

İki Tilmikosin Preparatının Koyunlarda Biyodeşdeğerliği

Bioequivalence in the Sheep of Two Tilmicosin Preparations

Elif Şahin¹, Murat Yıldırım²

¹Department of Pharmacology, İstanbul Yeni Yüzyıl University School of Pharmacy, İstanbul, Turkey

²Department of Pharmacology and Toxicology, İstanbul University-Cerrahpaşa School of Veterinary, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Şahin E, Yıldırım M. Bioequivalence in the Sheep of Two Tilmicosin Preparations. Experimed 2019; 9(1): 28-31.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, tilmikosin fosfat içeren bir jenerik ürünün orijinal preparata biyodeşdeğerliğini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 20 adet Kıvrıkcık ırkı sağlıklı koyuna tek doz (10 mg/kg, s.c.) çapraz tasarım esasına göre orijinal ve jenerik ürün uygulandı. 0. dakika ve uygulama sonrasında 15., 30. dakika ile 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kan örnekleri toplandı. Serum tilmikosin düzeyleri, ekstraksiyon işlemini takiben yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC) ile ölçüldü. Farmakokinetik parametreler non-kompartmantal model analizi kullanılarak hesaplandı. Biyodeşdeğerlik değerlendirilmesinde EAA(0-72) ve Cmax parametreleri temel alındı. Biyodeşdeğerlik kriteri EAA %80-125 (%90 güven aralığı) olarak kabul edildi.

Bulgular: Orijinal ilaca kıyasla jenerik ilacın EAA(0-72) oranı %105,7; Cmax oranı ise %106,6 olarak saptandı.

Sonuç: Sonuç olarak, iki ürünün biyodeşdeğer olduğu ve endike oldukları alanlarda birbirlerinin yerine kullanabilecekleri söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Biyodeşdeğerlik, koyun, tilmikosin fosfat

GİRİŞ

Beşeri ilaçlardan farklı olarak, biyodeşdeğerliği kanıtlanmamış ruhsatlı veteriner tıbbi ürünlerin birbirleri yerine kullanımı sadece tedavideki etkinlikleri bakımından değil, kesim öncesi bekletme süreleri ve sütün tüketilmeme sürelerini de değiştirebileceği için gıda güvenliği/halk sağlığı açısından da dolaylı olarak önem taşımaktadır.

Tilmikosin sadece veteriner hekimlikte kullanım için geliştirilmiş, siğir ve koyunlarda yaygın olarak kullanılan makrolid grubu bir antibiyotiktir (8). Bir çok Gram-pozitif bakteri (*Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.), pönomoniyeye sebep olan Gram-negatif bakteriler (*Pasteu-*

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate the bioequivalence of a generic product containing tilmicosin phosphate in comparison to the original preparation.

Material and Method: The original and generic products were applied to 20 healthy Kıvrıkcık sheep at a single dose (10 mg/kg, s.c.) according to a cross-over design. Blood samples were taken before and at 15 and 30th minutes and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96th hours following injections. The serum concentrations of tilmicosin were measured by high pressure liquid chromatography (HPLC) following extraction process. Pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental model analysis. AUC (0-72) and Cmax were based basis for evaluation of bioequivalence. The bioequivalence criterion was AUC 80-125 % (90 % confidence interval).

Result: Compared to the original product, AUC (0-72) of the generic product was 105,7% and the Cmax was 106,6%.

Conclusion: It is concluded that the two products are bioequivalent and could be used interchangeably in conditions where they are indicated.

Keywords: Bioequivalence, sheep, tilmicosin phosphate

rella haemolytica, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus* spp., *Campylobacter* spp.) ile *Mycoplasma* spp.lere etkiyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (7, 10). Tilmikosinin antibakteriyel etkisinden bağımsız olarak antiinflatuvar özelliği de vardır. İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-8 (IL-8) ve Tümör Nekrosis Faktör- α (TNF- α)'yı içeren birçok proinflatuvar sitokinlerin üretimini inhibe eder (2), bakteri tarafından uyarılan prostaglandin (PGE2) ekspresyonunu ve alveolar makrofajlarda prostaglandin sentezini azaltır (9). Tilmikosin, siğir ve koyunlarda duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu solunum sistemi enfeksiyonlarında uzun süreli sağaltıcı ve koruyucu etkiye sahip olduğu için tercih edilen bir antibiyotiktir (6, 7). Siğir ve koyun için tavsiye edilen doz deri altı yolla 10 mg/

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Elif Şahin **E-mail:** elif.sahin@yeniuyuzyil.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 18.02.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 12.03.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

kg canlı ağırlıktır (6, 8). Tek doz şeklinde uygulanan bu doz ile sağlanan akciğer konsantrasyonu 72 saat süresince *Pasteurella haemolytica* için MİK değerinin üzerinde seyretmektedir (7).

Çalışmanın amacı belirtilen avantajlarından dolayı koyun ve sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında sıklıkla tercih edilen tilmikosin fosfat içeren orijinal ürün ile ülkemizde en çok kullanılan jenerik bir preparatın koyunlarda biyoeşdeğerlik yönünden değerlendirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar, Bakım ve Beslenmesi: Çalışmada İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden temin edilen Kıvrıkcık ırkı, 1-4 yaş aralığında, 39-79 kg arası canlı ağırlığa sahip 10 adet koyun ve 10 adet koç kullanıldı. Hayvanların genel sağlık muayenesi yapıldıktan sonra, 2 haftalık adaptasyon süresi için aynı bakım ve beslenme şartları altında kalmaları sağlandı. Bütün koyunlara 500 g/gün miktarda toklu besi yemi, ad libitum düzeyde kuru ot ve su verildi.

İlaçlar: Çalışmada tilmikosin baza eşdeğer tilmikosin fosfat (300 mg/mL) içeren orijinal ürün ve jenerik bir preparat kullanıldı. Ürünler piyasadan satın alınarak temin edildi. Hekimlerden alınan bilgiler doğrultusunda sahada en çok tercih edilen ürün jenerik preparat olarak seçildi. İlaçların etken madde miktarına ait kalite kontrol amacı ile ölçümler yapıldı.

Hayvanların Gruplandırılması ve İlaç Uygulaması: Koyunlar rastgele seçilerek her grupta 5 dişi – 5 erkek olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Çalışmada iki- periyotlu, iki- ardışıklı çapraz geçişli tasarım kullanıldı (4). Klinik uygulama kısmı iki dönemde gerçekleştirildi. İlk dönemde A grubuna orijinal ilaç, B grubuna jenerik ilaç uygulandı. 2. Döneme geçmeden önce ilaçların vücuttan tamamen arınması için 14 gün beklendi. 2. Dönemde A grubuna jenerik ilaç, B grubuna ise orijinal ilaç uygulandı. İlaçlar, propektüslerinde belirtilen dozda (10 mg/kg) koyunlara, ön ayakların arkası ve kaburgaların üst kısmından deri altı yolla ve tek doz olarak uygulandı. Hayvanlara yapılan tüm uygulamalar, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun kararı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Kan Örneklerinin Alınması: Kan örnekleri 8 mL'lik jelli serum tüplerine, ilaç uygulamasından önce v. jugularis'den uygulama öncesi (0. zaman) ve uygulamadan sonra 15. ve 30. dakikalarda ve 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12., 24., 48., 72., 96.saatlerde alındı. 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra (11, 14, 16) ayrılan serum Eppendorf tüplerine alınarak analize kadar derin dondurucuda -20 0C'de saklandı (11, 16).

Ekstraksiyon Yöntemi ve Analitik Çalışmalar: Serum örneklerinden etken madde ekstraksiyonu için; Modric ve ark (11), Moran ve ark. (12) ve Avcı (1) tarafından yayınlanan metodlar modifiye ve valide edilerek uygulandı. C18 katı faz ekstraksiyon kartuşlarından vakum altında ekstraksiyon için %5'lik amonyum hidroksit/metanol kullanıldı. Azot gazı altında uçurulan numune 1 mL mobil fazda çözündürüldükten sonra HPLC sistemine (C18 kolon) 20 µg hacminde enjekte edildi.

Farmakokinetik ve İstatistik hesaplamalar: Tilmikosin serum konsantrasyon – zaman eğrileri WinNonLin (WinNonLin® Professional Version 4.1, Pharsight Corporation, Scientific Consulting Inc. North Carolina, USA) programı yardımı ile hazırlandı. EMEA'nın 16 Temmuz 2010 tarihli Veteriner Medikal Ürünler için Biyoeşdeğerlik Çalışmalarının Yürütülmesi Rehberi'ne göre farmakokinetik parametrelerin (Eğri Altı Alan – EAA; Maksimum serum konsantrasyonu - C_{max} ; Maksimum serum konsantrasyonuna ulaşma zamanı - t_{max}) hesaplanmasında non-kompartmantal model analizi kullanıldı (4). Her iki ilaç için bireysel değerlerden ortalama ± standart sapma olarak hesaplanan farmakokinetik parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar SSPS 10.0 istatistik paket programı kullanılarak Paired Samples t testi ile değerlendirildi. Tüm analizlerde güven aralığı %90 olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamda anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak belirlendi (4).

BULGULAR

İlaçların etken madde miktarına ait kalite kontrol amacı ile yapılan ölçümlerde etken madde miktarı orijinal üründe 294 mg/mL, jenerik preparatta ise 306 mg/mL olarak saptandı. HPLC analizi sonuçlarına göre 0. saatte ve 96.saatte tilmikosin saptanmadı. Serum tilmikosin düzeylerinden hareketle non-kompartmantal modele göre hesaplanan farmakokinetik parametrelere ait değerler (ortalama±SD şeklinde) Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tilmikosin içeren orijinal ürün ve jenerik ilacın deri altı yolla uygulanmasını takiben elde edilen ortalama EAA değerleri sırasıyla $30,95 \pm 1,82$ ve $34,17 \pm 1,41$ saat $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. İlacın serumda maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı (t_{max}) ortalamaları orijinal ürün ve jenerik preparat için sırasıyla 4,5 ve 3,4 saat olarak bulundu. C_{max} değeri ortalamaları ise orijinal ürün için $1,29 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$; jenerik ilaç için ise $1,36 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Tablo 1. Deri altı yolla uygulanan ve tilmikosin fosfat içeren orijinal ve jenerik preparatlara ait farmakokinetik parametreler

Parametre	Orijinal ilaç (Ortalama standart hata)	Jenerik ilaç (Ortalama± standart hata)	p
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1,29 ± 0,07	1,36 ± 0,07	0,41NS
t_{max} (saat)	4,5	3,4	0,12 NS
EAA_{0-72} (saat $\mu\text{g/mL}$)	29,01 ± 1,77	29,98 ± 1,26	0,73 NS
$EAA_{0-\infty}$ (saat $\mu\text{g/mL}$)	30,95 ± 1,82	34,17 ± 1,41	0,28 NS

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS: anlamlı değil; $p > 0,05$

C_{max} : Maksimum serum konsantrasyonu; t_{max} : Maksimum serum konsantrasyonuna ulaşma zamanı; EAA_{0-72} : 0 ile 72. saat arası eğri altında kalan alan; $EAA_{0-\infty}$: 0'dan sonsuza eğri altında kalan alan

Tablo 2: Jenerik ilacın Orijinal ilaca göre biyoeşdeğerliği

Parametre	Ortalama	Üst Sınır	Alt Sınır
EAA (saatµg/mL)	105,66	121,02	92,25
C _{max} (µg/mL)	106,55	120,05	94,57
C _{max} : Maksimum serum konsantrasyonu; EAA: Eğri altında kalan alan			

Jenerik ürüne ait EAA'nın orijinal ürüne kıyasla %80-125 sınırları içinde bulunduğu (%90 GA) belirlendi. Biyoeşdeğerlik için değerlendirilen jenerik ve orijinal ilaca ait farmakokinetik değerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

EMA'nın 2010 yılında çıkardığı veteriner tıbbi ürünlerin biyoeşdeğerlik çalışma rehberine göre jenerik ilaç ile orijinal ilaç içindeki etken madde miktarları arasındaki fark \pm %5'ten fazla olmamalıdır (4). Orijinal/Jenerik tilmikosin ürünleri arasındaki fark bu kritere uymaktadır.

Tilmikosinin farmakokinetiği çalışmamızda uygulanan doz ve verilmiş yolu ile melez koyun ırklarında (11, 13, 15) ve Xiaowei-han ırkı koyunlarda (18) araştırılmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen EAA değerleri sırasıyla 19 saat µg/mL (11), 33 saat µg/mL (13), 25,82 saat µg/mL (15) ve 18,46 saat µg/mL (18)'dir. Bizim çalışmamızda bulunan EAA değerleri ile, kendi aralarında da uyumsuzluk gözlenen bu çalışmalarda elde edilen EAA değerlerinin farklılığının ırk ve yaşa bağlı fizyolojik özelliklerden olduğu kadar farmakokinetik hesaplamalarda kullanılan yöntemden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Modric ve ark. (11) tarafından t_{max} değeri ortalama 3,9 saat olarak bulunmuştur. Elde edilen t_{max} değeri çalışmamızda elde edilen veriler ile uyumluluk göstermektedir.

C_{max} değeri ise Modric ve ark. (11) tarafından 0,822 µg/mL, Naccari ve ark. (13) tarafından 1,32 µg/mL ve Rui ve ark. (15) tarafından da 1,42 µg/mL olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda saptanan C_{max} değeri de bu çalışmalarda bildirilen verilerle uyumluluk göstermektedir. Biyoeşdeğerlik değerlendirilmelerinde genel bir kural olarak EAA ve C_{max} değerlerinin %90 güven aralığında ve %80-125 sınırlarında olması gerekmektedir (3-5, 17). Bu çalışmada biyoeşdeğerlik kararı verilirken EAA₀₋₇₂ ve C_{max} değerleri temel alınmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, orijinal ürünle kıyaslandığında jenerik preparatın EAA değerinin alt sınırının %92,25, üst sınırının %121,02 ve ortalamasının %105,6 olduğu; C_{max} değerinin ise alt sınırının %94,57, üst sınırının %120,05 ve ortalamasının %106,55 olduğu görülmüştür. Bu değerler kabul edilebilir sınırlar içerisinde bulunmuştur. Sonuç olarak EAA₀₋₇₂ ve C_{max} değerleri temel alınarak yapılan karşılaştırma, jenerik preparatın biyoeşdeğer olduğunu göstermektedir.

Hasta Onamı: Uygulanabilir değil.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.Ş., M.Y.; Tasarım - E.Ş., M.Y.; Denetleme - E.Ş., M.Y.; Kaynaklar - E.Ş., M.Y.; Gereçler - E.Ş., M.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - E.Ş., M.Y.; Analiz ve/veya Yorum - E.Ş., M.Y.; Literatür Taraması - E.Ş., M.Y.; Yazan - E.Ş., M.Y.; Eleştirel İnceleme - E.Ş., M.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 3583).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Istanbul University.

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.Ş., M.Y.; Supervision - E.Ş., M.Y.; Resource - E.Ş., M.Y.; Materials - E.Ş., M.Y.; Data Collection and/or Processing - E.Ş., M.Y.; Analysis and/or Interpretation - E.Ş., M.Y.; Literature Search - E.Ş., M.Y.; Writing - E.Ş., M.Y.; Critical Reviews - E.Ş., M.Y.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 3583).

KAYNAKLAR

1. Avci T (2010): Sığırlarda Parenteral yolla uygulanan bazı makrolid grubu antibiyotiklerin sütteki seviyelerinin Belirlenmesi. (Doktora Tezi) s.29.
2. Cao X-Y, Dongb M, Shen J-Z et al. Tilmicosin and tylosin have anti-inflammatory properties via modulation of COX-2 and iNOS gene expression and production of cytokines in LPS-induced macrophages and monocytes. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 431-8. [CrossRef]
3. SEMEA (2001): Note for Guidance on the investigation of bioavailability and Bioequivalence. Londra Committee for proprietary medicinal product (CPMP).
4. EMEA (2010). Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. Draft. Londra. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use.
5. FAO (2006): Guidance for Industry Bioequivalence Guidance. U.S.A. Center for veterinary Medicine (CVM).
6. FDA (2005): Micotil 300. Freedom of information summary Supplemental New Animal Drug Application NADA 140-929.
7. Giguère S. (2006). Macrolides, Azalides, and Ketolides. 191-206. In: Prescott JF (Ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing, US.
8. Kaya S. (2002). Makrolidler. 335-343. In: Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Ed), *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji*. Ankara Medisan Yayınevi, Ankara.
9. Lakritz J, Tyler JW, Marsh A, et al. Tilmicosin reduces lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophage prostaglandin E(2) production via a mechanism involving phospholipases. *Vet Ther* 2002; 3: 7-21.

10. McNeil FD. Tilmicosin. Food & Drug Administration www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e0e.html (10.04.2008).
11. Modric, S, Webb AI, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *J Vet Pharmacol Therap* 1998; 21: 444-52. [\[CrossRef\]](#)
12. Moran JW, Turner JM, Coleman MR. Determination of tilmicosin in Bovine and Porcine Sera by Liquid Chromatography. *J AOAC Int* 1997; 80: 1183-9.
13. Naccari F, Giofre F, Pellegrino M, et al. Effectiveness and kinetic behavior of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *Vet Rec* 2001; 148; 773-6. [\[CrossRef\]](#)
14. Ramadan A. Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Res Vet Sci* 1997; 62; 48-50. [\[CrossRef\]](#)
15. Rui P, Shen J, Li J, et al. The Pharmacokinetics of Tilmicosin administrated Intravenously and Subcutaneously in Healthy Sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 2005; 36; 296-300.
16. Shen J, Li C, Jiang H, et al. Pharmacokinetics of tilmicosin after oral administration in swine. *AJVR* 2005; 66; 1071-4. [\[CrossRef\]](#)
17. Tountain PL, Koritz GD. Veterinary drug bioequivalence determination. *J. Vet Pharmacol Therap* 1997; 20: 79-90. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhang J, Li J, Miao X, et al. Pharmacokinetics of Tilmicosin in Sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 2004; 35; 560-4.