



Veteriner tıbbi ürünlerde safsızlıklar

Mustafa Kesmen¹ , Tülay Bakirel² 

¹ İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü İlaç Kalite Kontrol Laboratuvarı, Pendik, İstanbul-Türkiye

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Büyükçekmece, İstanbul-Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 22.06.2020, Kabul tarihi / Accepted: 26.10.2020

Özet: Tıbbi ürünlerin içermiş oldukları arzu edilmeyen bileşenlerin belirlenmesi, farmasötik kalitenin teminatı açısından bir ön koşuldur. Tıbbi ürünlerde etkin madde ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olan safsızlıkların kontrolü ise bu güvencenin en kritik ve kompleks parametrelerinden birisidir. Farklı başlangıç materyalleri kullanılarak farklı formülasyonlarla geliştirilen ürünlerde bu parametrenin çeşitliliği, kontrolünün zorluğunu ve beraberinde getirdiği riskleri daha da artmaktadır. Veteriner tıbbi ürünlerin kapsamı tür çeşitliliği, hedef hayvan güvenliği, tüketici güvenliği, gıda güvenliği, kullanıcı güvenliği, çevresel güvenilirlik ve antimikrobiyel direnç yönleriyle beşeri tıbbi ürünlere göre daha geniştir. İlaç ürününün her hangi bir dozaj biriminin aynı miktarda aktif bileşen vermesi ve mümkün olduğunca safsızlık içermemesi amacıyla kalite kontrol uygulamaları kapsamında gerçekleştirilen safsızlık kontrolleri ve bu konudaki mevzuatlar oldukça karmaşıktır. İlaç üreticisinden tüketicisine kadar geniş bir kitleyi ilgilendiren safsızlık konusunun ele alındığı bu derlemede; safsızlıkların kontrolü ve önlenmesine yönelik rasyonel öneriler sunulmaya çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Degradasyon, farmasötik kalite, mutajenite, safsızlık, veteriner tıbbi ürün.

Impurities in veterinary medicinal products

Abstract: Identification of undesirable components contained in Medicinal Products is a prerequisite for the assurance of pharmaceutical quality. Control of impurities, which are any components other than active substances and excipients in medicinal products, is one of the most critical and complex parameters of this assurance. The variety of this parameter in products developed with different formulations using different starting materials, the difficulty of its control, and the accompanying risks increase even more. The scope of veterinary medicinal products is wider than human medicinal products in terms of species differences, target animal safety, public health, food safety, user safety, environmental safety, and antimicrobial resistance. Impurity controls and regulations on this matter are very complex to ensure that any dosage unit of the drug product gives the same amount of active ingredient and does not contain impurities as much as possible. In this review, the issue of impurity, which concerns a wide audience from the pharmaceutical manufacturer to the consumer, is discussed; It has been tried to present rational suggestions to prevent and control of these impurities.

Keywords: Degradation, impurity, mutagenicity, pharmaceutical quality, veterinary medicinal products.

Giriş

Veteriner ilaç endüstrisi; Veteriner Hekimlikte tedavi edici, koruyucu, besleyici ve tanı amaçlı kullanılmak üzere, ilaç etkin ve yardımcı maddelerinden farmasötik teknolojiye uygun olarak tıbbi ürünler üreten ve sağlık hizmetlerine sunan bir sanayidir. Sağlık ve tedaviye yönelik hizmetleri ile stratejik bir rol üstlenen bu endüstride, Veteriner tıbbi ürünün piyasaya arzı öncesinde etkinlik, güvenilirlik ve farmasötik kalitenin güvence altına alınması bir zorunluluktur (DPT 2007; Anonim, 2011; Anonim, 2012a). Ürün kalitesinin yaşamsal öneme sahip olduğu ve sürekli olarak istenilen kalitede ürün üretebilme becerisinin vazgeçilmez olduğu bu endüstride, tıbbi ürünlerin hedeflenen kalitede üretiminin güvence altına alınması ise resmi otoriteler tarafından yayımlanan dü-

zenlemeler ve gerçekleştirilen denetimler ile sağlanabilmektedir (Mike ve ark. 2014).

Hedef canlı türü ve halk sağlığı açısından önem arz eden tıbbi ürünlerin standardizasyonuna ilişkin kritik düzenlemelerin tarihçesine kısaca bakıldığında; Avrupada'ki ilk farmakopenin İspanya'da (1581) yayımlanmasından 1938 yılına kadar piyasaya giriş öncesi ilaçlar için herhangi bir güvenilirlik testinin yapılmadığı belirlenmiştir. İlk düzenleme, sülfanilamid eliksir isimli üründe çözücü olarak kullanılan dietilen glikol'un ölümlere neden olduğunun saptanması ile gündeme gelmiş ve 1938 yılında tıbbi ürünlere piyasaya sürülme öncesi bildirim zorunluluğu getirilmiştir (Rägo ve Santoso 2008). Çeşitli ülkelerde 1958-1960 yılları arasında piyasaya sürülen talidomidin 10.000 bebeğin fokomeli ve diğer deformitelerinin

den sorumlu olduğunun hükmü ile ilaç güvenilirlik çalışmalarında milat niteliğinde olan düzenlemeler yeniden şekillendirilmeye başlanmıştır. 1962 yılında Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (U.S.Food and Drug Administration [FDA]) yeni ilaçların etkinlik ve güvenilirliğini kanıtlanmasını gerekliliğine yönelik yasayı onaylamıştır. Benzer şekilde Avrupa Birliği'nde (AB) ilaçlara yönelik ilk düzenleme 1965 yılında 65/65/EEC sayılı direktif ile hayata geçirilmiş, bu direktif ile kamu sağlığının yüksek düzeyde korunmasının sağlanması ve sürdürülmesi amaçlanmıştır. Özellikle 1968 yılında talidomidin (R)-enantiyomerinin sedatif, (S)-enantiyomerinin ise teratojenik etkili olduğunun ispatlanması ile birçok ilaç etkin maddesinin kiral olduğu ve biyolojik etkilerinin farklılık gösterebileceği gerçeğine dayanarak 1993 yılında kiral etkin maddelerin araştırılmasına ilişkin kılavuz yayımlanmıştır. Bu kılavuz ile stereokimyasal olarak tanımlanmış aktif maddelerin incelenmesinin yolu açılmış ve yeni aktif maddelere stereojenik merkezler ile kiralite açısından kontrol zorunluluğu getirilmiştir (EMA 1993). AB Komisyonu 2001 yılında ilaçlara ilişkin yasal düzenlemelerin kapsamını genişleterek hayvan sağlığının daha iyi korunmasını sağlamaya yönelik veteriner ilaçları için de bir direktif yayımlamıştır. Günümüze değin AB'de beşeri ve veteriner ilaçların güvenirliliği ile kalitede standardizasyonunu sağlamaya yönelik bir çok düzenleme yapılarak uygulamaya geçirilmiştir. (DPT 2005; Rågo ve Santoso 2008; Smith, 2009; ACS 2014; Vargesson 2015).

Teknolojik ilerlemelere paralel bir şekilde her geçen gün artan sayıda yeni ilaç etkin maddelerinin ve tedavi alternatiflerinin çeşitlenip gelişimi, bazı uluslararası referans kuruluşlarca oluşturulan, tıbbi ürünlerde güvenilirlik konusunda bilimsel temele dayalı standartların güncellenmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu doğrultuda FDA, EMA gibi referans organizasyonların yanı sıra günümüzde Avrupa Birliği, Japonya ve ABD'nin ortaklığıyla kurulmuş olan Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use-ICH) ve Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products-VICH) tıbbi ürünlerde uluslararası standardizasyonu geliştirmek için işbirliğine devam etmektedirler (ICH 1990; VICH 1993). Belirli dönemlerde yayımlanan kılavuzlarda farmasötik ürünlere ait güvenilirlik uygulamalarının nasıl yürütüleceği; etkin maddenin sentezinden başlayıp en son ulaştığı

perakende satış yerleri, hatta gıdalarda ilaç kalıntısı olarak tüketiciye ulaşana kadar geçen süreci kapsayacak şekilde sunulmakta ve zaman zaman revize edilmektedir (Anonim 2012a; Erkeoğlu ve ark. 2014).

Ülkemizde veteriner tıbbi ürünlerin üretimi, ithalatı, ihracatı, kullanımı, reçeteli ya da reçetesiz satışı, izin, kontrol ve teminine ilişkin uygulamaların belirlenmesine yönelik otorite Tarım ve Orman Bakanlığı'dır. Ülkemizde henüz yeni geliştirilen molekül bulunmaması nedeniyle veteriner tıbbi ürünlere ait izin sürecinde, etkisi iyi bilinen ve güvenilirlik seviyesi kabul edilebilir ürünler için güvenilirlik ve etkinliğine dair detaylı bir bibliyografya ile farmasötik kalite çalışmalarının yanı sıra idari bilgi ve belgelerin sunulması yeterli görmektedir. Ancak Tarım ve Orman Bakanlığı'nca yayımlanan kılavuzlarda ruhsatlandırmaya ilişkin net hükümlerin bulunmaması durumunda; Avrupa Birliği, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Farmasötik Denetim Sözleşmesi (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme [PIC/S]), VICH ve ICH gibi kurum ve kuruluşların kılavuzları dikkate alınmaktadır (Anonim 2011a; Anonim 2012a).

Ürünlerin kalitesinin, dolayısıyla etkinliği ve güvenirliliğinin güvence altına alınmasının esas olduğu ulusal ve uluslararası düzenlemelere göre pazarlama izin sürecinde, İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practices-GMP) ilkeleri doğrultusunda formülün gelişimi, proses validasyonu, proses içi kontroller, başlangıç maddelerinin kontrolü ve stabilize çalışmaları yürütülmektedir (Anonim 2011a; Anonim 2012b; Anonim 2015). Mevcut çalışmalar sonucunda ise başlangıç materyali/ürünün kalitatif ve/veya kantitatif özellikleri ile uyması gereken test prosedürleri ve kabul limitlerini içeren spesifikasyonlar belirlenmektedir. Bu spesifikasyonlar, etkin madde, farmasötik form, uygulama yolu gibi kriterler esas alınarak, farmakope monografileri ve ilişkili kılavuzlara göre ürüne özgü fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalite özellikleri doğrultusunda oluşturulmaktadır. (EMA 1991; VICH 2005). Spesifikasyonlar organik, inorganik ve çözücü kalıntısı safsızlıklara ilişkin kontrolleri de kapsar (Anonim 2012a). Spesifikasyonlardaki tanıma, miktar tayini ve safsızlık kontrolleri her ürün için evrenseldir. Ürünün saflık kontrolleri; hedef hayvan türünde etkinliğin güvence altına alınmasını, safsızlıkların kontrolü ise ürünün hedef hayvan ve tüketici yönünden güvenirliliğinin garanti altına alınmasını hedeflemektedir (EMA 1991). Pazarlama izin başvurularında fiziko-kimyasal metotlar ürünün kalitesine ilişkin yeterli bilgi sağlayamıyorsa, in vivo ya da in vitro tayin metotları sunulur. Avrupa Farmakopesi ya da AB üyesi ülke farmakopesi monografinin

da yer alan spesifikasyonun, maddenin kalitesini garanti etmeye yetmemesi durumunda, spesifik safsızlıklara ait limitler de dahil olmak üzere daha uygun spesifikasyonlar istenebilmektedir (Anonim 2012a).

Tıbbi ürünlerde etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olarak tanımlanan safsızlıklar, hiçbir yarar sağlamadan sadece risk oluşturan kimyasallar niteliğindedir. Küçük miktarlarda dahi farmasötik ürünün etkinliği ve güvenilirliğini etkileyebilen bu bileşenler; sentez yöntemi, yetersiz saflaştırma, başlangıç maddelerinin kalitesi, formülasyon, bozunma ve bileşenler arası ortak etkileşim gibi birçok kaynaktan oluşabilmektedir. Çeşitlerine, artan sayı ve konsantrasyonlarına bağlı olarak tıbbi ürünün risk potansiyelini artıran safsızlıkların, ürünün piyasaya sürülmeden önceki süreçte nicelik ve niteliklerinin belirlenmesi bir zorunluluktur (VICH 2007a, 2007b; Jacobson-Kram ve McGovern 2007, Erkeoğlu ve ark. 2014). Buna ek olarak mevcut/bilinen aktif maddeleri içeren tıbbi ürünlerin kalitesinin değerlendirilmesi hakkında EMA tarafından yayımlanan bildirimde; orijinal ve jenerik ürünlerdeki safsızlıklar ve kullanılan yardımcı maddelerdeki farklılıkların, güvenilirlik ve etkinlik yönünden önemli farklılıkları başlatmaması gerektiği bildirilmekte olup, güvenilirlik yönünden önemli derecede fark olması durumunda biyoeşdeğerlikten bahsedilemeyeceği bilgisine yer verilmektedir. Dolayısı ile pazar hacminin önemli bir bölümünü oluşturan jenerik ürünlerin pazarlama öncesi süreçte safsızlık profillerinin, kalite, etkinlik ve güvenilirliğin bir göstergesi olarak tanımlanması önem arz etmektedir (EMA 2008).

Veteriner tıbbi ürünlerin kalite hedeflerine ulaşma sürecinde kritik kalite kontrol standartlarına uygun spesifikasyonlar kapsamında safsızlığa ilişkin kontroller yer almakta ve belirlenen safsızlık profillerinin, ürünün piyasaya sürülmesi sonrası süreçte de izlenmesi gerekmektedir (VICH 2005; Anonim 2012a). Bu doğrultuda VICH tarafından 2007 yılında yayımlanmış olan (VICH GL10 ve VICH GL11) veteriner ilaç madde ve tıbbi ürünlerine yönelik safsızlık rehberlerinde safsızlıklara yönelik karar mekanizmasında izlenecek yollar hakkında bilgiler sunulmaktadır. Veteriner tıbbi ürünlerde, çözücü kalıntısı safsızlıklarına dair kılavuz ise 2012 yılında uygulamaya girmiştir (VICH 2011). Ayrıca, 2017 yılında yayımlanan element safsızlıkları kılavuzlarıyla birlikte (EMA 2017), Veteriner tıbbi ürünlerde DNA reaktif (mutajenik) safsızlıkların kontrolü ve değerlendirmesine yönelik kılavuz, EMA tarafından 2018 yılında yayımlanmış olup adaptasyon süreci başlatılmıştır. Hedef hayvan türünün güvenliği perspektifiyle hazırlanan DNA reaktif safsızlıklar kılavuzu ile

hayat boyu 100.000'de 1 kanser riski temel alınarak mutajenik safsızlıkların kontrolü için sınırlamalar getirilmiştir (EMA 2018b).

Veteriner tıbbi ürünler; hayvan sağlığı ve refahı üzerinde direk, gıda güvenliği ve çevre üzerindeki dolaylı etkileri nedeniyle tek sağlık kavramının vazgeçilmez unsurlarıdır (Bakirel 2020). Dolayısıyla bu ürünlerin etkinlik ve güvenilirliğine ilişkin laboratuvar ve klinik çalışmaların belgelenmelerinin yanı sıra, üretimlerinden tüketime sunulacağı sürece kadar farmasötik kalitesinin güvence altına alınması önemli bir husustur. Bu kapsamda ilgili derlemede; Veteriner tıbbi ürünlerdeki organik ve DNA reaktif safsızlıklar, çeşitli boyutları ile ele alınmaya ve safsızlıkların kontrolüne yönelik rasyonel öneriler sunulmaya çalışılmıştır.

Safsızlıklar

Veteriner Tıbbi Ürünlerde Safsızlıklar

İlaç maddelerinde etkin maddeler, ilaç ürünlerinde ise etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olarak tanımlanan safsızlıklar, ilaçların güvenilirliği konusunda problem yaratan istenmeyen kimyasallar niteliğindedir (Erkeoğlu ve ark. 2014). ICH ve VICH'e göre ilaç maddelerinin safsızlıkları; üretim prosesiyle ilişkili olanlar, degradasyonla ilişkili olanlar, kalıntı solventleri ve ağır metaller olarak sınıflandırılmaktadır (Liu ve Chen 2019). Benzer şekilde, VICH GL10 ve GL11 kılavuzlarında veteriner ilaç safsızlıkları; organik, inorganik ve kalıntı solventleri şeklinde kategorize edilmektedir. İlaç maddelerinin üretim proses ve/veya depolanma süreçlerinde açığa çıkabilen organik safsızlar; tanımlanabilir veya tanımlanamaz, uçucu veya uçucu olmayan nitelikte olabilirler. Üretim prosesinden kaynaklanan inorganik safsızlıklar kapsamında ise reaktifler, ligandlar, katalizörler, ağır metaller, diğer artık metaller, inorganik tuzlar ve diğer malzemeler (filtre yardımcıları gibi) bulunabilir. Çözücüler, ilaç maddesinin sentezinde çözücülerin veya süspansiyonların hazırlanması için bir araç olarak kullanılan inorganik veya organik sıvılardır. İlaç maddelerinin üretim prosesinde kullanılan çözücü kalıntılarının kontrolü VICH GL18 kılavuzuna göre gerçekleştirilir (VICH 2007a, 2007b, 2011).

Uluslararası düzenleyici kuruluşlar veteriner tıbbi ürünlerde olası safsızlıkların kontrolüne ilişkin çeşitli kılavuzlar yayımlamıştır. Bu doğrultuda; VICH GL11 kılavuzunda veteriner tıbbi ürün safsızlıkları; etkin maddeden kaynaklanan safsızlıklar, yardımcı maddelerden kaynaklı safsızlıklar, ekstrakte edilebilir-sızabilir safsızlıklar ile degradasyon ürünleri-

ni kapsayacak şekilde değerlendirilmektedir (VICH 2007a, 2007b). İlave olarak EMA tarafından 2018 yılında yayımlanan "Veteriner Tıbbi Ürünlerde DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Kontrolü ve Değerlendirilmesine Yönelik Kılavuz" ile safsızlıkların kontrolüne ilişkin mekanizmanın kapsamı genişletilmiştir. Bu kılavuzda daha düşük dozlarda daha yüksek toksisiteye sahip, DNA hasarı oluşturma potansiyeli olan DNA reaktif safsızlıkların; başlangıç materyali kaynaklı, etkin madde-yardımcı madde-kap/kapak sistemi etkileşimi kaynaklı oluşabileceği gibi degradasyon ürünü olarak da meydana gelebileceği belirtilmektedir (EMA 2018b). Benzer şekilde tıbbi ürünlerde kristalizasyonla ilişkili (polimorfik formlar) ve stereokimya ilişkili safsızlıklar (stereoizomer, diastereoizomer, epimer, cis/trans safsızlıkları) ile yabancı kontaminantların da son üründe bulunabileceği bildirilmektedir (VICH 2007a, 2007b; Tian ve ark 2015; EMA 1993, 2018b).

Yukarıda yer alan bilgilerden de anlaşılacağı üzere farklı yıllarda yayımlanan kılavuzlarda safsızlıklar konusu çeşitli boyutlarıyla ele alınmış olup tüm kılavuzlar için tek tip bir sınıflandırmanın yapılması olanaksızdır. Bu yaklaşımla veteriner tıbbi ürünlere ilişkin safsızlıklar; ürün kalitesini, dolayısıyla etkinliği ve güvenilirliğini güvence altına alan ve her ürüne ait spesifikasyonda yer alan organik safsızlıklar ile birlikte, 2020 yılında uygulamaya giren DNA reaktif safsızlıklar olarak ele alınmış, tıbbi ürünlerde potansiyel safsızlıklar Şekil 1'de özetlenmiştir.

1. Organik Safsızlıklar

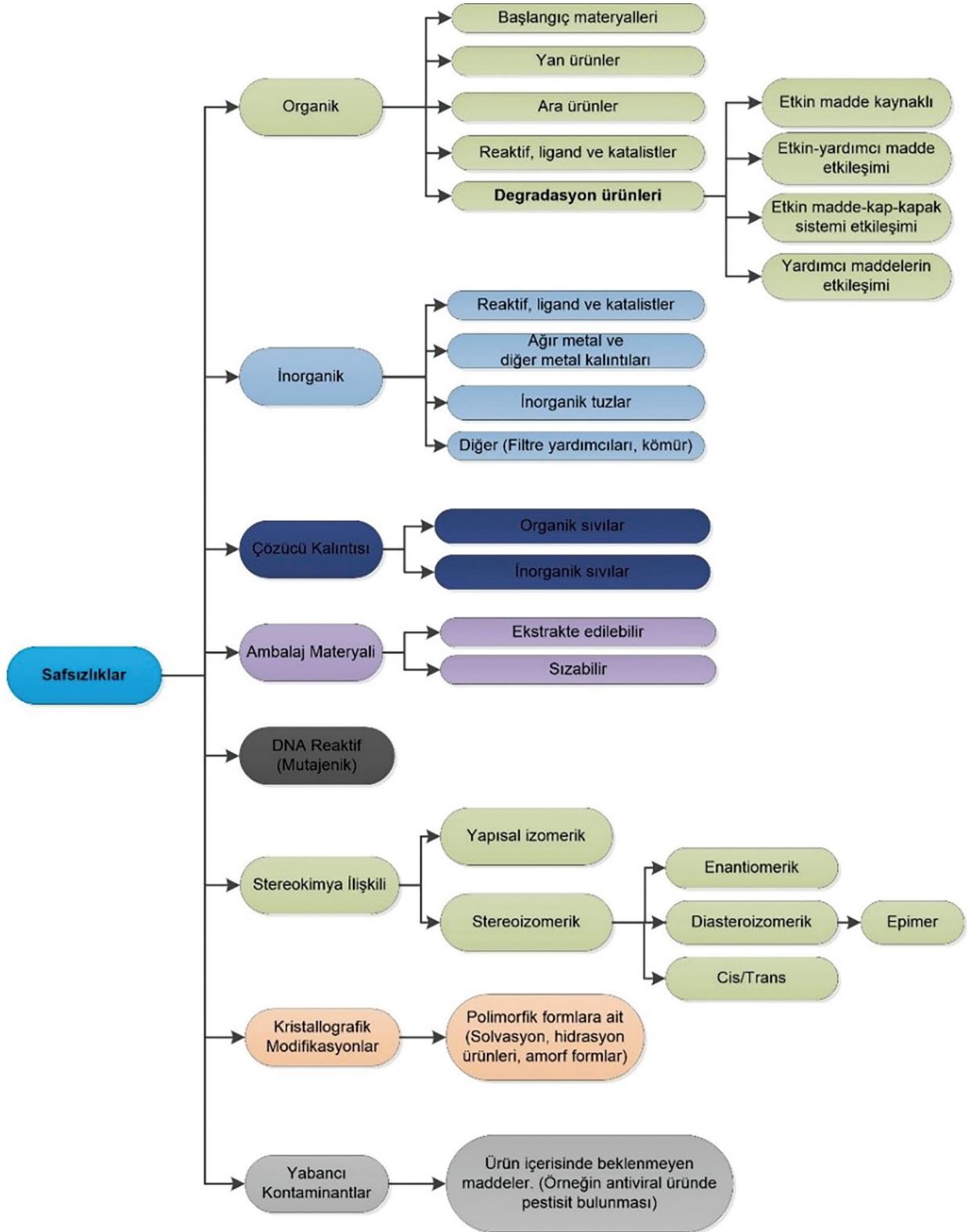
Organik safsızlıklar, ilaç maddesinin üretimi veya depolanması sırasında ortaya çıkabilirler. Dolayısıyla kimyasal sentez ve devamında degradasyonun sonucu olarak safsızlıklar tüm başlangıç materyali ve ilişkili tıbbi ürünlerde bulunabilir. Organik safsızlıkların kapsamında; ilaç maddesinin sentezinde kullanılan başlangıç materyalleri, ilaç maddesinin sentezi için gerekli olan ara ürün, beklenmeyen yan ürün ve degradasyon (bozunma) ürünleri ile reaktifler, ligandlar ve katalizörler yer alabilir (VICH 2007a).

Degradasyon ürünleri; ambalaj materyali veya yardımcı maddeler ile reaksiyon, pH, su, ışık, sıcaklık gibi değişimlerin etkisi aracılığıyla etkin maddelerin ve ürünlerin depolanması ve üretimi süresince oluşan kimyasal değişikliklerden kaynaklanan safsızlıklar olarak nitelendirilmektedir (VICH 2007a, 2007b). Özellikle farmasötik ürünlerin bileşiminde yer alan yardımcı maddelerde şekillenebilen reaktif safsızlıklar, tıbbi ürünler için kayda değer degradasyon kay-

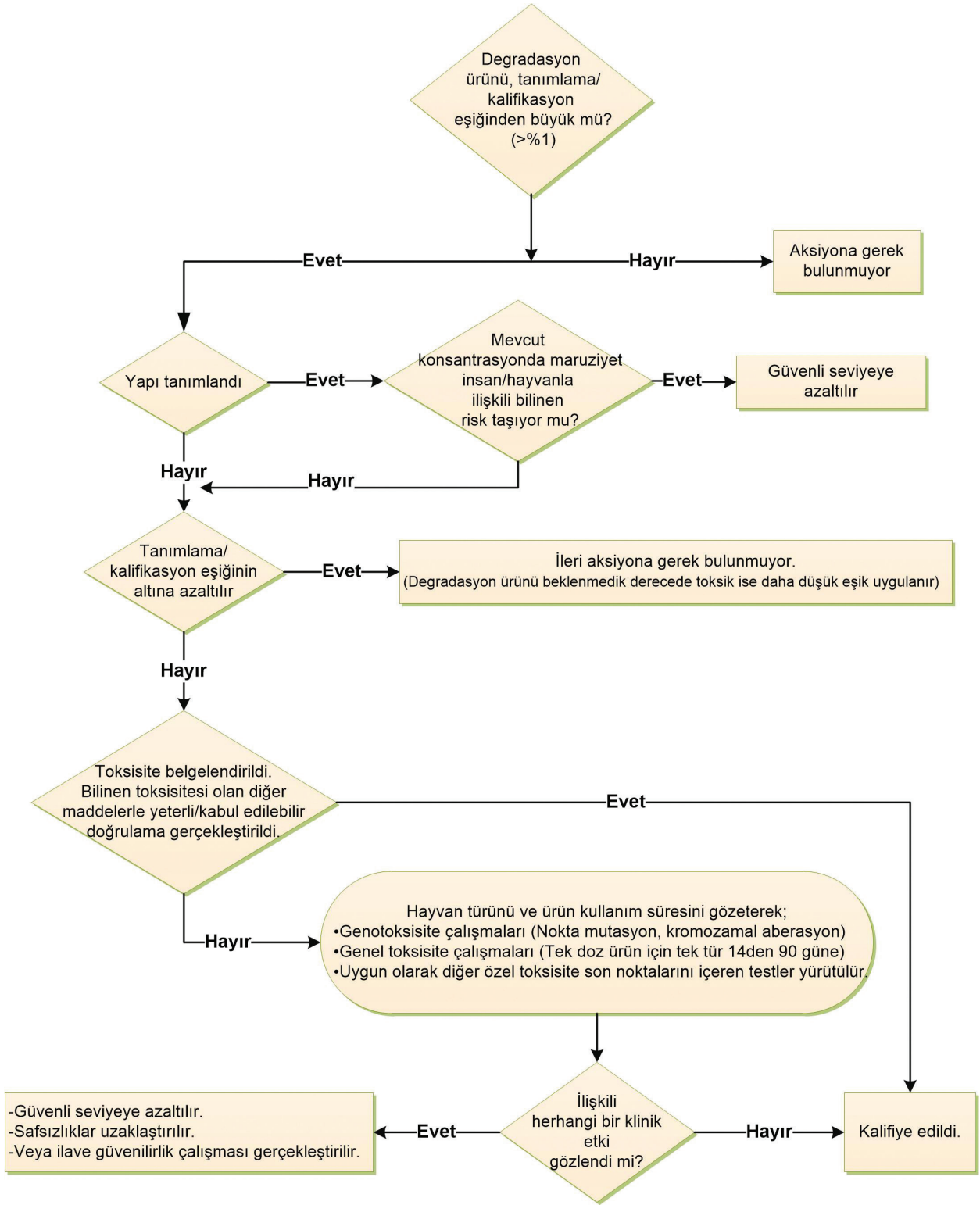
nağı olarak görülmektedir (Wu 2011, Elder ve ark. 2016). Dolayısıyla bu degradasyon ürünleri formülasyonun kalite, etkinlik ve güvenilirliğini değiştirebilme potansiyeline sahiptir (Pindelska ve ark. 2017). Avrupa Komisyonu'nun EC 470/2009 sayılı düzenlemesinde farmakolojik olarak aktif maddelerin tanımında; hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan etkin madde, yardımcı maddeler, degradasyon ürünleri ve onların metabolitleri arasında ayırım yapılmamakta olup (Anonim 2009), FDA veri tabanında; belirli dozaj formu ve potens için onaylanan konsantrasyon ve formda inaktif olduğu kabul edilen yardımcı maddelere ilişkin bilgiler yer almaktadır (FDA 2020).

Tıbbi ürünlerde organik safsızlıklar için belirlenen limitler; degradasyon ürünü olarak tanımlanan etkin madde-yardımcı madde reaksiyon ürünleri, etkin madde-ambalaj materyali reaksiyon ürünleri ve etkin maddelerin degradasyon ürünlerini kapsar (VICH 2007b). Degradasyon yolak bilgisi, ürün geliştirme ve laboratuvar çalışmaları, önerilen muhafaza koşullarında yürütülen uzun dönem, ara koşul, hızlandırılmış ve in-use (kullanım) stabilite çalışmaları sayesinde ürünün degradasyon profili karakterize edilir. Sıcaklık, nem, oksidasyon, hidroliz gibi koşulların etkilerinin gözlemlendiği stres testleri, potansiyel degradasyon ürünlerini göstermek için yardımcı ve gereklidir (EMA 2007c, 2008).

Son üründe % 0,3 üzerindeki degradasyon ürünü safsızlıklar bir kod numarası veya alıkonma zamanı gibi uygun bir tanımlayıcı ile raporlanırken % 1 üzerindeki degradasyon ürünlerinin tanımlanması zorunludur. % 1 altındaki degradasyon ürünlerinin tanımlanmasına gerek bulunmamakla birlikte beklenmedik derecede potent, kayda değer farmakolojik veya toksik etki üretme potansiyelinden şüphelenilen degradasyon ürünleri için analitik metotlar geliştirilir ve özel eşik değerler göz önünde bulundurulur. % 1 üzerindeki degradasyon ürünleri için kalifikasyon limiti uygulanmaktadır. Bu limiti aşan degradasyon ürünü safsızlıklar, klinik ve güvenilirlik çalışmalarında güvenli bulunan dozun altında ise kalifikasyonu yapılmış kabul edilir. Daha düşük ve daha yüksek kalifikasyon limitleri için vaka bazlı alternatif değerlendirme yapılır. Güvenilirlik verisi bulunmayan degradasyon ürünü safsızlıklar için yapının tanımlanması ile hedef hayvana özgü genel ve özel toksisite bilgilerinin sunulması gerekmektedir. Degradasyon ürünlerinin tanımlanması ve kalifikasyonu için karar ağacı Şekil 2'de verilmiştir (VICH 2007b).



Şekil 1. Tıbbi Ürünlerde Potansiyel Safsızlıklar (VICH 2007a, 2007b; Tian ve ark. 2015; EMA 1993, 2018b)



Şekil 2. Degradasyon Ürünlerinin Tanımlanması ve Kalifikasyonu için Karar Ağacı (VICH 2007b).

Günümüze değin etkin madde kaynaklı safsızlıklara dair birçok veri bilimsel literatüre aktarılmıştır. 2015-2017 yılları arasında Avrupa Birliği'nde gentamisin enjeksiyonluk çözeltisinin atlarda kullanımı sonucu, 9'u ölümlü sonuçlanan, anafilaktik tip reaksiyon olarak 154 istenmeyen etkinin rapor edilmesi bunlardan birisidir. Çeşitli analizler doğrultusunda, gentamisin içeren ürünlerin aynı üreticiye ait etkin madde serilerinde histamin kalıntıları bulunmuştur. İleri kontroller ile, yüksek düzeyde histamin safsızlığının, etkin maddenin uygun olmayan koşullarda muhafazasından kaynaklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (EMA 2018a).

1.1. Yardımcı Madde Seçiminin Ürün Güvenilirliği Yönünden Önemi

Avrupa İlaç Ajansı tarafından; veteriner tıbbi ürünlerde jenerik ürünler için referans ürüne karşı risk/fayda değerlendirmesinde biyoeşdeğerliğin ana ilke olduğu vurgulanmaktadır. Bu kapsamda; orijinal ve jenerik ürünler arasında risk/fayda dengesinin benzer olduğunun göz önünde bulundurulduğu belirtilmekle birlikte istisnai koşullarda bu dengenin kısmi olarak yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir. Özellikle yeni bir yardımcı madde kullanımının, yeni toksisite bilgilerine neden olabileceği hususuna dikkat çekilmiştir (EMA 2009).

Beşeri tıbbi ürünlere göre hedef hayvan güvenliği, tüketici güvenliği, kullanıcı güvenliği, çevresel güvenilirlik ve antimikrobiyal direnç yönleriyle veteriner tıbbi ürünlerin risk değerlendirmesi daha fazla çeşitliliği barındırmaktadır (EMA 2007b). Bu doğrultuda; veteriner tıbbi ürün izin başvurularında VICH GL6 ve GL38 kılavuzları ile birlikte kimyasalların kayıt, değerlendirme, izin ve kısıtlamalarını düzenleyen, REACH olarak isimlendirilen (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) düzenlemelerin takip edilmesi gereklidir (EMA 2015).

Veteriner tıbbi ürünlere ilişkin kılavuzlarda yardımcı maddelerin toksisite potansiyeline ilişkin kapsamlı atıflara yer verilmemesine rağmen, beşeri tıbbi ürünlerde kullanılan karsinojenik, mutajenik ve reprotoksik potansiyeli olan (Carcinogens, Mutagens, Reprotoxic-[CMR]) yardımcı maddelerin tespiti durumunda, yerine başka maddelerin kullanımı önerilmektedir. Herhangi bir yardımcı maddenin bir etkin madde veya yeni bir uygulama şekli ile ilk kez kullanılacak olması durumunda ise etkin madde formatında değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle, farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri olan yardımcı maddelerin bitmiş ürün formülasyonu üzerinden güvenilirlik değerlendirmesinin yapılması

öngörülmektedir. Yardımcı maddelerin her zaman mümkün olan en düşük miktarda kullanılması önerilmekle birlikte, bilinen yardımcı maddenin yeni bir uygulama yolunda kullanıldığında beklenmeyen reaksiyonlar gözlemlenebileceği de gözardı edilmemelidir. Standart yardımcı madde, bilinen bağlamdan daha yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ise güvenilirlik yönüyle değerlendirilmelidir (EMA 2007a).

2. DNA Reaktif Safsızlıklar

Tıbbi ürünlerin mutajenik ve genotoksik yönlerinin araştırılması, meydana gelebilecek risklerin kabul edilir düzeye indirilerek güvenilirliğinin değerlendirilmesi son derece önemlidir (Ziegelbauer ve ark. 2009). İlaçların çoğunluğu; hidrolize olabilen su, küçük miktarda elektrofil ve oksidasyonu katalizleyen metaller gibi reaktif türler içerebilmektedir (Pilaniya ve ark. 2010). Kimyasal tepkime sonucu DNA hasarını indüklenme potansiyeli bulunan maddeler, DNA reaktifler olarak tanımlanmakta olup, bakteri ters mutasyon testi (AMES) gibi uygun test yöntemleriyle mutajenik potansiyeli gösterilen safsızlıklar, DNA reaktif (Mutajenik) safsızlık olarak isimlendirilmektedir. Tıbbi ürünlerde saptanmaları durumunda ise düzeylerinin toksikolojik kaygı eşiğinin altına indirilmesi gerekmektedir (EMA 2018b).

Safsızlıkların değerlendirilmesinde, ilk aşama olan yapı-aktivite ilişkisinin aydınlatılması faydalı bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu amaçla kullanılan *in silico* yöntemler hayvan deneylerine alternatif olarak, veri boşluklarını doldurmak ve kimyasalların yönetimini geliştirmek için kabul edilebilir hale gelmiştir. Kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (Quantitative Structure Activity Relationship [QSAR]) prensipleri doğrultusunda, kimyasal bir yapının nitelikleri ve biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkiler, fizikokimyasal özellikleri arasındaki ilişkiler ile kimyasalların çevresel ve toksikolojik davranışlarının irdelenmesi mümkün olabilmektedir (Plošnik ve ark. 2016; Akı-Yalçın 2017). Değerlendirmenin ikinci aşamasında genotoksisite testleri ön plana çıkmaktadır. Bu testler ile DNA'da oluşan, geri dönüşümlü birincil hasarların ölçümü, geri dönüşümsüz hasarlara neden olarak germ hücrelerinde meydana geldiğinde sonraki jenerasyonlara aktarılabilen gen mutasyonları ile yapısal ve sayısal kromozom anomalileri saptanabilmektedir (VICH 2014; OECD 2015). Yapısında uyarıcı grup içeren, etkin madde yapısından farklı ve mutajenite verisi bulunmayan safsızlıklar için AMES testi uygulanır. Üreticiler tarafından bu çalışmaların İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practices [GLP]) koşullarında gerçekleştirilmesi beklenmekte

olup, GLP uyumlu olmadığı durumlarda çalışma raporunda sapma olarak tanımlanması, safsızlıkların sentezinin veya elde edilmesinin gerçekleştirilebilir olmadığı durumlarda ise minyatür formatta AMES testinin yürütülebileceği bildirilmiştir (EMA 2018b). Bununla birlikte, minyatür AMES testinde 300 mg kadar test maddesi gerekmektedir (Flamand ve ark. 2001).

Veteriner Tıbbi Ürün Safsızlıklarının Önlenmesine Yönelik Öneriler

Farklı formülasyonlar ve üretim prosesleri ile günden güne artarak çeşitlenen ve veteriner tıbbi ürünlerin yaşam döngülerinin farklı evrelerinde saptanabilen safsızlıkların kontrolü, hayvan ve halk sağlığının korunması açısından önemli bir konudur. Dolayısıyla etkin maddenin eldesinden tıbbi ürünlerin tüketimini kapsayan bu süreçte, düzenleyici otoriteden kullanıcıya kadar geniş bir yelpazede sorumluluklar düşmektedir.

Bu derlemede yararlanılan kaynaklar ve safsızlıklara ilişkin tez projem doğrultusunda, veteriner tıbbi ürünlerin etkinlik ve güvenilirliğine yönelik olumsuz etkileri olan safsızlıkların kontrol altına alınmasında etkili olabilecek çözüm önerileri ise aşağıda sunulan maddeler halinde özetlenebilir.

A. Safsızlıkların nitelik/niceliklerinin etkin bir şekilde saptanabilmesi ve olası etkilerinin rasyonel bir şekilde değerlendirilebilmesi için;

a) İyi Laboratuvar Uygulamaları sertifikasyonuna sahip, molekül sentezi ve saflaştırmasından hücre kültürü ve toksisite çalışmalarına kadar çeşitliliği kapsayan ve farklı disiplinleri barındıran, bütçesi özerk olan multidisipliner araştırma ve kalite kontrol merkezleri kurulması,

b) Safsızlıklar konusunda hizmet sunan mevcut kalite kontrol laboratuvarlarının altyapısının geliştirilmesi ve bu alanda görev alabilecek uzman (özellikle risk bazlı değerlendirme konusunda) personel istihdamının artırılması,

c) Kamu-üniversite-özel sektör işbirliğinin artırılarak konuya ilişkin ülke araştırma kaynaklarının daha etkin ve verimli şekilde kullanılması, bu alanda öncelikli destek programlarının artırılması,

B. Veteriner Tıbbi Ürüne yansıyan safsızlıkların etkin madde tedarikçisi, üretim yeri, ürün bileşimi gibi parametrelere bağlı olarak çeşitliliğini en aza indirmek amacıyla;

a) Tıbbi ürünün piyasaya arzı öncesi ve sonrası süreçte safsızlık potansiyellerinin bağımsız araştırmacılar tarafından izlenmesi,

b) Farmakope gerekliliklerine uygun referans standart ve madde kullanımıyla gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında, etkin maddelerin yanı sıra yardımcı madde safsızlıklarının da incelenmesi, safsızlıklara ilişkin potansiyel etkileşimlerin değerlendirilmesi ve ulaşılan verilerin bilimsel platformda yayımlanması,

c) Tıbbi ürünlerde saptanan safsızlıklarının hayvan türleri üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesinde, bilimsel geçerliliği olan yöntemlerin kullanılması (hedef hayvan türüyle ilişkili *in vitro* test sistemleri gibi),

d) Farklı sınıflandırmalara ait safsızlıkların, diğer safsızlıklarla birlikte tespit edilme olasılığına dayanarak (Örneğin elemental ve çözücü kalıntısı safsızlıkları) organizma yönünden kombine toksik etkisinin değerlendirilmesi için araştırmalar planlanması,

e) Genotoksik safsızlıklar konusunda kılavuzlar AMES testini referans test olarak göstermesine rağmen bu testin sonuçlarına ilişkin tartışılabilir bilimsel görüşler bulunmakta ve safsızlık tespiti için gereken test materyali nedeniyle zorluklarla karşılaşmaktadır. Dolayısıyla alternatif test yöntemlerine yönelik araştırmaların artırılması,

f) Geçmişte yaşanan olumsuz tecrübeler gözönünde bulundurularak izomerlerin terapötik ve toksik etkilerine yönelik araştırmaların artırılması,

C. İlaç safsızlığı kaynaklı düşük farmasötik kalitedeki ürünlerin ulusal ve uluslararası pazarda haksız rekabet edebilme potansiyelinin önüne geçilebilmesi için üreticiler tarafından;

a) Safsızlıklar konusuna ilişkin ilaç Ajansları kılavuzları ile birlikte Avrupa Kimyasallar Ajansı düzenlemelerinin yakından takip edilmesi,

b) Başlangıç materyali ve tıbbi ürün üretim prosesinde bilinen üretim yöntemlerinde gerçekleştirilen küçük değişikliklerin dahi potansiyel safsızlıklar üzerinde etkisinin büyük çapta olabileceği unutulmamalıdır. Dolayısı ile hedef hayvan, halk ve çevre sağlığına yönelik etkiler dikkate alınarak üretim aşamasında safsızlık kontrollerinin sıklığının artırılması, proses değiştirildiğinde safsızlık profillerinin detaylı olarak karşılaştırılması,

c) Barındırdığı safsızlıklarının güvenilirliği hakkında yeterli bilginin bulunmadığı, dolayısı ile hedef hayvan, kullanıcı, tüketici ve çevreye etkileri konusunda risk potansiyeline sahip kimyasal maddelerin takip edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması,

d) Hedef hayvan, kullanıcı, tüketici ve çevre sağlığına yönelik olası etkileri dikkate alınarak fi-

zyolojik fonksiyonları olumsuz etkileme potansiyeli bulunan yardımcı maddelerden kaçınılması,

d) Farmakovijilans verileri, ürün yaşam döngüsünün önemli geri bildirimlerini sağlayabilecek sistem olup, istenmeyen etkilerin safsızlıklar nedeniyle de meydana gelebileceğinin dikkate alınması,

e) Uzun dönem, ara koşul, hızlandırılmış, in-use stabilite ve stres testleri sonucunda saptanan yardımcı maddelerdeki kayıpların, degradasyon ürünlerine etkisinin değerlendirilmesi,

f) DNA reaktif safsızlıklara ilişkin kılavuz esas alınarak, hedef hayvan ve kullanıcı güvenliliği yönünden bu tip safsızlıklara ilişkin hükümlerin uygulanması,

g) Risk değerlendirme ilkelerinin, pazarlama izin sahiplerinin sorumluluğunda olduğunun göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

Biyolojik ve biyoteknolojik ürünler için ise konak hücre DNA'sı, hücre kültürü medyum bileşenleri, enzimler, ligandlar, izomerizasyon, asetilasyon, metilasyon, glikolizasyon gibi modifikasyonlar meydana gelebileceği için, safsızlık kontrollerinde ilişkili safsızlıkların artabileceğinin gözönünde bulundurulması önerilmektedir (Anonim 2011b).

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Doktora tezi, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü-TAGEM tarafından "*Veteriner Sağıltımda Yaygın Olarak Kullanılan İvermektin, Enrofloksasin ve Flunixin Meglumine Preparatlarının Safsızlıklarının Tayini ve Olası Genotoksik-Sitotoksik Potansiyellerinin In Vitro Olarak Araştırılması*" projesi kapsamında desteklenmiştir.

Bilgi: Bu derleme, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü bünyesinde yürütülen "*Türkiye'de ruhsatlı ivermektin çözeltilerinin safsızlık tayini ve olası genotoksik-sitotoksik etkilerinin in vitro olarak araştırılması*" isimli doktora tez çalışmasından türetilmiştir.

Kaynakça

Akı-Yalçın E, (2017). Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizinde Kullanılan Fizikokimyasal Parametreler (QSAR Parametreleri). Sunu. Ankara Üniversitesi. http://www.esisresearch.org/Uploads/Documents/qsar_parametreler_2017.pdf Erişim Tarihi; 03.05.2020.

American Chemical Society, (ACS), (2014). <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/thalidomide.html>. Erişim Tarihi: 04.12.2019

Anonim, (2009). European Commission, Regulation (EC) No 470/2009. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0470> Erişim Tarihi; 27.03.2020.

Anonim, (2011a). Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete, 24.12.2011-28152. Erişim Tarihi:20.01.2020.

Anonim, (2011b). https://admin.ich.org/sites/default/files/in-line-files/SESSION_III_ICHQ6B_Specifications.pdf. Erişim Tarihi:20.01.2020.

Anonim, (2012a). İmmünojen Veteriner Tıbbi Ürünler Dışındaki Veteriner Tıbbi Ürünlerin Başvuru Dosyası Kılavuzu. Erişim Tarihi: 20.01.2020, [https://kms.kay-sis.gov.tr/\(X\(1\)S\(13uw3bibpicsqth4um00cotp\)\)/Home/Goster/56460?AspxAutoDetectCookieSupport=1](https://kms.kay-sis.gov.tr/(X(1)S(13uw3bibpicsqth4um00cotp))/Home/Goster/56460?AspxAutoDetectCookieSupport=1).

Anonim, (2012b). Veteriner Tıbbi Ürünler İçin İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Kılavuzu, https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Veteriner%20Hizmetleri/vetsagurun/VTU_icin_GMP_Klavuzu.pdf Erişim Tarihi:14.03.2020.

Anonim, (2015). European Commission. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Volume 6B Notice to applicants, Veterinary Medicinal Products, Presentation and Content of the Dossier.

Bakırel T, (2020). Hayvansal Gıdalarda İlaç Kalıntıları ve Veteriner Tıbbi Ürünlerin Ruhsatlandırılması. Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, 198-225.

Devlet Planlama Teşkilatı (DPT), (2007). Dokuzuncu kalkınma planı (2007-2013): İlaç Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu.

Elder D P, Kuentz M, Holm R, (2016). Pharmaceutical excipients— quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 88-99. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.12.018

Erkeoğlu P, Baydar T, Şahin G, (2014). Toksikolojik Açısından İlaç Safsızlıkları. *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci* 2014;3(2). doi: 10.5336/pharmsci.2014-41382

European Medicines Agency (EMA), (1991). Guideline: Specifications and Control Tests on the Finished Product.

European Medicines Agency (EMA), (1993). Investigation of Chiral Active Substances.

European Medicines Agency, (EMA), (2007a). Opinion, https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/chmp-scientific-article-53-opinion-potential-risks-carcinogens-mutagens-substances-toxic_en.pdf Erişim Tarihi; 27.06.2019.

European Medicine Agency (EMA) (2007b). Recommendation On The Evaluation Of The Benefit-Risk Balance Of Veterinary Medicinal Products.

European Medicine Agency (EMA) (2007c). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Medicinal Products. EMEA/CVMP/VICH/899/99-Rev.1.

European Medicine Agency (EMA) (2008). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products. EMEA/CVMP/QWP/846/99-Rev.1.

European Medicines Agency (EMA), (2009). Recommendation on the assessment of the quality of medicinal products containing existing/known active substances.

European Medicines Agency (EMA), (2015). Guideline on the assessment of persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) or very persistent and very bioaccumulative (vPvB) substances in veterinary medicinal products.

European Medicines Agency (EMA), (2017). Implementation of risk assessment requirements to control elemental impurities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/QWP/631010/2017.

European Medicines Agency (EMA), (2018a). CVMP assessment report regarding the request for an opinion under Article 30(3) of Regulation (EC) No. 726/2004 For veterinary medicinal products containing gentamicin for parenteral administration to horses.

European Medicines Agency (EMA), (2018b). Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) im-

- purities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/SWP/377245/2016.
- Flamand N, Meunier JR, Meunier PA, Agapakis-Causse C, (2001). Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicology in vitro*, 15(2), 105-114.
- Food and Drug Administration (FDA), (2020). Inactive Ingredient Database. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> Erişim Tarihi; 08.03.2020.
- International Conference on Harmonisation (ICH), (1990). History. <https://www.ich.org/about/history.html>, Erişim Tarihi:11.11.2019.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (1993). <https://vichsec.org/>, Erişim Tarihi:11.11.2019.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2005). GL39 (Quality), Test procedures and acceptance criteria for new veterinary drug substances and new medicinal products: chemical substances.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2007a). VICH GL10 (Quality), Impurities In New Veterinary Drug Substances.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, (VICH), (2007b). VICH GL11 (Quality), Impurities In New Veterinary Medicinal Products.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2011). VICH GL18 (Quality), Impurities: Residual Solvents In New Veterinary Medicinal Products, Active Substances And Excipients.
- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), (2014). VICH GL23 (Safety), Studies To Evaluate The Safety Of Residues Of Veterinary Drugs In Human Food: Genotoxicity Testing.
- Jacobson-Kram D, McGovern T, (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced drug delivery reviews*, 59(1), 38-42. DOI: 10.1016/j.addr.2006.10.007
- Liu KT, Chen CH, (2019). Determination of Impurities in Pharmaceuticals: Why and How?. In *Quality Management and Quality Control-New Trends and Developments*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.83849
- Mike F, Pehlivan SB, Öner L, (2014). Farmasötik Ürünlerde Tasarımla Kalite Yaklaşımı. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, (2), 203-230.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2015). *Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines*.
- Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh B, (2010). Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010 Jul-Sep; 1(3): 302-310. DOI: 10.4103/0110-5558.72422
- Pindelska E, Sokal A, Kolodziejki W, (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced drug delivery reviews*, 111-146. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>
- Plošnik A, Vračko M, Sollner Dolenc M, (2016). Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 67(3), 169-182. DOI: 10.1515/aiht-2016-67-2801
- Rägo L, Santoso B, (2008). *Drug Regulation: History, Present and Future*, WHO, 65-76.
- Smith S, (2009). Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different, *Toxicological Sciences*, 110(1), 4-30. DOI: 10.1093/toxsci/kfp097
- Tian Y, Chang Y, Feng YC, Zhang DS, Hu C, (2015). Isolation, identification and characterization of related substances in furbenicillin. *The Journal of Antibiotics*, 68(2), 133-136. DOI: 10.1038/ja.2014.145
- Vargesson N, (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms, *Birth Defects Res C Embryo Today*, Jun; 105(2): 140-156. DOI: 10.1002/bdrc.21096
- Wu Y, Levons J, Narang AS, Raghavan K, Rao VM, (2011). Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1248-1263. DOI: 10.1208/s12249-011-9677-z
- Ziegelbauer HE, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ, (2009). "Applications of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity". *Toxicol Lett*. 2009, 186, 36-44. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.08.017

