, *Serratia* ve *Vibrio türleri* olmak üzere bakterilere oldukça etkilidir. İlaça duyarlı bazı bakteriler de şunlardır: *Brusella* türleri, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*, penisilinaz salgılayan ve metisiline dirençliler de dahil *Staphylococcus* türleri, *Mycobacterium* türleri (Terp ve Rybak, 1987; Giguere ve ark., 2006; Kaya ve ark., 2007).

Köpeklere 2 hafta süreyle 100 mg/kg dozda verildiğinde, kıkırdak yapıda hasara yol açabilir. Gebelere ağızdan 200 mg/kg veya parenteral 25 mg/kg dozda uygulandığında, yavruda teratojenik etkisi mevcuttur. Güneş ışığına duyarlı kılıcı etkisi de vardır (Kaya ve ark., 2007).

İstenmeyen etkilerinin çoğu mide bulantısı, kusma gibi mide-bağırsak sistemi ile ilgilidir (Terp ve Rybak, 1987).

Köpek ve kedilere ağızdan günde 2 kez ve 7-14 gün süreyle 5-15 mg/kg kullanılır. Tavşanlarda ağızdan günde 2 kez 5-20 mg/kg; gerbil, hamster, kobay gibi deney hayvanlarında günde 2 kez 5-10 mg/kg dozlarda kullanılır (Kaya ve ark., 2007).

1.4. Danofloksasin

Mesilat tuzu halinde bulunur; suda iyi (170 mg/ml) çözünür. Ağızdan iyi, Kİ ve DA uygulama yerinden tama yakın oranda (\geq %95) emilir. Akciğer dokusuna biraz daha iyi nüfuz etmesi dışında, özellikleri bakımından genellikle enrofloksasine benzer. Kİ yolla verilince akciğerlerdeki yoğunluğu plazmadakinin 4 katından fazladır. İlacın çoğu bakteri türündeki (*P. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somnus* gibi) EKEY'i 0.125 μ g/ml dolayındadır. Hayvanlara DA

ve KÍ yolla 1.25 mg/kg dozda uygulanır. Kanatlılarda ağızdan 5 mg/kg dozda kullanılır; buna göre, içme suyuna 25-50 mg/L miktarlarda katılır (Kaya ve ark., 2007).

1.5. Çalışmanın Amacı

Çalışmada, Türkiye’de kanatlılarda içme suyuna katılarak kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış enrofloksasin içeren 3 müstahzar (birisi ilk ruhsatlı, diğerleri daha sonra ruhsatlandırılmış) seçilerek, biyoeşdeğerliklerinin incelenmesi; farmasötik yönden benzer/birbirinin aynısı olan müstahzarların bazı farmakokinetik değişkenler esasına göre benzerliklerinin veya aralarında fark olup-olmadığının ortaya konulması; böylece, klinik sağaltım yönünden birbirine üstünlüklerinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Araç ve Cihazlar

- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK): Üretici Firma Thermo Finnigan, Model Surveyor, İngiltere) ve ekleri
 - o Diode Array Detektör (DAD; Surveyor)
 - o Gradient Pompa (Surveyor)
 - o Kolon (BDS C18 (250 mm X 4,6 mm X 5 µm)
 - o Autosampler (Surveyor)
- Hassas Terazî: Metler Toledo, Switzerland, AG204, Max 210g, Cihaz No C.İKK.19
- Vortex: Heidolph, Germany, AC 230 V, 50/60 Hz, 51W, 2500 rpm, Reax Control Type, Seri No. 090402790
- Şişe Çalkalayıcı: REAX 20, Heidolph Instruments, G.B 10326, 15 rpm
- Santrifüj: Kendo, Heraeus, Germany, Baujahr 2000, 37.2 kNm, 230 V_, 50/60 Hz, 8.0 A, 1400 W, Bestell-Nr 75005282 Sertifika No 107020425, GB 9969, D-37520 Osterode
- Numune Yoğunlaştırıcı: Zymark, GB10378, Sertifika No 107020426 Turbo Vap® LV
- Manyetik Karıştırıcı: VARIQMAG®, Electronicrühler, POLY 15, Hız 1/min
- pH Metre: Metler Toledo, GB 10522, MP 220
- Deiyonize Su Cihazı: ELGA, Purelab Ultra, GB 10341, Seri No PR07M193651

2.1.2. Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve İlaçlar

- Asetonitril (ACN): Gradient Grade for Liquid Chromatography, Merck 100030, LiChrosolv®
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄): Merck 1.04871.1000
- Ortofosforik asit (H₃PO₄): RPE-Analytical Grade Reagent, CAS No 7664-38-2, EEC-No 231-633-2
- Trietilamin (C₂H₅)₃N: J.T. Baker 8079
- Diklorometan (CH₂CL₂): Merck K369000644 707
- Sodyum hidroksit (NaOH): Merck, Lot No B0265262 829
- 1 M NaOH: 40 g NaOH alındı 1 L deiyonize suda çözdürüldü.
- 0,05 M NaOH: 2 g NaOH tartıldı 1L deiyonize suda çözdürüldü.
- 0,1 M NaOH: 4 g NaOH tartıldı 1 L deiyonize suda çözdürüldü.

- Potasyum hidroksit (KOH): Merck, Lot No B858612 143
- %10'luk KOH: 10 g KOH tartıldı, deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Sitrik asit: (C₃H₄(OH)(COOH).H₂O): Riedel-De Haen A.G. Seelze-Hannover, Lot No 059664
- Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄): Merck, Lot No F1438886 626
- Fizyolojik tuzlu su (FTS): Eczacıbaşı-Baxter H.Ü. San. Ve Tic. A.Ş., Vacoliter[®], Seri No G09 03 016 Ruhsat Tarihi ve No 16.01.1990-151/60, Üretim Tarihi 03.2007, Son Kullanım Tarihi 02.2010.
- Deiyonize su
- Enrofloksasin: Etkinliği %100,3; Üretim Tarihi 11.04.2006, Son Kullanma Tarihi 11.04.2008, Seri No 176293, Lot 010001160374, Batch KP047PZ. Bayer Türk A.Ş.'den temin edildi.
- Siprofloksasin: Etkinliği %99,55; Üretim Tarihi Ağustos 2006, Son Kullanma Tarihi Temmuz 2009. İ.E. Veteriner İlaçları Tic. A.Ş.'den temin edildi.
- Danofloksasin: Etkinliği % 74,4; Üretim Tarihi Aralık 1996, Son Kullanma Tarihi Şubat 2010, Lot 99040-QCS. Pfizer'den temin edildi.

2.1.3. İlaç ve Standartlar

2.1.3.1. İlaç

Enrofloksasin Dİ uygulama çözeltisi (10 mg/ml): 100 mg enrofloksasin etkin maddesi 1,25 ml sitrat tampon çözeltisi ile ıslatılarak pH 6,69'a ayarlandı (Gündüz, 1975). Sonra %10'luk KOH ile damla damla (4-5 damla) ilave edilerek enrofloksasin tamamen çözdürüldü ve FTS ile 10 ml'ye tamamlandı.

2.1.3.2. Standartların Hazırlanması

2.1.3.2.1. Stok Standart Çözeltiler

Enrofloksasin stok standardı (1 mg/ml): 10 mg enrofloksasin tartılıp 10 ml 0,05 M NaOH ile çözdürüldü. Enrofloksasin çalışma standart çözeltileri bu stok çözeltiden hazırlandı.

Siprofloksasin stok standardı (1 mg/ml): 10,0452 mg siprofloksasin tartılıp 10 ml 0,05 M NaOH ile çözdürüldü. Siprofloksasin çalışma standart çözeltileri bu stok çözeltiden hazırlandı.

Danofloksasin stok standardı (1 mg/ml): 13,4408 mg danofloksasin tartılıp 10 ml 0,05 M NaOH ile çözdürüldü. Danofloksasin çalışma standart çözeltileri bu stok çözeltiden hazırlandı.

2.1.3.2.2. Çalışma Standart Çözeltiler

Enrofloksasin çalışma standardı 1 (10 mg/ml): Bazı farmakokinetik parametrelerin ölçümü için Grup 1'e Dİ (Çizelge 2.2.2.1) uygulamak için hazırlandı (bkz. 2.1.3.1).

Enrofloksasin çalışma standardı 2 (40 µg/ml): 1 mg/ml'lik enrofloksasin stok standardı çözeltisinden 4 ml alındı; 0,05 M NaOH ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çalışma standart çözeltisinden de 0,05 M NaOH ile 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml'lik seyreltmeler hazırlandı. YBSK'da enrofloksasin ölçümü yapıldı.

Enrofloksasin çalışma standardı 3 (10 µg/ml): 1 mg/ml'lik enrofloksasin stok standardı çözeltisinden 1ml alındı; 0,05 M NaOH ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çalışma standart çözeltisinden de 0,05 M NaOH ile 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml'lik seyreltmeler hazırlandı. YBSK'da enrofloksasin ölçümü yapıldı. Ayrıca, ilaç içermeyen plazma numunelerine (0,8-5,0 µg/ml'lik seyreltmelere) katılarak pozitif numuneler hazırlandı (Çizelge 2.1.3.3.1).

Enrofloksasin çalışma standardı 4 (1 µg/ml): Enrofloksasin çalışma standardı 3'ten 1 ml alındı ve 0,05 M NaOH ile 10 ml'ye tamamlandı. İlaç içermeyen plazma numunelerine (0,05-0,4 µg/ml'lik seyreltmelere) katılarak pozitif numuneler hazırlandı (Çizelge 2.1.3.3.1).

Siprofloksasin çalışma standardı 1 (10 µg/ml): Siprofloksasin stok standardından 1 ml alındı; 0,05 M NaOH ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çalışma standartından 0,05 M NaOH çözeltisi ile 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml'lik seyreltmeler hazırlandı. YBSK'da siprofloksasinin ölçülmesinde kullanıldı. Ayrıca, ilaç içermeyen plazma numunelerine (0,8-5,0 µg/ml'lik seyreltmelere) katılarak pozitif numuneler hazırlandı (Çizelge 2.1.3.3.1).

Siprofloksasin çalışma standardı 2 (1 µg/ml): Siprofloksasin çalışma standardı 1'den 1 ml alındı; 0,05 M NaOH ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. İlaç içermeyen plazma numunelerine (0,05-0,4 µg/ml'lik seyreltmelere) katılarak pozitif numuneler hazırlandı (Çizelge 2.1.3.3.1).

Danofloksasin çalışma standardı 1 (20 µg/ml): Danofloksasin stok standardından 2 ml alındı; 0,05 M NaOH ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Bundan (enrofloksasin-siprofloksasin karışımı içeren) çalışma standardının her bir seyreltmesine (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml) aynı miktarda (100 µl) internal standart olarak katıldı (Çizelge 2.1.3.2.2.2). YBSK'da ölçümü yapıldı.

Danofloksasin çalışma standardı 2 (2 µg/ml): Danofloksasin çalışma standardı 1'den 1 ml alındı; 0,05 M NaOH ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çözelti ilaç içermeyen plazma numunelerine, enrofloksasin-siprofloksasin karışım çalışma standardı seyreltmelerinin her birine (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml) aynı miktarda (50 µl) katıldı (Çizelge 2.1.3.3.1). Sonra özütleme işlemi yapıldı. Böylece geriye kazanç testleri için pozitif numuneler hazırlandı. Daha sonra YBSK'da okundu.

Enrofloksasin-siprofloksasin karışım çalışma standardı: Enrofloksasin çalışma standardı 3 ve Siprofloksasin çalışma standardı 1'in ayrı ayrı tüm seyreltmeleri (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2,5; 5 µg/ml) yapıldı. Her birinden Çizelge 2.1.3.2.2.1'de belirtilen miktarlarda alınarak hazırlandı. Bu karışımlar 0,05 M NaOH ile 10 ml'ye tamamlandı.

Çizelge 2.1.3.2.2.1. Enrofloksasin-siprofloksasin karışım çalışma standartlarının seyreltmeleri.

Enrofloksasin-Siprofloksasin Seyreltmeleri (µg/ml)	Çalışma standartları ve seyreltmelerinden alınan miktar		
	10 µg/ml'lik Enrofloksasin (µl)	10 µg/ml'lik Siprofloksasin (µl)	0,05 M NaOH (µl)
0,05	50	50	9900
0,1	100	100	9800
0,2	200	200	9600
0,4	400	400	9200
0,8	800	800	8400
1,0	1000	1000	8000
2,5	2500	2500	5000
5,0	5000	5000	0

Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardı: Enrofloksasin-siprofloksasin karışım çalışma standardının her bir seyreltmesine danofloksasin çalışma standardı 1'den 100 µl internal standart olarak konuldu; böylece tüm seyreltmelerde danofloksasin yoğunluğu 0,2 µg/ml olması sağlandı. Karışım 0,05 M NaOH ile 10 ml'ye tamamlandı (Çizelge 2.1.3.2.2.2).

Çizelge 2.1.3.2.2. Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardı seyreltmeleri.

Enrofloksasin, Siprofloksasin ve Danofloksasin Seyreltmeleri (µg/ml)	10 µg/ml Enrofloksasin-Siprofloksasin (µl)	20 µg/ml Danofloksasin (µl)	0,05 M NaOH (µl)
Kör	0	100	9900
0,05	50	100	9850
0,1	100	100	9800
0,2	200	100	9700
0,4	400	100	9500
0,8	800	100	9100
1,0	1000	100	8900
2,5	2500	100	7400
5,0	5000	100	4900

2.1.3.3. Pozitif Numunelerin Hazırlanması

Enrofloksasin ve siprofloksasinin 0,05-0,4 µg/ml'lik seyreltmeleri için enrofloksasin çalışma standardı 4 ve siprofloksasin çalışma standardı 2; 0,8-5,0 µg/ml'lik seyreltmeleri için enrofloksasin çalışma standardı 3 ve siprofloksasin çalışma standardı 1; danofloksasinin 0,05-5,0 µg/ml'lik seyreltmeleri için danofloksasin çalışma standardı 2 kullanıldı (Çizelge 2.1.3.3.1). Bunlar, 0,5 ml ilaç içermeyen temiz plazmaya katıldı. Toplam hacmi artırmamak için 0,8-5,0 µg/ml'lik seyreltmeleri hazırlanırken enrofloksasin çalışma standardı 3 ve siprofloksasin çalışma standardı 1 kullanıldı.

Danofloksasinle pozitif numunelerin hazırlanması için danofloksasin çalışma standardı 2 kullanıldı; böylece, plazmadaki tüm seyreltmelerde danofloksasin yoğunluğu 0,2 µg/ml olması sağlandı (Çizelge 2.1.3.3.1).

Çizelge 2.1.3.3.1. Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım standart çözeltilerinin ilaç içermeyen temiz plazmalara katılan miktarları.

Pozitif Numuneler İçin Enrofloksasin, Siprofloksasin ve Danofloksasin Seyreltmeleri (µg/ml)	2 µg/ml Danofloksasin (µl)	1 µg/ml Enrofloksasin (µl)	1 µg/ml Siprofloksasin (µl)	İlaç içermeyen plazma (ml)
Kör	50	0	0	0,5
0,05	50	25	25	0,5
0,1	50	50	50	0,5
0,2	50	100	100	0,5
0,4	50	200	200	0,5

Pozitif Numuneler İçin Enrofloksasin, Siprofloksasin ve Danofloksasin Seyreltmeleri (µg/ml)	2 µg/ml Danofloksasin (µl)	10 µg/ml Enrofloksasin (µl)	10 µg/ml Siprofloksasin (µl)	İlaç içermeyen plazma (ml)
0,8	50	40	40	0,5
1	50	50	50	0,5
2,5	50	125	125	0,5
5	50	250	250	0,5

Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin ile hazırlanan karışım çalışma standardı seyreltmeleri YBSK'da okunduktan sonra hesaplanan sonuçlarla, bu çalışma standartlarını ilaç içermeyen temiz plazmalara katıp özütleme işlemini tamamladıktan sonra alınan sonuçlar karşılaştırıldı; duyarlılık limiti ve geriye kazanç belirlendi.

2.1.3.4. İlaç Müstahzarları

- Referans İlaç: 100 mg/ml enrofloksasin; Oral susp. 500 ml/şişe.
- Test 1 İlaç: 100 mg/ml enrofloksasin; Oral susp. 100 ml/şişe.
- Test 2 İlaç: 100 mg/ml enrofloksasin; Oral susp. 100 ml/şişe.

Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçları doğrudan üretici firmalardan temin edildi. İlaçların üretim ve son kullanma tarihi, seri numarası gibi tanımlayıcı bilgileri kaydedildi. Çalışmaya başlamadan önce, ilaçların etkin madde miktarları ölçüldü.

2.1.4. Laboratuvar Malzemeleri

- Cam tüp: 10 ml
- Heparinli tüp: 10 ml
- Ağız vida kapaklı, dereceli, dibi konik santrifüj tüpü: 15 ml
- Balon joje: İnterlab, 100-1000 ml
- Cam pipet: İnterlab, 1ml, 5ml
- Mikropipet: Eppendorf Research
- Beher: İnterlab, 50 ml
- Mezür: İnterlab, 250 ml
- Huni: İnterlab
- Ependorf tüp: 1,5 ml
- Yeşil enjektör iğnesi
- İnsülin enjektörü: Hayat 1 ml
- Tavuk sondası
- Rütin laboratuvar araç ve gereçleri ile cam malzemeler

2.1.5. Tampon Çözeltiler

Sitrat Tampon Çözeltisi (Gündüz, 1975)

Ana stok çözelti (disodyum sitrat çözeltisi): 2,1 g sitrik asit 20 ml 1 N NaOH içerisinde çözdürüldü ve deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Disodyum sitrat çözeltisinden 5,25 ml alındı; 4,75 ml 0,1 N NaOH ile karıştırılarak pH 6,69'a ayarlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi (Gündüz, 1975)

A çözeltisi: 9,080 g KH_2PO_4 deiyonize suda çözdürülerek 1 L'ye tamamlandı.

B çözeltisi: 11,880 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ deiyonize suda çözdürülerek 1 L'ye tamamlandı.

A çözeltisinden 2,0 ml, B çözeltisinden 8,0 ml alınarak karıştırıldı. Bu miktarlarda karıştırma ile pH 7,38 elde edildi.

2.1.6. Mobil Faz

%85'lik ortofosforik asit'ten 0,025 M'lık çözelti hazırlandı. Sonra, trietilamin ile pH 3,0'a ayarlandı. Mobil fazda kullanılan şişelere bu çözeltilerden 850 ml konuldu. Üzerine 150 ml ACN ilave edilerek karıştırıldı ve süzüldü. Degazda 15 dk bekletilerek hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Hazırlanan mobil faz cihaza yerleştirildi.

2.1.7. Deneme Hayvanları

Çalışmada Öz-Ak Tarım Ürünleri Gıda Turizm ve San. Tic. A.Ş., Ankara'dan temin edilen toplam 40 Ross 308 ırkı, günlük etçi erkek civciv kullanıldı.

2.2. Yöntem

Civcivlerin bakım ve beslenmesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Deneme Birimi'nde, kan alma ve plazmaların ayrılması Ankara

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında, özütleme işlemleri ve ölçümler Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Çalışma ile ilgili Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Ek-1).

2.2.1. Hayvanların Bakım ve Beslenmesi

Civcivler günlük olarak alındı. Hayvanlar gruplara ayrılmadan ilk hafta 30°C, diğer haftalarda 24-29°C sıcaklığa sahip ortamda 30 gün boyunca ilaç/kirletici madde kalıntısı (Kaya, 2006) içermeyen yemle beslendi ve sürekli ışık almaları sağlandı. Hayvanlara, deneme süresince su ve yem serbestçe sağlandı; ışık ve sıcaklık kontrol edildi. Yemin bileşimi Çizelge 2.2.1.1 de verildi.

Çizelge 2.2.1.1. Çalışmada hayvanlara yedirilen yemin özellikleri.

Ham madde	Oran, %
Mısır	45
Soya	15
Et Kemik	6
Tam yağlı soya	27,75
Kireç taşı	0,2
Dikalsiyum fosfat	1,5
Yemek tuzu	0,25
Vitaminler	0,30
Metionin	0,2
Ham protein	22
Metabolik enerji	3000 Kcal

2.2.2. Hayvanların Gruplandırılması

Hayvanlar 30 günün sonunda her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba (Grup 1, 2, 3, 4) ayrıldı (Çizelge 2.2.2.1). Her gruptaki hayvanlar ayrı ayrı tartılarak canlı ağırlıkları (1.8-2.15 kg arasında) belirlendi.

Her hayvanın 48 saatlik kan alma periyodu boyunca birbirleriyle temasları, oluşturulan özel barındırma sisteminde engellendi. Hayvanların isimlendirilmesi, çeşitli bölgelerinin boyanması şeklinde yapıldı. İlaç uygulaması yapılacağı günden önceki akşam hayvanların yem ve suları kaldırıldı.

Çizelge 2.2.2.1. Plazma ilaç yoğunluğunu belirlemek için kullanılan gruplar.

Gruplar	Enrofloksasin Dozu	Uygulama Yolu	Verilen Madde
Grup 1	10 mg/kg c.a.	Damar içi (Dİ)	Etkin madde
Grup 2	10 mg/kg c.a.	Ağızdan kursak içi	Referans ilaç
Grup 3	10 mg/kg c.a.	Ağızdan kursak içi	Test-1 ilaç
Grup 4	10 mg/kg c.a.	Ağızdan kursak içi	Test-2 ilaç

2.2.3. İlaçların Verilmesi ve Doz

Enrofloksasin çalışma standardı 1 Grup 1'e Dİ yolla; Referans İlaç Grup 2'ye, Test 1 İlaç Grup 3'e ve Test 2 İlaç Grup 4'e sonda ile ağızdan kursak içi yolla verildi. Tüm uygulamalarda doz 10 mg/kg c.a. olarak hesaplandı.

2.2.4. Kan Numunelerinin Toplanması

İlaçların uygulamasını takiben Grup 1'deki hayvanlardan ilaç verilmeden önce (0,0 dk), ilaç verildikten sonra 5. dk'dan, diğerlerinde 0,25. saatten başlamak üzere, 0,5., 1., 2., 4., 8., 12., 18., 24., 36. ve 48. saatlerde kanat altı damarından (*v.cutenea ulnaris*) heparinli tüplere doğrudan her seferinde yaklaşık 1,0-2,0 ml kan alındı.

Kan numuneleri alındıktan sonra 1 saat içinde 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar, ilaç analizleri yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Tüm numunelerde analizler 2 hafta içinde gerçekleştirildi.

2.2.5. Plazmada İlaç Analizi

Plazmada enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin analizlerinde özütleme ve numunelerin ölçümü Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde YBSK cihazı ile gerçekleştirildi.

2.2.5.1. Plazmada Enrofloksasin ve Siprofloksasin Yoğunluklarının Ölçülmesi

Plazmadan enrofloksasin ve siprofloksasinin özütlenmesi ve ölçülmesi Groeneveld ve Brouwers (1986)'in bildirdiği yöntemi esas alan Anadon ve ark. (1995) tarafından bildirilen YBSK yöntemine göre yapıldı.

Ağız vida kapaklı konik dereceli tüp içerisine 0,5 ml plazma alındı. Üzerine 50 µl danofloksasin, 0,5 ml fosfat tampon çözeltisi (pH 7,5) ve 1,5 ml diklorometan ilave edildi. Tüplerin ağız kapatılıp şişe çalkalayıcıda hafifçe karıştırıldı (100 devir/dk, 10 dk). Sonra 2500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Alttaki diklorometan kısmı insülin enjektörü yardımı ile temiz cam tüpe alındı. Üstteki kısım üzerine 0,5 ml fosfat tampon çözeltisi ve 1,5 ml diklorometan konularak tekrar çalkalayıcıda aynı devir ve hızda karıştırıldı. Tekrar 2500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Alttaki diklorometan kısmı insülin enjektörü yardımı ile alınarak daha önce alınıp temiz tüpe konulan diklorometan kısmına eklendi. Üstte kalan kısımda özütleme işlemi bir kez daha tekrarlandı. Son diklorometan kısmı da alınıp diğerleri ile birleştirildi; sonra 30 °C'de azot akımında uçuruldu. Uçurma işlemi sonunda özüt 0,5 ml 0,05 M NaOH ile çözdürüldü. Filtreli enjektör yardımı ile YBSK'ya ait özel şişeler içerisine süzülerek YBSK'ya uygulandı. Otomatik örnekleyici okuma işlemi 278 nm dalga boyunda ve bu özütten 20 µl kullanacak şekilde ayarlandı. Mobil fazın akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı.

2.2.5.2. Standartların Çıkış Zamanlarının Belirlenmesi

Enrofloksasin çalışma standardı 3, siprofloksasin çalışma standardı 1 ve danofloksasin çalışma standardı 1 (internal standart olarak) ayrı ayrı ve karışım halinde (Çizelge 2.1.3.2.2.2) cihaza enjekte edilerek çıkış zamanları (dk olarak) belirlendi.

2.2.5.3. Duyarlılık Limiti ve Geriye Kazancın Belirlenmesi

Standart eğrilerin çizilmesi, geriye kazanç testlerinin yapılması için, Çizelge 2.1.3.2.2.2'de belirtilen miktarlarda enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standart çözeltisi seyreltmeleri hazırlandı. Bu karışım çalışma standart seyreltmelerinin her birinden YBSK'ya 20 µl enjekte edildi. Buradan alınan sonuçlara göre standart eğri çizildi.

İlaç içermeyen temiz plazmaya Çizelge 2.1.3.3.1'de belirtilen miktarlarda enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardı çözeltisinden eklendi. Numune analizlerinde olduğu gibi aynı özütleme işlemleri burada da gerçekleştirildi. Özütlerden YBSK'ya 20 µl enjekte edildi. Buradan alınan sonuçlara göre standart eğri çizildi ve geriye kazanç hesaplandı.

2.2.6. Farmakokinetik Hesaplamalar

Plazma ilaç yoğunluğu dağılma dönemi hız sabitesi (α), emilme hız sabitesi k_a , α -dönemi yarı ömrü ($t_{1/2\alpha}$), ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü ($t_{1/2a}$), plazma ilaç yoğunluğu atılma dönemi hız sabitesi (β), atılma dönemi yarılanma ömrü ($t_{1/2\beta}$), plazma ilaç yoğunluk-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA), ilacın vücuttan % 63,2'sinin atılması için geçen süre (ortalama kalış süresi, OKS), plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi (t_{doruk}) ve plazma doruk ilaç yoğunluğu (Y_{doruk}) hesaplandı. t_{doruk} ve Y_{doruk} plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinden, diğerleri Shumaker (1986) tarafından bildirilen eşitlikleri esas alan Pharmacokinetic Calculation (PKCALC) programı ile gerçekleştirildi.

2.2.7. İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel hesaplamalar için "SPSS 11.0 for Windows" istatistik paket programından yararlanıldı. Veriler, aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. Farmakokinetik veriler için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı ve gruplar arasındaki farklılıklar Duncan testi ile değerlendirildi (Özdemir, 2005).

2.2.8. Biyoşdeğerlik Parametreleri

Biyoşdeğerlik çalışmalarını için, EAA, Y_{doruk} dikkate alındı; bu ölçütlerle, ilaçlar arasındaki biyoşdeğerlik durumu değerlendirildi. EAA ve Y_{doruk} değerlerinin normal dağıldığı kabul edilerek dönüştürülmemiş verilere varyans analizi ANOVA uygulandı. Alternatif olarak EAA ve Y_{doruk} değerlerinin log-normal dağılım gösterdiği kabul edilerek log-dönüştürülmüş verilere de ANOVA uygulanabilir (Toutain ve Koritz, 1997; Hantash ve ark., 2008; Resmi Gazete, 1994).

3. BULGULAR

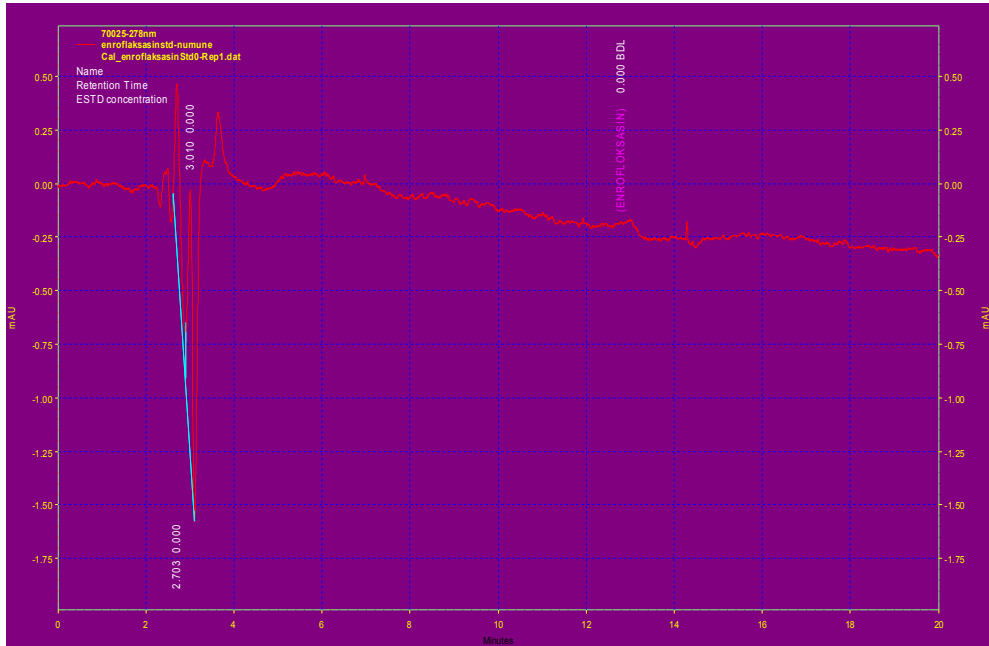
3.1. Yöntemin Duyarlılığı, Tekrarlanabilirliği ve Geriye Kazanç

3.1.1. Enrofloksasin, Siprofloksasin ve Danofloksasin'in YBSK'da Çıkış Zamanları

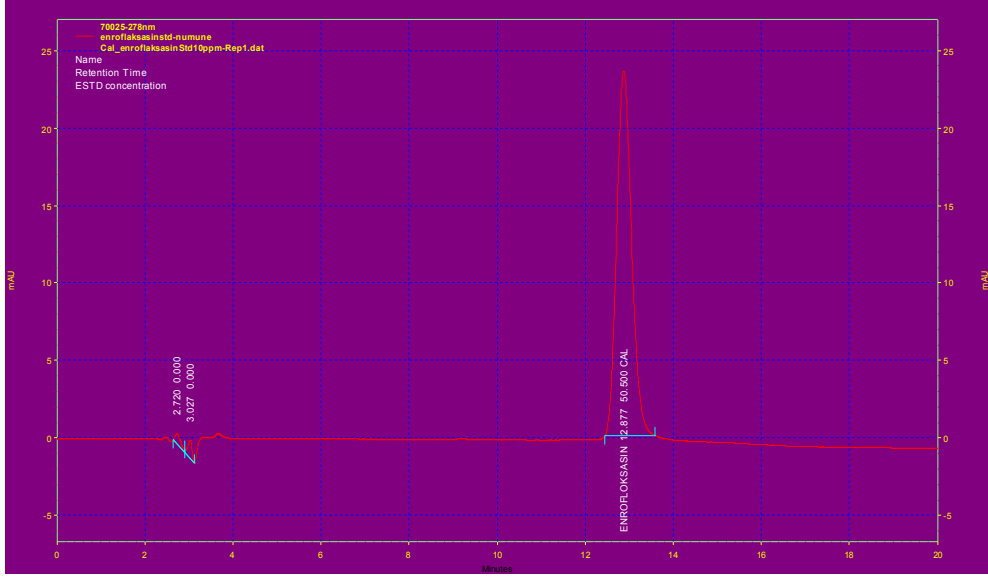
Cihaza önce %1 NaOH çözeltisi yerleştirildi. Otomatik örnekleyici bu çözeltilerden 20 µl kullandı ve kromatogramı alındı (Şekil 3.1.1.1). Sonra, enrofloksasin etkin maddesi belli yoğunluklarda (10 µg/ml, 40 µg/ml) hazırlanıp otomatik örnekleyiciye yerleştirildi; otomatik örnekleyici enrofloksasinin bu seyreltmelerinden 20 µl kullandı ve düzgün pik verip vermediği tespit edildi (Şekil 3.1.1.2 - 3.1.1.3).

Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışımı çalışma standardı otomatik örnekleyiciye yerleştirilerek (Çizelge 2.1.3.2.2.2) piklerinin zamanları tespit edildi ve Çizelge 3.1.1.1'de verildi.

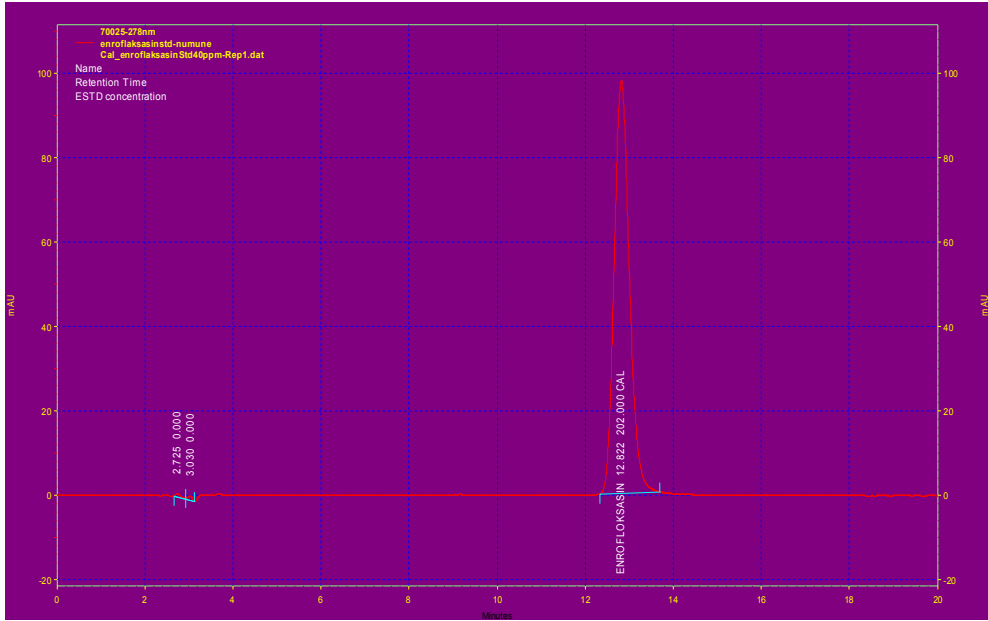
İlaç verilmeden önce hayvanlardan alınan ilaç içermeyen temiz kandan ayrılan plazmalarda aynı şartlarda özütleme işlemi yapıldı; özütler, YBSK'ya uygulandı ve kromatogramı alındı (Şekil 3.1.1.4). Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasinin pik verdiği zamanlarda herhangi bir pik oluşmadığı görüldü.



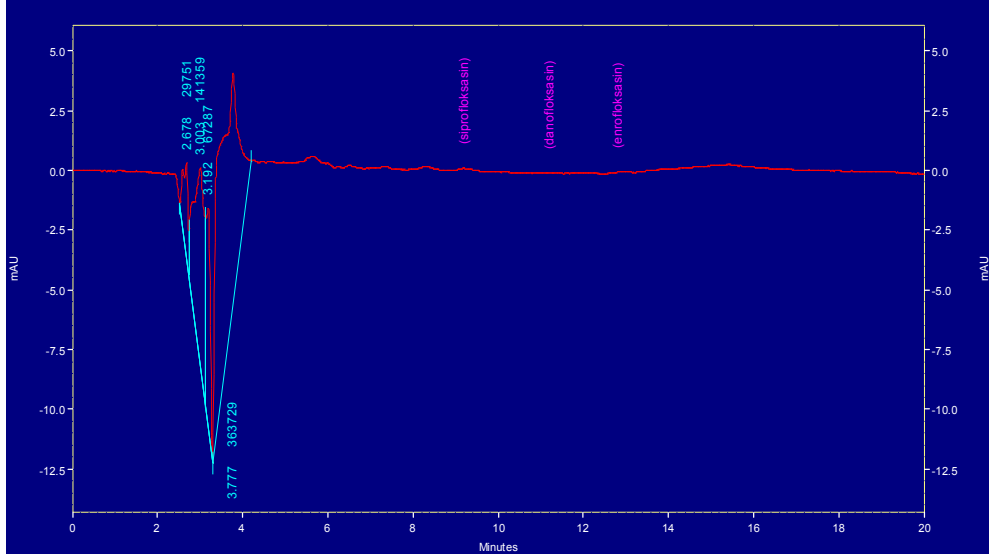
Şekil 3.1.1.1. NaOH çözeltisinin kromatogramı (%1 çözeltiden 20 µl).



Şekil 3.1.1.2. Enrofloksasin etkin maddesinin kromotogramı (10 µg/ml çözeltiden 20 µl).



Şekil 3.1.1.3. Enrofloksasin etkin maddesinin kromotogramı (40 µg/ml çözeltiden 20 µl).



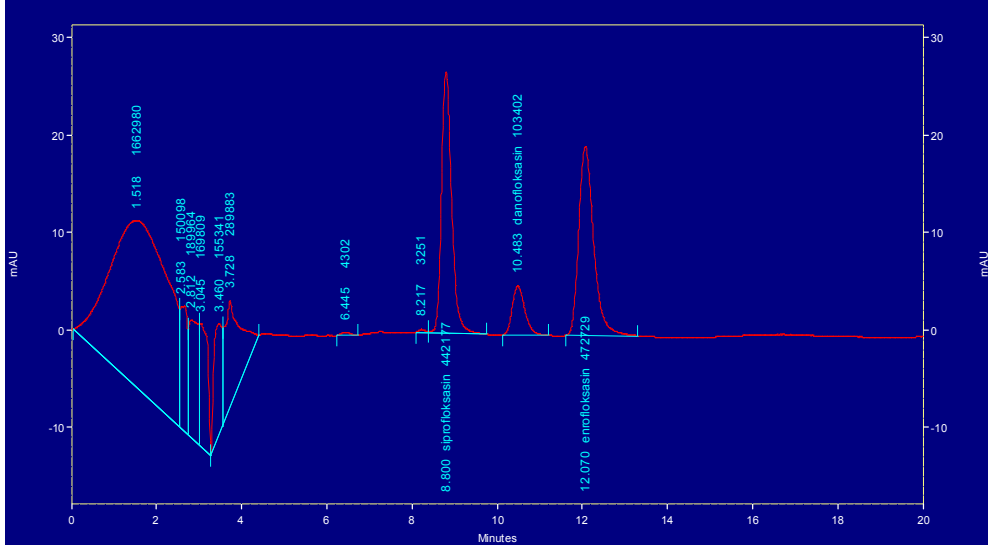
Şekil 3.1.1.4. İlaç içermeyen temiz plazma kromatogramı.

Çizelge 3.1.1.1. Standartların çıkış zamanları.

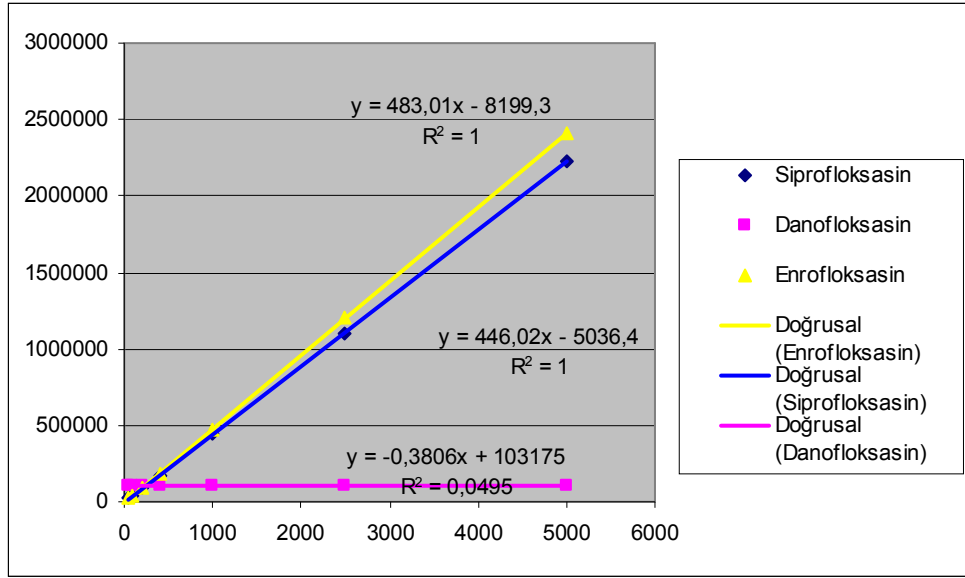
Etkin madde	Çıkış zamanı, dk
Enrofloksasin	11,9 – 12,8
Siprofloksasin	8,4 – 9,2
Danofloksasin	10,4 – 11,2

3.1.2. Standart Eğriler ve Geriye Kazanç Denemeleri

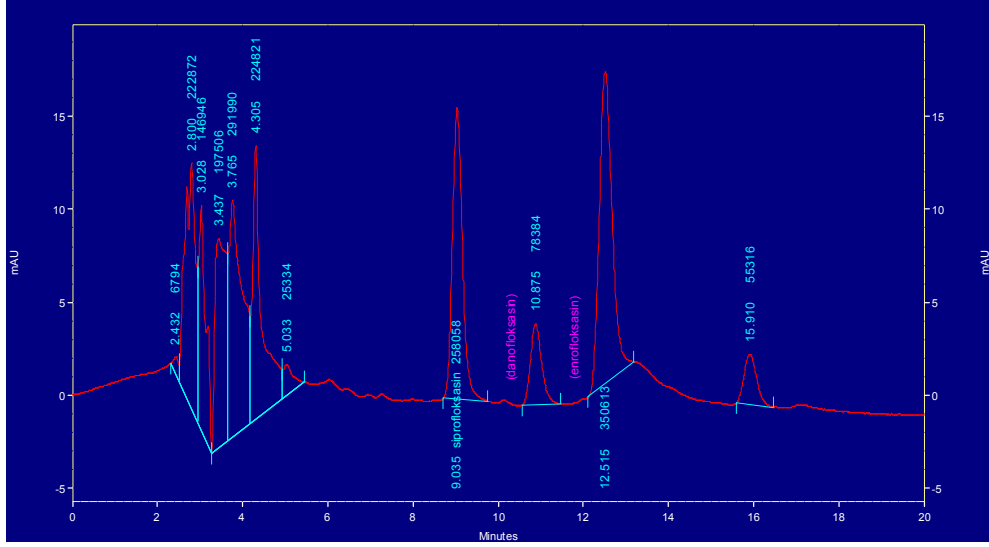
Önce, 1 µg/ml yoğunluğundaki enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardı (Çizelge 2.1.3.2.2.2) hazırlandı; otomatik örnekleyiciye yerleştirildi. Otomatik örnekleyici bundan 20 µl kullandı. Sonra verdiği pik ve alanları (Şekil 3.1.2.1) yardımı ile doğrusal eğriler çizildi (Şekil 3.1.2.2); elde edilen eğrilerin denklemleri hesaplandı. Sonra, ilaç içermeyen temiz plazmalara dışarıdan Çizelge 2.1.3.3.1'de belirtilen miktarlarda etkin madde katılarak özütleme işlemi yapıldı ve otomatik örnekleyiciye yerleştirildi. Otomatik örnekleyici bu özütten 20 µl kullandı, elde edilen pik alanları (Şekil 3.1.2.3) yardımı ile de doğrusal eğriler çizildi (Şekil 3.1.2.4); elde edilen eğrilerin denklemleri hesaplandı. Bu eğrilerden yararlanılarak geriye kazanç yüzde olarak hesaplandı (Çizelge 3.1.2.1); çizelgeden, geriye kazancın enrofloksasin için %75-90, siprofloksasin için %55-70 arasında değiştiği anlaşıldı.



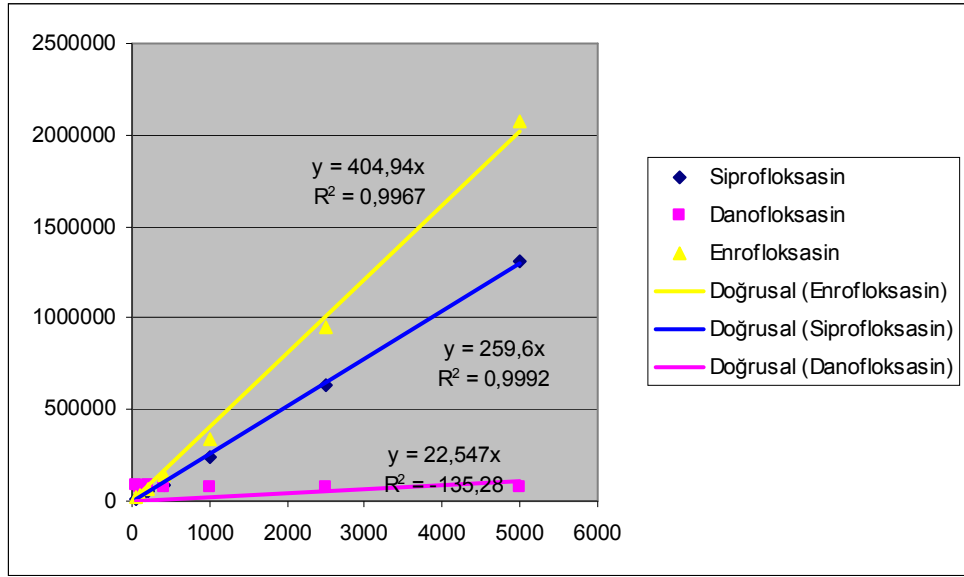
Şekil 3.1.2.1. Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının pik ve alanı (1 µg/ml çözeltiden 20 µl).



Şekil 3.1.2.2. Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının YBSK'daki pik alanlarından yararlanılarak çizilen standart eğrileri.



Şekil 3.1.2.3. 1 µg/ml yoğunluktaki enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının ilaç içermeyen temiz plazmaya katılarak özütleme işlemi yapıldıktan sonra verdiği pik ve alanı.

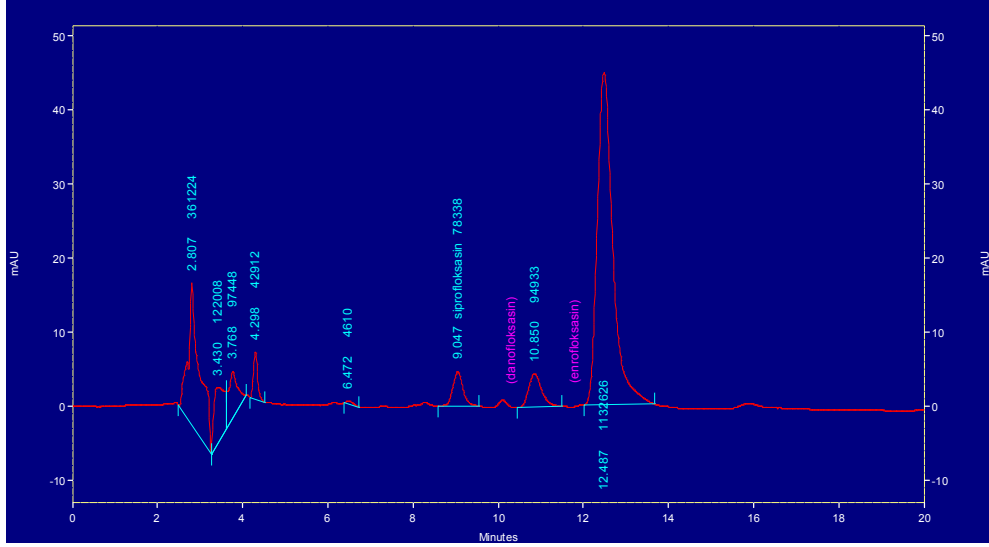


Şekil 3.1.2.4. Enrofloksasin, siprofloksasin ve danofloksasin karışım çalışma standardının ilaç içermeyen temiz plazmaya katılıp özütleme işlemi yapıldıktan sonra YBSK'daki pik alanlarından yararlanılarak çizilen standart eğrileri.

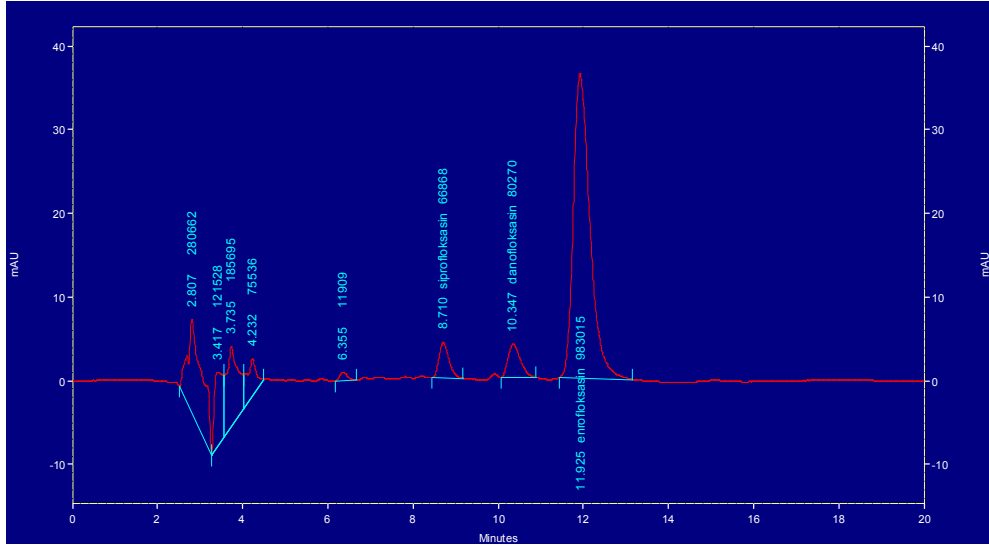
Çizelge 3.1.2.1. Enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin geriye kazancı.

Etkin madde	Geri kazanç, %
Enrofloksasin	75-90
Siprofloksasin	55-70

Daha sonra, çalışma numunelerinin ölçümüne geçildi. Çalışma numunelerinin plazmalarında özütleme işlemi yapıldı ve otomatik örnekleyiciye yerleştirildi. Cihaz, bu özütten 20 µl kullandı. Çalışmaya ilişkin alınan kromatografik görüntülerden Referans İlacın verildiği Grup 1'deki 1. hayvandan 2. ve 4. saatlerde alınan kan plazmasında hazırlanan özütlerin pik ve alanları Şekil 3.1.2.5 ve 3.1.2.6'da örnek olarak verildi.



Şekil 3.1.2.5. Referans İlaç verilen çalışma grubundaki 1. hayvanın 2. saatte verdiği pik ve alanı.



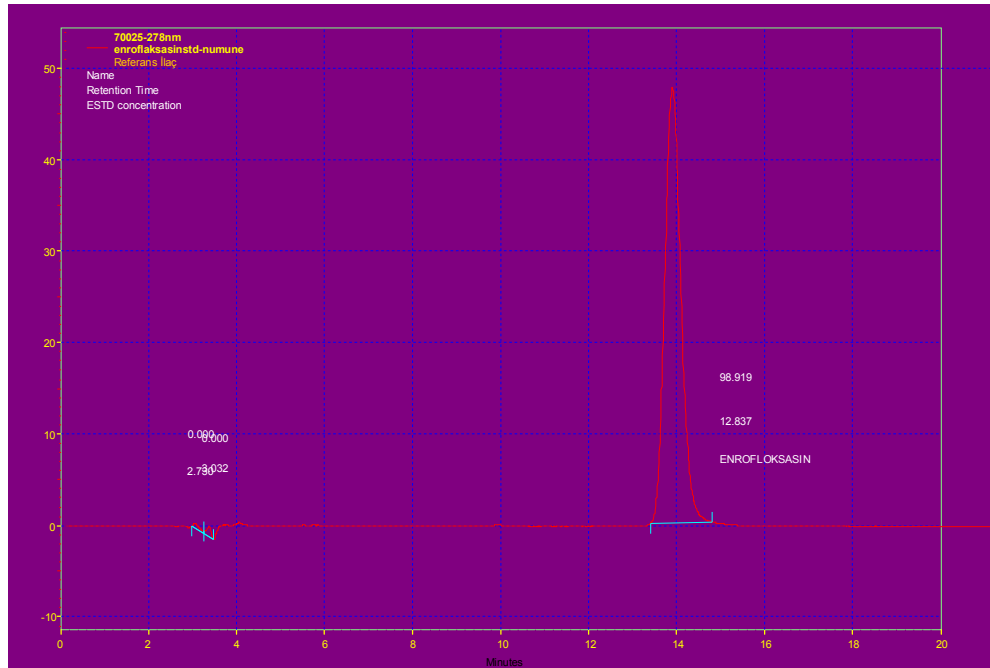
Şekil 3.1.2.6. Referans İlaç verilen çalışma grubundaki 1. hayvanın 4. saatte verdiği pik ve alanı.

3.1.3. Yöntemin Duyarlılığı

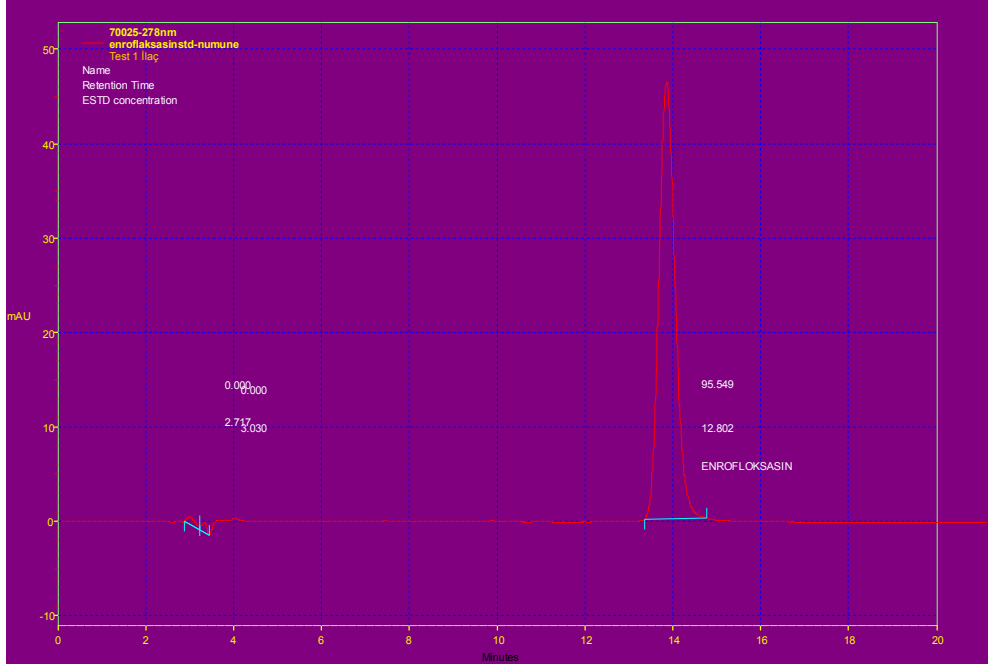
Hem enrofloksasin ve siprofloksasinle ayrı ayrı hem de karışımları ile yapılan denemeler sonucunda yöntemle plazmada 0,01 µg/ml enrofloksasin ve 0,04 µg/ml siprofloksasinin ölçülebildiği anlaşıldı. Plazmada enrofloksasinin en küçük etkili yoğunluğundan (<0,5 µg/ml) çok düşük değerler ölçülebildiği görüldü.

3.2. İlaç Müstahzarlarının Etkin Madde Miktarları

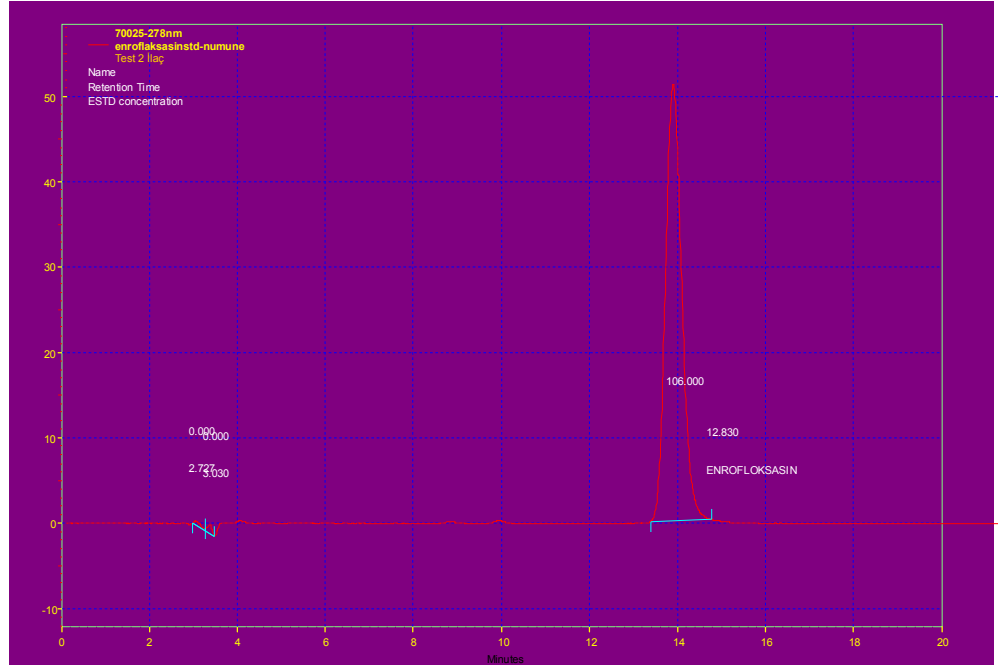
Test ilaçlarındaki etkin madde miktarı, Referans ilaç içindeki miktardan %5'ten fazla fark göstermemelidir (Kayaalp, 2008). Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçları 1,5 ml'lik şişelere konularak doğrudan otomatik örnekleyiciye yerleştirildi. Her bir ilaçtan cihaz 20 µl kullandı. Kromatogramları alındı ve etkin madde miktarları belirlendi (Şekil 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3; Çizelge 3.2.1). Bu çalışmada kullanılan Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının kontrol amacıyla yapılan ölçümlerinde etkin madde miktarları; Referans ilaç için 98,92 mg/ml, Test 1 ilaç için 95,55 mg/ml ve Test 2 ilaç için 106 mg/ml olarak ölçüldü. Bu etkin madde miktarları biyoşeydeğerlik çalışmalarında önemli olan ±%5 sınırları içinde olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.2.1. Referans İlaç kromatogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).



Şekil 3.2.2. Test 1 ilaç kromatogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).



Şekil 3.2.3. Test 2 ilaç kromatogramı (100 mg/ml çözeltiden 20 µl).

Çizelge 3.2.1. Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının etkin madde miktarları.

Numuneler	Etkin madde miktarları (mg/ml)	
	Formülasyondaki enrofloksasin miktarı, mg/ml	Ölçülen miktar, mg/ml
Referans ve Test İlaçları		
Referans ilaç	100	98,92
Test 1 ilaç	100	95,55
Test 2 ilaç	100	106

3.3. Plazma İlaç Yoğunlukları

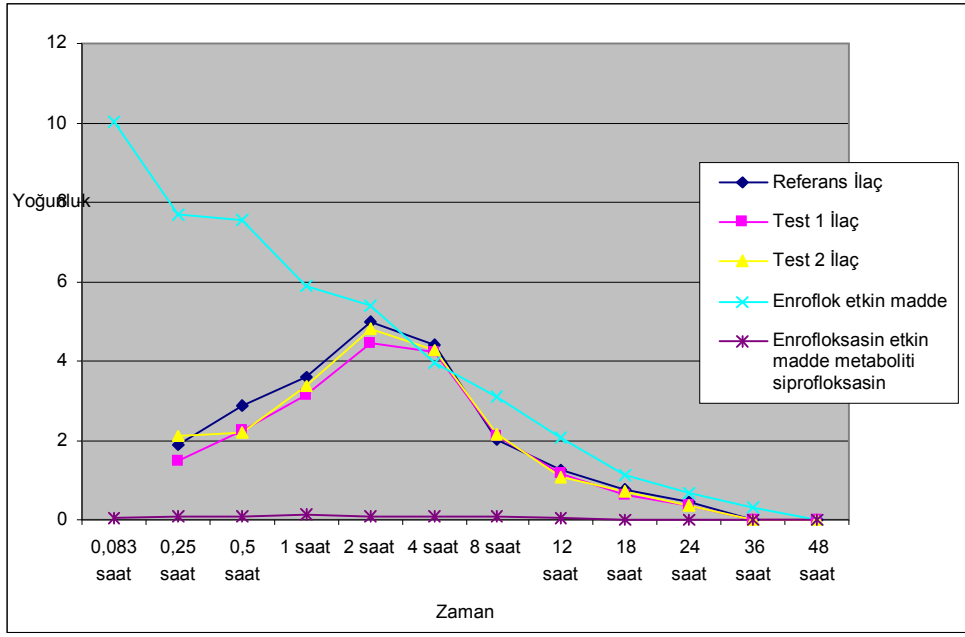
Enrofloksasinin Dİ uygulanması, Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının hayvanlara ağızdan kursak içi verilmesini takiben plazma numunelerinde ölçülen enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasin yoğunlukları Çizelge 3.3.1’de, plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri Şekil 3.3.1 ve 3.3.2’de verildi.

İlacın Dİ verilmesini takiben ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi incelendiğinde, dağılımının dışarıya açık 2-bölmeli modele uygunluk gösterdiği anlaşıldı ve farmakokinetik hesaplamalar buna göre yapıldı.

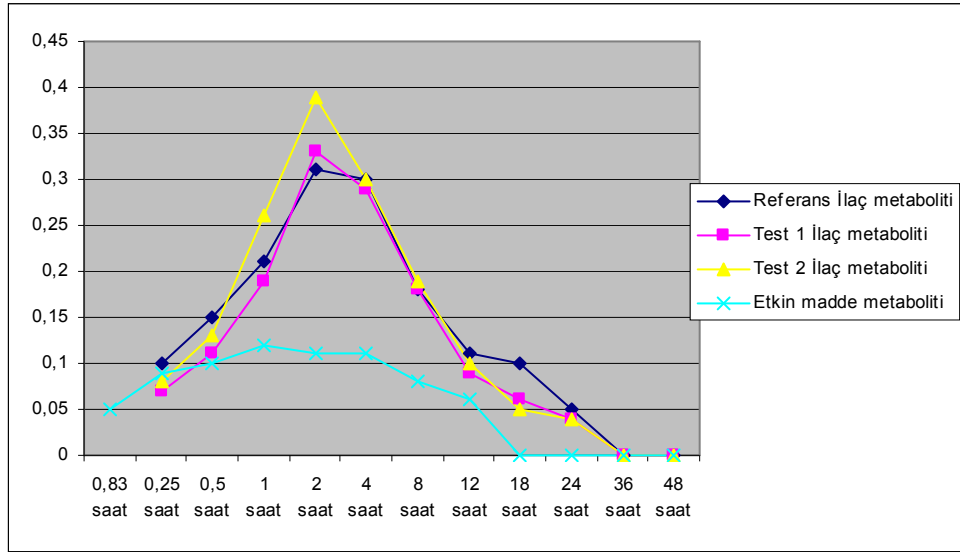
Enrofloksasinin Dİ uygulanması sonucu plazmada ölçülen ana madde ve metaboliti siprofloksasin ile Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi verilmesini takiben çizilen plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri logaritmik olarak da Şekil 3.3.3’de verildi.

Çizelge 3.3.1’de, Referans, Test 1, ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi verilmesini takiben 2. saatte plazma enrofloksasin yoğunluğunun doruk değerine (~4-5 µg/ml) çıktığı; yaklaşık 20 saat süreyle plazma ilaç yoğunluğunun $\geq 0,5$ µg/ml’de kaldığı; 36 saatte de tespit edilebilir sınırların altına indiği; siprofloksasin yoğunluğunun 2. saatte doruk değerine (~0,11-0,39 µg/ml) çıktığı görülmektedir.

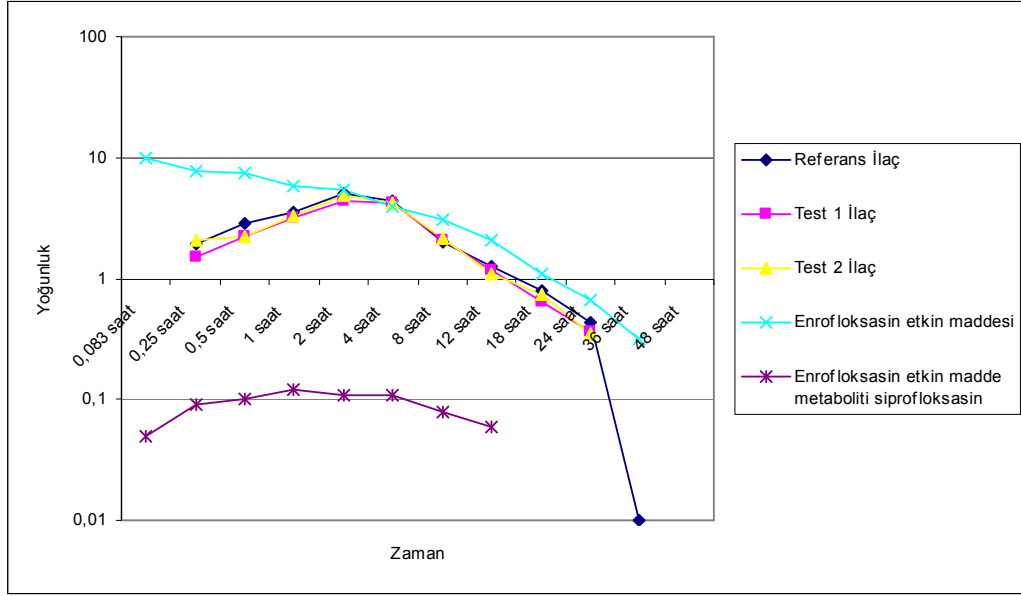
Diğer yandan, Referans ve test ilaçları birlikte değerlendirildiğinde, enrofloksasinin vücutta %5-10 siprofloksasin metaboliti oluşturduğu anlaşılmıştır.



Şekil 3.3.1. Enrofloksasinin etkin maddesinin Dİ uygulanması sonucu enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi ile Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucu çizilen enrofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.



Şekil 3.3.2. Enrofloksasin etkin maddesinin Dİ, Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucunda metabolitleri siprofloksasinin plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.



Şekil 3.3.3. Enrofloksasinin etkin maddesinin Dİ uygulanması sonucu enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin logaritmik plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi ile Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının ağızdan kursak içi 10 mg/kg uygulanması sonucu çizilen enrofloksasinin logaritmik plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri.

3.4. Farmakokinetik Değişkenler

Enrofloksasinin Dİ, Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının ağızdan kursak içi verilmesini takiben enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasinin farmakokinetik değişkenleri Çizelge 3.4.1'de, Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının logaritmik dönüşüm sonucu bazı farmakokinetik değişkenleri Çizelge 3.4.2'de, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının enrofloksasin ve siprofloksasin yönünden logaritmik dönüşüm sonucu biyoeşdeğerliği Çizelge 3.4.3'te verildi.

Çizelge 3.4.1'de hesaplanan farmakokinetik değişkenlere göre, enrofloksasin için ağızdan kursak içi uygulanan gruplarda (Referans, Test 1 ve Test 2 İlaç) Dİ uygulamaya göre EAA, OKS, α , β , Y_{doruk} değerlerinde önemli ($p < 0,05$) düşüş görüldü. Referans ve Test 1 ilaçlarının uygulandığı gruplarda Dİ uygulanana göre $t_{1/2\alpha}$ değerinde önemli ($p < 0,05$) kısalma, Test 2'de ise benzerlik görüldü. Ağızdan kursak içi uygulanan gruplarda (Referans, Test 1 ve Test 2 İlaç) Dİ uygulanana göre $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, t_{doruk} sürelerinde önemli ($p < 0,05$) uzama görüldü. Referans ilacın Dİ uygulamaya göre k_a değerinde önemli ($p < 0,05$) artış; Test 1 ve Test 2 ilaçlarının değerlerinde ise ($p > 0,05$) benzerlik görüldü.

Enrofloksasinin metaboliti siprofloksasinin ağızdan kursak içi uygulanan gruplarda (Referans, Test 1 ve Test 2 İlaç) Dİ uygulanan gruba göre α , β değerlerinde önemli ($p < 0,05$) düşüş; $t_{1/2\alpha}$, t_{doruk} süresinde önemli ($p < 0,05$) uzama, Y_{doruk} ve EAA'da önemli ($p < 0,05$) artış görüldü.

Ağızdan kursak içi uygulanan Test 1 ilacın Dİ uygulamaya göre OKS değerinde önemli ($p<0,05$) düşüş, k_a değerinde önemli ($p<0,05$) uzama, $t_{1/2a}$ süresinde önemli ($p<0,05$) kısalma, Referans ve Test 2 ilacın OKS, k_a ve $t_{1/2a}$ değerlerinde ise Dİ uygulamaya göre ($p>0,05$) benzerlik görüldü.

Enrofloksasinin ağızdan kursak içi biyoyararlanımı (F), çalışmada her gruptaki hayvanların EAA parametrelerinin ortalamaları alındı ve birbirlerine oranlanarak ($EAA_{\text{ağızdan}}/EAA_{\text{Dİ}}$) hesaplandı.

Çizelge 3.4.1. Ağızdan kursak içi (Referans, Test 1 ve Test 2 ilaçlarının), Dİ verilen enrofloksasinin etkin maddesi ve oluşan metaboliti siprofloksasinin farmakokinetik değişkenleri (aritmetik ortalama \pm standart hata, enalt-enüst değerleri).

Değişkenler	Enrofloksasin				Siprofloksasin metaboliti			
	Dİ	Referans ilaç	Test 1 ilaç	Test 2 ilaç	Dİ	Referans ilaç	Test 1 ilaç	Test 2 ilaç
EAA ($\mu\text{g.saat/ml}$)	69,61 \pm 3,65 ^b (58,14-85,30)	46,60 \pm 2,36 ^a (41,07-62,58)	41,27 \pm 1,02 ^a (35,18-44,41)	43,12 \pm 2,37 ^a (28,04-50,55)	1,08 \pm 0,06 ^x (0,92-1,51)	3,13 \pm 0,13 ^{yz} (2,75-3,85)	2,86 \pm 0,10 ^y (2,59-3,30)	3,38 \pm 0,14 ^z (2,86-4,06)
OKS (saat)	16,01 \pm 1,99 ^b (9,29-21,56)	8,61 \pm 0,44 ^a (7,44-10,59)	10,10 \pm 0,63 ^a (8,60-14,13)	10,15 \pm 0,30 ^a (9,30-10,96)	17,09 \pm 3,86 ^y (10,69-27,80)	16,70 \pm 1,87 ^y (11,27-20,47)	8,59 \pm 0,46 ^x (7,25-11,19)	15,87 \pm 1,33 ^y (10,09-22,79)
α (saat ⁻¹)	17,20 \pm 1,19 ^b (14,35-22,30)	1,88 \pm 0,34 ^a (0,90-3,00)	0,96 \pm 0,15 ^a (0,74-1,86)	1,58 \pm 0,78 ^a (0,55-5,46)	13,03 \pm 3,79 ^y (4,86-30,51)	0,97 \pm 0,16 ^x (0,68-1,80)	1,19 \pm 0,14 ^x (0,62-1,83)	0,86 \pm 0,05 ^x (0,66-1,01)
β (saat ⁻¹)	2,23 \pm 0,90 ^b (0,49-6,46)	0,48 \pm 0,09 ^a (0,31-0,97)	0,37 \pm 0,05 ^a (0,19-0,61)	0,35 \pm 0,04 ^a (0,17-0,60)	0,94 \pm 0,21 ^y (0,22-1,61)	0,40 \pm 0,09 ^x (0,09-0,67)	0,29 \pm 0,03 ^x (0,18-0,41)	0,25 \pm 0,02 ^x (0,17-0,37)
k_a (saat ⁻¹)	0,07 \pm 0,01 ^a (0,03-0,12)	0,12 \pm 0,01 ^b (0,09-0,18)	0,09 \pm 0,00 ^a (0,04-0,13)	0,08 \pm 0,00 ^a (0,05-0,11)	0,06 \pm 0,01 ^x (0,01-0,11)	0,04 \pm 0,01 ^x (0,01-0,10)	0,13 \pm 0,01 ^y (0,08-0,18)	0,04 \pm 0,00 ^x (0,03-0,06)
$t_{1/2a}$ (saat)	0,03 \pm 0,00 ^a (0,03-0,04)	0,46 \pm 0,10 ^b (0,23-0,81)	0,71 \pm 0,08 ^b (0,29-0,93)	0,78 \pm 0,16 ^b (0,12-1,25)	0,10 \pm 0,04 ^x (0,01-0,39)	0,64 \pm 0,10 ^y (0,18-1,00)	0,64 \pm 0,08 ^y (0,11-0,87)	0,81 \pm 0,05 ^y (0,67-1,03)
$t_{1/2\beta}$ (saat)	0,61 \pm 0,20 ^a (0,10-1,40)	1,69 \pm 0,14 ^b (1,16-2,18)	2,09 \pm 0,30 ^b (1,13-3,59)	2,09 \pm 0,17 ^b (1,53-2,61)	3,98 \pm 0,27 ^x (0,42-2,07)	1,62 \pm 0,31 ^x (0,54-3,16)	2,51 \pm 0,38 ^y (1,67-3,80)	2,83 \pm 0,21 ^y (1,86-3,87)
$t_{1/2a}$ (saat)	10,71 \pm 1,62 ^b (5,82-16,40)	5,61 \pm 0,58 ^a (3,71-7,66)	6,94 \pm 0,42 ^a (5,99-8,78)	8,02 \pm 0,82 ^{ab} (5,99-11,42)	12,12 \pm 2,62 ^y (6,05-20,75)	12,40 \pm 1,25 ^y (8,77-14,45)	5,32 \pm 0,66 ^x (3,75-8,13)	15,44 \pm 1,49 ^y (10,25-22,80)
t_{doruk} (saat)	0,12 \pm 0,02 ^a (0,08-0,25)	2,50 \pm 0,32 ^b (2,00-4,00)	2,75 \pm 0,36 ^b (2,00-4,00)	2,50 \pm 0,32 ^b (2,00-4,00)	0,93 \pm 0,25 ^x (0,25-2,00)	2,50 \pm 0,32 ^y (2,00-4,00)	2,25 \pm 0,25 ^y (2,00-4,00)	2,00 \pm 0,00 ^y (2,00-2,00)
Y_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	10,31 \pm 0,39 ^b (8,49-11,46)	5,13 \pm 0,25 ^a (3,64-5,86)	4,59 \pm 0,23 ^a (3,63-5,64)	4,98 \pm 0,38 ^a (2,77-6,36)	0,15 \pm 0,01 ^x (0,10-0,21)	0,31 \pm 0,01 ^y (0,25-0,39)	0,33 \pm 0,01 ^y (0,27-0,44)	0,39 \pm 0,01 ^z (0,31-0,46)
F(%)	-	66,94	59,28	61,94				

- a,b,c : Enrofloksasin için aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).
X,y,z : Siprofloksasin için aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).
 k_a : Emilmeli verilmelerde birinci derece emilme hız sabitesi
 α : Plazma ilaç yoğunluğu dağılım dönemi hız sabitesi
 β : Plazma ilaç yoğunluğu atılma dönemi hız sabitesi
 $t_{1/2a}$: Ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü
 $t_{1/2\alpha}$: Dağılım dönemi yarı ömrü
 $t_{1/2\beta}$: Atılma dönemi yarı ömrü
OKS : İlacın vücuttan %63,2'sinin atılması için geçen süre
 t_{doruk} : Plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi
 Y_{doruk} : Plazma doruk ilaç yoğunluğu
EAA : Plazma ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altındaki kalan alan
F(%) : Biyoyararlanım

Farmakokinetik veriler için ANOVA uygulandı ve gruplar arasındaki farklılıklar Duncan testine göre yapıldı; $p < 0,05$ farklılık önemli olarak değerlendirildi.

Enrofloksasin için Referans ve Test 2 İlaçlarında Test 1'e göre biyoyararlanımda artış, Test 2 İlacında Referans İlacı göre düşüş gözlemlendi.

Parametrelerin simetrik dağılımını sağlamak, değişiklikleri dengede tutmak amacıyla logaritmik dönüşüm kullanılabilir (Tutain ve Koritiz, 1997). Bu amaçla çalışmada Referans ve Test İlaçlarının biyoeşdeğerlikleri EAA, t_{doruk} ve Y_{doruk} ölçütlerinin logaritmaları alındı ve değerlendirildi. Biyoeşdeğerlik açısından değerlendirildiğinde, Referans İlaç, Test 1 ve Test 2 İlaçlar ile karşılaştırıldığında EAA ve Y_{doruk} değerlerinde düşme gözlenirken, t_{doruk} değerlerinin Referans ve Test 2 İlaçta değişmediği Test 1 İlaçta biraz uzun sürdüğü görüldü.

Referans ve Test ilaçlarında EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} logaritmik dönüşüm sonucunda elde edilen değerlerinin karşılaştırılması sonucu bunların kabul edilebilir sınırlar (0,80-1,25) içerisinde olduğu görüldü (Çizelge 3.4.2).

Çizelge 3.4.2. Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının, logaritmik dönüşüm sonucu bazı farmakokinetik değişkenleri.

Değişkenler	Enrofloksasin			Siprofloksasin			p-değeri
	Referans İlaç	Test 1 İlaç	Test 2 İlaç	Referans İlaç	Test 1 İlaç	Test 2 İlaç	
EAA ($\mu\text{g.saat/ml}$)	1,66±0,01 ^a (1,61-1,80)	1,61±0,01 ^a (1,55-1,65)	1,62±0,02 ^a (1,45-1,70)	0,49±0,05 ^{yz} (0,44-0,59)	0,45±0,04 ^y (0,41-0,52)	0,52±0,05 ^z (0,46-0,61)	0,00
Y_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	0,70±0,02 ^a (0,56-0,77)	0,65±0,02 ^a (0,56-0,75)	0,68±0,03 ^a (0,44-0,80)	-0,50±0,06 ^y -0,60- -0,41	-0,47±0,06 ^{yz} -0,57- -0,36	-0,41±0,06 ^z (-0,51- -0,34)	0,00

a,b,c : Enrofloksasin için aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).
X,y,z : Siprofloksasin için aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

Çizelge 3.4.3. Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının, enrofloksasin yönünden logaritmik dönüşüm sonucu bazı farmakokinetik değişkenleri ve Test 1 ve Test 2 İlaçlarının biyoeşdeğerlikleri.

Değişkenler	Logaritmik değerler			μ_{T1}/μ_R	μ_{T2}/μ_R	p-değeri
	Referans İlaç	Test 1 İlaç	Test 2 İlaç			
EAA ($\mu\text{g.saat/ml}$)	1,66±0,01 (1,61-1,80)	1,61±0,01 (1,55-1,65)	1,62±0,02 (1,45-1,70)	0,96	0,97	0,00
Y_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	0,70±0,02 (0,56-0,77)	0,65±0,02 (0,56-0,75)	0,68±0,03 (0,44-0,80)	0,92	0,97	0,00
Kabul Edilebilir Limit	0,80-1,25					

μ_{T1}/μ_R . Test 1 İlacın biyoeşdeğerliği
 μ_{T2}/μ_R . Test 2 İlacın biyoeşdeğerliği

4. TARTIŞMA

İlaç sektörünün gelişmesiyle birlikte her geçen gün benzer özellik ve kullanımdaki müstahzarların sayısı da artmaktadır. Özellikle son yıllarda ilaç çeşitliliğindeki artış, hasta sahiplerinin kendilerine sağlanan sağlık hizmetlerinin maliyeti hakkında çok fazla bilgi sahibi olmamaları, yeni ilaçların birçok hasta için umut ifade etmesi nedeniyle özel sektörün piyasaya sürekli yeni ilaç akışı sağlayarak bu ihtiyacı karşılamaya çalışması sonucunda daha eski ve ucuz ilaçların, daha yeni ve yüksek fiyatlı ilaçlarla yer değiştirmesi, sağlık hizmetlerinin bütçe içindeki yükünün artmasına neden olarak, kamu açısından bu talebin maliyetini karşılama sorununu gündeme getirmiştir.

Türkiye’de üretilen ve ithal edilen, kanatlılarda ağızdan kullanıma uygun, enrofloksasin içeren çözelti halinde 32 veteriner müstahzarı vardır (Çizelge 1.2.5.1); bu çalışmada bunlardan sadece ikisi incelenmiştir. Bu müstahzarların formülasyonlarında eşit miktarda etkin madde olduğu (100 mg/ml) bildirilmekte, farmasötik olarak eşdeğer, birbirinin muadili oldukları kabul edilmektedir.

Bir ilacın klinik açıdan diğerinin yerine kullanılabileceğini gösteren en önemli unsur biyoeşdeğer olduğunun kanıtlanmasıdır. ABD, AB ülkelerinde, beşeri ilaçlar yanında, veteriner hekimlikte kullanılan ilaçlarda da biyoeşdeğerlik çalışmaları zorunlu kılınmış ve rutin olarak biyoeşdeğerlik çalışmaları yapılmaktadır (Posyniak ve ark., 2001; Toutain ve Koritz, 1997; EMEA, 2002). Fakat, ülkemizde veteriner hekimliğinde biyoeşdeğerlikle ilgili düzenlemeler yoktur.

Veteriner ilaçları ile ilgili pek çok farmakokinetik çalışmalar yapılmasına ve yayınlanmasına rağmen (Anadon ve ark., 1990; Broome ve ark., 1991; Giles, C.J. ve ark., 1991; Cabanes ve ark., 1992; Walker ve ark., 1992; Apley, M.D. ve Upson, D.W., 1993; Kung ve ark., 1993; Anadon ve ark., 1995; Kaya ve ark., 1996; Abd el-aziz ve ark., 1997; Baydan ve ark., 1998; Ovando ve ark., 1999; Elmas ve Traş, 1999; Elmas ve ark., 2000; Elmas ve ark., 2001; Elmas ve ark., 2002; Lucas ve ark., 2004; Parlar ve Kaya, 2005; Dimitrova ve ark., 2006; Şahan ve Kaya, 2006), az sayıda biyoeşdeğerlik çalışması (Knoll ve ark., 1999; Lifschitz ve ark., 1999; Brown ve ark., 2000; Sumano ve ark., 2001; Posyniak ve ark., 2001; Chong ve ark., 2002; Clark ve ark., 2003; Liu ve ark., 2004; Hantash ve ark., 2008; Sarıca Soyer ve Liman, 2008; Altıntaş ve Yarsan, 2009) vardır.

İlaçların ruhsatlandırılması için gerekli belgeler içinde biyoyararlanım/farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarla ilgili belgelerin bulunması bir gerekliliktir. Ruhsatlandırma safhası ve piyasa kontrolünde ilaçlar daha ziyade kimyasal ve farmasötik yönden incelenmektedir; bu durum ilaçların etkinliği ile ilgili fikir edinmede yetersiz kalmaktadır. Bir ilacın etkinliğinin gösterilmesi için, kimyasal/farmasötik eşdeğerlik yanında, terapötik eşdeğer olduğunun da kanıtlanması gerekir. Hekimin aynı etkin maddeyi, aynı miktarda içeren ilaçtan birini diğerinin yerine kullanmak zorunda kaldığı zaman üzerinde durduğu özellik terapötik eşdeğerliktir. Terapötik eşdeğerliği kanıtlanmış olan ilaçlar değiştirilebilir ilaçlardır.

İlaçlarda kalite, etkinlik ve güvenlik kadar, bunların birbiri yerine kullanılabilir olması, özellikle sağaltımın maliyeti ve ekonomi yönünden de son derece önemli olmaktadır. İki ilacın terapötik eşdeğerliğinin klinik denemelerle gösterilmesi pratik bakımdan zorluk gösterir (Kayaalp, 2001). Dünya Sağlık Örgütü'nün 1996 yılında (WHO, 1996) yayınlanan teknik raporuna göre, ilaçların birbirinin yerine kullanılabilir olması için terapötik eşdeğerliğinin sağlanmış olması gerektiği belirtilmiştir. Biyoeşdeğerlik çalışmaları, sonucu etkileyebilen biyolojik, analitik ve istatistiksel faktörleri göz önünde bulundurularak, dikkatli bir şekilde tasarlanmalıdır.

Bu çalışma ile veteriner hekimliği ilaçlarında biyoeşdeğerliliğe yönelik çalışmaların teşvik edilmesi ve elde edilecek sonuçlardan hareketle bu alandaki araştırma ve geliştirme çalışmalarında ışık tutması amaçlanmıştır.

İnvivo biyoeşdeğerlik çalışmalarında vücut sıvılarında miktar tayininde geçerli ve hassas yöntemlerin kullanılması güvenilirliği ve kaliteyi etkileyen önemli faktörlerdir (Toutain ve Koritz, 1997). Bu amaçla YBSK sık tercih edilen, duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemdir. Bu çalışmada da enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasin ölçümlerinde YBSK kullanılmıştır.

Yöntemin duyarlılığı plazmada enrofloksasin için 0,01 µg/ml, metaboliti siprofloksasin için 0,04 µg/ml olarak tespit edildi. Bu yönden yöntemin duyarlılığı, Anadon ve ark. (1995)'ninkine göre daha az (0,003 µg/ml enrofloksasin; 0,003 µg/ml siprofloksasin; YBSK); Posyniak ve ark. (2001)'ninkine benzer (0,02 µg/ml enrofloksasin; 0,01 µg/ml siprofloksasin; YBSK); Şahan ve Kaya (2006)'ninkinden daha yüksektir (0,1 µg/ml enrofloksasin; agar jel disk diffüzyon yöntemi). İlaç formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan taşıyıcı madde/maddeler, hayvanlara verilen yemin içeriği ilacın sindirim kanalından emilmesini ve plazmadaki miktarını önemli ölçüde etkiler. Analiz yöntemlerinin duyarlılıkla ilgili farklılıkları, numunelerin analiz metotlarına, YBSK cihazının özellikleri ve çalışma şartlarına bağlanabilir.

Bu çalışmada, plazmada enrofloksasinin en küçük etkili yoğunluğundan (<0,5 µg/ml) çok düşük değerlerin (50 katı) ölçülebilmesi sebebiyle yöntemin duyarlılık sınırı yeterli olarak görülmüştür.

Çalışmada geriye kazanç oranı plazmada enrofloksasin için %75-90, siprofloksasin için %55-70 bulundu. Bu değerler enrofloksasin yönünden Posyniak ve Ark. (2001), Anadon ve ark. (1995)'nin plazmada, Sumano ve ark. (2001)'nin serumda bulunduğu değerlere (sırasıyla %>90, %87, %92-97) benzer bulunmuştur. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, çalışmada bulunan geriye kazanç oranlarının çalışma sonuçlarını güvenli kılacak şekilde uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada ağızdan kursak içi uygulamada Referans, Test 1 ve Test 2 İlaçlarının biyoyararlanımı sırasıyla %66,94, %59,28 ve %61,94 hesaplandı. Bulunan değer Anadon ve ark. (1995)'nin bulunduğu değerlere (ağızdan kursak içi verilen enrofloksasin etkin maddesi %64,) benzer, Parlar ve Kaya (2005)'nin bulunduğu değerlerden (ağızdan içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin etkin maddesinin biyoyararlanımı Grup 2A (Referans İlaç)'da % 73,44, Grup 2B (Test İlaç)'da %98,80 ve Grup 2C (Test İlaç)'da %74,64) düşük, Şahan ve Kaya (2006)'nin bulunduğu değerlerden (ağızdan içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin etkin maddesinin biyoyararlanımı Grup 2'de %70,43, Grup 3'te %48,67) Grup 2'ninkine benzer, Grup 3'ünkinden yüksek olduğu görüldü. Biyoyararlanımlar arasındaki farkın, etkin maddenin seyreltildiği suyun sertlik derecesi (Sumano ve ark., 2001 ve 2004), yeme katılan bağlayıcı madde (Şahan ve Kaya, 2006), ilaç formülasyonundaki yardımcı maddeler ve kullanılan yöntem farklılığından ileri geldiği sanılmaktadır.

Bu çalışmada, enrofloksasinin etçi piliçlerde Dİ uygulanmasını takiben ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin 2-bölmeli dışarıya açık modele uygunluk gösterdiği bulundu. Farmakokinetik hesaplamalarda buna göre yapıldı.

İlacın verilmesini ve emilmesini takiben vücutta hızla dağıldığı anlaşılmıştır. Çalışmada enrofloksasinin dağılıma dönemi yarı ömrü ($t_{1/2\alpha}$), Dİ grupta $0,03\pm 0,00$ saat, ağızdan kursak içi verilen Referans İlaç için $0,46\pm 0,10$ saat, Test 1 İlaç için $0,71\pm 0,08$ saat, Test 2 İlaç için $0,78\pm 0,16$ saat olarak bulundu. $t_{1/2\alpha}$, Parlar ve Kaya (2005)'nin bulunduğu değerlerden [Grup 1 (Dİ grup) için $0,08\pm 0,00$ saat; içme suyuna katılarak verilen Grup 2A (Referans İlaç) için $0,14\pm 0,07$ saat; Grup 2B (Test İlaç) için $0,09\pm 0,01$ saat; Grup 2C (Test İlaç) için $0,14\pm 0,06$ saat; agar jel disk difüzyon yöntemi] uzun; Kaya ve ark. (1996)'nin bulunduğu değerlerden [Grup 1 (Dİ grup) için $0,237\pm 0,029$ saat; ağızdan kursak içi verilen Grup 2 (Test İlaç) için $2,091\pm 0,705$ saat ve Grup 3 (Test İlaç) için $3,970\pm 1,402$ saat; agar jel disk difüzyon yöntemi]

çok kısa; Anadon ve ark. (1995)'nin bulduğu değerlerden (Dİ grupta $0,07\pm 0,001$ saat; ağızdan kursak içi $1,43\pm 0,10$ saat; YBSK) kısa olduğu görüldü.

İlacın dağılım döneminin kısa sürdüğünü, dağılım dönemi hız sabitesi (α) de göstermiştir. Bu çalışmada α değeri, Dİ uygulamada bulunan değerinin ($17,20\pm 1,19$ saat⁻¹), ağızdan kursak içi verilen Referans, Test 1 ve Test 2 ilaç uygulamaları sonucu bulunan değerlerle (sırasıyla $1,88\pm 0,34$ saat⁻¹, $0,96\pm 0,15$ saat⁻¹, $1,58\pm 0,78$ saat⁻¹) karşılaştırıldığında önemli bir fark ($p<0,05$) göstermiştir.

Enrofloksasinin atılma dönemi yarı ömrü ($t_{1/2\beta}$), Dİ grupta $0,61\pm 0,20$ saat, ağızdan kursak içi verilen Referans ilaç için $1,69\pm 0,14$ saat, Test 1 ilaç için $2,09\pm 0,30$ saat, Test 2 ilaç için $2,09\pm 0,17$ saat olarak bulundu. Çalışmada elde edilen bulgular Anadon ve ark. (1990)'nin bulduğu değerlere (içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin için 2-3,5 saat; agar jel disk difüzyon yöntemi) benzer; Parlar ve Kaya (2005)'nin bulduğu değerlerden [Grup 1 (Dİ grup) için $9,62\pm 0,36$ saat; içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin Grup 2A (Referans ilaç) için $17,32\pm 1,69$ saat, Grup 2B (Test ilaç) için $5,33\pm 0,21$ saat, Grup 2C (Test ilaç) için $34,65\pm 2,72$ saat; agar jel disk difüzyon yöntemi]; Kaya ve ark. (1996)'nin bulduğu değerlerden [Grup 1 (Dİ grup) için $6,079\pm 0,056$ saat; ağızdan kursak içi verilen Grup 2 (Test ilaç) için $14,82\pm 4,67$ saat, Grup 3 (Test ilaç) için $26,38\pm 11,64$ saat; agar jel disk difüzyon yöntemi]; Anadon ve ark. (1995)'nin bulduğu değerlerden (Dİ grupta $10,29\pm 0,45$ saat ağızdan kursak içi verilen grupta $14,23\pm 0,46$ saat; YBSK); Ovando ve ark. (1999)'nin bulduğu değerlerden (Dİ grupta $6,99\pm 0,48$ saat; YBSK) önemli ölçüde kısa sürdüğü tespit edilmiştir.

Ortalama kalış süresi (OKS), Dİ grupta $16,01\pm 1,99$ saat, ağızdan kursak içi verilen Referans ilaç için $8,61\pm 0,44$ saat, Test 1 ilaç için $10,10\pm 0,63$ saat, Test 2 ilaç için $10,15\pm 0,30$ saat bulundu. OKS'nin Dİ ilaç verilen grupta ağızdan verilen gruba göre daha uzun sürdüğü görüldü. OKS'nin Dİ grupta diğer gruplara göre önemli ($p<0,05$) derecede uzun olması Dİ uygulandığında ilacın vücuttan daha uzun sürede atıldığını gösterir. Çalışmada elde edilen bulgular Kaya ve ark. (1996)'nin bulduğu değerlerle [Grup 1 (Dİ grupta) için $8,371\pm 0,100$ saat; ağızdan kursak içi verilen Grup 2 (Test ilaç) için $21,44\pm 10,51$ saat ve Grup 3 (Test ilaç) için $36,17\pm 13,88$ saat; agar jel disk difüzyon yöntemi] karşılaştırıldığında, çalışmada Dİ ilaç uygulanan grupta OKS'nin daha uzun sürdüğü görüldü.

Eğri altındaki alan (EAA), Dİ grupta $69,61\pm 3,65$ $\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$, ağızdan kursak içi verilen Referans ilaç için $46,60\pm 2,36$ $\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$, Test 1 ilaç için $41,27\pm 1,02$ $\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$, Test 2 ilaç için $43,12\pm 2,37$ $\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$ olarak bulundu. Çalışmada ağızdan kursak içi verilen Referans ve Test ilaçlarının EAA'nı Posyniak ve ark. (2001)'nin ağızdan kursak içi ilaç uygulaması

sonucu bulduğu Referans ve Test İlaç değerlerinden (sırasıyla 18,653±1,846 µg.saar/ml; 17,934±1,636 µg.saar/ml), Kaya ve ark. (1996)'nın bulduğu değerlerden [Grup 1 (Dİ grup) için 46,26±2,56 µg.saar/ml, ağızdan kursak içi verilen Grup 2 (Test İlaç) için 18,395±2,220 µg.saar/ml; Grup 3 (Test İlaç) için 26,91±7,97 µg.saar/ml; agar jel disk difüzyon yöntemi] yüksek; Ovando ve ark. (1999)'nın bulduğu değerden (Dİ grupta 26,76±2,55 µg.saar/ml) daha yüksek; Parlar ve Kaya (2006)'nın bulduğu değerlere [ağızdan içme suyuna katılarak ilaç verilen grupta Grup 2A (Referans İlaç) için 30,7±4,8 µg.saar/ml; Grup 2B (Test İlaç) için 41,3±3,4 µg.saar/ml ve Grup 2C (Test İlaç) için 31,2±3,5 µg.saar/ml; agar jel disk difüzyon yöntemi] benzerlik gösterdiği anlaşıldı.

Enrofloksasinin plazmada doruk yoğunluğa ulaşma süresi (t_{doru}), Dİ grupta 0,12±0,02 saat, ağızdan kursak içi verilen Referans İlaç için 2,50±0,32 saat, Test 1 İlaç için 2,75±0,36 saat, Test 2 İlaç için 2,50±0,32 saat bulundu. Çalışmada Referans ve Test ilaçları için t_{doru} , Posyniak ve ark. (2001)'nın Referans ve Test İlacının değerlerine (sırasıyla 2,00 saat; 2,00 saat; ağızdan kursak içi, YBSK), Anadon ve ark. (1990)'nın bulduğu değere (2,00 saat; ağızdan içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin için, agar jel disk difüzyon yöntemi) benzerlik gösterdiği anlaşıldı.

Enrofloksasinin doruk plazma değeri (Y_{doru}), Dİ grupta 10,31±0,39 µg/ml, ağızdan kursak içi verilen Referans İlaç için 5,13±0,25 µg/ml, Test 1 İlaç için 4,59±0,23 µg/ml, Test 2 İlaç için 4,98±0,38 µg/ml bulundu. Çalışmada Referans ve Test ilaçları için Y_{doru} , Posyniak ve ark. (2001)'nın Referans ve Test İlacı değerlerinden (sırasıyla 0,92±1,105 µg/ml; 0,98±0,099 µg/ml, ağızdan kursak içi, YBSK), Anadon ve ark. (1990)'nın bulduğu değerden (1,4 µg/ml; ağızdan içme suyuna katılarak verilen enrofloksasin için, agar jel disk difüzyon yöntemi) oldukça yüksek bulundu. Bu durumun, bu çalışmada vücuda giren ilaç miktarının (emilme oranı veya EAA) diğerlerine göre daha fazla olması ve analiz metotlarından ileri geldiği sanılmaktadır.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında, ölçütlerin simetrik dağılımını sağlamak ve değişiklikleri dengede tutmak için logaritmik dönüşüm yapılması önerilmektedir (Tutain ve Koritiz, 1997). Bu sebeple, çalışmada Referans ve Test İlaçlarının biyoeşdeğerlikleri için EAA ve Y_{doru} ölçütlerinin logaritmik dönüşümleri (\log_{10}) yapıldı ve buna göre değerlendirildi. T_{doru} ölçütü zamana bağlı bir parametre olduğu için logaritmik dönüşümü yapılmadı.

Referans ve Test İlaçları EAA, Y_{doru} , t_{doru} gibi farmakokinetik değişkenler yönünden incelendiği ve değerlendirildiğinde, bunların biyoeşdeğerlik kabul sınırları (0,80-1,25 veya %80-125) aralığında olması halinde biyoeşdeğer oldukları kabul edilebilir (Kayaalp, 2008).

Çalışmada ilaçların biyoeşdeğerliği, EAA ve Y_{doruk} için logaritmik dönüşüm yapılarak değerlendirildiğinde, Test 1 ve Test 2 ilaçların EAA değerlerinin (sırasıyla $1,61 \pm 0,01$ ve $1,62 \pm 0,02$ $\mu\text{g} \cdot \text{saat/ml}$) Referans İlaç değerine ($1,66 \pm 0,01$ $\mu\text{g} \cdot \text{saat/ml}$) bölünmesiyle (μ_{T1}/μ_R ve μ_{T2}/μ_R) elde edilen değerler sırasıyla 0,96 ve 0,97'dir. Test 1 ve Test 2 ilaçların Y_{doruk} değerlerinin (sırasıyla $0,65 \pm 0,02$ ve $0,68 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$) Referans İlaç değerine ($0,70 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$) bölünmesiyle (μ_{T1}/μ_R ve μ_{T2}/μ_R) elde edilen değerler sırasıyla 0,92 ve 0,97'dir.

Zamana bağlı bir parametre olduğu için logaritmik dönüşümü yapılmayan Test 1 ve Test 2 ilaçlarının t_{doruk} değerlerinin (sırasıyla $2,75 \pm 0,36$ ve $2,50 \pm 0,32$ saat) Referans İlaç değerine ($2,50 \pm 0,32$ saat) bölünmesiyle (μ_{T1}/μ_R ve μ_{T2}/μ_R) elde edilen değerler sırasıyla 1,00 ve 1,00'dir.

Test ve Referans ilaçların EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} değerlerinin biyoeşdeğerlik için 0.80-1.25 arasında olduğu belirlendi. Biyoeşdeğerlik sınır değerleri, Test 1 ve Test 2 ilaçları için sırasıyla $0.80 < \mu_{T1}/\mu_R < 1.25$ ve $0.80 < \mu_{T2}/\mu_R < 1.25$ şeklinde yazılabilir. Bu sonuçlar üç ilacın da biyoeşdeğer olduğunu ve birbirinin yerine kullanılabileceğini gösterdi.

Veteriner hekimliğinde sık kullanılan diğer bazı ilaçlarla az sayıda da olsa biyoeşdeğerlik çalışmaları yapılmıştır. Posyniak ve ark. (2001) tavuklarda ağızdan kursak içi uygulanan iki farklı enrofloksasin müstahzarının; Altıntaş ve Yarsan (2009) broilerlerde ağızdan kursak içi uygulanan bazı sülfonamid preparatlarının; Yılmaz (2006) sığırlarda kas içi yolla uygulanan enrofloksasin içeren iki müstahzarın; Brown ve ark. (2000) sığırlarda kas içi ve deri altı uygulanan seftiofur sodyumun; Hantash ve ark. (2008) tavuklarda ağızdan kursak içi uygulanan doksisisiklin içeren iki müstahzarın; Clark ve ark. (2003) köpeklerde deri altı ve ağızdan uygulanan karprofenin; Lifschitz ve ark. (1999) domuz ve sığırlarda deri altı yoluyla uygulanan iki farklı ivermektin müstahzarın iki türde de biyoeşdeğer olduğunu; Sarıca ve Liman (2008) etçi piliçlerde ağızdan kursak içi uygulanan iki farklı siprofloksasin müstahzarın biyoeşdeğer olmadığını; Sumano ve ark. (2001) kanatlılarda ağızdan kursak içi uygulanan dört farklı enrofloksasin müstahzarın üçünün biyoeşdeğer olduğunu, birinin ise olmadığını bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tavsiye edilen dozlarda ağızdan kursak içi uygulanan enrofloksasin içeren Referans ve Test İlaç müstahzarlarının, incelenen farmakokinetik ölçütlerin (EAA, Y_{doruk} , t_{doruk}) değerlendirilmesi sonucunda biyoeşdeğer oldukları ve birbirinin yerine kullanılabilecekleri anlaşılmıştır.

Yeni bir ilacın keşfedilmesi son derece pahalı olduğu ve ruhsatlandırılarak piyasaya çıkma süreci 10 yıldan daha fazla sürdüğü için Araştırma-Geliştirme (Ar-Ge) maliyeti bir hayli yüksektir. Orijinal ilaç (Patent ilaç) dünyanın birçok yerinde yasalarla, patent koruma haklarıyla belirli bir süre korunur ve bu süreç içinde başka bir firmanın bu ilacın benzerini üretmesine izin verilmez. Eşdeğer ilaç, orijinal ilacın korunma süresi bittikten sonra üretilir ve orijinal ilacın sadece farmasötik eşdeğeri değil, aynı zamanda biyoeşdeğeri olması gerekir. Yasa, yönetmelik ve kurallara uygun denetimli üretilen eşdeğer ilaçlar, orijinal ilaçlar kadar etkilidirler. Sağlık harcamalarını düşürmek isteyen ülkeler, beşeri hekimlikte eşdeğer ilaç kullanımıyla önemli ölçüde tasarruf sağlamaktadır.

Eşdeğer ilaç, orijinal ilacın fiyatından %20-80 daha ucuzdur. İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası'nın (İEİS, 2009) verilerine göre, dünyanın 13'üncü büyük ilaç pazarı olan Türkiye, 2004-2008 yılları arasında eşdeğer ilaç kullanımı sayesinde 3 milyar 879 milyon TL tasarruf etmiştir.

Özellikle enrofloksasin içeren müstahzarlar pahalı olduğundan, bilinçli kullanılması gerekmektedir. Bugün ilaç giderlerini azaltmak isteyen ülkelerde, jenerik ürünlere olan destek, bir devlet politikası haline gelmektedir. Ekonomik açıdan güçlü olan ülkelerde, orijinal ve jenerik ilaçlar arasında sağlıklı bir denge kurmak amacıyla jenerik ilaçlar desteklenerek, sağlık harcamalarında önemli tasarruflar sağlanmaktadır.

Tüm AB'de olduğu gibi ülkemizde de veteriner ilaç piyasasındaki olumsuz rekabetin önlenmesi, ekonomik yönden mevzuat düzenlemelerinin getirilmesi, hayvan sağlığı, gıda güvenliği bakımından kaliteli ilaç üretiminin yapılması, piyasadaki ilaçlarla ilgili kontrol laboratuvarlarının kurulması, beşeri ilaçlarda olduğu gibi veteriner ilaçlarında da biyoeşdeğerlik çalışmalarının istenmesi bir zorunluluk gibi görülmektedir. Eşdeğer ilaç kullanımının desteklenmesiyle, Türkiye'nin, rekabet gücünün artması ve bu yöndeki ihracat potansiyelinin değerlendirilmesi mümkün olacaktır.

Beşeri ilaçlarda olduğu gibi veteriner ilaçlarında da biyoeşdeğerlik çalışmalarının yapılması, eşdeğer ilaç kullanımının desteklenmesi ve yaygınlaştırılması, hasta sahiplerinin bu konuda bilinçlendirilmesi açısından, mesleki bilinç ve sorumlulukları gereği, meslektaşların her türlü çabayı göstereceklerini umut ediyoruz.

ÖZET

Ağızdan Kullanılan Bazı Enrofloksasin Müstahzarlarının Etçi Piliçlerde Biyoeşdeğerliğinin İncelenmesi

Bu çalışmada, etçi piliçlerde ağızdan kullanılan üç farklı enrofloksasin müstahzarının biyoeşdeğerliği incelendi.

Çalışmada günlük olarak alınan, 30 gün boyunca ilaç/kirletici madde kalıntısı içermeyen yemle beslenmiş 40 etçi erkek piliç (Ross 308 ırkı) kullanıldı. Her grupta 10 hayvan olmak üzere 4 deneme grubuna ayrıldı. Enrofloksasin Dİ çözeltisi Grup 1'e, Referans İlaç Grup 2'ye, Test 1 İlaç Grup 3'e ve Test 2 İlaç Grup 4'e verildi. Grup 2, 3 ve 4'e uygulama, ağızdan kursak içi yolla (10 mg/kg c.a dozunda) sonda ile yapıldı. Grup 1'dekilerden ilaç verilmeden önce (0,0. dk) ve ilaç verildikten sonra 5. dk'da; diğer gruplarda ilaç verildikten sonra 0,25., 0,5., 1., 2., 4., 8., 12., 18., 24., 36. ve 48. saatlerde steril, heparinli tüplere 1,0-2,0 ml kan numuneleri alındı. Kanların plazmaları ayrıldı.

Plazmadan enrofloksasin ve siprofloksasinin özütlemesini takiben, ölçümleri Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi ile yapıldı. Özütleme aşamasında internal standart olarak danofloksasin etkin maddesi kullanıldı.

Enrofloksasin etkin maddesinin Dİ verilmesini takiben çizilen plazma yoğunluğu-zaman eğrisinden ilacın vücutta 2-bölmeli dışarıya açık modele göre dağıldığı anlaşıldı. Farmakokinetik hesaplamalar buna göre yapıldı.

Yöntemin duyarlılığı, tekrarlanabilirliği ile ilgili testler yapıldı. Buna göre, YBSK'da enrofloksasin 11,9-12,8 dakikalarda, siprofloksasin 8,4-9,2 dakikalarda, danofloksasinin 10,4-11,2 dakikalarda pik verdiği belirlendi. Yöntemin duyarlılığı enrofloksasin için 0,01 µg/ml, metaboliti siprofloksasin için 0,04 µg/ml; geriye kazanç enrofloksasin için %75-90, metaboliti siprofloksasin için %55-70 olarak tespit edildi.

Referans ve Test İlaçlarının biyoeşdeğerliği incelendi. Biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde Test 1 ve Test 2 İlaçlarının EAA ve Y_{doruk} değerlerinin Referans İlaça bölünmesi ile elde edilen değerlerin (EAA için sırasıyla 0,96 ve 0,97; Y_{doruk} için sırasıyla 0,92 ve 0,97) kabul edilebilir sınırlar içerisinde (0,80-1,25) olduğu belirlendi.

Çalışmada elde edilen veriler üç ilacın birbiriyle eşdeğer olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, üç ilacın sahada birbirinin yerine değiştirilebilir ilaç olarak kullanılabilceği anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Biyoeşdeğerlik, enrofloksasin, etçi piliç, siprofloksasin, YBSK.

SUMMARY

Investigation of the bioequivalence of some enrofloxacin preparations by oral administration to broilers.

In this study, three different orally administered enrofloxacin preparations were investigated for their bioequivalence.

40 male broilers (Ross 308 strain) were fed by drug-contaminant free feed for 30 days and purchased daily and then divided into four groups, each containing 10 broilers. Enrofloxacin IV solution was administered to Group 1 by intravenously; whereas Reference drug to Group 2, Test 1 drug to Group 3 and Test 2 drug to Group 4 were administered orally (10 mg/kg bw) by intragastric catheters. Around 1,0-2,0 ml of blood samples were taken to sterile heparinized tubes, from Group 1 before (0,0. min) and after (5 min) the drug administration; and the rest of the groups in 0,25., 0,5., 1., 2., 4., 8., 12., 18., 24., 36. ve 48. hours.

After the separation of plasma, enrofloxacin and ciprofloxacin extraction were carried out by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Danofloxacin was used as internal standart for the extraction phase.

It was found that enrofloxacin followed two-compartmental open distribution model according to the results by plasma concentration-time curve after IV administration of enrofloxacin. Pharmacokinetic calculation are made with reference to this.

The sensitivity and repeatability tests were carried out in HPLC; where enrofloxacin showed its peak at 11,9-12,8 min, ciprofloxacin at 8,4-9,2 min and danofloxacin at 10,4-11,2 min. Sensitivity was 0,01 µg/ml for enrofloxacin and 0,04 µg/ml for its metabolite ciprofloxacin; recovery value was 5-90% for enrofloxacin and 55-70% for its metabolite ciprofloxacin.

The bioequivalence of the reference and the test drugs were figured out. Test 1 and Test 2 drugs showed the results for their bioequivalence in acceptable limits (0,80-1,25) which were calculated by dividing the AUC and Cmax values by the reference drugs (for AUC 0,96 and 0,97; for Cmax 0,92 and 0,97 respectively).

The results indicate that three drugs are bioequivalent with each other and to conclude; therefore, these drugs can be used in replacable means.

Key words: Bioequivalence, broiler, enrofloxacin, ciprofloxacin, HPLC.

KAYNAKLAR

- ABD EL-AZİZ, M.I., AZİZ, M.A., SOIMAN, F.A., AFIFY, N.A. (1997). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *Brit. Poultry Sci.*, **38**: 164-168.
- ALTINTAŞ, L., YARSAN, E. (2009). Ağızdan kullanılan bazı sülfonamid preparatlarının broilerlerde biyoeşdeğerliği. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **15 (2)**: 217-223.
- ALTREUTHER, P. (1987). Data on chemistry and toxicology of Baytril. *Vet. Med. Rev.*, **2**: 87-89.
- ALTREUTHER, P. (1992). Safety and tolerance of enrofloxacin in dogs and cats. Proceedings 1 st Int. Symposium on Baytril: p. 15-19.
- ANADON, A., MARTINEZ-LARRANAGA G.A., DIAZ, M.J., VELEZ, B., BIRINGAZ, P. (1990). Pharmacokinetic and residue studies of quinolone compounds and olaquinolox in poultry. *Ann. Res. Vet.*, **21**: 137-144.
- ANADON, A., MARTINEZ-LARRANAGA, M.R., DIAZ, M.J., BRINGAS, P., MARTINEZ, M.A., FERNANDEZ-CRUZ, M.L., FERNANDEZ, M.C., FERNANDEZ, R. (1995). Pharmacokinetic and residues of enrofloxacin in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, **6**: 501-506.
- ANONİM. (2004). Conduct of bioequivalence studies in animals. Erişim: [<http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralexivol-7/A/7AE4a.pdf>]. Erişim Tarihi: 06.02.2008.
- APLEY, M.D., UPSON, D.W. (1993). Lung tissue concentrations and plasma pharmacokinetics of danofloxacin in calves with acute pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **54(6)**: 937-943.
- BALL, P. (1989). Adverse reactions and interactions of fluoroquinolones. *Clinic. Investig Med.*, **12**: 28-34.
- BAUDİTZ, R. (1987). Result of clinical studies with Baytril in poultry. *Vet. Med. Res.*, **39**: 130-136.
- BAYDAN E., KURTDEDE, A., KAYA, S., BÖRKÜ, K., YARSAN, E., PEKKAYA, S. (1998). Sağlıklı ve Pylonefritisli köpeklerde enrofloksasinin farmakokinetiği üzerine çalışmalar. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.*, **9**: 73-76.
- BAYER, A.G. (1999). Baytril. Erişim [<http://www.baytril.com/index.php/fuseaction/download/ln>] Erişim tarihi: 5.12.2005.
- BERTINO, J.J. , FISH, D. (2000). The safety profile of the fluoroquinolones. *Clin. Ther.*, **22**: 798-817.
- BOOTHE, D.M. (1997). Principles of drug selection for respiratory infections in cats. *Suppl. Compend Contn. Educ. Pract. Vet.*, **19**: 5-15.
- BRAIN, E., SCULLY, M.B., B. CH. (1990). Pharmacology of the Quinolones. *Suppl. to Urology.*, **35**: 8-10.
- BREITSCHWERDT, E.B., DAVIDSON, M.G., AUCOIN, D.P., LEVY, M.G., SZABADOS, N.S., HEGARTY, B.C., KUEHNE, A.L., JAMES, R.L. (1991). Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain Spotted Fever in dogs. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **11**: 2375-2381.

- BROOME, R.L., BROOKS, D.L., BABISH, J. G., COPELAND, D. D., CONZELMAN, G.M. (1991). Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits. *Am. J. Vet. Res.*, **52**: 1835-1841.
- BROWN, S.A., CHESTER, S.T., SPEEDY, A.K., HUBBARD, V.L., CALLAHAN, J.K., HAMLOW, P.J., HIBBARD, B., ROBB, E.J. (2000). Comparison of plasma pharmacokinetics and bioequivalence of ceftiofur sodium in cattle after a single intramuscular or subcutaneous injection. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **23**: 273-280.
- CABANES, A., ARBOIX, M., ANTON, J.M.G., REIG, F. (1992). Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. *Am. J. Vet. Res.*, **53(11)**: 2090-2093.
- CHONG, W., KIM, Y.J., KIM, S.D., HAN, S.K., RYU, P.D., (2002). Lack of bioequivalence of two oxytetracycline formulations in the rabbits. *J. Vet. Sci.*, **3(1)**: 25-30.
- CHU, D.T.W., FERNANDES, P.B. (1989). Structure-activity relationship of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 131-135.
- CLARK, T.P., CHIEFFO, C., HUHNS, J.C., NIMZ, E.L., WANG, C., BOY, M.G. (2003). The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **26**: 187-192.
- COLWELL, P. E., JAMALI, F., DRYDEN, W., FRIESEN, E., KOVEN, S., MOHAMED, I., OSMOND, B., SEVERINI, A. S., SHELDON, L., SHELDON, R., TAM, Y., TSUYUKI, R., ZHANEL, G. (1998). Bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs. Canadian society for pharmaceutical sciences discussion. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 1(1): 2-7.
- DIMITROVA, D.J., LASHEV, L.D., YANEV, ST.G., PANDOVA, V.T. (2006). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in male and female turkeys following intravenous and oral administration. *Vet. Res. Communicat.*, **30**: 415-422.
- ELMAS, M., TRAŞ, B. (1999). Bazı Antimikrobiyel İlaçların Plazma ve Lenf Sıvısındaki Farmakokinetik Profillerinin Karşılaştırılması. *J. Vet. Animal Sci.*, **23**: 591-597.
- ELMAS, M., YAZAR, E., TRAŞ, B., BAŞ, A.L., ERYAVUZ, A. (2000). Pharmacokinetics and oral bioavailability of enrofloxacin in faunated and defaunated Angora goats. *Revue Med. Vet.*, **151(6)**: 507-510.
- ELMAS, M., TRAŞ, B., KAYA, S., BAŞ, A.L., YAZAR, E., YARSAN, E. (2001). Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats. *Canadian J. Vet. Res.*, **65(6)**: 64-67.
- ELMAS, M., YAZAR, E., BAŞ, A.L., TRAŞ, B., BAYEZİT, M., YAPAR, K. (2002). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and tissue concentrations of parent drug and ciprofloxacin after intramuscular administrations of free and liposome-encapsulated enrofloxacin in rabbits. *J. Vet. Med.*, **49**: 507-512.
- EMEA. (2002). Not for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, Committee for Proprietary Medical Products (CPMP). *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use*. London, CPMP/EWP/QWP/1401/98.
- EMEA (2001). Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. Committee for Veterinary Medicinal Products, *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology*. EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL.
- FİLİZİ, A. (1995). Kanatlılarda bazı iki değerli iz minerallerin, florokinolon grubu antibakteriyel ilaçların ağızdan biyoyararlanımı üzerinde etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **42**: 337-347.

- FLAMMER, K., AUCOIN, D.P., WHITT, D.A. (1991). Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in african grey parrots following single and multiple doses. *J. vet Pharmacol. Therap.*, **14**: 359-366.
- FDA. (2000). Guidance for industry. Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products-general considerations. Erişim: [<http://www.fda.gov/cder/guidance/3615fnl.pdf>]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- FDA. (2002). Guidance for industry. Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), October.
- GARCIA OVANDO, H., GORLA, N., LUDERS, C., POLONI, G., ERRECALDE, C., PRIETO, G., PUELLES, I. (1999). Comparative pharmacokinetic of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **22**: 209-212.
- GİGUERE, S., PRESCOTT, J.F., BAYKOT, J.D., WALKER, R.D. and DOWLING, P. M. (2006). Fluoroquinolones. Alınmıştır. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4nd Ed., Blackwell Publishing. s: 263-284.
- GILES, C.J., MAGONIGLE, R.A., GRIMSHAW, W.T.R., TANNER, A.C., RISKI, J.E., LYNCH, M.J., RICE, J.R. (1991). Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **14**: 400-410.
- GROENEVELD, A.J.N., BROUWERS, J.R.B.J. (1986). Quantitive determination of ofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and perfloxacin in serum by high pressure liquid chromatography. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, **8**: 79-84.
- GÜNDÜZ, T. (1975). Tampon Çözeltiler. *Ankara Üniv. Fen Fak. Yayınları*. 221-223.
- HANTASH, T.M., ABU-BASHA, E.A., ROUSSAN, D.A., ABUDABOS, A.M. (2008). Pharmacokinetics and Bioequivalence of Doxycycline (Providox® and Doxyvet 0-50 S®) Oral Powder Formulations in Chickens. *International J. Poult.Sci.*, **7(2)**: 161-164.
- HOOPER, D.C., WOLFSON, J.S., (1991). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *The New England J. Med.*, Feb. **324**: 384-394.
- HOOPER, D.C., WOLFSON, J.S. (1993). Adverse effects. In Hooper DC, Wolfson JS (eds): Quinolone Antimicrobial Agents, (2nd Ed). Washington D.C: American Society for Microbiology, p.: 489-512.
- İBRAHİM, I. G. (2006). Enrofloksasinin etlik civciv ve piliçlerde eklemelere yönelik etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ile değerlendirilmesi. Doktora Tezi Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- INTORRE, L., MENGOZZI, G., BERTINI, S., BAGLIACCA, M., LUCHETTI, E, SOLDANI, G. (1997). The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Muscovy duck. *Vet. Res. Commun.*, **21**: 127-36.
- İLAÇ ENDÜSTRİSİ İÇ VERENLER SENDİKASI (2009). Türkiye'de eşdeğer ilaç. Erişim: http://www.ieis.org.tr/asp_sayfalar/index.asp?sayfa=705&menuk=13 Erişim Tarihi: 29.10.2009.
- KAYA, S., BAYDAN, E., BİLGİLİ, A., YARSAN, E., ŐEKER, Y. (1996). Etlik piliçlerde enrofloksasinin farmakokinetiği ve manganla enrofloksasin arasında emilme yönünden etkileşmeler. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **43 (2)**: 195-202.

- KAYA, S. (2006). Çoğul-Mikotoksin Analizi. Alınmıştır: *Zehirli Maddelerin Laboratuar Analizi* Editör: S. Kaya. Birinci Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s.: 66-70.
- KAYA, S., PİRİNÇCİ, İ., ÜNSAL, A., KARAER, Z., TRAŞ, B., BİLGİLİ, A., AKAR, F. (2007). Antibiyotikler. Alınmıştır: *Veteriner Farmakoloji*. Editör. S Kaya. 2. Cilt, 4. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s.: 327-488.
- KAYA, S., PİRİNÇCİ, İ., ÜNSAL, A., TRAŞ, B., BİLGİLİ, A., AKAR, F. (2009). Biyoçeşdeğerlik. Alınmıştır: *Veteriner Farmakoloji*. Editör. S Kaya. 1. Cilt, 5. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s.: 34.
- KAYAALP, S.O. (2008). Biyoyararlanım ve Biyoçeşdeğerlik Araştırması. Alınmıştır: *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler*. 4. Baskı, Ankara: Pelikan Yayıncılık Ltd.Şti., s.: 796-797.
- KKGM. (2009). Türkiye'de ruhsatlı enrofloxasinin ağızdan kullanıma uygun çözeltiler. Erişim: <http://www.kkqm.gov.tr/> Erişim Tarihi: 02.10.2009.
- KNOLL, U., GLÜNDERİ, G., KIETZMANN, M. (1999). Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **22**: 239-246.
- KONTOS, V.I., ATHANASIOU, L.V. (1998). Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis. *Canine Practice*, **23**: 10-14.
- KUNG, K., RIOND, J.L., WANNER, M. (1993). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **16**: 462-468.
- LIFSCHITZ, A., PI, A., ALVAREZ, L., VIRKEL, G., SANCHEZ, S., SALLOVITZ, J., KUJANEK, R., LANUSSE, C. (1999). Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **22**: 27-34.
- LINDENSTRUTH, H., FROST, J.W. (1993). Enrofloxacin (Baytril®) – eine Alternative in der Psittakoseprophylaxe und -therapie bei importierten. *Psittaciden. Dtsch. tierärztl. Wsch.*, **100**: 364-368.
- LIU, L., QI, M., WANG, P., LI, H. (2004). High-performance liquid chromatographic method for the bioequivalence evaluation of desloratadine fumarate tablets in dogs. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, **34**: 1013-1019.
- LUCAS, J.J., RODRIGUEZ, C., MARTELLA, M.B., LABAQUE, M.C., NAVARRO, J.L., SAN ANDRES, M.I. (2004). Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous administration to greater rhesas: a preliminary study. *Res. in Vet. Sci.*, **78**: 265-267.
- MİTCHELL, M.A. (2006). Enrofloxacin. *J. Exotic Pet Med.*, **15 (1)**: 66-69.
- NEER, M. (1988). Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobial drugs. *JAVMA*, **193**: 577-580.
- NEUMAN, M. (1988). Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial: 4- quinolones. *Clin Pharmacokinetic*, **14**: 96-121.
- OVANDO, H.G., GORLA, N., LUDERS, C., POLONI, G., ERRECALDE, C., PRIETO, G., PUELLES, I. (1999). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **22**: 209-212.

- ÖNER, L. (2003). Değişirilebilir (Interchangeable) ilaç ve biyoşdeğerlik. Erişim: [http://www.recete.org/mised/mised_3/9.php]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- ÖZDEMİR, O. (2005). Medikal İstatistik. 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, s.: 163-166.
- PARLAR, A., KAYA, S. (2005). Etlik piliçlerde enrofloxasin içeren müstahzarların farmakokinetiği. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **52 (2)**: 99-103.
- PATON, J.H., REEVES, D.S., (1988). Fluoroquinolone antibiotics: Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs*, **36(2)**: 193-228.
- PLUMB, D.C. (1991). Enrofloxacin. Alınmıştır. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. Pharma. Vet. Publishing. USA. 5nd Ed., p.: 295-298.
- POSNIYAK, A., ZMUDZKI, J., SEMENIUK, S., NIEDZIELSKA, J. AND ELLIS, R. (1999). Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, **13**: 279-285.
- POSNIYAK, A., ZMUDZKI, J., NIEDZIELSKA, J. AND BIERNACKI, B. (2001). Bioequivalence study of two formulations of enrofloxacin following oral administration in chickens. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **45**: 353-358.
- PRESCOTT, J.F., BAGGOT, J.D. (1993). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 2nd Ed. Iowa State Univ. Press. Ames.
- RESMİ GAZETE (1994). Farmasötik müstahzarların biyoyararlanım ve biyoşdeğerliliğinin değerlendirilmesi hakkında yönetmelik. *Resmi Gazete*. Yayıml Tarihi: 27 Mayıs 1994. Sayı: 21942. Erişim: [http://suam.uludag.edu.tr/files/08.pdf]. Erişim Tarihi: 06.09.2009.
- RUTGERS, H.C., STEPIEN, R.L., ELWOOD, C.M., SİMPSON, K.W., BATT, R.M. (1994). Enrofloxacin treatment of Gram-negative infections. *Vet Rec.*, **135 (15)**: 357-359.
- SARICA SOYER, Z., LİMAN, B.C. (2008). The comparison of bioequivalence of two different specialites including ciprofloxacin used in broiler chickens. *J. Health Sci.*, **17 (1)**: 23-30.
- SCHEER, M. (1987). Concentrations of active ingredient in the serum and in tissues after oral and parenteral administration of baytril. *Vet. Med. Rev.*, 104-118.
- SCULLY, B.E. (1990). Pharmacology of the fluoroquinolones. *Urology*, **5 (1)**: 8-10.
- SHAKIBAEI, M., PFISTER, K., SCHWABE, R., VORMANN, J., STAHLMANN, R. (2000). Ultrastructure of Achilles tendons of rats treated with ofloxacin and fed a normal or magnesium-deficient diet. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 261-266.
- SHUMAKER, R.C. (1986). PKCALC: a basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metabolism Rev.*, **17**: 331-348.
- STEIN, G.H. (1991). Drug interactions with fluoroquinolones. *Am. J. Med.*, **91**: 81-86.
- SUMANO, L.H., GUTIERREZ, O. L., ZAMORA, M. A. (2001). Bioequivalence of four preparation of enrofloxacin in poultry. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **24**: 309-313.
- SUMANO, L.H., GUTIERREZ, O. L., AGUILERA, R., ROSILES, M.R., BERNARD, B. M. J. GRACIA, M.J. (2004). Influence of hard water on the bioavailability of enrofloxacin in broilers. *Poultry Sci. Asso.*, **19**: 726-731.

- ŞAHAN, S., KAYA, S. (2006). Hidrate sodyum kalsiyum aluminosilikat içeren yemle beslenen etlik piliçlerde enrofloksasinin farmakokinetiği. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **53 (2)**: 111-115.
- ŞAHİN, S. (2003). Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlilik çalışmalarında farmakokinetiğin önemi. Erişim: [http://www.recete.org/mised/mised_3/9.php]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- TARIM SİGORTASI KANUNU (5363). 21.06.2005 tarih ve 25852 sayılı Resmi Gazete.
- TERP, D.K., RYBAK, M.J. (1987). Ciprofloxacin. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*. **21**: 568-574.
- TOUTAIN, P.L., KORITZ, G.D. (1997). Veterinary drug bioequivalence determination. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, **20**: 79-90.
- TRAŞ, B., YAZAR, E. (2002). İlaçlarda kalite, etkinlik ve güvenlik testi olarak biyoeşdeğerlik. *TVHB Derg.*, **2 (3-4)**: 75-78.
- VANCUTSEM, P.M., BABISH, J.G., SCHWARK, W.S. (1990). The Fluoroquinolone antimicrobials: Structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet.*, **80**: 173-186.
- VYBÍRALOVA, Z., NOBİLİS, M., ZOULOVA, J., KVETİNA, J., PETR, P. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**: 851-858.
- WALKER R.D., STEIN G.E., BUDSBERG S.C., ROSSER, E.J., MACDONALD, K.H. (1992). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **53**: 2315-2319.
- WATANABE, T., FUJIKAWA, K., HARADO, S., OHURA, K., SASAKI, T., TAKAYAMA, S. (1992). Reproductive toxicity of the new quinolone antibacterial agent levafloxacin in rats and rabbits. *Arzneim Forsch Drug Res*. **42**: 374-377.
- WETZSTEIN, H.G., DEJONG, A. (1996). In vitro bactericidal activity and post antibiotic effect of fluoroquinolones used in veterinary medicine. *Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, **18**: 22-29.
- WHO, Technical Report Series, 863 (1996). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, WHO, Geneva, pp.: 114-140.
- WOLFSON, J. S., HOOPER, D. C. (1989). Fluoroquinolones antimicrobial agent. *Clin. Microbiol. Rev.*, 378-424.
- YILMAZ, İ. (2006). Enrofloksasin içeren iki farklı müstahzarın sığırlarda kas içi yolla uygulama sonrası biyoeşdeğerliğinin değerlendirilmesi. *Dokora Tezi*.

EK-1

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ETİK KURUL TOPLANTI KARARLARI

Toplantı Tarihi	Toplantı sayısı	Karar No	Konusu
27.11.2006	017	035	"Ağızdan Kullanılan Bazı Enrofloksasin Müstahzarlarının Etçi Piliçlerde Biyoşdeğerliğinin İncelenmesi" isimli proje.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kuruluna gönderilen "Ağızdan Kullanılan Bazı Enrofloksasin Müstahzarlarının Etçi Piliçlerde Biyoşdeğerliğinin İncelenmesi" konulu deneysel çalışmanın ekteki başvuru formu değerlendirilmiştir.

Çalışmanın deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 13' üncü maddesinde belirtilen " Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Yönergenin 12'nci maddesinde belirtilen " Hayvanların Deneyleri İle İlgili İlkeler" başlığı altındaki etik kurallar saklı kalmak koşuluyla çalışmanın hazırlanmasında " Etik Kurul Yönergesi" ilkelerine uyulduğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kaan M. İŞCAN (Başkan)

Yrd. Doç. Dr. Nusret APAYDIN (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Gökhan ERASLAN (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Nazmi ÇETİN (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Rahşan ÖZEN (Üye)

Araş. Gör. Dr. Savaş SARIOZKAN (Üye) (GÖREVLİ)

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Ayşe KANICI
Doğum yeri ve tarihi	: Konya 25.10.1974
Uyruğu	: T.C.
Medeni Durumu	: Bekar
İletişim adresi ve telefonu	: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji 06110 Dışkapı/ANKARA 05427618916
E-posta	: akanici@hotmail.com
II- Eğitimi	
Doktora	: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı (2003-2009).
Lisans	: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1993-1998)
Lise	: İnönü Lisesi (1989-1992)
Orta Okul	: İnönü Lisesi (1986-1989)
İlk Okul	: 13 Ekim İlköğretim Okulu (1981-1986)
Yabancı dili	: İngilizce
III- Ünvanları	
Araştırma Görevlisi	: 2001-
IV- Mesleki Deneyimi	
Araştırma Görevlisi	: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı (2001-2003)
Özel Sektör	: 1999-2001
V- Bilimsel İlgili Alanları	
Yayınları	1. ÇİTİL, M., KARAPEHLİVAN, M., TUZCU, M., DOĞAN, A., UZLU, E., ATAKIŞI, E., KANICI, A., UZUN, M. (2007). Deneysel Kronik Aflotoksikozis Oluşturulan Bildircinlerde (Coturnix coturnix japonica) l-karnitinin Patolojik, Biyokimyasal ve Hematolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Araştırılması. <i>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi</i> . 9(2) : 223-227.
	2. KANICI, A., DOĞAN, A. (2003). Davranış Bozukluğu Olan Kedilerin Tedavisinde İlaçların Kullanılması. <i>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi</i> . 9 (2) : 223-227.
Poster	1. KANICI, A., KAYA, S. (2009). Güvercinlerde İlaç Kullanımı ve Kullanılan İlaçlar. <i>VIII. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi</i> , 01-04 Temmuz 2009, Sürmeli Efes Otel, Suçluk-İzmir.
	2. ISHRAGA G. İBRAHİM, YARSAN E, ATMACA N, KANICI A. (2006). Evaluation of Effects of Enrofloxacin on Some Haematological Parameters and Body Weight in Broilers, 01-02. Haziran.2006, Stara Zagora, Bulgaristan.
VI- Bilimsel Etkinlikleri	
Seminer 1	: Güvercinlerde İlaç Kullanımı ve Kullanılan İlaçlar (2004).
Seminer 2	: Özel Siklooksijenaz-2 (Cox-2) Engelleyicileri (Koksib'ler) (2005).
VII- Diğer Bilgiler	
Eğitim Programı Haricinde Aldığı Kurslar ve Katıldığı Eğitim Seminerleri	
Ulusal Akademik Dergiler, Akademik Yükselmeler, Ulakbim Veri Tabanları Eğitim Semineri, 29.12.2009, Tandoğan-Ankara.	
How to Write a Competitive Proposal for Framework 7 başlıklı eğitim (2009), Tübitak-Ankara.	
Hayvansal Gıda Maddelerinde Veteriner İlaç Kalıntıları, Mikotoksinler ve Salmonella konulu çalıştay 08-09	

Ekim 2008, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü; Bornova-İzmir.
Ankara Üniversitesi Tömer Dil Kursu (2008), Ankara.
Deney Hayvanları Kullanma Sertifikası (2008), Ankara.
Alpaca'ların Kıl yapısının Elektron Mikroskopta Değerlendirilmesi 14 Ekim-14 Aralık 2007, University of Wisconsin Madison, USA.
Organizasyonunda Katkıda Bulunduğu Bilimsel Toplantılar
Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 22-24 Eylül 2005, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Prof. Dr. Satı Baran Konferans Salonu, Ankara. Düzenleme Kurulu Üyesi.
İkinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 6-8 Eylül 2007, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Konferans Salonu, Samsun. Düzenleme Kurulu Üyesi
Üçüncü Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi 30 Eylül-2 Ekim 2010, Pine Bay Holiday Resort, Kuşadası-Aydın. Düzenleme Kurulu Üyesi
Katılmış Olduğu Bilimsel Toplantı ve Seminerler
VIII. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 01-04 Temmuz 2009, Sürmeli Efes Otel, Suçluk-İzmir.
"Etik, Her Yerde ve Her Zaman" isimli panel; Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 100.Yıl Salonu (2009), Tandoğan-Ankara.
EREF 2009: Attracting Research Talent isimli konferans (2009), Tübitak-Ankara.
III. Ulusal NBC Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı), 13-14 Haziran 2007, GATA Konferans Salonu, Ankara.
Midwest Microscopy and Microanalysis Society Symposium (2007), University of Wisconsin Madison-USA.
İkinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 6-8 Eylül 2007, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Konferans Salonu, Samsun.
SEM A.Ş. LC ve LC/MS Dünyasına Bakış, 09.06.2006, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
II. Ulusal NBC Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı), 08-09 Kasım 2005, GATA Konferans Salonu, Ankara.
Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 22-24 Eylül 2005, Prof. Dr. Satı Baran Konferans Salonu, Ankara.
II. Ulusal HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Sempozyumu, 07-09 Ekim 2004, GATA Konferans Salonu, Ankara.
HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Ulusal Sempozyumu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, 25-27 Mayıs 2003, GATA Konferans Salonu, Ankara.
Yeni Yüzyılda Modern İnce Tabaka Kromatografisi (T.L.C.) ve HPTLC, Kromatografinin Temel Uygulamasının Geldiği Son Nokta ve Kantifikasyon, 22 Mayıs 2003, Altinel Otel, Ankara.