

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞIZDAN KULLANILAN BAZI SÜLFAKİNOKSALİN
PREPARATLARININ ET-TİPİ PİLİÇLERDE
BİYOEŞDEĞERLİĞİ**

Harun ALP

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİMDALİ
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine BAYDAN**

2008 - 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: / /2008

Prof. Dr.
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyoeşdeğerlik	7
1.1.1. Biyoyararlanım Tespit Yöntemleri	9
1.1.2. Biyoyararlanım / Biyoeşdeğerlik Ölçütleri	12
1.1.3. Biyoyararlanım/Biyoeşdeğerlik Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	13
1.1.4. Biyoeşdeğerliğin Değerlendirilmesi	14
1.1.5. Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Ölçütlerinin Kabul Sınırları	15
1.2. Sülfonamidler	17
1.2.1. Genel Yapısı	18
1.2.2. Sülfakinoksalin	19
1.2.3. Etki Şekli	19
1.2.4. Etki Spektrumu	21
1.2.5. Farmakokinetik Özellikleri	22
1.2.6. Klinik Kullanımı	24
1.3. Çalışmanın Amacı	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Gereçler	27
2.1.1. Araç ve Cihazlar	27
2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler	27
2.1.3. Laboratuvar Malzemeleri	27
2.1.4. Analitik Çözeltiler	28
2.1.5. Deneme Hayvanları	28
2.1.6. Kullanılan İlaçlar	28
2.2. Yöntem	28
2.2.1. Plazma Analizleri	30
2.2.1.1. Plazma Sülfakinoksalin Yoğunluğunun Belirlenmesi	30
2.2.2. Standart Eğrilerin Çizilmesi ve Geri Kazanım Testleri	30
2.2.3. Farmakokinetik Hesaplamalar	31
2.2.4. İstatistiksel Hesaplamalar	31
3. BULGULAR	33
3.1. Plazma Sülfakinoksalin (SQ) Değerlerinin Tespitine Yönelik Bulgular	33
3.2. Farmakokinetik Değişkenlere Yönelik Bulgular	34
4. TARTIŞMA	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42

ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45
EKLER	49
Ek-1 (Etik Kurul Kararı)	50
ÖZGEÇMİŞ	51

ÖNSÖZ

Günümüzde her alanda tüketime sunulan ürünlerin kalite ve güvenliği büyük önem taşır. Rekabetin hızla arttığı günümüz ticari hayatında üretici firmalar pazar paylarını büyütme ve rekabet edilebilecek kalitede ürün elde etmek için araştırma-geliştirme çalışmalarını artırmışlardır. Uluslar arası ticaretin hızla artması ve ürünlerde kalite ve güvenliğin öne çıkması, resmi kurumların bu alandaki kontrol ve denetleme çalışmalarının artmasını da teşvik etmiştir. Sağlık gibi çok önemli bir alanda yoğun şekilde kullanılan ilaçlar için güvenlik ve kalite, diğer ürün gruplarına göre çok daha büyük önem arz eder. İlaçların etkinlik, güvenlik ve kalitesinin kontrol ve denetlenmesi ise öncelikle biyoeşdeğerlik çalışmaları ile yapılır. Bu yönüyle biyoeşdeğerlik testleri, aynı etkin maddeyi ihtiva eden benzer formülasyonlardaki farklı müstahzarların karşılaştırılmasında kullanılan bilimsel ve biyolojik esaslı kalite kontrol testleridir. Biyoeşdeğerlik testlerinin amacı, iki ürünün sistemik etkilerinin etkinlik ve güvenlik yönünden aynı olup olmadığını tespit etmek ve buna koşut olarak söz konusu ürünlerin uygun plazma yoğunluklarını göstermektir. Ayrıca, bir ilacın aynı kullanım alanındaki diğer müstahzarlar arasında güvenle tercih edilebilmesi de yine bu testlerle ortaya konabilmektedir.

Bu çalışmada, veteriner hekimliğinde ucuz ve dayanıklı olmaları, kolay bir şekilde uygulanabilmeleri, etki spektrumlarının geniş olması ve özellikle de diğer ilaçlarla birlikte kullanılmalarda halinde etki spektrumlarının genişlemesi gibi avantajları bulunan, günümüzde bakterilerden ileri gelen solunum ve sindirim sistemi ile idrar yolları hastalıklarında sıklıkla kullanılan sülfonamid grubunun genel özelliklerini taşıyan sülfakinoksalin müstahzarları model olarak seçilmiştir. Bu düşünceden hareketle planlanan ve sunulan çalışma kapsamında, özellikle tavuklar olmak üzere, kanatlılarda geniş kullanım alanı bulan sülfakinoksalin müstahzarlarının çeşitli farmakokinetik değişkenleri incelenmiş ve bu parametreler esas alınarak in vivo şartlarda ilaçların biyoeşdeğerlikleri karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmanın yapılmasında emeği geçen başta danışman hocam Prof.Dr. Emine BAYDAN olmak üzere, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Sezai KAYA ile tez izleme komitemde yer alan Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ ve Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL'a; Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ender YARSAN'a, A.Ü. Veteriner Fakültesi Çiftlik Müdürü Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY'a, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve çalışan personele; özellikle tez çalışmamın uygulama aşamasındaki yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Araş.Gör.Dr. Levent ALTINTAŞ'a ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Araş.Gör.Dr. Dinç EŞSİZ'e ve Abant İzzet Baysal üniversitesi'nden Yrd.Doç.Dr. Serkan ÇAKIR'a içtenlikle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Plazma ilaç yoğunluğu dağılma dönemi hız sabitesi
β	: Plazma ilaç yoğunluğu atılma dönemi hız sabitesi
EAA	: Plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi altında kalan alan
k_a	: Emilmeli verilmelerde birinci derece emilme hız sabitesi
M	: Molar
OKS	: İlacın vücutta ortalama kalış süresi
$t_{1/2\alpha}$: a-dönemi yarı ömrü
$t_{1/2\beta}$: β -dönemi yarı ömrü
$t_{1/2a}$: Ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü
t_{doruk}	: Plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi
Y_{doruk}	: Plazma doruk ilaç yoğunluğu
Y_p^0	: to anında plazma ilaç yoğunluğu
c.a.	: Canlı ağırlık
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AB	: Avrupa Birliği
SQ	: Sülfakinoksalin
SMZ	: Sülfametoksazol
TMP	: Trimetoprim
BY/BE	: Biyoyararlanım/Biyoeşdeğerlilik
Dİ	: Damar içi
DAP	: Diaminoprimidin
FDA	: Food Drug Administration
WHO	: World Health Organization
EMA	: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1.	Sülfonamidlerin genel kimyasal yapısı	18
Şekil 1. 2.	Sülfakinoksalinin kimyasal yapısı	19
Şekil 1. 3.	Sülfonamidlerin etki mekanizması	21
Şekil 3.1.	Belirli yoğunluklardaki SQ'nin spektrofotometrideki absorbanslardan yararlanılarak hazırlanan standart eğrisi	33
Şekil 3.2.	Belirli yoğunluklardaki SQ'nin spektrofotometrideki absorbanslardan yararlanılarak hazırlanan geri kazanç eğrisi	34
Şekil 3.3.	Damar içi (Grup I), kursak içi (Grup II, III ve IV) verilme durumlarında SQ'nin yarı-logaritmik plazma yoğunluğu-zaman eğrisi	35

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. İlaç ürünlerinin ruhsatlandırılmasında gerekli olan bilgiler	4
Çizelge 1.2. Hayvan türlerine göre sülfakinoksaline duyarlı olan etken çeşitleri	22
Çizelge 2.1. Sülfakinoksalinin Standart Yoğunlukları	33
Çizelge 3.1. Damar içi (Grup I), kursak içi (Grup II, III ve IV) verilen SQ'nin farmakokinetik değişkenleri (aritmetik ortalama±standart sapma)	36
Çizelge 3. 2. B ilacının (test) A ilacına (referans) göre (logaritmik dönüşüm uygulanmamış ve uygulanmış) biyoeşdeğerliği	37

1. GİRİŞ

Günümüz hayvan yetiştiriciliğinde, özellikle kanatlılarda, sağaltıcı, koruyucu, büyüme ve gelişmeyi hızlandırıcı olarak pek çok ilaç kullanılır ve kullanılan bu ilaçlar da kendilerine özgü bir kinetik program çerçevesinde vücudu terk ederler. Ancak, ilaçların vücuttan atılması için gereken süreler çoğu kez oldukça uzundur ve ilaçların kullanıldığı hayvanlardan elde edilen yumurta, süt gibi hayvansal ürünlere de ilaç geçişi kaçınılmazdır. Bu durum özellikle kanatlı yetiştiriciliğinde sürekli ilaç kullanımı da göz önüne alındığında önemli bir sağlık sakıncası doğurur. Ayrıca kanser sıklığındaki artış, insanlarda çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerde hızla direncin gelişmesi ve allerjik olaylar gibi olgular da bu varsayımı güçlendirir. Bu durum, giderek bilinçlenen ve kaliteli-sağlıklı ürün tüketimi eğiliminde olan tüketicilerde büyük kaygı uyandırmaktadır. Bu yönüyle değerlendirildiğinde Gıda Tarım Örgütü (GTÖ), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gibi uluslararası kuruluşlar bu tür sağlık sakıncalarını en aza indirebilmek için ilaç kullanımından sonra her ilaca özgü olan bekletme sürelerine uyulmasını zorunlu kılmıştır (Baydan ve ark., 2002).

Günümüzde her alanda tüketime sunulan ürünlerin kalite ve güvenliği büyük önem taşımaktadır. Özellikle rekabetin hızla arttığı günümüz ticari hayatında üretici firmalar pazar paylarını büyütme ve rekabet edilebilecek kalitede ürün elde etmek için araştırma-geliştirme çalışmalarını artırmışlardır. Uluslararası ticaretin hızla artması ve ürünlerde kalite ve güvenliğin öne çıkması, resmi kurumların bu alandaki kontrol ve denetleme çalışmalarının artmasını da teşvik etmiştir. Sağlık gibi çok önemli bir alanda yoğun şekilde kullanılan ilaçlar için güvenlik ve kalite, diğer ürün gruplarına göre çok daha büyük önem arz eder (Traş ve Yazar, 2002).

Veteriner hekimlikte ilaç eşdeğerliği ve önemi konusuna geçmeden önce biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlikle ilgili birkaç kavramı tanımlamakta yarar vardır:

Müstahzar: Belirli bir formülasyona göre belirli bir farmasötik halinde araştırma/geliştirme boyutunda veya üretim boyutunda imal edilen ilaçtır.

Biyoyararlanım: Etkin maddenin veya onun terapötik molekül kısmının farmasötik şekilden emilerek etki yerinde veya onu yansıtan biyolojik sıvılarda (genellikle serum veya plazmada) var olma hızı ve derecesidir (Yıldırım ve Şener, 1999).

Biyoeşdeğerlik: Resmi düzenlemelerdeki tanımına göre biyoeşdeğerlik; farmasötik eşdeğer olan iki ürünün (biri test, diğeri referans) aynı molar dozda verilışinden sonra biyoyararlanımlarının (farmasötik alternatiflerde bulunan aktif bileşenin etki yerine ulaşma hız ve derecesi) kabul edilen sınırlar içinde (\pm %20) birbirinden farksız olmaları ve böylece terapötik etkilerinin hem etkinlik hem de güvenlik bakımından aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasına denir. Etkin maddeleri aynı deneysel koşullarda, aynı molar dozda uygulandıklarında emilim hızı ve miktarı açısından anlamlı fark göstermeyen farmasötik eşdeğer preparatlara da **biyoeşdeğer ilaçlar** denir (Yıldırım ve Şener, 1999; Şahin, 2003; Traş ve ark, 2005).

Terapötik eşdeğerlik: Bir müstahzarın etkinliği ve güvenilirliği daha önce tespit edilmiş bir başka müstahzar ile aynı etkin maddeyi veya terapötik molekül kısmını içermesi ve aynı etkinlik ve güvenliği klinik olarak göstermesi hali olarak tanımlanır.

Kimyasal eşdeğerlik: İki farklı preparat içerisindeki etkin maddenin aynı kimyasal yapıya sahip olmalarına denir.

Farmasötik eşdeğerlik: Kimyasal eşdeğerliğe ek olarak iki preparatın aktif madde miktarının ve dozaj şekillerinin de aynı olmasına denir.

Jenerik eşdeğerlik: Karşılaştırıldığı patentli ilaçla aynı etkin maddeyi, aynı miktarda ve aynı farmasötik şekilde içeren preparatlardır.

Amerika Bileşik Devletleri (ABD) İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) jenerik ilaçların patentli ilaçla aynı etkin maddeyi aynı miktar ve farmasötik şekilde içermesini yeterli görmeyip farmasötik eşdeğerlik yanında terapötik eşdeğer olmasını da istemektedir (Yıldırım ve Şener, 1999).

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

Klinik eşdeğerlik: Aynı canlıda aynı doz ve doz aralığında verildiğinde aynı sağaltıcı etkiye yol açan ve farmakolojik, kimyasal veya farmasötik olarak eşdeğer ilaçları veya ilaç şekillerini karşılayan bir terimdir (Posyniak ve ark., 2001; Kaya, 2002).

Ülkemizde birçok ilaç firması, hem beşeri hem de veteriner alanda piyasaya bol miktarda müstahzar çıkarmakta ve bunların çoğu da aynı etkin maddeyi içermektedir. Dolayısıyla veteriner hekim, aynı etkin maddeyi içeren iki farklı üründen birini diğerinin yerine belli bir endikasyon için kullanmak zorunda kalmakta ve ilaçların birbirinin muadili olup olmadığına karar vermesi gerekmektedir. Bu tip uygulamalarda başarıyı belirleyen en önemli faktörlerin başında, ilacın formülasyonu ve uygulama yerine göre hedef bölgeye ulaşabilen ilaç miktarının bilinmesidir. Çünkü bu bilgiler, ilaçların terapötik yeterlilikleri, toksisiteleri, gıda güvenliği, halk sağlığı ve ülke ekonomisi gibi konular açısından son derece önemlidir. İlaçların etkinlik, güvenlik, kalite, kontrol ve denetlenmesi ise öncelikle biyoeşdeğerlik (BE) ve biyoyararlanım (BY) çalışmaları ile yapılır (Or ve ark., 1994).

İlaç ürünlerinin ruhsatlandırılması için gerekli belgeler arasında biyoyararlanım ve/veya biyoeşdeğerlik çalışmaları bir gereklilik olarak yer alır

(Çizelge 1.1). Özellikle ilacı ilk keşfeden firmanın ilacı ile patent korumasında olmayan farmasötik eşdeğer olarak üretilen bir ilacın terapötik eşdeğer olduğunun kanıtlanması, bu ilacın klinik açıdan diğerinin yerine kullanılabileceğini gösteren en önemli unsur olarak kabul edilir. Dolayısıyla ilaçların ruhsatlandırılmasında kalite, etkinlik ve emniyet kadar bunların birbiri yerine kullanılabilir olup olmaması (eşdeğerliği) da hastanın sağlığı ve emniyeti açısından önemlidir (Şahin, 2003).

Çizelge 1.1. İlaç ürünlerinin ruhsatlandırılmasında gerekli olan bilgiler.

Ruhsatlandırma Gereklilikleri	Referans	Eşdeğer
Firma genel bilgisi	√	√
Ürün özellikleri (Prospektüs, etiket, ambalaj)	√	√
Uzman raporu	√	√
İlacın bileşimi	√	√
İyi Üretim Uygulamaları (GMP)	√	√
Başlangıç malzemelerinin kontrolü	√	√
Bitmiş ürün kontrolü	√	√
Stabilite testleri (Etkin madde ve bitmiş ürün)	√	√
Eşdeğer ürünün referans ürünle karşılaştırılması		√
Pre-klinik çalışmalar	√	
Klinik çalışmalar	√	
Biyoeşdeğerlik		√

Kaynak: (Anonim, 2008a).

AB'nin ilaç çalışma grubu olan İlaçlarda Araştırma ve Tedarik için Üst Düzey Grubu'nun (G10) eşdeğer ilaçlar konusundaki görüşleri şöyledir (Anonim, 2008a);

Eşdeğer ilaçlar, Avrupa Komisyonu G10'un stratejisinin temel unsurları arasındadır. G10'un önerisi, "üye ülkelerin kendi pazarlarında eşdeğer ilaç kullanımını artırmaya yönelik yöntemler geliştirmesi ve kamu sağlığı için eşdeğer ilaç endüstrisinin gelişimine ve rekabete önem verilmesi" yönündedir.

G10 Çalışma Grubu'nun 2003 yılı Lizbon Çalıştayı'nda aldığı bazı kararlar aşağıdaki gibidir:

- Hekimler eşdeğer ilaçları reçetelemek için eğitilmeli, reçeteleme kararlarının ekonomik sonuçları anlatılmalıdır.
- Referans ilaç yerine verilmek üzere eşdeğerlerinin listesi çıkarılmalıdır.
- Tüketiciler, eşdeğer ilaçlar konusunda bilinçlendirilmelidir.
- Eşdeğer ilaç ağırlıklı geri ödeme sistemleri oluşturulmalıdır.
- Eşdeğer ilaçların ruhsatlandırılmasındaki gecikmeler önlenmelidir.

İlaç sektöründe, ruhsatlandırma işlemleri, tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz açısından da en önemli konudur. İlacın özelliğinden dolayı diğer ticari ürünlerden farklı olarak piyasaya arzından önce yetkili otorite tarafından ruhsatının ve satış izninin verilmesi gereklidir. Ülkemizde beşeri ilaçların ruhsatlandırılmasını düzenleyen hukuki belge 1262 sayılı kanuna bağlı olarak 02.03.1995 tarih ve 22218 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Tıbbi Farmasötik Ürünler Yönetmeliği'dir. Ayrıca, 27.05.1994 tarih ve 21942 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Farmasötik Müstahzarların Biyoyararlanım-Biyoeşdeğerliğinin (BY/BE) değerlendirilmesi hakkında yönetmelik ve 06.02.1990 tarih ve 20425 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan İlaç Ruhsatlandırma Danışma Komisyonunun Kuruluş ve Görevleri Hakkındaki Yönetmelik de bu alan içerisinde değerlendirilir. Veteriner müstahzarlar için 23.10.2002 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan "Veteriner İspençiyari ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliği" bulunmaktadır. Bu Yönetmeliğin amacı, veteriner hekimlikte kullanılmaya mahsus veteriner ispençiyari ve/veya tıbbi müstahzarların ruhsatlandırılma esaslarını, insan ve hayvan sağlığı açısından güvenli ve doğru kullanımını sağlamak için müstahzarların prospektüs ve etiketlerinde bulunması gereken bilgileri ve bakanlıktan ruhsatlı müstahzarların ruhsatla ilgili işlemlerini belirlemektir (Canbolat, 2002; Resmi Gazete, 2002).

Yeni bir ilacın ülkemizde keşfine yönelik yatırımların yetersiz olduğu da göz önüne alınırsa, en azından jenerik ilaçlar üzerine belli bir dikkatin yoğunlaşması gerekir. Bu alanda BY/BE çalışmaları önemli bir yer alır. Orijinal ilaç üreticileri için

problem arz etmeyen bu çalışmalar özellikle jenerik üreticiler için büyük önem taşır. Beşeri müstahzarlar için 2000 yılı başından itibaren BY/BE çalışmaları gerektiren ilaçlar için bu belgeleri olmadan halka satış izni verilmemektedir. Bu durum, özellikle Ruhsatlandırma Yönetmeliği'nin sekizinci maddesinde açıkça belirtilmektedir. Sağlık Bakanlığı'nın BY/BE çalışmalarına verdiği değer geri ödeme kurumlarını da bu yönde teşvik etmiştir. Sağlık Bakanlığı, ucuz ilaç uygulamasında temel olarak BY/BE belgelerinin göz önüne alınmasını, "ucuz ilaç" değerlendirmenin BY/BE belgeleri olan ilaçlar arasında yapılmasının gerekliliğini öne sürmektedir. Şu anda, bu çalışmaların hepsinin yönlendirilebileceği merkez sayısı sınırlıdır. Bundan dolayı, çalışmaların büyük bir kısmı yurt dışına yönelmektedir. İlaç pazarını dengeli bir hale getirebilmek için BY/BE çalışmalarının piyasadaki ilaçlar için tamamlanması gerekir. Ayrıca farmasötik eşdeğer veya farmasötik alternatif ilaçların birbirlerinin yerine kullanılabilmesi (interchangeable) için terapötik eşdeğerliğin sağlanmış olması gerekir (WHO, 1996; FDA, 2000; Canbolat, 2002; Öner, 2003).

Eşdeğer ve Referans İlaç

Eşdeğer ilaç, patent süresi sona ermiş orijinal farmasötik ürünün (referans ilaç) terapötik eşdeğeri olan ürüne denir. Bu ürünler, temelde benzer ürün olarak aynı etkin maddeyi içerir. Bu nedenle eşdeğer ilaç, yüksek fiyatlı orijinal ürünlerin etkin alternatifi olarak değerlendirilmekte ve yaygın olarak reçetelendirilmektedir.

Eşdeğer ilaçların, orijinal ilaçlarla aynı farmakolojik etkilere sahip olduğu, dolayısıyla hasta üzerinde aynı tedaviyi sağladığı bilimsel çalışmalarla kanıtlanır.

Referans ilaç, yenilikçi firma tarafından geliştirilerek patent koruması altında pazara verilen ilk üründür. Koruma süreleri bittikten sonra bu ürünler veya jenerik ilaçlar üretilir.

Bir eşdeğer ürünün, üretiminden satışa sunulmasına kadar geçen tüm evreler referans ürünlerle aynı aşamaları sergilemekte, sadece daha önce referans ilaç

üreticileri tarafından canlılar üzerinde gerçekleştirilen klinik çalışmalar yapılmamaktadır.

Günümüzde, referans ilaç üreticisi tarafından canlı deneklerde kullanılarak başarılı olduğu kanıtlanan ilaçlarla ilgili klinik çalışmaların eşdeğer ilaç üreticilerince tekrarlanması, etik açıdan ve halk sağlığı bakımından uygun bulunmamaktadır.

Eşdeğer ilaçlarda, sağlık otoritelerinin gerekli gördüğü tüm inceleme ve araştırmalar yapılmakta, hasta üzerinde referans ürünle aynı tedaviyi sağladığı yani terapötik eşdeğeri olduğu biyoeşdeğerlik çalışmalarıyla kanıtlanmaktadır (Anonim, 2008a).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1996 yılında yayınlanan teknik raporuna göre etkin madde ve/veya farmasötik dozaj şeklinin fizikokimyasal, farmakokinetik, farmasötik vb. özelliklerine göre aşağıdaki çalışmalardan geçerli olan birisinin yapılması ile ancak terapötik eşdeğer ürün elde edilir (WHO, 1996; Öner, 2003).

- Biyoeşdeğerlik çalışmaları
- İn vitro çözünme testleri
- Farmakodinamik çalışmalar
- Klinik çalışmalar

1.1.Biyoeşdeğerlik

Biyoeşdeğerlik testleri, aynı etkin maddeyi ihtiva eden benzer formülasyonlardaki farklı müstahzarların karşılaştırılmasında kullanılan bilimsel ve biyolojik esaslı kalite kontrol testleridir. Biyoeşdeğerlik testlerinin amacı, iki ürünün sistemik etkilerinin etkinlik ve güvenlik yönünden aynı olup olmadığını tespit etmek ve buna koşut olarak söz konusu ürünlerin uygun plazma yoğunluklarını göstermektir. Ayrıca, bir ilacın aynı kullanım alanındaki diğer müstahzarlar arasında güvenle tercih edilebilmesi de yine bu testlerle ortaya konur. Biyoeşdeğerlik, tüketici, hekim, halk sağlığı, üretici ve uluslar arası ticaret yönüyle de büyük önem taşır. ABD ve AB'nde,

beşeri ilaçlarda olduğu gibi, veteriner hekimliği ilaçlarında da biyoeşdeğerlik çalışmaları titizlikle uygulanmaktadır (EMEA, 2001; Posyniak ve ark, 2001; Traş ve Yazar, 2002).

Biyoeşdeğerlik çalışmalarının esası referans ürüne karşı test edilecek ilacın biyoeşdeğerliğini karşılamaktır. Referans ürün ise genellikle ilk ruhsat almış ve tam doz olarak kabul edilen üründür. Biyoeşdeğerliğin değerlendirilmesinde ilacın biyoyararlanımı da son derece önemlidir. Biyoeşdeğerliği test etmek için kandaki etkin madde yoğunluk eğrisinin zamana bağlı olarak çizilmesi ilk tavsiye edilen metottur. Aynı ve uygun deney şartları altında iki ürünün biyoyararlanımlarının kabul edilebilir sınırlar arasında olması durumunda iki ürün biyoeşdeğer olarak kabul edilir. Biyoyararlanım incelemelerinde, etkin maddenin (ilacın) veya etkin metabolitlerin ve gereken durumlarda ilaç molekülünün etkin kısmının, esas olarak plazma yoğunluğu-zaman eğrisi belirlenerek, bu eğrinin altında kalan alanın (EAA) en az üç yarılanma ömrüne eşit bir süre boyunca ölçülmesi gerekir. Bu yönüyle hız ve miktarı belirleyen en bariz verilerin doruk yoğunluk (Y_{doruk}), EAA ve doruk yoğunluk zamanı (t_{doruk}) olarak sırasıyla ölçülmesi önemlidir. Genel kural olarak iki ilacın uygulanmasından sonra % 90 güven aralığında, biyoeşdeğerliğin EAA için % 80-125, Y_{doruk} için ise % 70-143 sınırları arasında olması gerekir. Yine de geniş güvenlik aralığındaki ya da etki penceresi geniş olan bileşikler için bu sınırlardaki farklılıklar tolere edilebilir (Resmi Gazete, 1994; Colwell ve ark., 1998; EMEA, 2001; Posyniak ve ark., 2001; Traş ve ark., 2002; Şahin, 2003; Traş ve ark., 2005).

Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre ağız yoluyla verilen bir ilacın biyoeşdeğerlik çalışmalarından muaf olabilmesi için etkin maddenin yüksek çözünürlüğe ve geçebilmeye, ilaç ürününün ise yüksek çözünme hızına sahip olması gerekir. Bir etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olması en yüksek dozunun 37 °C de pH 1-8 aralığındaki üç tamponun (tercihen pH 1.0, 4.6, 6.8) her birinin 250 ml'sinde çözünmesi demektir. Bir etkin madde yüksek çözünürlüğe sahip ise biyoeşdeğerlik çalışmalarından genellikle muaf olur. Ancak polimorfizm ve partikül büyüklüğü gibi faktörler çözünme hızını etkileyeceği için bu gibi durumlarda özel dikkat gösterilmesi gerekir. Damar içi referans doza oranla emilme derecesinin %

90'dan fazla olması durumunda etkin maddenin geçişinin yüksek olduğu kabul edilir. Yüksek geçişin bir göstergesi olarak kabul edilen lineer ve tam geçiş durumlarında biyoyararlanımın etkilenme olasılığının az olduğu belirtilmiştir. Ayrıca test ve referans ürünlerin çözünme hızı profillerinin benzerliğinin 37 °C de pH 1-8 aralığındaki üç tamponda (tercihen pH 1.0, 4.6, 6.8) gösterilmesi gerekmektedir. Bu amaçla benzerlik faktörü tayin edilebildiği gibi uygun bir model veya modelden bağımsız yöntemlerde kullanılabilir. Eğer etkin maddenin %85'inden fazlası ilk 15 (veya 30) dakika içinde çözünürse herhangi bir matematiksel işlem yapmadan profiller benzer kabul edilir (EMEA, 2001; Şahin, 2003; Altıntaş, 2006).

Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan yöntemler öncelik sırasına göre;

- Farmakokinetik çalışmalar
- Farmakodinamik çalışmalar
- Klinik çalışmalar
- İn vitro çalışmalar şeklinde sıralanmıştır (Şahin, 2003).

1.1.1. Biyoyararlanım Tespit Yöntemleri

Biyoyararlanım (BY), bir farmasötik şekil içinden emilme ve vücuttaki etki yerine erişebilme hız ve derecesi olarak tanımlanır. Farmakokinetik açıdan, bir formülasyon için elde edilen biyoyararlanım verileri ağızdan verilen dozun sistemik dolaşıma geçen kısmının tayin edilmesini sağlar. İlave olarak, biyoyararlanım çalışmaları, dağılma, atılma, ilacın emilmesi üzerine besinlerin etkisi, doz orantısı, etkin bileşenin farmakokinetiğinde doğrusallık gibi oldukça yararlı farmakokinetik bilgiler sağlar. Yine, biyoyararlanım verileri ilacın sistemik dolaşıma girmeden önceki permeabilitesi, presistemik enzimler ve/veya taşıyıcıların etkisi hakkında da dolaylı olarak bilgi sağlayabilir (FDA, 2002; Şahin, 2003).

Plazma verileri kullanılarak biyoyararlanım tayini, klinik çalışmalardan elde edilen plazma yoğunluk-zaman eğrilerinden tayin edilen farmakokinetik parametreler ile incelenen her formülasyonun emilme hız ve derecesi hakkında bilgi verir. Emilme hızını tespit etmek için bölme modelleri, grafiksel ve gözlemsel yöntemler kullanılabilir. Uygulama kolaylığı nedeniyle en sık kullanılan yöntem gözlemsel yöntemdir. Bu yöntem ilaç ürünün verilmesinden sonra ilacın plazma doruk yoğunluğunun (Y_{dorum}) ve doruk zamanının (t_{dorum}) tayin edilmesi esasına dayanır (Welling ve ark., 1991; Şahin, 2003).

Emilme derecesini tayin etmek için sıfırdan sonsuza kadar plazma yoğunluk-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA) kullanılır. Pek çok ilaç için EAA verilen dozla doğru orantılı olarak değişir. Eğer dozla EAA arasında böyle bir orantı yoksa ilacın biyoyararlanımının değerlendirilmesi güçtür. Plazma yoğunluk-zaman eğrisi altında kalan alanı tayin etmek için bir ilacın bir sayısal integrasyon yöntemi (örneğin lineer veya log-lineer trapezoidal kuralı) kullanılabilir. Bu yöntemlerle sıfırdan son ölçüm noktasına kadar olan alan ($EAA-t_n$) tayin edilebildiği için son ölçüm noktasından sonsuza kadar olan alan ($EAA-t_n-o$) tayin etmek için bir ekstrapolasyon işleminin yapılması gerekir. Ekstrapolasyon işleminin güvenilirliği açısından terminal fazda en az 3-4 nokta bulunmalıdır. Ekstrapole edilen alanın toplam alana olan katkısının %20'den fazla olmaması istenir. Bunun için kan örneklerinin en az üç yarılanma ömrüne eşit bir süre boyunca alınması gerektiği belirtilmiştir (Welling ve ark., 1991; Shargel ve ark., 1993; Kayaalp, 1998; Şahin, 2003).

Doğrudan ve (örneğin hız sabiti, hız profili) ve dolaylı (örneğin Y_{dorum} , t_{dorum} , ortalama emilme zamanı, ortalama geçiş zamanı, EAA'ya göre normalize edilmiş Y_{dorum}) farmakokinetik ölçütlerin emilme hızını değerlendirme yetenekleri sınırlı olduğu için FDA sistemik maruz kalma ölçütlerinin kullanılmasını tavsiye etmektedir (FDA, 2002). Maruz kalma ölçütleri olarak plazma yoğunluk-zaman eğrisinin erken (kısmi EAA), doruk (Y_{dorum}) ve toplam ($EAA-t$ ve $EAA0-o$) kısmı tanımlanmıştır. İlacının terminal yarı ömrünün ($t_{1/2}$)'de sunulması gerekmektedir. Kısmi alan referans formülasyon için t_{dorum} değerlerinin popülasyon meydanında kesilmelidir ve beklenen doruk zamanından önce en az iki örnek toplanmalıdır.

Biyoyaralanım çalışmaları çoğu zaman ilacın tek dozda verilmesiyle gerçekleştirilir. Ancak;

- Ölçümlerde duyarlık sorunları tek dozdan sonra yeterince doğru bir plazma yoğunluğu ölçümünü olanaksız kılıyorsa,
- Plazma yoğunlukları ve atılma hızındaki birey içi değişkenlik doğal olarak büyükse,
- Doza ve zamana bağlı farmakokinetik geçerli ise,
- Uzatılmış salın ürünler söz konusu ise kararlı durum incelemeleri istenebilir (Resmi Gazete, 1994).

Kararlı durum çalışmalarında, plazma yoğunluk zaman eğrisinde kararlı duruma (plato) ulaşıldıktan sonra biyoyaralanım değerlendirilir. Elde edilen eğrinin platodaki tek bir dozla ilgili eğri altındaki alan dilimi (EAA_t), (Y_{doruk}), dozlama aralığı (t) sonundaki yoğunluğu (Y_{min}) ve t_{doruk} ölçülür. Ayrıca bir dozlama aralığındaki ortalama yoğunluk ($Y_{\text{av}} = \text{EAA}_t / t$), dalgalanma derecesi [$= (Y_{\text{doruk}} - Y_{\text{min}}) / Y_{\text{av}}$] ve sallanma [$= (Y_{\text{doruk}} - Y_{\text{min}}) / Y_{\text{min}}$] tayin edilir. Kararlı durum çalışmalarında maruz kalmanın ölçütü olarak kararlı durumda bir dozlama aralığında plazma yoğunluk-zaman profili altında kalan alan kullanılır (EMEA, 2001; FDA, 2002; Şahin, 2003).

1.1.2. Biyoyararlanım / Biyoedeğerlik Ölçütleri

Tek Doz ve Yinelenen Doz (Kararlı Durum) Çalışmaları

Genellikle tek doz çalışmaları biyoedeğerlik çalışmaları için yeterli ve istenen çalışmalardır. Ancak bazı değiştirilmiş salım sağlayan ürünler ile doza- ve zamana-bağımlı farmakokinetik gösteren ilaçlarda kararlı durum veya yinelenen doz çalışmalarına gereksinim duyulur (FDA, 2000; EMEA, 2001).

Tek Doz Çalışmaları

İlaçla ilgili yasal düzenlemeler ve rehberler, tek doz BY ve BE çalışmalarında, aşağıda belirtilen farmakokinetik ölçütlerin belirlenmesini önerirler;

- Sıfırdan t_x zamanına kadar plazma yoğunluk-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA_{0-t_x}), burada t_x ; ölçülen son yoğunluk olan Y_x 'e karşılık gelen zamandır.
- Sıfırdan sonsuza kadar plazma yoğunluğu-zaman eğrisi altında kalan alan ($EAA_{0-\infty}$).
- En yüksek ilaç yoğunluğu (Y_{doruk}) ve en yüksek ilaç yoğunluğuna ulaşabilmesi için geçen süre (t_{doruk}), doğrudan gözlem değerinden elde edilmelidir.

Yinelenen Doz (Kararlı Durum) Çalışmaları

İlaçla ilgili yasal düzenlemeler ve rehberler, yinelenen doz biyoyararlanım ve biyoedeğerlik çalışmalarında aşağıda belirtilen farmakokinetik ölçütlerin belirlenmesi önerilir (Labaune 1989; Steinişans, 1995; Öner, 2003).

- Kararlı durumda bir doz aralığını (τ) aşan bir zamana kadar olan plazma yoğunluğu-zaman eğrisi altında kalan alan ($EAA_{0-\tau}$). Burada τ ; dozlama aralığıdır.
- Son doz uygulamasından sonra doğrudan gözlem değerinden elde edilen en yüksek ilaç yoğunluğu (Y_{doruk}) ve bu yoğunluğa ulaşabilmesi için geçen süre (t_{doruk}).
- Kararlı durumda her dozlama aralığı sonundaki ilaç yoğunluğu.
- Kararlı durumda ortalama ilaç yoğunluğu.
- Kararlı durumdaki dalgalanma derecesi.
- Kararlı durumdaki salınım derecesi (FDA, 2000; EMEA, 2001; Öner, 2003)

BY ve BE çalışmalarının değerlendirilmesinde; deneyin düzenleme aşaması oldukça önemli bir yer tutar. Her araştırmada olduğu gibi BY ve BE çalışmalarında da araştırmanın düzeni teknik yönden hatalı ise hiçbir istatistik teknik ve yöntem, bu çalışmalardan da geçerli ve güvenilir sonuçlar çıkaramaz, başı ve sonu belirsiz verileri anlamlı hale getiremez (Öner, 2003).

1.1.3. Biyoyararlanım/Biyoeşdeğerlik Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerliğin tayini için, önerilen yöntem farmakokinetik çalışmalardır. Farmakokinetik ölçümler bir ilaç şeklinden ilacın sistemik dolaşıma girişini tayin eden bir biyotayin olarak da değerlendirilebilir. Ağız yoluyla verilen ve pek çok hızlı salıveren ve değiştirilmiş salınım yapan ürünlerin biyoeşdeğerliklerinin gösterilmesinde genellikle tek doz çalışmaları tavsiye edilir (Resmi Gazete, 1994; FDA, 2000; EMEA, 2001; FDA, 2002; Öner, 2003; Şahin, 2003; Altıntaş, 2006).

Farmakokinetik ölçümlerin kullanılmadığı durumlarda ise, geçerliliği olan farmakodinamik uygulamaların yapılması önerilir. Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerliği desteklemek amacıyla iyi kontrol edilmiş klinik çalışmaların da kullanılabilmesi, ancak biyoeşdeğerliğin gösterilmesi amacıyla karşılaştırmalı klinik çalışmaların genellikle duyarsız olduğu ve mümkün olduğunca kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre çözünürlüğü, emilimi, çözünme hızı yüksek olan ve ağız yoluyla verilen ilaçların biyoeşdeğerliğinin gösterilmesinde bir in vitro yaklaşımın (çözünme hızı) kullanılması uygundur (Şahin, 2003).

1.1.4. Biyoeşdeğerliğin Değerlendirilmesi

Biyoyararlanım veya biyoeşdeğerlik çalışmasının değerlendirilmesinde aşağıdaki temel ölçütler esas alınır (Williams ve ark., 2000; FDA, 2001; Öner, 2003).

- Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmasında kullanılan ölçüt,
- Bu ölçüt için belirlenen güven aralığı,
- Önceden saptanmış biyoeşdeğerlik sınırları.

Bu temel esaslara göre biyoeşdeğerlik çalışmalarının tasarımında üç yöntem kullanılır.

- Ortalama biyoeşdeğerlik,
- Popülasyon biyoeşdeğerlik,
- Bireysel biyoeşdeğerlik.

Ortalama biyoeşdeğerlik, bu güne kadar birçok biyoeşdeğerlik çalışmasında kullanılmıştır ve şuanda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Çift tek-yönlü test esasına dayanan %90 güven aralığında, test ve referans ürünün ortalama ölçütlerinin genellikle %80-125 sınırlarında değerlendirildiği bir yöntemdir. Ortalama

biyoeşdeğerlik yöntemi ile gönüllü-formülasyon etkileşiminin varyansı değerlendirilemez (Bolton, 1990; Öner, 2003).

Popülasyon biyoeşdeğerlik ve bireysel biyoeşdeğerlik’de ise ortalamaların yanı sıra ölçüm değişkenleri de karşılaştırılabilir. Popülasyon biyoeşdeğerlik yaklaşımı, popülasyondaki ölçümün toplam değişkenliğini değerlendirir, bireysel biyoeşdeğerlik yaklaşımı ise test ve referans ürünler için gönüllü-içi değişkenliği olduğu kadar gönüllü-formülasyon etkileşimini de değerlendiren bir yöntemdir.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında deney düzeni tekrarlı olmayan tasarımlar ve tekrarlı çapraz tasarımlar olmak üzere iki temel bölümde incelenir. Tekrarlı olmayan tasarımlar, standart iki formülasyonlu, iki dönem ve iki sıralı çapraz tasarımlardır. Bunlar genellikle ortalama veya popülasyon yaklaşımının olduğu biyoeşdeğerlik karşılaştırmaları için seçilen yöntemlerdir. Tekrarlı çapraz tasarımlar ise bireysel biyoeşdeğerlik çalışmaları için önemli çalışmalardır, bu tasarımla test ve referans ürüne ait biyoyararlanım ölçütlerinin gönül-içi varyans ile gönüllü-formülasyon varyansının kestirimine olanak verir (FDA, 2001; Öner, 2003).

1.1.5. Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Ölçütlerinin Kabul Sınırları

Plazma yoğunluğu-zaman eğrisi altında kalan alan için %90 güven aralığında kabul sınırları 0.80- 1.25 (%80-125)’dir, Y_{doruk} için bu durumun geçerli olmasının yanı sıra etkinlik ve güvenirliliğin göz önünde bulundurulması koşulu ile bu aralığın genişlemesinin mümkün olabileceği belirtilmektedir. Geniş güvenlik aralığına sahip ilaçlar için daha geniş sınırlar kabul edilebilir; ancak, dar güvenlik aralığına ya da dik doz cevap eğrisine sahip ilaçlar için %20’lik bir fark bile kabul edilmeyebilir. Y_{doruk} değeri örnekleme zamanına bağlı olarak geniş değişkenlik gösterdiğinden, güvenlik aralığı %70-143 sınırları arasında kabul edilebilir. T_{doruk} değeri kullanılacağı zaman değişkenliğinin mutlak güven aralığı kabul edilebilir olarak seçilmelidir; 10 dakikalık t_{doruk} için %20 değişkenlik ile 120 dakikalık t_{doruk} için %20 değişkenlik aynı anlama gelmez. Bu nedenle t_{doruk} için biyoeşdeğerlik genişliği dikkatli seçilmelidir. İyi bir

ilaç ürünü biyoeşdeğerliğini dolayısıyla biyoyararlanım ölçümlerindeki performansını raf ömrü boyunca korumalıdır (Resmi Gazete, 1994; Colwell ve ark., 1998; FDA, 2000; EMEA, 2001; FDA, 2002; Traş ve Yazar, 2002; Öner, 2003; Şahin, 2003; Anonim, 2004a; Traş ve ark., 2005).

Günümüzde birçok ilaç firması hem beşeri hem de veteriner alanda piyasaya bol miktarda müstahzar çıkarmakta ve bunların çoğu da aynı etkin maddeyi içermektedir. Dolayısıyla veteriner hekim, aynı etkin maddeyi içeren iki farklı üründen birini diğerinin yerine belli bir endikasyon için kullanmak zorunda kaldığında, ilaçların birbirinin muadili olup olmadığına karar vermesi gerekir. Bu tip uygulamalarda başarıyı belirleyen en önemli faktörlerin başında, ilacın formülasyonu ve uygulama yerine göre hedef bölgeye ulaşabilen ilaç miktarının bilinmesi gelir. Çünkü bu bilgiler, ilaçların terapötik yeterlilikleri, toksisiteleri, gıda güvenliği, halk sağlığı ve ülke ekonomisi gibi konular açısından da son derece önemlidir. Örneğin, biyoyararlanımı %60 olan digoksin içeren bir preparatla hastanın kalp yetmezliği kontrol altına alınmışken, aynı dozda fakat biyoyararlanımı %30-40 olan başka bir firmanın ilacı verildiğinde kalp yetmezliği şiddetlenmiş ve biyoyararlanımı %80 olan bir preparat da dijital toksisitesi yapabilmiştir (Or ve ark, 1994).

Sonuç olarak, benzer klinik ve farmakolojik etkileri olan, benzer plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisi gösteren ilaç formülasyonlarının değerlendirilmesinde biyoeşdeğerlik testleri önemli rol oynar (Tountain ve Koritz, 1997). Özellikle ağız yoluyla kullanılan ve biyoyararlanım sorunu gösteren etkin madde ve/veya farmasötik dozaj şekillerinde terapötik eşdeğerliğin gösterilmesinde en önemli testler biyoeşdeğerlik testleridir. Ülkemizde yaygın olarak kullanılan farmasötik eşdeğerlik, ilacın etkinliğini göstermede yetersiz kalan bir kavramdır. Bir ilacın etkinliğinin kanıtlanabilmesi için farmasötik eşdeğerliğinin yanında terapötik eşdeğer olduğunun da kanıtlanması gerekir. Terapötik eşdeğerliği kanıtlanmış ilaçlar değiştirilebilir ilaçlardır; yani, birbirlerinin yerine kullanılabilirler. Yine bu amaçla bir etkin maddenin bir formülasyondan sistemik dolaşıma geçme hız ve derecesini tayin etmek amacıyla yapılan biyoyararlanım çalışmalarında ve aynı maddeyi içeren test ve referans ürünlerinin klinik açıdan birbirlerinin yerine kullanılıp

kullanılmayacağını göstermek amacıyla gerçekleştirilen biyoeşdeğerlik çalışmalarında öncelikli olarak farmakokinetik çalışmalar tercih edilmelidir (Resmi Gazete, 1994; WHO, 1996; FDA, 2000; Öner, 2003). Dolayısıyla, ilaçların ruhsatlandırılması için gerekli belgelerin içinde bioyararlanım/farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarla ilgili belgelerin bulunması bir gerekliliktir. Özellikle ilaçları 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 kullanılabileceğini (muadil ilaç) gösteren en önemli unsurdur. Dolayısıyla biyoeşdeğerlik testleri, ilaçların ruhsatlandırılması, kalitesi, etkinliği ve güvenilirliği kadar, bunların birbirinin yerine kullanılabilir olması, etkili sağaltımın yapılması ve sağaltım maliyeti gibi konularda son derece önemlidir (Resmi Gazete, 2005).

1.2. SÜLFONAMİDLER

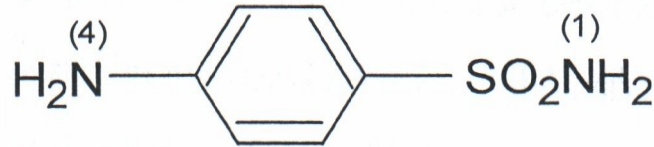
Veteriner hekimliğinde çok sık kullanılan ilaçlar arasında yer alan sülfonamidler, paraaminobenzensülfonamid (sülfanilamid)'in sentetik türevleri olup, insan ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi amacıyla sistemik bir şekilde kullanılan ilk etkili kemoterapötik ajanlardır. İlk kez 1908 yılında Gelmo tarafından sentezlenen sülfanilamidin antibakteriyel etkisinin olduğu 1932 yılında Domagk'ın boya maddesi olan prontosil'in, fareleri *Streptococcus haemolyticus*'un öldürücü dozlarına karşı koruduğunu ortaya koymasıyla anlaşılmıştır. Sülfonamidlerin bulunması ve geniş şekilde kullanılmaya başlanmalarını takiben, etkili oldukları bakterilerin yol açtıkları hastalıklarda önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Sülfonamidler 1970'li yıllardan itibaren, bakteriyel direncin gelişmesi nedeni ile genellikle diamino-primidin (DAP) grubu (trimetoprim, o-metoprim, aditoprim vb.) *dihidrofolat redüktaz* inhibitörleri ile birlikte kullanılmaktadırlar (Barnett ve Busby, 1970; Nizamlioğlu, 1992; Elmas, 1997; Kaya, 2002; Tosun, 2008).

Sülfonamidlerin ucuz ve dayanıklı olmaları, kolay bir şekilde uygulanabilmeleri, etki spektrumlarının geniş olması ve özellikle de diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaları halinde etki spektrumlarının daha da genişlemesi gibi avantajları bulunur. Bu avantajlarından dolayı, günümüzde başta kanatlılar olmak üzere, tüm evcil hayvanlardaki bakterilerden ileri gelen solunum ve sindirim sistemi ile idrar yolları hastalıklarında sıklıkla kullanılırlar (Özkazanç ve Kaya, 1983; Şanlı ve ark., 1987; Kaya, 2000).

1.2.1. Genel Yapısı

Sülfonamid türevleri sentetik olarak hazırlanır ve benzer yapıya sahiptirler. Sülfonamidler, esas itibarıyla sülfanilamid maddesinin türevidirler. Sülfonamidlerin genel yapısı, $-SO_2-NH_2$ grubu ile amino grubunun para pozisyonunda bağlandığı benzenik çekirdekte oluşur (Şekil 1.1). Yapıdaki azot atomlarından birinin yerine çeşitli radikaller bağlanarak, farklı etki gücü ve sürelerine sahip değişik sülfonamid bileşikleri türetilebilir (Bevill, 1988; Bywater, 1991; Spoo ve Jim, 1995; Şahindokuyucu, 2003).

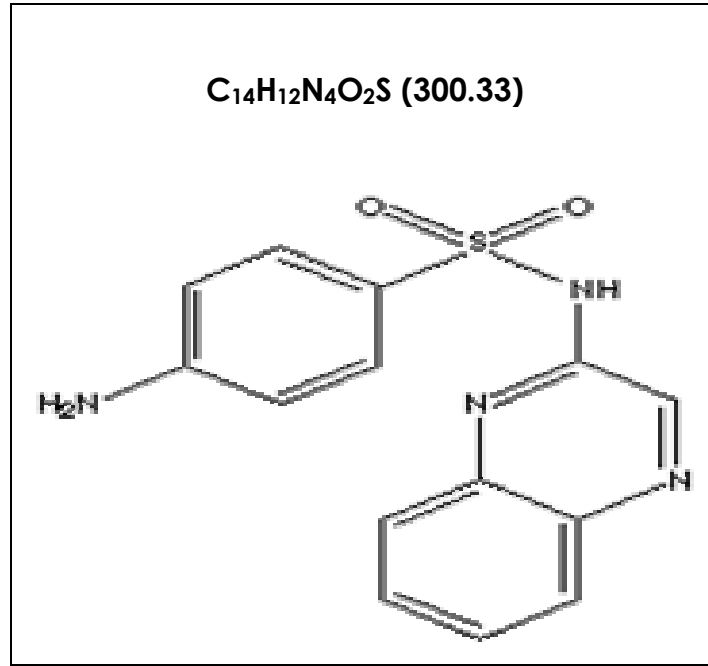
Sülfonamidler, sülfanilik asitin amidleri ve türevleri veya sülfonamidler diye de bilinirler. Günümüze kadar çok sayıda (5000 dolayında) sülfonamid türevi sentezlenmiş olup, bunlardan sadece 25-30 kadarı uygulama alanı bulmuştur (Pena ve ark, 1995; Bevill, 1988; Kaya, 2002).



Şekil 1.1. Sülfonamidlerin genel kimyasal yapısı (Budavari, 1996).

1.2.2. SÜLFAKİNOKSALİN

Sülfakinoksalin, amid azotuna 2-aminokinoksalin grubunun bağlanması ile oluşur (Şekil 1.2). Sülfakinoksalinin sinonimleri, 4-amino-N-2-kinoksalinbenzensülfonamid, N¹-(2-kinoksalin) sülfanilamid, 2-sülfanilamidokinoksalin, N¹-(2-kinoksalin) sülfonamid ve sülfabenzpirazindir. Sülfakinoksalin, molekül formülü C₁₄H₁₂N₄O₂S, molekül ağırlığı 300.34³⁶, pKa'sı 5.5^{19,46} olan, sarı renkte, tatsız, kokusuz, su ile eter de çözünmeyen, alkolde ise çok az çözünen, madensel asit ve alkalilerin sulu çözeltilerinde iyi çözünen, kristalize bir tozdur (Şener, 1985; Moffat, 1986; Manger, 1991; Budavari ve ark., 1996; Micromedex, 2000; Şahindokuyucu, 2003; Usp, 2007).



Şekil 1.2. Sülfakinoksalinin kimyasal yapısı (Anonim, 2008b).

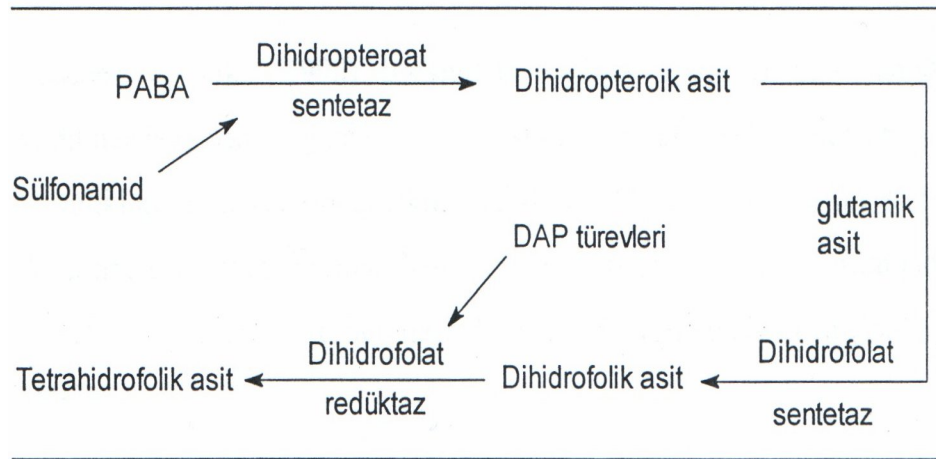
1.2.3. Etki Şekli

Sülfonamidler, bakterilerin üremesini durdurarak veya gelişmesini engelleyerek etkilerini gösterirler. Böylece, gelişmesi duraklamış bakteriler vücudun savunma sistemleri tarafından yok edilirler. Çok yüksek yoğunluklarda bakterilerde öldürücü

etki de oluşturabilirler. Özellikle, bakterilerin hızlı gelişme-üreme dönemlerinde daha etkilidirler; zira, bu esnada hem bakteriye dışardan besin maddesi girişi fazladır, hem de vücudun savunma sistemleri daha etkindir. Onun için, akut hastalığın sağaltımında daha etkilidirler (Kaya, 2002).

Sülfonamidler, para-aminobenzoik asidin (PABA) hem yapısal analogu (antimetabolit) olup hem de yarışmalı antagonistidirler. Bakterinin PABA'yı kullanarak bakteriyel gelişim için gerekli olan folik asiti (pteroilglutamik asit) sentezlemesini inhibe ederler. Daha açık bir ifade ile, PABA molekülünün yerine geçerek DNA sentezi için gerekli olan folik asit oluşumunu dolayısıyla bakteri hücrelerinin üremesini engellerler. Kendi folik asitlerini sentezleyen mikroorganizmalar sülfonamidlere karşı duyarlı olup, hazır folik asiti kullananlar ise ilaçtan etkilenmezler. Sülfonamidler tarafından oluşturulan **bakteriyostatik** etki PABA konsantrasyonunun arttırılmasıyla yarışmalı olarak engellenebilir. İnsanlar ve hayvanlar folik asiti besinlerle almak zorunda olduklarından sülfonamidlerin bu etki mekanizmasından etkilenmezler (Usp, 2007; Tosun, 2008).

Sülfakinoksalin, etki spektrumu geniş sülfonamid türevi bir ilaçtır ve sülfonamid grubunun genel özelliklerini taşır. Bu yönüyle bakterilerin üreme veya gelişmesini engelleyerek etkisini gösterir. Etki şekli olarak, para-aminobenzoit asit (PABA) ve dihidropterin arasındaki tepkimeyi gerçekleştiren *dihidropteroat sentetaz*'ın etkinliğini önler ve bakterilerde folik asitin sentezini inhibe eder (Şekil 1.3). Böylece bakteri ve bazı protozoa türlerinde RNA, protein sentezi ve üremeyi önler (Kaya, 2002).



Şekil 1.3. Sülfonamidlerin etki mekanizması (Kaya, 2000).

1.2.4. Etki Spektrumu

Sülfonamidler grup olarak Gram-pozitif bakterilere etkirler; ayrıca, Gram-negatif bakteriler, Rickettsia, Chlamydia ve protozoa türlerine de etkilidirler.

Sülfakinoksalin, kanatlılarda genellikle kör bağırsak koksidiyozunun sağaltımı ve önlenmesi ile çeşitli hayvan türlerinde koksidiyoza sebep olan *Eimeria spp.*, *Pasteurella multocida* ve *Salmonella gallinarum*'a karşı oldukça etkilidir (Çizelge 1.2) (Usp, 2007). Özellikle koksidiyoz etkeni olan *E. Tenella*'nın 1. ve 2. nesil meront ve merozoitleri olmak üzere tüm gelişme dönemlerini etkiler. İlaç, sporlanmış oositlere maruz kalınmasını takiben 48. hatta 72. saatte bile koksidiyozun kontrolünü sağlayabilir. Dolayısıyla, bir sürüde koksidiyoz belirtileri başladığında dahi, başarıyla kullanılabilir (Ceylan, 1979; Lindsay ve Blagburn, 1995; Willams ve ark., 1995; Şanlı, 1999; Kaya ve Pirinççi, 2000; Kaya, 2002; Şahindokuyucu, 2003).

Çizelge 1.2. Hayvan türlerine göre sülfakinoksaline duyarlı olan etken çeşitleri.

Hayvan Türleri	Hastalık Etkeni
Sığır	Eimeria bovis ve E. zuernii.
Tavuk	E. tenella, E.necatrix, maxima, E. brunetti, E. acervulina (Koksidiyoz etkenleri) Pasteurella multocida (Akut Kolera etkeni) Salmonella gallinarum (Tifo etkeni; Fowl typhoid)
Köpek	Koksidiyoza ilişkin etkenlerin neden olduğu Enteritis ve bakteriyel solunum sistemi enfeksiyonlarında (bronşit ve pneumoni gb.).
Tavşan	E. stiedae
Koyun	E. ovinoidalis
Hindiler	E. adenoeides ve E.meleagrimitis Salmonella gallinarum (Tifo etkeni; Fowl typhoid)
Sülün, Bildircin ve Hindilerde	Pasteurella multocida (Akut Kolera etkeni)

Kaynak: (Micromedex, 2000; Usp, 2007).

1.2.5. Farmakokinetik Özellikleri

Sülfakinoksalin ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından iyi emilir ve bütün vücuda dağılır (Usp, 2007). İlaç, kan-beyin engeli dahil olmak üzere, bütün doğal engelleri kolayca geçer. Ayrıca, ağızdan verildikten sonra kısa sürede dokular, vücut boşlukları ve tüm salgılarda (idrar ve safra başta olmak üzere) etkili yoğunluğa ulaşır. İlaç özellikle karaciğer başta olmak üzere diğer dokularda da metabolize olur. İlacın biyotransformasyonu temel olarak asetilasyon, glukuronid konjugasyon ve aromatik hidroksilasyon yollarıyla gerçekleşir (El-Sayed ve ark., 1995; Furusawa ve Tsuzukida, 1998; Şahindokuyucu, 2003; Usp, 2007).

Williams ve ark. (1995) etlik civcivlere tek doz olarak ağızdan verdikleri sülfakinoksalinin radyolojik yöntemle dokulara dağılımını incelemişler; ilacın

bağırsaktan hızla emildiğini ve 30 dakika sonra lens hariç bütün dokulara dağıldığını tespit etmişlerdir. White ve Williams (1983)'da etçi tavuklara 300 mg/kg c.a. miktarında on farklı sülfonamid türevini (sülfakinoksalin, sülfadimidin, sülfadimetoksin, sülfadiazin, sülfakloropirazin, sülfamerazin, sülfakloropridazin, sülfatiazol, sülfanilamid ve sülfafurazol) 4 gün boyunca yeme katarak vermişler; bunun sonucunda sülfakinoksalinin sindirim kanalından diğer sülfonomidlere göre daha iyi emildiğini ve daha yüksek kan yoğunluğuna ulaştığını bildirmişlerdir.

Furusawa ve Tsuzukida (1998) yumurtacı tavuklara 400 mg/kg c.a. miktarında sülfakinoksalini yeme katarak 3 gün boyunca vermişler ve dokulardaki (kan, böbrek, karaciğer, kas, yağ ve yumurtalık) yoğunluklarını incelemişlerdir. Sonuçta, sülfakinoksalinin sülfamonometoksin ve sülfadimetoksine göre daha yüksek kan yoğunluğuna ulaştığını, tüm vücut kesimlerine hızla dağıldığını ve dokularda da sülfamonometoksin ve sülfadimetoksine göre daha yüksek yoğunlukta bulunduğunu tespit etmişlerdir. Lüders ve ark. (1974)'da etçi tavuklara sülfakinoksalin (50 ppm) ve sülfamezatini (100 ppm) içme suyuna katarak, 3 gün boyunca uygulamışlar ve sülfakinoksalinin daha düşük dozda verilmesine rağmen, daha yüksek kan yoğunluğu sağladığını bildirmişlerdir.

Tavuklara sülfakinoksalinin, 100 mg/kg c.a. damar içi tek doz enjeksiyonunu takiben farmakokinetik profili incelenmiş ve elde edilen plazma yoğunluk-zaman eğrisine göre ilacın iki bölmeli dışarıya açık modele göre dağıldığı tespit edilmiştir (El-Sayed ve ark, 1995). Sülfakinoksalinin ağızdan tek dozda verildikten sonra, doruk plazma yoğunluğuna ulaşma süresini (t_{dorum}) El-Sayed ve ark. (1995) 5,56 saat; Li ve ark. (1995) ise 3,75 saat olarak bulmuşlardır. Ayrıca, El-sayed ve ark. (1995) ilacın biyoyararlanımını ağızdan verilmeyi takiben % 72 olarak tespit etmişlerdir.

Sülfonamidlerin kandaki 80-100 µg/ml yoğunluğu, antikoksidial ve antibakteriyel etki için yeterli olmaktadır (Banerjee ve ark., 1974). Sülfakinoksalin, bu plazma yoğunluğunu 24 saat sürdürür. Bu sebeple, sülfakinoksalin hızlı emilen ve yavaş atılan sülfonamidler grubu içerisinde yer alır (Ceylan, 1979; El-Sayed ve ark., 1995; Willams ve ark., 1995; Şahindokuyucu, 2003).

Sülfakinoksalin, plazma proteinlerine (özellikle albumine) yüksek oranda (% 90'dan fazla) bağlanır (Schlenker ve Simmons, 1950). Bankowski ve Johnson (1949) tavuklarda yaygın olarak kullanılan 6 farklı sülfonamid türevinin (sülfakinoksalin, sülfaguanidin, sülfanilamid, sülfamerazin, sülfametazin ve sülfatiazol) proteinlere bağlanma oranlarını tespit etmişler ve plazma proteinlerine en yüksek oranda sülfakinoksalinin bağlandığını bildirmişlerdir. Sülfakinoksalinin sadece küçük bir kısmı metabolize edilir.

Birçok hayvan türünde sülfonamidlerin metabolize edilmesinde başlıca yol asetilasyondur. Asetilasyon sonucu oluşan N4-asetilsülfakinoksalinin antikoksidial ve antibakteriyel etkinliği yoktur. N4-asetil metabolitinin çoğu deasetilasyona uğrar ve ana bileşiğe dönüşür (Schlenker ve Simmons, 1950; Shaffer ve Bieter; 1950; Ceylan, 1979; Spoo ve Jim, 1995; Willams ve ark., 1995; Şahindokuyucu, 2003).

Sülfakinoksalin, plazmadaki miktarıyla orantılı olarak yumurtaya geçer (Righter ve ark., 1970; Ceylan, 1979). Furusawa ve ark. (1998) yumurtacı tavuklara 200 mg/kg c.a. dozunda sülfakinoksalini yeme katarak 7 gün boyunca vermişler ve yumurtaya geçen ilaç yoğunluğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta, ilacın yumurtada 9. günde tespit edilebilen limitin (0,01 ppm) altında bulunduğunu bildirmişlerdir (Şahindokuyucu, 2003).

1.2.6. Klinik Kullanımı

Koksidiozun sağaltımı ve önlenmesinde en sık kullanılan sülfonamid türevleri sülfakinoksalin, sülfadiazin, sülfadimetoksin, sülfadoksin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfanitran ve sülfakloropirazindir. Kanatlılarda sülfonamidler, kör bağırsak koksidiozundan ziyade bağırsak koksidiozu üzerine etkilidirler. Bu ilaçlardan sülfakinoksalin ve sülfadimidin kör bağırsak koksidiozuna karşı da etki gösterirler. Sülfakinoksalin kanatlılarda genellikle kör bağırsak koksidiozunun sağaltımı amacıyla suya ve koruyucu amaçla da yeme katılarak verilir. Hastalığın özellikle ileri dönemlerinde hayvanlar yemi pek yemezler ama suyu içmeye devam ederler. İlaçtan istenen ölçüde faydanın elde edilebilmesi için, her hayvanın

vücuduna 145mg/kg/gün miktarında ilaç girmelidir. Bu miktarda ilaç alımı ise 1000 ppm miktarında ilaç ihtiva eden yem veya 400 ppm ilaç kapsayan suyla sağlanabilir; anılan düzeylerde ilaç 3 gün verilmeli ve zorunlu olmadıkça da uygulama 5 günü aşmamalıdır. Hastalıkta koruyucu olarak ilaç yeme 500 ppm miktarında katılarak aralıklı veya 125 ppm miktarında katılarak devamlı verilir. Sülfakinoksalin hindilerde koruyucu olarak yeme 150-500 ppm arasında değişen miktarlarda katılarak kullanılır. Sülfakinoksalin dana, kuzu, kedi ve köpeklerin bağırsak koksidiyozu; tavşanlarda bağırsak ve karaciğer koksidiyozu ile kanatlılarda özellikle kör bağırsak koksidiyozu olmak üzere bağırsak koksidiyozunun sağaltımı ve önlenmesinde kullanılır (Banerjee ve ark., 1974; Manger, 1991; Einstein ve ark., 1994; Lindsay ve Blagburn, 1995; Atta ve El-Zeni, 1998; Kaya, 2002).

İlaç, ayrıca akut tavuk kolerası (*Pasteurella multocida*) ve akut tavuk tifosunun (*Salmonella gallinarum*) sağaltımında gerek tek başına gerekse DAP türevleri ile birlikte kullanılır (Righter ve ark., 1970; White ve Williams, 1983; Epstein ve Ashworth, 1989; Şahindokuyucu, 2003; Usp, 2007).

1.3. Çalışmanın Amacı

Çeşitli ülkelerde eşdeğer ilaç kullanımının teşviki için bazı yöntemler uygulanmaktadır. ABD’de, eşdeğer ürünlerinin ruhsatlandırma sürecinin hızlandırılması ve tanıtım kampanyası yapılması amacıyla FDA bütçesine ek ödenek tahsis edilmiştir. İngiltere’de tıp fakültesi öğrencilerine, reçete yazarken eşdeğer ürünleri tercih etmeleri yönünde eğitim verilmektedir. Belçika, İspanya, Portekiz, Avusturya, Fransa gibi ülkelerde kamuoyuna yönelik eşdeğer ilaç bilgilendirme kampanyaları düzenlenmektedir. İsviçre’de eşdeğer ilaçlar için daha düşük katkı payı alınmaktadır. Japonya’da hekimlere, reçetede “referans ilaç yerine eşdeğerini verebilirsiniz” bölümünü işaretlemeleri, eczacılara ise, hastanın onayıyla referans ilacı eşdeğer ilaçla değiştirmeleri karşılığında prim ödemesi yapılmaktadır.

Bu yönüyle meseleye bakıldığında, veteriner ilaç formülasyonlarının biyoeşdeğerliklerinin belirlenmesi AB ve diğer ülkelerde gittikçe artan öneme sahiptir. Ayrıca biyoeşdeğerlik sertifikasını almış ürünler, uluslararası standartlarda ürün özelliği taşırlar. Çünkü biyoeşdeğerlik testleri, ilaçların farmakokinetik hareketlerini değiştiren faktörlerin anlaşılması, bu ilaçların etkinliklerinin en üst düzeye çıkarılması için oldukça önemlidir. Yani veteriner hekim etkili bir sağaltım için tercihini yaparken, ilaçlara ve canlıya ait özellikleri tam anlamıyla bilmesi gerekir. Bu da ancak biyoeşdeğerlik deneme sonuçlarının bilinmesiyle mümkün olmaktadır. Dolayısıyla ülkemizde üretilen veteriner müstahzarların etkinliğini, güvenilirliğini ve kalitesini artırmak, tüketici ve üretici haklarını korumak, daha etkili ve ekonomik sağaltım yapmak, bu alanda faaliyet gösteren firmaların kaliteli ürün üretimini teşvik etmek ve ayrıca AB'ne uyum için sürdürülen çalışmalara katkıda bulunmak amacı ile veteriner hekimlikte kullanılan ilaçlarda biyoeşdeğerlik çalışmalarına gereken önem verilmelidir.

Bu düşünceden hareketle planlanan ve sunulan çalışma kapsamında özellikle tavuk hastalıklarında yaygın şekilde kullanılan sülfakinoksalin müstahzarlarının biyoeşdeğerliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Araç ve Cihazlar

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601), pH metre (Mod pH 390 No: 96CY44), Terazi (KemSohn GmbH, WCO 177455), Hassas terazi (Sartorius, Basic BA110S), Santrifüj (Labofuge 200, Heraus Sepatech, 7500363/0 1 ve Mechanika precyzyina, 5990), Otomatik pipetler (10- 100 µl ve 100-1000 µl' lik, Transferpette), Vorteks (Veip Scientifica, 2X3).

2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Amonyum sülfamat (Merck, 101220), Sodyum nitrit (Merck, 106544), N(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NED) (Sigma, N-9 125), Trikloroasetik asit (TCA) (Merck, 100810), Heparin (Nevparin), Sülfakinoksalin sodyum tuzu (% 95; Sigma, S-7382), Deiyonize su.

2.1.3. Laboratuvar Malzemeleri

Cam tüpler (5, 10 ve 20'lik), balon joje, pipet, pastör pipeti, beher, mezür, huni, ependorf tüp, kanül, filtre kâğıdı (Whatman 42), aliminyum folyo, puar.

2.1.4. Analitik Çözeltiler

% 10'luk ve % 20'lik TCA

% 0,1'lik Sodyum nitrit: Deiyonize suda, günlük olarak hazırlandı.

% 0,5'lik Amonyum sülfamat: Deiyonize su ile hazırlandı ve çözelti buzdolabında muhafaza edildi.

% 0,1'lik NED: Deiyonize su ile hazırlandı ve çözelti buzdolabında muhafaza edildi.

2.1.5. Deneme Hayvanları

Çalışmada, Ores firmasından temin edilen 40 adet Ross 308 ırkı et tipi civciv kullanılmıştır.

2.1.6. Kullanılan İlaçlar

A ilacı (Referans): 32 mg sülfakinoksalin içeren 200 ml'lik oral süspansiyon.

B ilacı (Test): 32 mg sülfakinoksalin içeren 200 ml'lik oral süspansiyon.

2.2. Yöntem

Hayvanların bakım, besleme ve kan alma işlemleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği'nde gerçekleştirildi. Civcivler çalışmanın ilk haftasında 30°C, diğer haftalarında 24-29°C'ye sahip kümese konuldu ve sürekli ışık alacakları bir ortam sağlandı. Hayvanlara deneme süresi boyunca hiçbir ilaç ve katkı maddesi içermeyen yem verildi. Hayvanlar ham proteini %23, ham selülozu %6, ham kül %8, metabolik enerjisi 3100 kcal/kg olan yem ile beslendi. Yirmi sekizinci günün sonunda hayvanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I'deki hayvanlara kanat altı venasından 100 mg/kg c.a dozunda sülfakinoksalin'e eşdeğer miktarda sülfakinoksalin sodyum standardı verildi; ilaç verildikten sonra 5., 15., 30. ve 45. dakikalar ile 1., 1,5., 3., 6., 9., 12., 18. ve 24. saatlerde heparinli tüplere (1 ml kan için 100 ünite heparin) kan örnekleri alındı.

Grup II'deki hayvanlara 100 mg/kg c.a. dozunda sülfakinoksalin'e eşdeğer miktarda sülfakinoksalin sodyum standardı sonda ile doğrudan kursağa verildi; ilaç verildikten sonra 15., 30. ve 45. dakikalar ile 1., 1,5., 3., 6., 9., 12., 18., 24. ve 36. saatlerde heparinli tüplere (1 ml kan için 100 ünite heparin) kan örnekleri alındı.

Grup III'deki hayvanlara 100 mg/kg c.a. dozunda sülfakinoksalin'e eşdeğer Referans İlaç sonda ile doğrudan kursağa verildi; ilaç verildikten sonra 15., 30. ve 45. dakikalar ile 1., 1,5., 3., 6., 9., 12., 18., 24. ve 36. saatlerde heparinli tüplere (1 ml kan için 100 ünite heparin) kan örnekleri alındı.

Grup IV'deki hayvanlara 100 mg/kg c.a. dozunda sülfakinoksalin'e eşdeğer Test İlaç sonda ile doğrudan kursağa verildi; ilaç verildikten sonra 15., 30. ve 45. dakikalar ile 1., 1,5., 3., 6., 9., 12., 18., 24. ve 36. saatlerde heparinli tüplere (1 ml kan için 100 ünite heparin) kan örnekleri alındı.

Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları alındı ve analizleri yapılana kadar -18°C 'de muhafaza edildi. Plazmadaki sülfakinoksalin yoğunluğu Bratton ve Marshall'ın yöntemini esas alan Hammond (1977)'un bildirdiği yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlendi.

Plazma örneklerinde ölçülen ilaç yoğunluklarının zamana göre eğrisi çizildi, buna göre biyoeşdeğerlik çalışmaları için gerekli olan EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} değerleri hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Wagner, 1975).

2.2.1. Plazma Analizleri

Plazma ilaç etkin maddelerinin analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.2.1.1. Plazma Sülfakinoksalin Yoğunluğunun Belirlenmesi

Plazma örneklerinin ekstraksiyon ve renk geliştirme aşaması Bratton ve Marshall (1939)'ın yöntemini esas alan Hammond (1977)'un bildirdiği yöntemine göre yapıldı. Buna göre, 10 ml'lik tüpe 2 ml deiyonize su konuldu ve üzerine 0,2 ml plazma eklendi. Sonra 4 ml % 10'luk TCA çözeltisi konuldu ve tüpün kapağı kapatılarak bir dakika karıştırıldı. Beş dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatanttan 2 ml alınarak başka bir 10 ml'lik tüpe konuldu. Süpernatantın üzerine 0,4 ml % 0,1'lik sodyum nitrit çözeltisi eklendi ve karıştırıldıktan sonra 3 dk bekledi. Bundan sonra 0,4 ml % 0,5'lik amonyum sülfamat çözeltisi eklendi ve karıştırıldıktan sonra 2 dk bekledi. Ardından, üzerine 1,2 ml % 0,1'lik NED çözeltisi eklendi ve karıştırılarak tüplerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 5 dk karanlıkta beklemeye bırakıldı. Bu süreyi takiben çözeltilerin absorbanları spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.2.2. Standart Eğrilerin Çizilmesi ve Geri Kazanım Testleri

Standart eğrisinin çizilmesi için % 98,76'lık sülfakinoksalin sodyum standardından 405 mg alınarak deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlandı. Böylece 4 mg/ml'lik stok 1 çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok 1 çözeltisinden 1550 µl alındı ve 10 ml'ye distile su ile tamamlandı. Sonuçta 620 µg/ml'lik stok 2 çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti kullanılarak diğer sulandırmalar yapıldı (Çizelge 2.1.). Örnek analizlerinde olduğu gibi, aynı işlemler antibiyotik içermeyen plazmada renk geliştirme aşamasına kadar takip edildi. Bu işlemlerden sonra aşağıdaki oranlarda hazırlanan sülfakinoksalin çalışma çözeltilerinden 10'ar µl alınarak süpernatanta

eklendi ve daha sonra renk geliştirme aşaması tamamlandı. Elde edilen absorbanlar doğrultusunda standart eğri çizildi.

Çizelge 2.1. Sülfakinoksalinin standart yoğunlukları.

Yoğunluk ($\mu\text{g/ml}$)	Stok 2'den Alınacak Miktar (μl)	Deiyonize Su (μl)
620	1000	-
496	800	200
372	600	400
310	500	500
248	400	600
186	300	700
124	200	800
62	100	900

2.2.3. Farmakokinetik Hesaplamalar

Plazma ilaç yoğunluğu dağılma dönemi hız sabitesi (α), α -dönemi yarı ömrü ($t_{1/2\alpha}$), ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü ($t_{1/2a}$), plazma ilaç yoğunluk-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA), ilacın vücuttan % 63,2'nin atılması için geçen süre (OKS), plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi (t_{doruk}) ve plazma doruk ilaç yoğunluğunun (Y_{doruk}) hesabı Shumaker (1986) ve Wagner (1975) tarafından bildirilen eşitlikleri esas alan PKCALC farmakokinetik programıyla gerçekleştirildi.

2.2.4. İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel hesaplamalar için "SPSS 11.0 for Windows" istatistik paket programından yararlanıldı. Veriler, aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. Plazma ve dokular için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Farklı olan gruplar, Duncan testi ile tespit edildi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 2000).

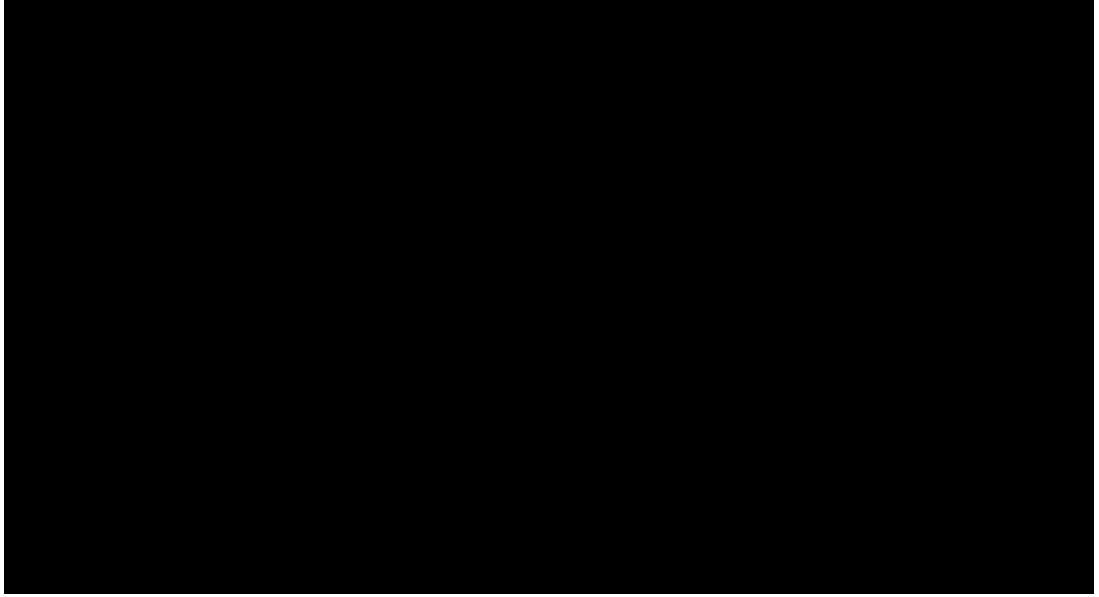
Plazma örneklerinde ölçülen ilaç yoğunluklarının zamana göre eğrisi çizildi; buna göre biyoeşdeğerlik çalışmaları için gerekli olan EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} değerleri hesaplandı ve ilaçlar arasındaki biyoeşdeğerlik durumu EquivTest istatistik programı kullanılarak değerlendirildi (EquivTest, 2005).

3. BULGULAR

3.1. Plazma Sülfakinoksalin (SQ) Değerlerinin Tespitine Yönelik Bulgular

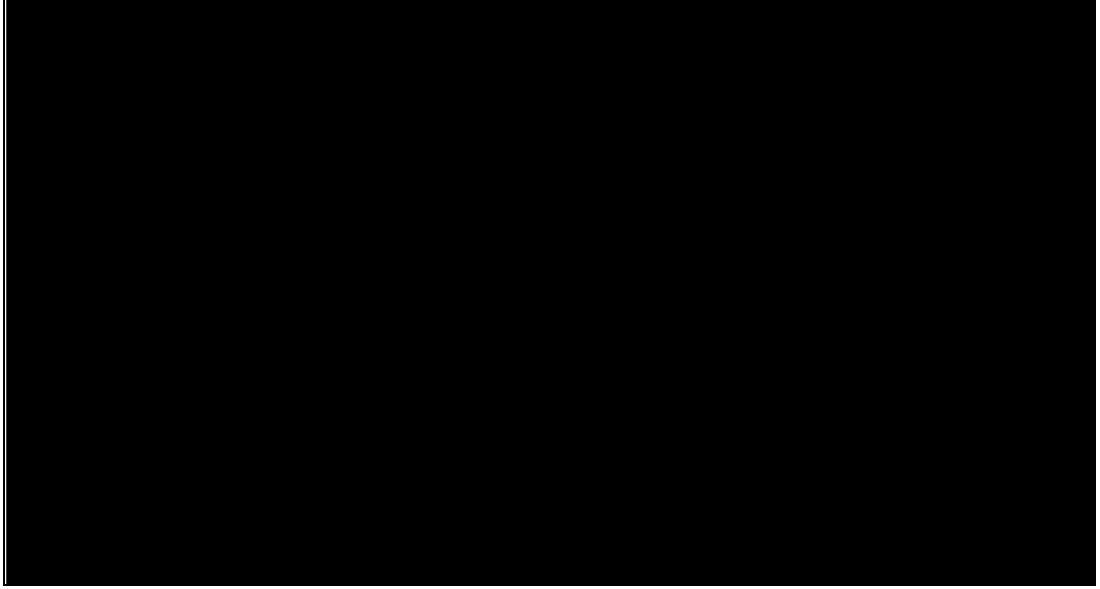
Standartlardan elde edilen absorbanların yardımı ile sülfakinoksalin standart eğrisi çizildi ve doğrusal olarak elde edilen eğrinin denklemi hesaplandı (Şekil 3.1).

Plazmalardan elde edilen absorbanlar standartlardan hesaplanan denklemde yerine konarak plazmaların içerdiği SQ miktarları tespit edildi ve değerler $\mu\text{g/ml}$ plazma olarak ifade edildi.



Şekil 3.1. Belirli yoğunluklardaki SQ'nin spektrofotometrideki absorbanlardan yararlanılarak hazırlanan standart eğrisi.

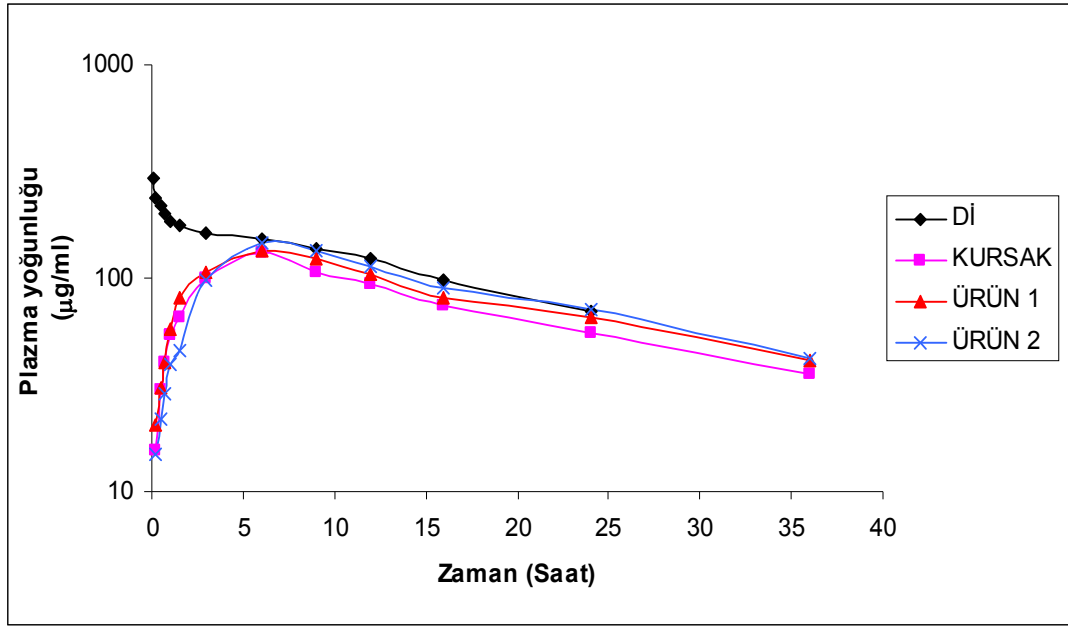
Yöntemin duyarlılığı 1,41 µg/ml; geriye kazanç oranı ise % 90 olarak tespit edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Belirli yoğunluklardaki SQ'nin spektrofotometrideki absorbanslardan yararlanılarak hazırlanan geri kazanç eğrisi.

3.2. Farmakokinetik Değişkenlere Yönelik Bulgular

İlaç karışımının damar içi verilmesini takiben plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrileri (Şekil 3.3.) incelendiğinde ve eğrinin değişik bölme modellerine göre regresyon analizi yapıldığında, SQ (r^2 : 0,99) vücuttaki dağılımının iki-bölmeli dışarıya açık modele uyduğu tespit edildi ve farmakokinetik parametreleri buna göre hesaplandı.



Şekil 3.3. Damar içi (Grup I), kursak içi (Grup II, III ve IV) verilme durumlarında SQ'nin yarı-logaritmik plazma yoğunluğu-zaman eğrisi.

Çizelge 3.1.'de hesaplanan farmakokinetik parametrelere göre SQ için Grup II, Grup III ve Grup IV karşılaştırıldığında; Grup III ve Grup IV istatistiki olarak farklı (Grup III < Grup IV, $p < 0,005$) fakat her iki grupta Grup II'ye istatistiki olarak benzer bulundu. $t_{1/2\beta}$ değerleri karşılaştırıldığında ise Grup III ve Grup IV istatistik olarak farklı (Grup IV < Grup III, $p < 0,005$) ve her iki grupta Grup II'ye istatistiki olarak benzer bulundu. $t_{1/2\alpha}$ değeri bakımından Grup II ve Grup III'e bakıldığında istatistik yönünden önemli bir fark yokken, fakat Grup II ve Grup IV arasında istatistik olarak önemli bir fark bulundu (Grup II < Grup IV, $p < 0,005$). Buna karşın Grup III ve Grup IV istatistiki olarak benzer bulundu. EAA yönünden bakıldığında Grup III ve Grup IV arasında istatistiki olarak fark yokken, her iki grupta Grup II'ye göre önemli fark gözlemlendi (Grup III ve Grup IV > Grup II, $p < 0,005$). F (%) yönünden bakıldığında Grup III ve Grup IV arasında istatistik olarak fark yokken, her iki grupta Grup II'ye göre istatistik olarak farklı bulundu (Grup III ve Grup IV > Grup II, $p < 0,005$).

Çizelge 3.1. Damar içi (Grup I), kursak içi (Grup II, III ve IV) verilen SQ'nin farmakokinetik değişkenleri (aritmetik ortalama±standart sapma).

Değişkenler	Sülfakinoksalin (SQ)			
	Grup I (min-max değerleri)	Grup II (min-max değerleri)	Grup III (min-max değerleri)	Grup IV (min-max değerleri)
α (saat ⁻¹)	3,586±1,278 ^a (2,06-5,10)	0,184±0,046 ^b (0,12-0,24)	0,197±0,094 ^b (0,10-0,35)	0,133±0,032 ^b (0,09-0,19)
β (saat ⁻¹)	0,0412±0,001 ^a (0,04-0,04)	0,0365±0,002 ^{bc} (0,03-0,04)	0,0344±0,003 ^b (0,03-0,04)	0,0379±0,001 ^c (0,03-0,04)
$t_{1/2\alpha}$ (saat)	-	1,565±0,235 ^a (1,30-1,83)	1,470±0,498 ^a (0,45-2,1)	1,891±0,644 ^a (1,11-2,67)
$t_{1/2\beta}$ (saat)	16,837±0,658 ^a (16,19-17,91)	19,045±1,215 ^{bc} (17,84-21,26)	20,332±2,294 ^c (17,59-24,40)	18,278±0,547 ^{ab} (17,77-19,09)
$t_{1/2\alpha}$ (saat)	0,220±0,086 ^a (0,140-0,34)	4,010±1,161 ^b (2,92-6,03)	4,204±1,726 ^{bc} (2,00-6,73)	5,481±1,309 ^c (3,610-7,620)
OKS (saat)	24,085±0,917 ^a (23,18-25,51)	28,410±1,347 ^b (26,01-30,24)	29,958±1,934 ^b (27,29-32,25)	28,437±0,979 ^b (26,80-29,73)
t_{doruk} (saat)	-	6,128±0,623 ^a (5,36-6,75)	5,870±1,559 ^a (2,65-7,76)	6,810±1,585 ^a (4,76-8,59)
Y_{doruk} (µg/ml)	-	196,070±33,712 ^a (145,96-296,61)	226,301±19,569 ^a (196,16-253,49)	214,201±32,888 ^a (173,45-252,22)
EAA $t_{0-\infty}$ (mg/saat/L)	4699,791±260,754 ^a (4337,13-5133,22)	3566,447±454,691 ^b (2810,66-4122,43)	4120,218±506,797 ^c (3010,49-4473,37)	4113,364±180,547 ^c (3850,85-4375,40)
F (%)	-	0,759±0,096 ^a (0,60-0,88)	0,877±0,107 ^b (0,64-0,95)	0,875±0,038 ^b (0,82-0,92)

^{a, b, c, d.} SQ için aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

α , plazma ilaç yoğunluğu dağılım dönemi hız sabitesi,

β , Plazma ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin atılma döneminin eğimi,

$t_{1/2\alpha}$, ağızdan verilme durumunda sindirim kanalından emilme yarı ömrü,

$t_{1/2\alpha}$, α -dönemi yarı ömrü,

$t_{1/2\beta}$, β -dönemi yarı ömrü,

OKS, ilacın vücuttan %63,2'sinin atılması için geçen süre (Ortalama kalış süresi),

t_{doruk} , plazma ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi,

Y_{doruk} , plazmada doruk ilaç yoğunluğu,

EAA $t_{0-\infty}$, plazma ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altındaki kalan alan,

F, biyoyararlanım.

Biyoeşdeğerlik yönünden Grup IV (test ilacı), Grup III (referans ilaç) ile karşılaştırıldığında EAA, Y_{doruk} değerlerinde bir düşüş, t_{doruk} değerinde ise bir artış görüldü. Ancak aradaki bu farkın ilaçların biyoeşdeğer olmaları için gerekli sınırlar içerisinde olduğu belirlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2. SQ için B ilacının (test) A ilacına (referans) göre (logaritmik dönüşüm uygulanmamış ve uygulanmış) biyodeşerliği.

	EAA	Log EAA	t_{doruk}	Log t_{doruk}	Y_{doruk}	Log Y_{doruk}
Test İlacı	4113,364±180,547	3,614	6,810±1,585	0,833	214,201±32,888	2,330
Referans İlaç	4120,218±506,797	3,614	5,870±1,559	0,768	226,301±9,569	2,354
Oran	0,99	1	1,16	1,08	0,94	0,99
Biyoedeşerlik Kabul Sınırı	0,80-1,25	0,80- 1,25	0,80-1,25	0,80- 1,25	0,80-1,25	0,80- 1,25

4. TARTIŞMA

Biyoeşdeğerlik çalışmasında esas, test ilacının bu alanda ilk ruhsat alan ürün olarak kabul edilen referans ürüne karşı biyolojik sistemlerdeki etkisinin belirlenmesidir. Bu durumu farmakokinetik hesaplamalar ortaya koyar. Her iki ilaç da hedef canlıya uygulanır. Belirli dönemlerde kan örnekleri alınarak ilaç yoğunlukları, duyarlı analitik yöntemlerle hesaplanır. Bu amaçla ilaç yoğunluğunun ölçülmesinde bugün için ilaç çeşidine göre HPLC, spektrofotometre, ELISA gibi yöntemlerden yararlanılır.

Çalışma kapsamında plazma SQ yoğunluğu Bratton ve Marshall (1939)'ın yöntemini esas alan Hammond (1977)'un bildirdiği spektrofotometrik yöntem esas alınarak gerçekleştirildi. Yöntemin duyarlılık limiti 1,41 µg/ml olarak ölçüldü.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında karşılaştırma test ve referans ürünün EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} değerleri esas alınarak yapılır. Sonuçta %90 güven aralığında olacak şekilde % 80-125 sınırları arasında bir benzerlik iki ürünün biyoeşdeğer olduğunu gösteren kriter olarak kabul edilir. Y_{doruk} yönünden ise örnekleme zamanı da dikkate alınarak %70-143'lük sınırlar kabul edilebilir sınırı oluşturur.

Çalışma kapsamında SQ için geriye kazanç denemeleri öncelikle yapıldı. Bu analizler sonucunda yöntemin geriye kazanç oranı %90,4 olarak bulundu. Bu değer in Altıntaş, L (2006) ve Elmas ve ark. (2000)'ın bulduğu değerlere (sırasıyla %93,98; %92 ve %92) benzerlik gösterir nitelikte olduğu görüldü. Buna karşın Jaouen ve ark. (1983) ve Chakwenya ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarından (sırasıyla %104 ve %68) farklılık gösterdiği belirlendi. Bu durum kullanılan yöntemin farklılığından kaynaklanmaktadır. Analiz yöntemine göre duyarlılık da değişmektedir.

Çalışmada dört grup oluşturuldu. Bunlardan ilk gruba SQ standard çözeltisi Dİ yolla uygulandı. Grup II'ye sülfakinoksalin standart çözeltisi kursak içi yolla uygulanırken, söz konusu iki grup ilacın farmakokinetik profilinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Grup III'e referans ilaç, Grup IV'e ise test ilacı uygulandı. Referans ilaç test ilaç ile karşılaştırıldığında EAA, Y_{doruk} ve t_{doruk} değerleri ortalamaları referans ilaç için EAA: $4120,218 \pm 506,797$; Y_{doruk} : $226,301 \pm 19,569$; t_{doruk} : $5,870 \pm 1,559$; test ilaç için ise EAA: $4113,364 \pm 180,547$; Y_{doruk} : $214,201 \pm 32,888$; t_{doruk} : $6,810 \pm 1,585$ olarak bulundu ve bu değerler kabul edilebilir sınırlar (%80-125) içerisinde tespit edildi. Yine karşılaştırılan farmakokinetik parametrelere logaritmik dönüşüm uygulandıktan sonra referans ilaç için EAA: 3,614; Y_{doruk} : 2,354; t_{doruk} : 0,768; test ilaç için ise EAA: 3,614; Y_{doruk} : 2,330; t_{doruk} : 0,833 oranlarının kabul edilebilir sınırlar (%80-125) içerisinde oldukları tespit edildi. Söz konusu durum iki ilacın biyoeşdeğer olduğunu gösterir bir durum olarak kabul edildi.

Veteriner ilaçları yönüyle ülkemizde bu alanda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Altıntaş, L (2006) tarafından yapılan çalışmada sülfonamid-TMP esasına dayanan iki ürün karşılaştırılmıştır. Her iki etkin madde için değerlendirmeler ayrı ayrı yapılmıştır. Kanatlılarda yapılan bu çalışmada ölçümler HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda EAA yönünden 0,84-0,87 aralığında olacak şekilde her iki ilaç için değerlendirme yapılmış ve iki ilaç biyoeşdeğer kabul edilmiştir.

Bunun yanı sıra Murrieta ve ark. (1990) ve Pokrajac ve ark. (1998) tarafından yapılan ve beşeri ilaçları esas alan çalışmada sülfonamid-trimetoprim kombinasyonlarının biyoeşdeğerliği karşılaştırılmış ve bu ilaçların biyoeşdeğer oldukları bulunmuştur.

FDA (1993) tarafından yapılan çalışmada da atlarda sülfonamid-TMP içeren iki farklı müstahzar biyoeşdeğer bulunmuştur.

Çalışma kapsamında biyoeşdeğerlik yanında SQ için bazı farmakokinetik parametreler de hesaplandı. Buna göre; OKS Grup I, Grup II, Grup III ve Grup IV'te sırasıyla $24,085 \pm 0,917$; $28,410 \pm 1,347$; $29,958 \pm 1,934$; $28,437 \pm 0,979$ olarak bulundu. Altıntaş, L (2006) tarafından yapılan çalışmada SMZ için Dİ yolla uygulama da OKS (7,90), kursak içi uygulamada (15,95), SMZ'nin iki farklı müstahzarı için ise (12,84) ve (10,52) olarak bulunmuştur. Söz konusu değerler çalışmadakilerden daha düşük bulunmuştur. Bu durum kullanılan analitik yöntemden ve sülfonamid çeşidinin farklı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Bunun yanında 4 grup içerisinde Dİ uygulamadaki grupta OKS'nin düşük olması Dİ uygulama sonunda ilacın organizmada az kalması ile açıklanabilir.

EAA yönüyle yapılan değerlendirmede Dİ uygulama sonunda EAA ($4699,791 \pm 260,754$) olarak bulundu. Bu değer, Altıntaş, L (2006) tarafından yapılan çalışmada Dİ yol için bulunan değerden ($389,43 \pm 20,6$), yüksek bulundu. Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında El-sayed ve ark., (1995), Reddy ve ark., (1998) ve Queralt ve Castells (1985)'in buldukları değerlerden (sırasıyla $4078,8 \pm 143,21$; $1429,13$ ve $31,320$) yüksek; Şahindokuyucu, F (2003) bulduğu değerden ($5090,3 \pm 194,4$) düşük bulundu.

Yine EAA yönüyle yapılan değerlendirmede kursak içi uygulama sonunda EAA Grup II, Grup III ve Grup IV için sırasıyla $3566,447 \pm 454,691$; $4120,218 \pm 506,797$ ve $4113,364 \pm 180,547$ olarak bulundu. Bu değerler, Altıntaş, L (2006) tarafından yapılan çalışmada kursak içi yol için ($199,62 \pm 6,9$) ve SMZ içeren iki müstahzar için ($307,96 \pm 16,8$ ve $259,58 \pm 25,9$) bulunan değerlerden yüksek bulundu. Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında El-sayed ve ark., (1995), Reddy ve ark., (1998) ve Queralt ve Castells (1985)'in buldukları değerlerden yüksek (sırasıyla $2941,93 \pm 69,58$; $1550,53$ ve $29,357$); Şahindokuyucu, F (2003)'nin kursak içi uygulamalarından bulduğu değerlerden düşük ($4763,4 \pm 561,01$ ve $4260,0 \pm 115,5$) bulundu.

Grup II için biyoyararlanım oranı %75,9 olarak bulunurken, Grup III için %87,7 ve Grup IV içinde %87,5 olarak ölçüldü. Bunlardan ilaç uygulaması yapılan

Grup III ve Grup IV'ün biyoyararlanım değerleri, El-sayed ve ark., (1995), Reddy ve ark.(1988) ve Lashev ve Mihailov (1994)'ün bulduğu değerlerden (%72,65; %60,6 ve %81) ve aynı şekilde Altıntaş, L (2006)'nin bulduğu değerden (%51,26) yüksek bulunurken Şahindokuyucu, F (2003)'nin bulduğu değerden (%93,57) düşük bulundu. Bu türden farklılıkların özellikle analitik yöntemle bağlı olmakla birlikte, ilaçtaki yardımcı maddelerin ve kombinasyon çeşitliliğinin olmasından kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Farmakokinetik parametreler içerisinde Y_{doruk} ve t_{doruk} yönünden bakıldığında Grup II, Grup III ve Grup IV de bu değerler sırasıyla Y_{doruk} için $196,070 \pm 33,712$; $226,301 \pm 19,596$ ve $14,201 \pm 32,888$; t_{doruk} için $6,128 \pm 0,623$; $5,870 \pm 1,559$ ve $6,810 \pm 1,585$ olarak bulundu. Bu değerler Altıntaş, L (2006) tarafından yapılan çalışmada alınan sonuçlardan (SMZ içeren standart ve iki müstahzar için sırasıyla 21,24; 20,39 ve 17,80) daha yüksek tespit edildi. Bununla birlikte yine bu yönden elde edilen sonuçlar Reddy ve ark.(1988) ile Queralt ve Castells (1985)'in bulgularından (Y_{doruk} için 146,31 ve 54,50; t_{doruk} için 3,44 ve 1,50) yüksek bulundu. Bunun yanı sıra t_{doruk} değerleri yönünden ise Altıntaş, L (2006)'ın bulduğu değerle (6 saat) uyumlu bulundu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaçların kalite kontrol ve etkinlikleri açısından değerlendirilmesinde önemli bir yere sahip olan biyoeşdeğerlik testleri, gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte hastalıkların tedavisi ve önlenmesi amacıyla ilaçların kullanımında başarılı sonuçların alınabilmesi için yapılması gereken testlerden biridir.

Günümüzde teknolojik ilerlemelere paralel olarak ilaç endüstrisinde de gelişmeler artarak devam etmektedir. Bunun sonucunda aynı etkin maddeyi aynı miktarlarda içeren benzer müstahzarların sayısı da hergeçen gün artmakta ve uygulama alanına girmektedir. İlaçla yapılacak sağaltım uygulamalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri de ilacın biyoyararlanımı yani basit bir ifadeyle uygulama yerinden hedef bölgeye ulaşabilen ilaç miktarıdır. Aynı etkin maddeleri aynı oranlarda içeren benzer müstahzarların birbirlerin muadili olabilmeleri için farmasötik olarak biyoeşdeğer olmaları gerekir. Bu sebeple AB'ye uyum sürecinde olduğumuz şu günlerde gelişmiş ülkelerde (ABD ve AB ülkeleri) veteriner hekimliği ilaç endüstrisinde rutin olarak biyoeşdeğerlik çalışmalarının yapıldığı göz önüne alırsak, ülkemizde de bu alana verilen önemin artırılması gereklidir.

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen veriler iki ilacın birbirleriyle eşdeğer olduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla bu iki ilacın birbirinin yerine, yani 'değiştirilebilir ilaç' olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmaların fazla olmaması nedeniyle elde edilen sonuçlar hakkındaki yorumları da kısıtlamaktadır.

Sonuç olarak, en kısa zamanda veteriner ilaçlarına yönelik biyoeşdeğerlik çalışmalarına gereken önem verilmeli ve beşeri hekimliktekine benzer yasal düzenlenmelerin çıkarılması ve uygulanması sağlanmalıdır.

ÖZET

Ağızdan Kullanılan Bazı Sülfakinoksalin Preparatlarının Et-tipi Piliçlerde Biyoşdeğerliği

Bu çalışma, etlik piliçlerde ağızdan kullanılan iki farklı sülfakinoksalin müstahzarının (SQ) biyoşdeğerliliğini belirlemek amacı ile yapıldı.

Çalışmada 28 günlük, ilaç uygulanmamış, 40 adet (Ross 308 ırkı) etçi piliç kullanıldı. Hayvanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 deneme grubuna ayrıldı. Grup I'dekilere damar içi, Grup II, Grup III ve Grup IV'deki hayvanlara kursak içi yoluyla 100 mg/kg c.a dozunda sülfakinoksalin ilaç verildi. İlaç verildikten sonra 5., 15., 30. ve 45. dakikalar ile 1., 1,5., 2., 3., 4., 6., 9., 12., 18., 24. ve 36. saatlerde steril tüplere kan örnekleri alındı.

Plazma SQ yoğunlukları, spektrofotometre (Schimadzu, UV1601) kullanılarak belirlendi. Her iki ilaç damar içi verilmesini takiben belirlenen iki bölmeli dışarıya açık modele göre dağıldı.

Sülfakinoksalin için yöntemin duyarlılığı 1,41 µg/ml; geriye kazanç oranı ise % 90 olarak tespit edildi.

Biyoşdeğerliğin değerlendirilmesinde Grup III (referans, A ilacı) ve Grup IV (test, B ilacı) ilaçları karşılaştırıldığında SQ için EAA ve Y_{dorum} ortalama değerleri azalırken, t_{dorum} değerlerinde artma görüldü. Sülfakinoksalin için A ve B ilacında EAA ve Y_{dorum} değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılmasında üç değer de kabul edilebilir sınırlar içerisinde (%80-125) olduğu görüldü. Çalışmadan elde edilen veriler iki ilacın birbirleriyle eşdeğer olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu iki ilacın birbirinin yerine, yani “değiştirilebilir ilaç” olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sülfakinoksalin, biyoşdeğerlilik, farmakokinetik, etçi piliç.

SUMMARY

Bioequivalence of Some Sulphaquinoxaline Formulations Following Oral Administration in Broilers.

The present study was carried out to determine the bioequivalence of two different products of sulphaquinoxaline (SQ) used orally in broiler.

In the present study, 40 unmedicated 28 daily-old chicks (Ross 308) were used. Animals were divided into 4 experimental groups each containing 10 chicks. Sulphaquinoxaline at level of 100 mg/kg BW was given to Group I via intravenous route and Group II, III and IV via intracrop route. Blood samples were taken into sterilized tubes at 5., 15., 30. and 45. minutes and 1., 1,5., 2., 3., 4., 6., 9., 12., 18., 24. and 36. hours following drug administration.

Plasma SQ concentrations were measured by spectrophotometer (Schimadzu, UV1601). Both drugs distributed according to two-compartment open model following the administration of intravenously.

The sensitivity of the extraction method for SQ was detected 1,41 µg/ml; the mean recovery value of the extraction procedure for SQ was detected 90,0 %.

When compared the drugs of Group III (reference; A) and Group IV (test; B) for SQ bioequivalence; although mean AUC and C_{max} values decreased, increase in mean t_{max} values was observed. Mean AUC and C_{max} values for SQ were found to be in acceptable ranges (80-125%) when compared mean AUC and C_{max} values for A and B drugs. Data obtained in the present study showed that both drugs had similar bioequivalence. As a result it was concluded that both drugs could be used instead of each other as an "inter-changeable drug".

Key words: Sulphaquinoxaline, bioequivalence, pharmacokinetic, broiler.

KAYNAKLAR

- ALTINTAŞ, L. (2006). Ağızdan kullanılan bazı sülfonamid preparatlarının broilerlerde biyodeşğerliliği. *Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*.
- ANONİM. (2004a). Conduct of bioequivalence studies in animals. Erişim: [http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralexivol-7/A/7AE4a.pdf]. Erişim Tarihi: 06.02.2008.
- ANONİM. (2008a). Eşdeğer İlaç. Erişim Adresi: http://www.esdegerilac.com/asp_sayfalar/index.asp? menuk=17&sayfa=255. Erişim Tarihi: 01/02/2008.
- ANONİM. (2008b). Erişim Adresi: http://chemdb.niaid.nih.gov/struct_search/all/. Erişim Tarihi: 01/02/2008.
- ATTA, A. H., EL-ZENI, S. A. (1998). Tissue residues of some sulfonamides in normal and *Eimerja stiedaj* infected rabbits. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **106**: 295-298.
- BANERJEE, N. C., YADAVA, K. P., Jİ-IA, H. N. (1974). Distribution of sulphaquinoxaline in tissues of poultry. *IndJPhysiolPharmacol.* 18: 361-363.
- BANKOWSKI, R.A., JOHNSON, A. B. (1949). The binding of sulfonamide drugs to the plasma proteins of chicken blood. *Am. J. Vet. Res.* **10**: 282-283.
- BARNETT, M., BUSHBY, S. R. M. (1970). Trimethoprim and the sulphonamides. *The Vet Rec.* 87:39-42.
- BAYDAN, E., TRAŞ, B., BİLGİLİ, A., TANYILDIZI, S., FİLAZİ, A., YARSAN, E., ÖZDEMİR, M., AKKAYA, R. (2002). Etlik Piliçlerde Kullanılan Çeşitli Veteriner İlaçlarının Kalıntıları Üzerine Pişirme, Dondurma Ve Benzeri İşlemlerinin Etkilerinin Araştırılması 1. Sülfonamid Grubu Bazı antibakteriyellerin İncelenmesi. 2. Kinolon Grubu Bazı Antibakteriyellerin İncelenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* **13**: 56-76.
- BEVIL, R. F. (1988). Sülfonamides. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed: N. H. Booth. 6 th Edition. Iowa State University, Ames. p.: 785-795.
- BOLTON, S. (1990). *Pharmaceutical Statistics*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- BRATTON, A. C., MARSHALL, E. K. (1939). A new coupling component for sulphanilamide determination. *J. Biol. Chem.* **128**: 537-550.
- BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITT, A., HECKELMAN, P.E., KINNEARY, J. F.(1996). In: *The Merck Index*. Twelfth Edition. Merc Co8c Inc. Whitehouse Station, N. J., USA.
- BYWATER, R. J. (1991). Sulphonamides and diaminopyrimidines. In: *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. Eds: G. C. Brander, D. M. Pugh, R. J. Bywater, W. L. Jenkins. 5 th Ed. Baillere Tindali, London. p: 489-494.
- CANBOLAT, O. (2002). İlaç ve İlaç Politikalarına Bakış. Sena Ltd. Şti. Ankara.
- CEYLAN, S. (1979). Protozoonlar üzerine etkiyen ilaçlar. İçinde: *Veteriner Farmakoloji*. s.: 180-217.
- CHAKWENYA, J., LAKRITZ, J., TYLER, J., FALES, W. H., KRACKE, J. M., SMITH, K., HOLLE, J. (2002). Pharmacokinetics and bioavailability of trimethoprim-sulphamethoxazole in alpacas. *J Vet Pharmacol Ther.* **25**: 321-327.
- COLWELL, P. E., JAMALI, F., DRYDEN, W., FRIESEN, E., KOVEN, S., MOHAMED, I., OSMOND, B., SEVERİNİ, 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 PharmaceutSci.* 1(1):2-7.
- EINSTEIN, R., JONES, R. S., KNIFTON, A., STARMER, G. A. (1994). Antiprotozoan Drugs: İn: *Principle of Veterinary Therapeutics*. Longman Singopore Publishers Ltd.
- ELMAS, M. (1997). Bazı antimikrobiyel ilaçların plazma ve lenf sıvısındaki farmakokinetik profillerinin karşılaştırılması. *Türkiye Cumhuriyeti Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*.
- ELMAS, M., TRAŞ, B., BAŞ, A. L., YAZAR, E., ÜMİTLİ, S., BİRDANE, Y.O.(2000). The disposition and milk levels o sulphamethoxazole-trimethoprim combination after intrauterine administration in lactating cows during postpartum. *The Indian Veterinary Journal.* 77: 862-866

- EL-SAYED, M. G. A., ABD EL-AZİZ, M. 1., EL-KHOLY, H. M. H. (1995). Kinetic behaviour of sulphaquinoxaline and amprolium in chickens. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 102: 481-485.
- EMEA. (2001). Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Note for Guidance on The Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. London, 26 July 2001. CPMP/EWP/QWP/ 1401/98.
- EPSTEIN, R. L., ASHWORTH, R. B. (1989). Tissue sulfonamide concentrations and correlation in turkey. *Am. J. Vet. Res.* 50: 926-928.
- EQUIVTEST™. (2005). EquivTest from Statistical Solutions. Erişim: [http://www.statsol.ie/equivtest/eqdemo.htm]. Erişim Tarihi: 20.10.2005.
- FDA. (1993). Freedom of Information Summary. NADA 200-003. Erişim: [http://www.fda.gov/cvm/FOI/3400.htm]. Erişim Tarihi: 05.01.2008.
- 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. (2001). Guidance for industry, 'Statistical approaches to establishing bioequivalence.
- FDA. (2002). Guidance for industry. Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), October.
- FURUSAWA, N., TSUZIKJIDA, Y. (1998). Tissue concentrations of sulphaquinoxaline administered in the food of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 39: 683-685.
- HAMMOND, K. B. (1977). Drugs and children: Methods for therapeutics monitoring *Ciin. Toxicol.* 10: 159-183.
- JAOUEN, C., COLIN, C., COLIN, J.N., FREDJ, G., THUILLIER, A. (1983). Comparative study of two analytical methods to measure the drug association sulphamethoxazole-trimethoprim: Clinical applications. *Journal de pharmacie Clinique.* 2(2): 145-155.
- BERZAS, J. J., RODRIGUEZ, J., LEMUS, J. M. and CASTAIEDA, G. (1993). Adsorptive stripping voltammetric behaviour of sulphaquinoxaline using differential-pulse and square-wave techniques. *Analytica Chimica Acta*, 273 (1993) 369-375. Elsevier Science Publishers B V, Amsterdam.
- KAYA, S. (2000). Kemoterapötikler. İçinde: *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. Editörler: S. Kaya, İ. Pirinççi, A. Bilgili. 2. Baskı. 2. Cilt. A. Medisan Yayınevi. Ankara. s: 267-440.
- KAYA, S., PİRİNÇÇİ, İ. (2000). Protozoonları etkileyen ilaçlar. İçinde: *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. Editörler: S. Kaya, İ. Pirinççi, A. Bilgili. 2. Baskı. Cilt 2. Medisan Yayınevi. Ankara.s.:479-506.
- KAYA, S. (2002). Kemoterapötikler. Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji. Cilt 2, baskı 3. Medisan Yayınevi. 13: 488.
- KAYAALP, O. (1998). Sülfonamidler, ko-trimoksazol ve trimetoprim. Alınmıştır: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara Hacettepe T.A.Ş. 1. Cilt. 8. Baskı. s: 277- 286.
- LABAUNE, J.P. (1989). Handbook of pharmacokinetics, Ellis Horwood Limited, Chichester.
- LASHEV, L.D., MIHAILOV, R. (1994). Pharmacokinetics of sulphamethoxazole and trimethoprim administered intravenously and orally to japanese quails. *J vet pharmacol Ther.* 17(5): 327-330.
- LINDSAY, D. S., BLAGBURN, B. L. (1995). Antiprotozoan drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed: H. R. Adams. Iowa State University Press, Ames. p.: 950-968.
- LI, T., QIAO, G. L., HU, G.Z., MENG, F. D., QIU, Y. S., ZHANG, X. Y., GUO, W. X., YIE, H. L., LI, S. F., LI, S. Y. (1995). Comparative plasma and tissue pharmacokinetics drug residue profiles of different chemotherapeutants in flows and rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 18: 260-273.
- LUDERS, H., LAI, K. W., HINZ, K. H. (1974). Blut-und Gewebespiegel von Sulfametazin und Sulfaquinoxalin bei Broilern nach Verabreichung der Medikamente über das Trinkwasser. *Zbl. Vet. Med. B.* 21: 110-118.
- MANGER, B. R. (1991). Anticoccidials. In: *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. Eds: G. C. Brander, D. M. Pugh, R. J. Bywater, W. L. Jenkins. 5 th Ed. Baillere Tindall, London. p.: 549-552.
- MICROMEDEX, INC. (2000). Sulfonamides: Veterinary-systemic. United State Pharmacopea. Erişim: [www.usp.org/veterinary/monographs/Sulfonamides.pdt]. Erişim tarihi: 22.06.2002.

- MOFFAT, A.C. (1986). *Ciarke İsolation And Identfication of Drugs*. Second Edition. THA Pharmaceutical Press, London.
- MURRIETA, F. F. J., HERNANDEZ, C. G., MENENDEZ, J. C., CHAVEZ, F., HERRERA, J. E., HONG, E. (1990). Pharmacokinetics of sulphamethoxazole and trimethoprim in mexicans: Bioequivalence of two oral formulations (URO-TS and Bactrim F). *Biopharm Drug Dispos.* **11**(9): 765-772.
- NİZAMLIOĞLU, F. (1992). Sülfonamid-Trimetoprim kombinasyonu uygulanan broyler piliçlerin plazma, kırmızı kas ve karaciğer ilaç düzeyleri ve atılma sürelerinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- OR. E.. DODURKA, T., YILGIN, C., TAN, H. (1994). Biyoyararlanım ve veteriner hekimlik açısından önemi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* **20**(2-3): 5-11.
- ÖNER, L. (2003). Değiştirilebilir (interchangeable) ilaç ve biyoeşdeğerlik. Erişim: [http://www.recete.org/mised/mised_3/9.php]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- ÖZKAZANÇ, N., KAYA, S. (1983). Hayvanların pişmemiş yenilebilir dokularında sülfonamid analizi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **30**: 624-638.
- PENA, M. 5., ACEDO, M. J., SALINAS, F., MAHEDERO, M. C., ARON, J. J. (1995). Anaysis of sulfamethazine in the presence of sulfamerazine or sulfadiazine by firstderivative photochemically induced fluorescence. *J Pharm Biomed Anal.* **13**: 1107- 1112.
- POKRAJAC, M., MILJKOVIC, B., SIMIC, D., BRZAKOVIC, B., GALETIN, A. (1998). Comparative pharmacocinetics and bioavailability of two cotrimoxazole preparations. *Pharmazie.* **53**(7):470-472.
- POSYNIK, A., ZMUDSKI, J., NIEDZIELSKA, J., BIERNACKI, B. (2001). Bioequivalence study of two formulations of enrofloxacin following oral administration in chickens. *Buli Vet Inst Pulawy.* **45**: 353-358.
- QUERALT, J., CASTELLS, I. (1985). Pharmacokinetics of sulphamethoxazole and trimethoprim association in hens. *Poultry Science.* **64**: 2362-2367.
- REDDY, K.S., JAIN, S.K., UPPAL, R.P. (1998). Pharmacokinetic studies of sulphonamides in poultry. *Indian Journal of Animal Science.* **58**(4): 437-439.
- RESMİ GAZETE (1994). Farmasötik müstahzarların biyoyararlanım ve biyoeşdeğerliliğinin değerlendirilmesi hakkında yönetmelik. *Resmi Gazete*. Yayımlanma Tarihi: 27 Mayıs 1994. Sayı: 21942. Erişim: [<http://www.ikev.org/docs/tr/biyoyararlanim.pdf>]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- RESMİ GAZETE (2002). Veteriner ispençiyari ve tıbbi müstahzarlar ruhsat yönetmeliği. *Resmi Gazete*. Yayımlanma Tarihi: 23 Ekim 2002. Sayı: 24915. Erişim: [[http://www.kkgm.gov.tr/Mevzuat/3_2851_Vet_ismenciari_yonetmeliği .htm](http://www.kkgm.gov.tr/Mevzuat/3_2851_Vet_ismenciari_yonetmeliği.htm)]. Erişim Tarihi: 30.10.2005.
- RESMİ GAZETE (2005). Tarım Sigortası Kanunu. 21.06.2005 tarih ve 25852 sayılı.
- RIGHTER. H. F., WORTHINGTON, B. 5., ZIMMERMAN, H. E., MERCER, H. D. (1970). Tissue-residue depletion of sulphaquinoxaline in poultry. *Am J Vet Res.* **21**: 105 1-1054.
- SCHLENKER, F. S., SIMMONS, B. K.(1950). The absorption, distribution, and excretion of sulphaquinoxaline in poultry. *Am. J Vet. Res.* **11**: 291-295
- SHAFFER, J. M., BIETER, R. N. (1950). Conversion of acetylsulfonamides to the unconjugated form by the chicken kidney. *.I. Pharmacol. Expl. Ther.* **100**: 192-200.
- SHARGEL, L., YU, A.B.C., *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, Prentice-Hall International Editions, Third Edition (1993).
- SHUMAKER, R. C. (1986). PKCALC. A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metabol. Rev.* **17**: 331-428
- SPOO, J. W., JIM, J. E. (1995). Chemotherapy of microbial diseases. İn: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed: H.R. Adams. Iowa State University Press. Ames. p.: 753-773.
- STEINJANS, V.W., Sauter, R., Diletti E. (1995). 'Shape analysis in single- and multiple-dose studies of modifiedrelease products', in Bio-International 2: Bioavailability, Bioequivalence and pharmacokinetic studies (Blume, H.H., Midha K.K.) Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 193-206.
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (2000). Biyoistatistik, 9.Baskı. Hatiboğlu Yayınları: 53. Şahin Matbaası, Ankara.
- ŞAHİN, S. (2003). Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlilik çalışmalarında farmakokinetiğin önemi. Erişim: [http://www.recete.org/mised/mised_3/9.php]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.

- ŞAHİNDOKUYUCU, F. (2003). Sağlıklı ve koksidiyozlu etlik piliçlerde sülfakinoksalinin farmakokinetiği. *Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*.
- ŞANLI, Y., KAYA, S., ÖZKAZANÇ, N. (1987). Tavukçulukta kullanılan bazı sülfonamid türevlerinin yumurtaya geçme özellikleri üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **34**:16-30.
- ŞANLI, Y. (1999). Veteriner Klinik Farmakoloji. Özhan matbaacılık. Ankara.
- ŞENER, S. (1985). Monografiler. İçinden: Veteriner Klinik Farmakoloji ve Formüller. Bölüm 2. s.: 43-212.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP). (2007). Erişim Adresi: www.usp.org/pdf/EN/Veterinary/Sulfonamides.pdf. Erişim Tarihi: 25.03.2008.
- TOSUN, M. (2008). Antimikrobik ilaçlar. Erişim Adresi: pharm.ege.edu.tr/pp/metinertosun/antimikrobiyal_tedavi_temel_kavramlar.pdf. Erişim Tarihi: 25.02.2008.
- TOUNTAIN, P.L., KÖRİTZ, G.D.(1997). Veterinary drug bioequivalence determination. *J. Vet. Pharmacol. Therap*, **20**: 79-90.
- TRAŞ, B., YAZAR, E. (2002). Bioequivalence as quality, efficacy and safety test for drugs. Erişim: [<http://www.tvhb.org.tr/Dergi/ilackalite.htm>]. Erişim Tarihi: 06.05.2003.
- TRAŞ, B., YAZAR, E., ELMAS, M. (2005). Veteriner Hekimliğinde İlaç Kullanımına Pratik ve Akılcı Yaklaşım. Selçuk Üniversitesi Basımevi. Konya.
- WAGNER, J. G. (1975). Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. Illinois: The Hamilton Press, Inc, USA.
- WELLING, P.G., TSE, F.L.S., Digh, S.V. Pharmaceutical Bioequivalence. Marcel Dekker Inc. (1991).
- WHITE, G., WILLIAMS, R. S. (1983). Evaluation of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline for the treatment of bacterial and coccidial diseases of poultry. *Vet. Rec.* 24: 608-612.
- WHO. (1996). Technical Reprt Series, 863, WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva.
- WILLIAMS, R. B., FAREBROTHER, D. A., LATTEr, V. S. (1995). Coccidiosis: A radiological study of sulphaquinoxaline distribution in infection and uninfected chickens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18: 172-179.
- WILLIAMS, R.L., PATNAIK, R.N., Chen M.L. (2000). The basis for individual bioequivalence? *Euro-pean Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25, 13-17.
- YILDIRIM, M., ŞENER, S. (1999). Türkiye’de İlaç Eşdeğerliliği ve Etiket Dışı İlaç Kullanımı. Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlaması ve Güvenli Kullanımı Sempozyumu. Ankara.

EKLER