T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROFİLİK VE LİPOFİLİK ÖZELLİKTEKİ ANTİBAKTERİYEL İLAÇLARIN SÜTÜN YAĞLI VE YAĞSIZ KISMINDA DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ

Zeynep ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ

KONYA – 2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROFİLİK VE LİPOFİLİK ÖZELLİKTEKİ ANTİBAKTERİYEL İLAÇLARIN SÜTÜN YAĞLI VE YAĞSIZ KISMINDA DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ

Zeynep ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202008 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2018

ÖNSÖZ

Hayvan sağlığını korumak, hastalıkları tedavi etmek ve hayvanlardan birim başına daha fazla verim elde etmek için ilaçların kullanılması kaçınılmazdır. İlaçların etiket dışı ve irrasyonel kullanımı halk sağlığını, hayvansal ürün kalite ve güvenliğini olumsuz etkileyen ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan kalıntılara neden olabilmektedir. İnsan sağlığını korumak için her ilacın hayvansal ürünlere yönelik maksimum kalıntı limit (MRL) ve yasal arınma süreleri belirlenmiştir. Laktasyondaki hayvanlarda ilaç kullanımı, sütlerin yasal arınma süresince kullanılamaması, üretici ve ülke ekonomisi için kayıp anlamına gelmektedir. Hayvansal gıdalarda ilaç kalıntılarını önlemeye ve kalıntı ihtiva eden ürünleri değerlendirmeye imkan veren metotların geliştirilmesine yönelik çalışmaların önemi vurgulanmaktadır.

İlaçların dolaşımdan doku ve süt gibi biyolojik sıvılara geçişi, canlıya (tür, ırk, hastalık, laktasyon dönemi, sayısı ve sağım, beslenme ve çevre, hormonal faktörler) ve ilaca (proteine bağlanma, fizikokimyasal özellikler, uygulama yolu, ilaç-ilaç ve ilaç-besin etkileşimi) ait çeşitli faktörlerden etkilenir. Özellikle proteine bağlanma oranı ve lipofilite sütte ilaç dağılımında önemli rol oynar.

Makrolid ve aminopenisilin grubu antibiyotikler veteriner hekimlikte geniş kullanım alanına sahiptir. Doku ve süte yüksek oranda geçen makrolidlerin yarılanma ömrü uzundur. Hidrofilik özellikte ve çoğunun süte geçiş oranı hakkında yeterli veri olmayan aminopenisilinler ise meme dokusunda irritan etkilerinin az ve proteinlere düşük düzeyde bağlanmaları nedeniyle mastitis tedavisinde sıklıkla tercih edilirler.

Bu çalışma, lipofilik ve hidrofilik ilaçların diğer biyolojik sıvı ve dokulardaki dağılımlarında olduğu gibi sütün farklı kısımlarında da benzer davranış sergileyecekleri öngörülerek, hidrofilik amoksisilin ve lipofilik tilozinin krema, yağsız süt ve kazeinde dağılım oranlarını belirleyerek, sütün bu kısımlarının yasal arınma süresince kullanılabilirliğini belirlemek için yürütülmüştür. İlaçların biyolojik sıvılardaki dağılımını *in vitro* verilerin yansıtıp yansıtmadığını ortaya koymak için çalışma *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki aşamada tasarlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren, her türlü bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ başta olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Levent BAŞ, Prof. Dr. Halis OĞUZ, Prof. Dr. Muammer ELMAS, Prof. Dr. Enver YAZAR'a, projenin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Kamil ÜNEY'e, Doç. Dr. Ayşe ER, Arş. Gör. Dr. Burak DİK, Arş. Gör. Hatice ESER FAKI, Arş. Gör. Emre BAHÇIVAN ve Arş. Gör. Devran COŞKUN'a teşekkür ederim.

Çalışmanın deneysel kısmını çiftliğinde yapmama imkan sağlayan Ali ŞİMŞEK'e ve teknik desteklerinden dolayı Anadolu İlaç ve Kimya San. A.Ş. ve Damla İlaç'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde katkıları tartışılmaz olan, süreç boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (17202008)'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER ve KISALTMALAR	**vi**
1.GİRİŞ	**1**
1.1. Sütün Oluşumu ve Bileşimi	1
1.2. İlaçların Süte Geçiş Mekanizmaları	2
1.3. Süte İlaç Geçişini Etkileyen Faktörler	4
1.3.1. Canlıya Ait Faktörler	5
1.3.2. İlaca Ait Faktörler	11
1.4. Hidrofilik ve Lipofilik İlaçların Sütte Dağılımları	15
1.4.1. Amoksisilin	17
1.4.2. Tilozin	19
1.5. Sütte Kalıntı ve Ekonomik Yönden Önemi	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	**22**
2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	22
2.2. Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve İlaçlar	22
2.3. Hayvan Materyali	23
2.4. Deneysel Uygulamalar	23
2.5. Sütlerde Somatik Hücre Sayımı	24
2.6. Tam Sütün Yağsız Süt, Krema ve Kazeine Ayrılması	24
2.7. Süt ve Süt Kısımlarının Analiz İçin Hazırlanması	25
2.8. Amoksisilin ve Tilozinin Süt ve Süt Kısımlarında Miktar Tayinleri	25
2.9. Tam Süt, Yağsız Süt ve Kremada Total Protein Tayini	26
2.10. Metot Validasyon	27
2.10.1. Özgünlük (Specificity)	27
2.10.2. Doğrusallık (Linearity)	27

2.10.3. Duyarlılık (Sensitivity) 27

2.10.4. Kesinlik (Precision) ve Gerçeklik (Accuracy) 27

2.10.5. Geri Kazanım (Recovery) 28

2.10.6. Veri ve İstatistiksel Analiz 28

3. BULGULAR **30**

3.1. Sütlerdeki Somatik Hücre Sayısı 30

3.2. Tam Süt, Yağsız Süt ve Kremada Toplam Protein Yüzdesi 30

3.3. Metot Validasyonu 30

3.3.1. Özgünlük (Specificity) 30

3.3.2. Doğrusallık (Linearity) 30

3.3.3. Geri Kazanım (Recovery) 30

3.3.4. Duyarlılık (Sensitivity) 31

3.3.5. Kesinlik (Precision) ve Gerçeklik (Accuracy) 31

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi 31

4. TARTIŞMA **38**

4.1. Metot 38

4.2. Amoksisilinin Süt Kısımlarındaki Dağılımı 38

4.3. Tilozinin Süt Kısımlarındaki Dağılımı 40

4.4. Amoksisilin ve Tilozinin Kazeindeki Düzeyleri 41

5. SONUÇ ve ÖNERİLER **42**

6. KAYNAKLAR **43**

7. EKLER **50**

EK A: Etik Kurul Kararı 50

EK B: Tezden Üretilmiş Yayın / Yayınlar 51

8. ÖZGEÇMİŞ **52**

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	ATP-binding cassette
ADI	Günlük kabul edilebilir alım miktarı
bABCG2	Sığır $ABCG_2$
BCRP	Meme kanseri direnç proteini
cABCG2	Keçi $ABCG_2$
C_{max}	İlacın biyolojik sıvıdaki doruk yoğunluğu
DDT	1,1'-(2,2,2-Trichloroethane-1,1-diyl)bis(4-chlorobenzene)
DHEAS	Dihidroepiandrosteron
DMT	Desmisinosil tilozin
EAA	Eğri altında kalan alan
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FMN	Flavin mononükleotid
FSIS	Gıda Güvenliği ve Kontrol Hizmeti
FTC	Fumitremorgin C
G	Gram
G	Gravite
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IM	Kas içi
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline
Kg	Kilogram
LC	Sıvı kromatografi
LOD	Tespit limiti

log *P*	Partizisyon katsayısı
Log oct*P*'*app*	Oktanol/su partizisyon katsayısı
LOQ	Hesaplanabilir limit
µg	Mikrogram
M	Molar
MDCKII	Madin – Darby canin kidney
mg	Miligram
Ml	Mililitre
MRL	Maksimum kalıntı limiti
MRP	Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein
MS	Kütle spektrometri
ng	Nanogram
NRP	Amerika Ulusal Kalıntı Programı
OMT	5-O-mikaminosiltilonolid
PCB	Poliklorlu bifenil
P-gp	P-glikoprotein
Phlp	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
R^2	Korelasyon katsayısı
S/G	Sinyal / Gürültü oranı
S/P	Süt / Plazma oranı
SNF	Yağsız katı madde
SPE	Katı faz ekstraksiyon
SS	Standart sapma
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
VK	Varyasyon katsayısı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1 Farklı türlere ait sütlerin kimyasal bileşimi (%)

Çizelge 1.2 Bazı sığır ırklarına ait inek sütlerinin kimyasal bileşimleri (%)

Çizelge 1.3 Kolostrumun normal süte dönüşümü sırasında kimyasal bileşiminde oluşan değişiklikler (%)

Çizelge 1.4 Aylara bağlı olarak sütün bileşimindeki değişimler (%)

Çizelge 3.1 Tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinde amoksisilin ve tilozinin validasyon değerleri

Çizelge 3.2 Farklı konsantrasyonlarda süte amoksisilin ilave edildikten sonra süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Çizelge 3.3 İneklere amoksisilin (tek doz, 14 mg/kg, IM) uygulandıktan sonra farklı örnekleme zamanlarında süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Çizelge 3.4 Farklı konsantrasyonlarda süte tilozin ilave edildikten sonra süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Çizelge 3.5 İneklere tilozin (tek doz, 15 mg/kg, IM) uygulandıktan sonra farklı örnekleme zamanlarında süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1 Çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* aşamasında amoksisilinin yağsız süt, krema ve kazeinde dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Şekil 3.2 Çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* aşamasında tilozinin yağsız süt, krema ve kazeinde dağılımı (%) (ortalama ± SS)

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hidrofilik ve Lipofilik Özellikteki Antibakteriyel İlaçların Sütün Yağlı ve Yağsız Kısmında Davranışlarının Belirlenmesi

Zeynep ÖZDEMİR

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2018

Bu çalışmanın amacı amoksisilin ve tilozin uygulanan Holstein ırkı inek sütlerinde ilaçların fizikokimyasal özelliklerine göre sütün farklı kısımlarına dağılımını belirlemektir. Çalışma hem *in vitro* hem de *in vivo* yürütülerek, *in vitro* çalışmanın sütün farklı kısımlarına ilaç dağılımını *in vivo* çalışmaya uygun olarak yansıtıp yansıtmadığını belirlemek amaçlandı.

Çalışma *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki aşamada yapıldı. *İn vivo* çalışma çapraz-dizaynda, 6 adet sağlıklı Holstein ırkı (450-500 kg, 2-4 yaş) sütçü inek üzerinde gerçekleştirildi. İlk olarak ineklere 14 mg/kg dozunda amoksisilin boyun bölgesi dorsolateralinden kas içi yolla uygulandı. Süt örnekleri (100 mL) ilaç uygulama öncesi (0) ve takip eden 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144.saatlerde toplandı. İlaç arınma süresini takiben ineklere 15 mg/kg dozunda tilozin boyun bölgesi dorsolateralinden kas içi yolla uygulandı. Süt örnekleri (100 mL) ilaç uygulama öncesi (0) ve takip eden 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde toplandı. Tam süt, yağsız süt, krema ve kazeindeki amoksisilin ve tilozin konsantrasyonları HPLC-UV ile belirlendi. Çalışmanın *in vitro* aşamasında 0,004 – 400 µg/g amoksisilin ile 0,05 – 50 µg/g tilozin, ilaç içermeyen sütlere eklendikten sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyonun ardından yağsız süt, krema ve kazeine ayrılarak, ilaç konsantrasyonları belirlendi. Ayrıca süt ve süt kısımlarında toplam protein yüzdesi belirlendi.

Amoksisilinin çalışmanın her iki aşamasında da yağsız sütte krema ve kazeine göre daha fazla biriktiği tespit edildi. Tilozinin *in vitro* aşamada tam ve yağsız sütteki konsantrasyonları benzer iken, *in vivo* aşamada kremada daha fazla dağıldı ancak bu beklenenden düşüktü. Tam ve yağsız sütte toplam protein yüzdesi benzer ve kremadan daha yüksek belirlendi

Sonuç olarak hidrofilik özellikteki amoksisilinin krema ve kazeinde daha az biriktiği bu nedenle amoksisilinin krema ve kazeinden arınma süresinin tam sütten daha kısa olabileceği belirtilebilir. Bu öngörünün doğrulanması için daha hassas analiz yöntemleri ile ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmada tilozin konsantrasyonu yağsız süt ve kremada 48.saatte, 24.saatte ise kazeinde 50 µg/kg ve altında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dağılım; hidrofilik; ilaç; lipofilik; süt bileşeni.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of Behaviors of the Hydrophilic and Lipophilic Antibacterial Drugs in Skim Milk and Cream

Zeynep OZDEMIR

Department of Pharmacology and Toxicology

PhD THESIS / KONYA-2018

The aim of this study is to determine the distribution of amoxicillin and tylosin in the different fraction of the milk according to physicochemical properties of drugs. The study was also conducted *in vitro* and *in vivo* to determine whether convenience of in vitro study in to reflect the distribution of drugs in the different fraction of milk.

The study was conducted in two stage as *in vitro* and *in vivo*. The *in vivo* study was performed in cross-over design. The study was carried out on 6 healthy Holstein breed dairy cattle. Firstly amoxicillin (i.m., single dose, 14 mg/kg) was administered to cows. Milk samples were collected before drug administration (0) and at 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours after drug administration. Following the washout period, tylosin (i.m., single do**se,** 15 mg/kg) was administered to each cow. Milk samples were collected before drug administration (0) and at 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours after drug administration. Concentrations of amoxicillin and tylosin in whole milk, skim milk, cream and casein were measured by HPLC-UV. The *in vitro* stage of the study 0,004 – 400 µg/g concentration of amoxicillin and 0,05 – 50 µg/g concentration of tylosin were added to the drug free milk and drug concentrations in the whole milk, skim milk, cream and casein were measured after incubation at 37 °C for 30 min. Also the percentage of total protein in milk and milk fractions was determined.

It was determined that amoxicillin is more accumulated in skim milk than cream and casein in both *in vitro* and *in vivo* stages of the study. Tylosin concentrations in whole and skim milk were similar to the *in vitro* study while the results of the *in vivo* study showed that tylosin more accumulated in cream more than in skim milk, but the accumulation rate of tylosin in cream was low than expected. In both stages of study, tylosin is less concentrated in casein than in skim milk and cream. It was determined that percentage of total protein in skim milk and whole milk was similar and was high than in cream.

It can be stated that amoxicillin accumulates less in cream and casein therefore the withdrawal time of amoxicillin in cream and casein may be shorter than whole milk. There is to need additional study with more sensitive analysis methods to verify this prediction. The concentration of tylosin was determined to be 50 µg/kg or less in cream and skim milk at the 48 h and in casein at the 24 h, respectively.

Key words: Accumulation; drug; hydrophilic; lipophilic; milk component.

1.GİRİŞ

1.1. Sütün Oluşumu ve Bileşimi

Meme kompleks bir organ olup destekleyici, epitelyum hücrelerinden oluşan alveoler, sütü depolamak için kanal, kan - lenf dolaşım ve sinir sistemlerinden oluşur.

Sütü salgılayan hücreler (alveol epitelyum hücreleri), alveollerde etrafı bağ doku ile çevrili olarak bulunurlar. Alveoler kanallar birleşerek sütün toplandığı hazneye açılan büyük kanalları meydana getirirler.

Alveollerdeki epitel hücreler, kandan sütü sentezler. Sütün temel unsurları (protein, lipit, laktoz, su gibi) alveol epitel hücrelerinin endoplazmik retikulumunda sentezlenerek golgi kompleksine taşınır ve buradan farklı (ekrin, apokrin ve merokrin) salgılama yollarıyla hücrenin apikal (boşluğa bakan) yüzünden alveol boşluğuna aktarılır. Alveol boşluğunda biriken süt, hormonal uyarımla süt kanallarına geçer ve basınç meydana getirir. Bu durum sütün salgılanma hızını azaltır. Memenin süt oluşturma kapasitesi memedeki salgı dokusunun hacmine bağlıdır.

Meme dokusunda büyük bir süt deposu görevi yapan sinüs laktiferus, sinüs papillaris ile meme başında devam eder. Emilme ve sağım işlemi alveolleri kasar sonuçta sütü kanallara sevk ederek meme bezindeki basıncın artmasına neden olurlar. Meme bezinden süt ne kadar hızlı alınırsa, o kadar çok süt kanallardan hazneye gelir. Sonuçta alveol epitelyum hücreleri, azalan basınç nedeni ile tekrar süt oluşturmaya başlarlar.

İnek sütü % 80-90 suya ilave olarak başlıca emülsiyon şeklinde yağ globülleri, kolloidal şekilde dağılmış proteinler ile çözelti şeklinde laktoz ve çözünür proteinler oluşturur. Bu besin unsurlarına ek olarak çeşitli mineral maddeler, vitaminler, enzimler (laktoperoksidaz, lizozim, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, lipaz, fosfataz, proteaz), immunglobulinler (IgG, IgA, IgM), organik bileşikler ve çözünmüş gazlar (oksijen, karbondioksit, azot) da sütün bileşimine girer. Kazein miselleri ve yağ globülleri sütün önemli unsurlarıdır; peynir ve tereyağı gibi süt ürünlerinin bileşiminde önemli rol oynarlar (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004).

Süt bileşimi tür, ırk, laktasyon dönemi, gebelik, yaş, hastalık, mevsim, beslenme ve meme sağlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

1.2. İlaçların Süte Geçiş Mekanizmaları

İlaçların süte geçişinde temel mekanizmaları pasif difüzyon, transmembran proteinlerinin de yer aldığı aktif transport sistemler ve iyon tuzağı oluşturur. Pasif difüzyon, plazmadan süte ilaç geçişinde rol oynayan başlıca faktördür. İlaçların süte geçişi kolaylaştırılmış difüzyon aracılığıyla da meydana gelebilir. Kolaylaştırılmış difüzyon daha çok enzim ve proteinlerin taşınmasında etkindir. Ayrıca pinositoz ve ekzositoz ilaçların süte geçişinde etkin olan diğer yollardır (Ito ve Alcorn 2003). Glikoz, aminoasit, kalsiyum, magnezyum ve sodyum gibi besin maddeleri de süte aktif transportla taşınır. Biyomekanik mekanizmalar, 1000 daltondan büyük molekül ağırlığa sahip olan moleküllerin geçişinde önem taşır. Molekül ağırlığı büyük olan maddeler ile kolloidlerin biyolojik membranlardan geçişlerinde pinositoz da rol oynar. İneklerde yapılan çalışmalar ile süte aminopirin (Banerjee ve ark 1967), N-asetilat paraaminohippurik asit (Rasmussen 1968a) ve N-asetilat sülfanilamid (Rasmussen 1968b) gibi bileşiklerin geçişinin doyurulabilirliği gösterilmiştir.

İlaçlar taşıyıcı sistemler aracılığı ile de süte geçerler. İnsanlarda yapılan çalışmada simetidinin süt/plazma oranı 5,8 olarak bulunmuştur; bu oran fizikokimyasal bölümlemeye dayanan pasif difüzyona oranla 1,1 kat daha fazladır (Oo ve ark 1995). Keçi ve ineklerde yapılan çalışmada benzilpenisilin ile eş zamanlı verilen probenesidin süte geçen miktarında azalma olmuştur (Schadewinkel-Scherkl ve ark 1993). Nitrofurantoin, furaltadon, simetidin, ranitidin ve probenesidin öngörülen difüzyon ve fizikokimyasal bölümleme ilkelerine oranla sütte yüksek düzeyde akümüle olduğu belirlenmiştir (McNamara ve ark 1992, McNamara ve ark 1996, Kari ve ark 1997, Gerk ve ark 2001a, Gerk ve ark 2001b). Gerk ve ark (2002) dipiridamolün nitrofurantoinin süt/serum oranını % 60'dan, Ito ve Alcorn (2003) ise simetidinin süt/serum oranını % 80'den daha fazla azalttığını ortaya koymuştur. Bahsedilen bu çalışmalar meme bezinde taşıyıcı aracılı transport sisteminin/sistemlerinin varlığını ve ilaçlar arasında yarışma olduğunu ortaya koymaktadır.

ATP-binding cassette (ABC) aktif olarak molekül taşıyan en geniş protein ailelerinden biridir (Higgins 1992, Dean ve ark 2001). ABC transmembran protein ailesi; hücrelerin plazma membranından çeşitli ilaçların, karsinojen maddelerin ve toksinlerin taşınmasında rol oynayan ve enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanan transmembran proteinlerden oluşur. Bu proteinler, bütün hücre tiplerinden çeşitli endojen ve eksojen maddelerin atılımında da görev alırlar (Perez ve ark 2009). ABC familyasından P-glikoprotein (P-gp), meme kanseri direnç proteini (BCRP, breast cancer resistance protein) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP, multi drug resistance protein) çeşitli organlara ilaç taşınmasında en çok görev alan transmembran proteinlerdir (Schinkel ve Jonker 2003, Fromm 2004). P-gp; beyin, fötus, gonad, göz, prostat ve kemik iliği gibi dokularda ilaç ve toksin birikimini minimize ederek koruyucu bariyer olarak işlev görür. Bu dokular haricinde meme bezinde de bulunur (Lespine ve ark 2008). Ancak laktasyon periyodunda P-gp'nin mRNA seviyelerinin düştüğü belirlenmiştir (Alcorn ve ark 2002).

BCRP; ABC'nin "White" alt familyasının bir üyesidir. Bu transmembran protein aktif olarak hücrelerden ilaçları bağırsak, böbrek, karaciğer ve diğer organ lümenlerine atılımını sağlar. Aynı zamanda süte madde geçişinde de etkili bir transmembran proteindir. BCRP, meme dokusunda özellikle gebeliğin son dönemleri ve laktasyon periyodunda yüksek oranda bulunur (Jonker ve ark 2005, Pulido ve ark 2006, Wu ve ark 2008). BCRP süt üretilen alveol epitelyum hücrelerinin apikal membranında yer alır (Jonker ve ark 2005). BCRP fötuse toksin geçişini engellerken, süte ksenobiyotiklerin taşınmasında aktif rol oynar. İnsan ve inekte BCRP substratı olduğu belirlenen ilaçların BCRP transmembran proteinden yoksun transgenik (BCRP -/-) ve yabanıl fareler karşılaştırıldığında BCRP -/- fare sütünde konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Jonker ve ark 2005). BCRP, çeşitli besin maddelerinin süte geçişinde de etkili olmakla birlikte, BCRP substratı olarak bilinen folat, dihidroepiandrosteron (DHEAS) ve vitamin B_{12} miktarlarının BCRP -/- farelerin sütünde değişmediği ortaya konmuştur (Chen ve ark 2003, Suzuki ve ark 2003). Aynı zamanda BCRP -/- hayvanların yavrularında sütle beslenmeye bağlı büyüme geriliği de gözlenmemiştir (Jonker ve ark 2002, Zhou ve ark 2002).

BCRP'nin genetik polimorfizmleri süte ilaç geçişinde göz önünde bulundurulmalıdır. BCRP'nin sentezlenmesi ve/veya fonksiyonundaki değişiklikler

süte BCRP substratlarının geçişinde ve farmakokinetiğinde önemli değişikliklere yol açabilir (Jonker ve ark 2007, Ni ve ark 2010). BCRP polimorfizmlerinden Y581S, danofloksasinin süte geçişinde artışa neden olmuştur. Y581S polimorfizminin heterozigot varyantı Y/S, homozigot varyantı Y/Y'ye göre danofloksasinin sütteki konsantrasyonunda 2 kat artışa neden olmuştur (Otero ve ark 2013). Ayrıca,Y581S polimorfizminin süt üretimi, sütün protein ve yağ bileşiminden de sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cohen-Zinder ve ark 2005, Weikard ve ark 2012). BCRP varyantları türlere göre de farklılık gösterebilir. Triklabendazol metabolitlerinin (triklabendazol sülfoksit ve sülfon) koyun BCRP varyantındaki inhibitör etkilerinin sığır varyantlarına (Y581 ve S581) göre daha düşük olduğu, ayrıca bu metabolitlerin sığır Y581 varyantını daha iyi inhibe ettiği belirlenmiştir (Barrera ve ark 2013).

1.3. Süte İlaç Geçişini Etkileyen Faktörler

İlacın süte geçişi süt/plazma (S/P) oranı ile tanımlanır. S/P oranı; sütün bileşiminden (su, yağ, protein, pH) ve ilacın fizikokimyasal özelliklerinden (iyonizasyon derecesi, molekül ağırlığı, proteine bağlanma ve lipofilite) etkilenir. S/P oranı bilinmiyorsa; ilacın pKa, plazma proteinlerine bağlanma, lipofilitesi dikkate alınarak bu değer tahmin edilebilir. BCRP substratlarının S/P oranları da beklenenden yüksek olmaktadır (van Herwaarden ve Schinkel 2006). Maternal plazma ilaç konsantrasyonu sütteki ilaç konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu konsantrasyon dozla değişmekle birlikte maternal ilaç metabolizasyonu da bu oran üzerinde etkilidir. İlacın metabolize edilme yeteneği genetik olarak belirlenir ve memelilerde bu oran değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda klomipraminin köpekler arasında 50 kata kadar varan plazma konsantrasyon farkı gösterdiği ifade edilmiştir (Tras 2016).

Gebelik ve laktasyon döneminde başta hormonlar olmak üzere fizyolojik fonksiyonlarda önemli değişiklikler gözlenir. Gebelikte maternal serum ilaç konsantrasyonu; gastrik boşalmanın yavaşlaması sonucunda asidik ortama ve yıkıcı enzimlere daha uzun süre maruz kalma, azalan gastrointestinal motilite sonucu ilaç emiliminin artması, protein bağlama kapasitesinin azalması ile serumdaki serbest ilaç konsantrasyonunun artması, artan karaciğer metabolizması sonucu ilaçların hızla metabolize edilmesi, vücuttaki yağ oranının, plazma hacminin, toplam vücut suyunun artması sonucunda optimal dozdaki serum konsantrasyonunun azalması gibi

fizyolojik değişimlerden etkilenir. Laktasyon döneminde ise serum albümin, globulin ve albümin/globulin oranı artar (El-Sherif ve Assad 2001, Karapehlivan ve ark 2007). Gebeliğin son dönemlerinde plazma proteinlerinin düzeyinde bir azalma olduğu, plazma protein konsantrasyonunun laktasyon süresi ilerledikçe normal seviyeye ulaştığı kaydedilmiştir (Brzostowski ve ark 1995). Laktasyon döneminde ilacın farmakokinetiğinde meydana gelen değişimler çoğu zaman gebelikteki farmakokinetik değişimlere benzerlik gösterir. Yapılan bir çalışmada gebeliğin son dönemindeki kısraklarla laktasyonun ilk dönemindeki kısraklar arasında gentamisinin dağılımı, atılımı ve ilaca maruziyette (EAA) fark gözlenmediği ifade edilmiştir (Santschi ve Papich 2000). İlaç farmakokinetiği postpartum ve laktasyon süresince hormonal kaynaklı değişimlerden, vücut yağ oranından, vücut ağırlığından ve vücut kitlesinden etkilenebilir.

1.3.1. Canlıya Ait Faktörler

Tür

Tür, sütün yağ bileşiminde farklılığa neden olan en önemli faktördür (Woodford ve ark 1986). Koyun sütü; inek ve keçi sütüne göre daha fazla yağ ve protein içerir. Yapılan iki farklı çalışmada doramektin koyun ve keçilere aynı dozaj rejiminde uygulanmış, ilaç koyun sütünde daha fazla akümüle olmuştur (Carceles ve ark 2001, Imperiale ve ark 2003). İnek ve koyunlarda danofloksasin ile yapılan çalışmalarda; danofloksasinin koyun sütündeki konsantrasyonu daha yüksek belirlenmiştir (Shem-Tov ve ark 1997, Shem-Tov ve ark 1998). Bu veriler ışığında lipofilik ilaçların keçi ve inek sütüne kıyasla yağ oranı yüksek olan koyun sütüne daha fazla akümüle olacağı ifade edilebilir. Çizelge 1.1'de farklı türlere ait sütlerin kimyasal bileşimleri sunulmuştur.

Çizelge 1.1 Farklı türlere ait sütlerin kimyasal bileşimi (%) (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004)

Tür	Su	Yağ	Protein	Toplam Kuru Madde
İnek	87,20	3,70	3,50	12,80
Keçi	87,00	4,25	3,52	13,00
Koyun	80,71	7,90	5,23	19,29
Manda	82,09	7,96	4,16	17,91

Irk

Sütün bileşimini etkileyen faktörlerden biri de ırktır. Irka bağlı süt kompozisyonundaki değişiklikler, süte ilaç geçişini de etkileyebilir. Süte ilaç geçişinde etkili olan süt yağ oranının, laktasyon dönemi süresince Ayrshire ve Guernsey ırkı ineklerde yaklaşık 3 kat, Jersey inek sütünde ise 13 kattan fazla arttığı belirlenmiştir (Kernohan ve ark 1971). Ayrıca Jersey ve Guernsey ırkı sığırların süt protein oranı yüksektir (Council 1988). Protein fraksiyonları da ırklar arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Holstein ırkı ineklerin sütleri major kazeinden fakirken, gama-kazein yönünden zengindir (Rolleri ve ark 1956). Süt proteinlerine bağlanma affinitesi fazla olan lipofilik ilaçlar bu ırkların sütünde daha çok konsantre olabilir. Çizelge 1.2'de bazı sığır ırklarına ait inek sütlerinin kimyasal bileşimleri verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı sığır ırklarına ait inek sütlerinin kimyasal bileşimleri (%) (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004)

Irk	Yağ	Protein	Su	Toplam Kuru Madde	Yağsız Kuru Madde
Guernsey	5,05	3,90	85,35	14,55	9,60
Jersey	5,05	3,78	85,47	14,53	9,48
Ayrshire	4,03	3,51	86,97	13,03	9,00
Holstein	3,41	3,32	87,72	12,28	8,87

Hastalık

Mastitis gibi meme hastalıkları, süte ilaç geçişini etkileyebilecek derecede sütün fiziksel ve kimyasal bileşimi ve meme dokusunda önemli değişimlere neden olur. Yangı ürünleri ve ödem, süt kanallarını tıkayarak ve basınç oluşturarak ilaçların dağılımını bozar. Meme dokusundaki yangı; damar geçirgenliğini ve süt bileşimini değiştirerek, ilaçların sütten plazmaya, plazmadan süte ve meme dokusuna geçişini artırır. Artışa ayrıca epitelyum hücre bütünlüğünün bozulması da katkı sağlar. Mastitisle birlikte sütte bikarbonat iyon miktarının artması pH'yı alkaliye kaydırır. Süte ilaç geçişini etkileyen diğer bir faktör ise uzun süren yangıların oluşturduğu fibrozistir. Fibrozis dokularda ilaç emilimini olumsuz yönde etkiler. Bu faktörlere bağlı olarak ilaçların sütteki farmakokinetiği mastitisle değişik derecelerde etkilenebilmektedir (Sezgin ve Tras 2016).

Mastitis genellikle süt yağ yüzdesinde düşüşe ve süt yağ bileşiminde değişikliğe neden olur (Schultz 1977, Kitchen 1981, Needs ve Anderson 1984). Mastitisin süt yağ bileşimini nasıl etkilediği konusunda görüş farklılıkları vardır. Mastitisin serbest ve kısa zincirli yağ asidi miktarlarında artışa, diğer yandan fosfolipid ve uzun zincirli yağ asitlerinde ise azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Schultz 1977, Needs ve Anderson 1984). Ayrıca mastitisin süt protein kompozisyonunu değiştirdiği; kazein, β-laktoglobulin, α-laktalbumin gibi süt proteinlerinde azalışa, kan serum protein (peynir altı suyu proteinleri) tiplerinde ise artışa neden olduğu belirlenmiştir (Schultz 1977, Kitchen 1981, Poutrel ve ark 1983, Kroeker ve ark 1985, Gehring ve Smith 2006). Grappin ve ark (1981) somatik hücre sayısındaki her log birim artışta, peynir altı suyu proteininin toplam proteine oranının % 2,08 arttığını, kazeinin toplam proteine oranının ise % 1,85 azaldığını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise kazeinin toplam proteine oranının % 2,79 azaldığı bildirilmiştir (Ng-Kwai-Hang ve ark 1982).

İlaç atılımı üzerinde önemli rolü olan süt verimi, mastitis için risk oluşturmaktadır. Klinik mastitisli sığırlarda sağlıklı olanlara göre süt veriminin azalması, sütün ilaçtan arınma süresini de uzatabilmektedir (Gruet ve ark 2001, Gehring ve Smith 2006). Sağlıklı ve mastitisli ineklere aynı dozaj rejimiyle uygulanan azitromisinin sütteki farmakokinetik parametreleri karşılaştırıldığında, mastitisli inek sütünde ilacın ortalama kalış süresinin uzadığı belirlenmiştir (Mestorino ve Errecalde 2012). Başka bir araştırmada ise sağlıklı ve mastitisli ineklere meme içi uygulanan sefasetrilin farmakokinetik parametreleri karşılaştırıldığında, mastitisli sütte sefasetrilin daha fazla konsantre olduğu ortaya konmuştur (Burmanczuk ve ark 2011). Benzimidazol grubu antelmentik bileşiklerden triklabendazol, fenbendazol ve albendazol ile yapılan çalışmada mastitis sadece albendazol metabolitlerinin (albendazol sülfoksit ve albendazol sülfon) sütteki davranışını değiştirmiş; mastitisli sütlerde EAA, biyolojik yarılanma ömrü ve süt/plazma oranları normal sütlerdekine göre daha yüksek tespit edilmiştir (Sezgin ve Tras 2016).

Akut rumen asidozu, klinik şiddetiyle orantılı olarak süt verimi ve süt yağ oranında azalmaya neden olur (Ramos ve ark 2018).

Laktasyon Dönemi, Sayısı ve Sağım

Sütle ilaç atılımı meme dokusu fonksiyonlarına bağlıdır. Süt üretimini etkileyen ırk, genetik, beslenme, fotoperiyod, laktasyon dönemi, mastitis ve sağım sıklığı gibi faktörler süt ilaç farmakokinetiğini etkiler. Bu nedenle süt ilaç konsantrasyonu son ilaç uygulamasından sonra geçen zamana göre değişebilir (Whittem ve ark 2012).

Laktasyonun farklı periyotlarında süt protein ve yağ oranındaki değişimlerin, sütle ilaç atılımını değiştirdiği ortaya konmuştur (Martinez ve Modric 2010). Kolostrum, sütte yağ oranının en fazla olduğu dönemdir. Bu dönemi takip eden 2 ay boyunca süt yağ yüzdesi azalırken ilerleyen laktasyon dönemlerinde süt yağ oranı artış gösterir. Ayrıca kolostrum; kazein, β-laktoglobulin, α-laktalbumin açısından normal süte göre 2 kat daha zengindir (Council 1988). Rogers ve Stewart (1982) ineklerde laktasyon sayısı arttıkça (5 ve daha fazla), süt yağ ve protein yüzdesinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Süt protein yüzdesindeki düşüş özellikle kazein de meydana gelmektedir (Kroeker ve ark 1985). Sütteki yağ ile protein miktarı arasında pozitif bir ilişki bulunmakta ve yağ oranı arttıkça protein oranı da artmaktadır (Bengtsson ve ark 1997). Davies ve ark (1983) laktasyon dönemi boyunca süt yağ asit bileşiminde de belirgin değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Laktasyonun ilk yarısında kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin oranı artarken uzun zincirli yağ asitlerinin oranı azalır. Aynı zamanda çevre ve beslenme, yağ asit sentez ve oranını etkiler (Council 1988). Kolostrumun normal süte dönüşümü sırasında kimyasal bileşiminde meydana gelen değişiklikler Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Emziren annelerle yapılan bir çalışmada süt veriminin ilk hafta maksimum, toplam protein miktarının emzirmenin başladığı ilk üç günde yüksek, yağ içeriğinin düşük olduğu ayrıca süt yağ seviyesinin ikinci aydan itibaren bireylerin fizyolojik özelliklerine bağlı olarak yavaş yavaş yükseldiği belirlenmiştir (Hytten 1954).

Süt yağ oranı sağım süresince artar. Sağım süresince gözlenen artış alveollerde biriken yağ globüllerinin kümelenmesinden kaynaklanmaktadır (Jenness 1985). Bu nedenle meme tamamen boşaltılmazsa süt yağ yüzdesi normalden düşük, fakat bir sonraki sağımda ise yağ miktarı normalden yüksek olacaktır. Ayrıca sağım aralıkları eşit olmadığı zaman en yüksek yağ yüzdesi en kısa aralıktan sonra elde edilir

(Wheelock 1980). Süt yağ asit tipi sağım ya da sağım aralığından etkilenmez (Christie 1979). Sağım prosedürü veya sıklığındaki değişiklikler süt protein yüzdesi üzerinde önemsiz bir etkiye sahiptir. Jenness (1985) süt proteini ile yağsız katı madde (SNF) yüzdesinin sağım sırasında değişmediğini bildirmiştir. Rogers ve Stewart (1982) ise sağım aralığı 16 saati aşmadığı sürece süt proteini ile SNF yüzdesinin değişmediğini belirtmiştir. Sağım sıklığının 2 – 3 kat artırılmasının da süt protein yüzdesinde değişiklik oluşturmadığı ortaya konmuştur (Amos ve ark 1985, DePeters ve ark 1985, Gisi ve ark 1986).

Çizelge 1.3. Kolostrumun normal süte dönüşümü sırasında kimyasal bileşiminde oluşan değişiklikler (%) (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004)

Doğumdan Sonraki Süre	Total Protein	Kazein	Yağ	Toplam Kuru Madde
0.saat	17,57	5,08	5,10	26,99
6.saat	10,00	3,51	6,85	20,46
12.saat	6,05	3,00	3,80	14,53
1.gün	4,52	2,76	3,40	12,77
2.gün	3,74	2,63	2,80	11,46
3.gün	3,86	2,70	3,10	11,86
4.gün	3,76	2,68	2,80	11,85
120.gün	3,86	2,68	3,75	12,67
168.gün	3,36	2.42	3,45	12,13

Sağımın başlangıcından sonuna doğru sütün yağ oranı giderek artar. Memedeki toplam sütün 1., 2., 3. ve 4. kısımlarının yağ oranları, sırasıyla % 2; % 2,7; % 3,7 ve % 6,4 gibi büyük farklılıklar gösterir. Bunun nedeni süt yağ globüllerinin memeden yavaş akmasıdır. Bu nedenle özellikle süt verimi yüksek olan ineklerin mümkün olduğunca sağımları belirli bir zaman içinde (yaklaşık 15 dakika) yapılmalı ve meme tam olarak boşaltılmalıdır. Meme tam olarak boşaltılmadığı ve sağım kısa sürede tamamlanmadığında süt yağ oranı düşecek bu da ekonomik kayba neden olacaktır (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004).

Beslenme ve Çevre

Asetik ve bütirik asit gibi uzun zincirli yağ asitleri süt yağının oluşmasında temel bileşenlerdir. Süt yağ yüzdesi; asetik ve bütirik asit oranı ile doğru, propiyonik asit oranı ile ters orantılıdır. Sutton (1980) süt yağında meydana gelen değişikliklerin % 60'ının rumende propiyonat oranındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Asetat/propiyonat oranı ile süt yağı arasında pozitif ilişki vardır. Süt yağ oranında doğrusal artış, asetat/propiyonat oranı 2,2'nin üzerine çıktığında gözlenir

(Davis 1978), dolayısıyla propiyonat üretimini artıran diyetler süt yağı üzerinde büyük etkiye sahiptir. Asetat/propiyonat oranını yemin fiziksel yapısı, besleme şekli, yem kalitesi, kaba yem/konsantre yem oranı etkiler (Sutton 1980). Rasyonlardaki konsantre yem oranı kaba yem oranına göre fazla ise süt yağı azalma eğilimindedir (Sutton 1980). Yemlerle alınan kısa ve orta zincirli yağ asit konsantrasyonlarının azalıp, uzun zincirli yağ asit miktarlarının artması da süt yağ oranını olumsuz etkiler (Banks ve ark 1983). Yemin fiziksel boyutu küçüldükçe süt yağı da azalır. İnce öğütülmüş yemler rumen fermentasyonunda propiyonat oranını artırmaktadır (Sutton 1980). Ayrıca yemlere metiyonin gibi yem katkı maddelerinin eklenmesi süt yağ oranını arttırmıştır (Lundquist ve ark 1983).

Süt yağ oranı mevsime bağlı olarak da değişkenlik gösterebilir; bu oran yaz aylarında kış aylarına göre % 0,4 daha az etkilenir (Jenness 1985). Diğer yandan yaz aylarında yüksek çevre sıcaklıkları süt yağ asidi çeşidini de etkileyebilir. Yaz aylarında palmitik, stearik ve oktadekanoik asit düzeyi kışın aynı ineklerden elde edilen süt yağ asit içeriğine göre daha düşük olma eğilimindedir (Christie 1979). Süt protein yüzdesi ve verimi ilkbahar ve yaz aylarında daha yüksektir (Ng-Kwai-Hang ve ark 1982, Keown ve ark 1986). Aşırı soğuk veya sıcak havanın süt yağ ve toplam kuru maddesini en fazla % 7 oranında etkilediği belirtilmektedir (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004). Aylara bağlı olarak sütün bileşimindeki yüzde değişimler Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Baklagiller içinde en yüksek yem değerine sahip olan soya, hayvan beslemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Soyanın, süte ilaç geçişinde etkili olan BCRP transmembran proteini üzerine inhibitör etkisi olduğu ortaya konulmuştur (Imai ve ark 2004, Merino ve ark 2010).

Çizelge 1.4. Aylara bağlı olarak sütün bileşimindeki değişimler (%) (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004)

Ay	Yağ	Protein	Yağsız Kuru Madde	Toplam Kuru Madde
Ocak	4,21	3,36	9,26	13,57
Şubat	4,22	3,62	9,23	13,45
Mart	4,16	3,56	9,25	13,41
Nisan	4,10	3,54	9,27	13,37
Mayıs	4,10	3,53	9,27	13,37
Haziran	3,96	3,45	9,17	13,13
Temmuz	3,95	3,46	9,16	13,12
Ağustos	3,95	3,54	9,24	13,18
Eylül	4,10	3,62	9,28	13,38
Ekim	4,24	3,66	9,29	13,53
Kasım	4,27	3,69	9,28	13,55
Aralık	4,30	3,65	9,29	13,39
Ortalama	4,14	3,58	9,25	13,39

*Değerler altı sığır ırkı (Ayrshire, Jersey, Guernsey, Brown Swiss, Holstein ve Guernsey Holstein melezi) sürüsünden elde edilmiştir.

Hormonal Faktörler

Süt yağ yüzdesi üzerine hormonların etkisi tam olarak bilinmemektedir**.** Adrenalin ve noradrenalinin lipolitik aktiviteyi arttırdığı bilinmekle birlikte, süt yağı üzerindeki etkileri ortaya konulamamıştır. Eppard ve ark (1985) ineklere eksojen büyüme hormonu uygulandığında hem süt yağ yüzdesi hem de süt bileşiminin değiştiğini, Bauman ve ark (1985) ve Peel ve ark (1985) ise süt bileşiminde değişiklik olmaksızın süt verimini arttırdığını belirtmişlerdir. Düşük dozlarda (5 ve 10 IU/gün) büyüme hormonu, yağ bileşiminde değişikliğe neden olmadan süt yağ oranını azaltırken yüksek dozlarda (50 ve 100 IU/gün), yağ bileşiminde endojen yağ asidi ve α-laktalbumin seviyesini arttırmıştır (Eppard ve ark 1985). Sutton (1980) tiroprotein (tiroksinin etkisine benzer etkiye sahip iyotlanmış protein), fitoöströjenik 1,3-butandiol ve glukokortikoidlerin süt yağ yüzdesini arttırmadığını bildirmiştir.

Büyüme hormonu cinsiyet özelliklerinde değişiklikler yanında çeşitli doku ve organlarda tümör insidansında artış, infertilite, kalp krizi, karaciğer yetmezliği gibi sağlık problemlerine yol açtığından ülkemizde 1992 yılında gıda amaçlı üretilen hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır (Çetinkaya ve Muş 2010).

1.3.2. İlaca Ait Faktörler

İlaçların fizikokimyasal özellikleri doku ve süt gibi biyolojik sıvılara ilaç geçişinde rol oynayan en önemli faktörlerdendir. Bu faktörler aşağıda detaylı olarak incelenmiştir.

Proteine Bağlanma

İlaçlar dolaşımda proteinlere bağlı ve serbest halde bulunur. Proteine bağlı ilaç farmakolojik olarak etkisizdir ancak ilaç için rezervuar olarak görev yapar. Proteine bağlı ilaç ile serbest ilaç denge halindedir. Proteine bağlı ilaçların dokuya dağılımları sınırlı olduğu için sütteki konsantrasyonları da düşük olacaktır. Albümine özellikle asidik ilaçlar, α_1-asit glikoproteinlere özellikle bazik ilaçlar bağlanır (Agatonovic-Kustrin ve ark 2002).

Sütte meme epitelyal hücreleri tarafından sentezlenen ve ilaç moleküllerini bağlama potansiyeline sahip spesifik proteinler de (kazein, laktalbümin, α ve β laktoglobulin) bulunur. Süt protein oranının % 3,5-5,23 arasında değiştiği, bu oranın türlerde farklılık gösterdiği ve inek süt proteinin % 86'sını kazeinin oluşturduğu belirtilmektedir (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004, Bobe ve ark 2007, Barłowska ve ark 2011). Süt proteinlerine yüksek oranda bağlanan ilaçların atılımı hızlı ve dokuya dağılım yetenekleri azdır (Gehring ve Smith 2006).

İyonizasyon ve pH

Zayıf asidik veya bazik karakterdeki ilaçların sulu ortamda iyonize olma oranları, pKa değerleri ve ortam pH'sı ile ilgilidir. Non-iyonize ve lipofilik ilaçlar biyolojik membranları kolaylıkla geçer.

Plazma pH'sı sabit olup 7,4 civarında iken süt pH'sı asidiktir. Gangrenöz mastitis haricinde, mastitisli sütlerin pH'sı alkaliye kayar. Sütteki ilacın iyonizasyon derecesi enfeksiyonun şiddetine de bağlıdır (Gruet ve ark 2001).

Zayıf asidik ve bazik ilaçların sütle atılımları; ilacın pKa ve plazma konsantrasyonları ile süt ve plazma pH'sı tarafından belirlenir. Süt pH'sı plazmadan daha asidik olduğundan, zayıf bazlar asitlere göre daha çabuk süte geçerler. Ancak yangılı dokularda artan damar geçirgenliği, meme içi uygulamalarda sütten plazmaya ve plazmadan süte ilaç geçişini arttırır (Agatonovic-Kustrin ve ark 2002).

pKa'nın sütteki ilaç konsantrasyonuna etkisi sülfonamidlerle yapılan çalışmada ortaya konulmuş, düşük pKa (5,4)'ya sahip sülfasetamidin S/P oranı 0,08; yüksek pKa (10,4)'ya sahip sülfanilamidin S/P oranı ise 1,00 olarak hesaplanmıştır (Sisodia ve Stowe 1964).

Moleküler Ağırlık

İlaç ve diğer kimyasalların süte geçişi, molekül büyüklüğü ve molekül ağırlığıyla ilişkilidir. Molekül büyüklüğü ve ağırlığı küçük olan ilaçlar süte daha kolay geçerler.

Su ile dolu membran porları 100 molekül ağırlığındaki maddelerin hareketine hidrostatik veya osmotik basınç farkıyla izin verirler. Molekül ağırlığı 120 olan etanol plazmadan süte hızlı şekilde geçerek sütte belli bir konsantrasyon oluşturur. Büyük moleküler ağırlığa sahip bileşikler ise intersellüler difüzyon ile süte geçerler, bu şekilde alveoler hücrelerin süte geçişi önlenir. Molekül ağırlığı 600 veya daha büyük olan ilaçların yüksek konsantrasyonlarda süte geçmesi mümkün değildir. Bu nedenle heparin (30,000) ve insülin (6,000) gibi yüksek molekül ağırlığa sahip maddeler süte geçemez (Agatonovic-Kustrin ve ark 2002). Knutsson ve Sperber (1961) moleküler ağırlığı 3000-4000 olan polietilen glikolün meme içi uygulanmasından sonra meme bezinden emilmediğini belirtmişlerdir.

Çözünürlük

Memenin alveol ve epitelyum tabakası ağırlıklı olarak lipid yapıdadır ve kolostrumun üretilmeye başladığı ilk birkaç gün çok geçirgendir. Bu nedenle ilaçların su ve yağdaki çözünürlüğü süte geçişi etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Lipofilik ilaçların biyolojik membranlardan emilimi ve dokulara dağılımı iyidir (Ziv 1980). Laktasyonun son sağımında infüzyon tarzında uygulanan lipofilik ilaçların sütten yüksek oranda atıldığı, bunun lipofilik ilaçların hızlı emiliminden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Ziv ve Sulman 1975). Aynı araştırıcılar, süt plazmadan daha fazla yağ içerdiğinden lipofilik ilaçların süte geçme eğiliminin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Uygulama Yolu

Uygulanan her ilaç değişik düzeylerde süte geçebilmektedir. Plazma ilaç konsantrasyonu uygulama yolu ile ilişkilidir. Oral yolla uygulanan ilaçların presistemik eliminasyona (mide-barsak enzimleri, pH'ya maruziyet, bağırsak florası, transmembran proteinle etkileşim) uğraması ilacın plazma konsantrasyonunu,

dolayısıyla süt konsantrasyonunu da azaltacaktır. Parenteral uygulamalarda ise emilim oldukça hızlıdır. Parenteral uygulanan ilaçların, oral yolla uygulanan ilaçlara göre sütle atılım yüzdesi daha fazladır (Imperiale ve ark 2004). Farklı parenteral yollarla (damar içi, kas içi, deri altı) uygulanan ilaçların sütte oluşturdukları konsantrasyon karşılaştırıldığında, damar içi uygulanan ilaçların sütte daha fazla akümüle olduğu ortaya konmuştur (Fernández-Varón ve ark 2006, Mestorino ve Errecalde 2012).

İlaç-İlaç ve İlaç-Besin Etkileşimi

Ksenebiyotik ve biyolojik maddeler BCRP transmembran proteinin fonksiyonlarında değişikliklere (inhibisyon ve indüksiyon) neden olarak ve onunla yarışmaya girerek bu taşıyıcı proteinin substratlarının sütteki konsantrasyonlarını değiştirmektedirler. Real ve ark (2011) ivermektin ile danofloksasinin süt düzeyindeki etkileşimini incelemişler ve ivermektinin BCRP transmembran proteinini inhibe ederek danofloksasinin sütte konsantrasyonunu azalttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde, albendazol ve triklabendazolun, enrofloksasin ve moksidektinin süt farmakokinetik parametrelerinde değişikliğe neden olduğu ortaya konmuştur (El-Sooud 2003, Barrera ve ark 2013).

İlaç-ilaç etkileşimlerinde olduğu gibi BCRP düzeyindeki ilaç-besin etkileşimlerinin de ksenobiyotik ve biyolojik maddelerin süte geçişini değiştirdiği çalışmalarla ortaya konmuştur. Protein kaynağı olarak hayvan yemlerinde yaygın olarak kullanılan soya; flavonoidlerden zengin olup, 100 g soya 100-200 mg izoflavon (daidzein ve genistein) içerir. Yapılan çalışmalarla daidzein ve genisteinin BCRP substratı olan danofloksasin, enrofloksasin ve nitrofurantoinin süte geçişini azalttığı ortaya konmuştur (Pulido ve ark 2006, Perez ve ark 2009, Perez ve ark 2013). Sigara dumanı ve kızarmış ette yüksek oranda bulunan kanserojenik etkili 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridin (Phlp) düzeyinin yabanıl farelerle karşılaştırıldığında BCRP -/- farelerin sütünde düşük olduğu belirlenmiştir (Jonker ve ark 2005). van Herwaarden ve ark (2007) yabanıl farelerin sütüne riboflavinin BCRP -/- farelere göre 60 kattan daha fazla geçtiğini tespit etmiştir. Flavin mononükleotid (FMN) düzeyi yabanıl farelere kıyasla BCRP -/- farelerde 6 kat daha düşük belirlenmiştir. Flavin adenin dinükleotid (FAD) düzeyinde ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı çalışmada BCRP -/- farelerde farklı vitaminlerin (vitamin A,

B_1, B_6, B_9, B_{12}, C, E, H, K_1) sütte konsantrasyonları araştırılmış, yalnızca biotin (vitamin H) BCRP -/- farelerin sütünde 3 kat daha az bulunmuştur. Et ve balık gibi protein içeren gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan kanserojenik ve mutajenik etkili heterosiklik aminlerin (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) ve mikotoksinlerden aflatoksin M_1'in süte geçtiği; yabanıl farelerde bu bileşiklerin süt/plazma oranlarının BCRP -/- farelere kıyasla sırasıyla 3,4; 2,6 ve 3,8 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (van Herwaarden ve Schinkel 2006). PCB 126, süt ve süt ürünlerini kontamine edebilen ve insan kanserojeni olarak bilinen dioksin benzeri poliklorlu bifenil (PCB) türevidir. Manzini ve ark (2017) PCB 126'nın Madin-Darby canine kidney-sığır ABCG2 (MDCKII-bABCG2) hücre kültüründe Hoechst H33342'nin bABCG2 aracılı atılımını arttırdığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada, PCB126 ile önceden muamele edilmiş hücrelerin AFM_1 ile inkübe edilmesinin ardından PCB 126'nın, bABCG2 efluks aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. Manzini ve ark (2017) AFM_1'in, bABCG2 substratı olabileceğini belirtmektedirler. Fumitremorgin C (FTC) ve ABCG2 inhibitörü olarak bilinen equol, MDCKII-bABCG2 ve keçi ABCG2 (cABCG2) hücrelerinde PhIP taşınmasında belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan, sadece equol, bABCG2 ve cABCG2'yi inhibe ederek enrofloksasinin geçişinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, FTC ve equol, MDCKII-bABCG2 hücrelerinde sodyum salisilatın efluks oranını düşürürken, MDCKII-cABCG2 hücrelerinde değişiklik gözlenmemiştir (Wassermann ve ark 2013). Mahnke ve ark (2016) bABCG2 substratı olarak bilinen monepantel metabolitinin (monepantel sülfon); bABCG2 ekspre edebilen MDCKII hücrelerinde FTC, enrofloksasin, oksfendazol ve moksidektin tarafından bu proteini ekspre edemeyen MDCKII hücrelerine kıyasla önemli ölçüde inhibe edildiğini bulmuşlardır.

1.4. Hidrofilik ve Lipofilik İlaçların Sütte Dağılımları

Süt; protein, laktoz, elektrolit ve yağ damlacıklarının oluşturduğu su fazlı bir süspansiyondur. İlaçlar sütte laktalbumin gibi proteinlere bağlı, yağ globülleri içinde çözünmüş veya aköz kısımda serbest olarak bir veya birden fazla süt bileşeninde bulunabilirler (Craig ve Stitzel 2004).

Yağda çözünen ilaçların genellikle sütün lipid fazında konsantre olduğu ve süt proteinlerine bağlandığı, ancak bu ilaçların süt proteinlerine bağlanma oranlarının

plazma proteinlerine bağlanma oranından daha düşük olduğu belirtilmektedir (Yurchak ve Jusko 1976, Bitzen ve ark 1981, Syversen ve Ratkje 1985, Atkinson ve Begg 1988a). Fenotiyazin, benzodiazepin, trisiklik antidepresanlar, β-blokörler, kalsiyum antagonistleri gibi lipofilik ilaçların sütün lipid fazında daha çok konsantre olduğu belirlenmiştir. Süt bileşimi laktasyon periyodu ve beslenmeden belirgin şekilde etkilendiğinden (Hytten 1954, Hall 1975), yüksek oktanol/su partisyon katsayısına (log oct*P'app*) sahip ilaçların süt/plazma konsantrasyon oranı doğrudan sütün lipid içeriğinden etkilenebilir (Atkinson ve Begg 1988b). Partisyon katsayısı (log *P*) ayrışma ya da iyonlaşma olmadan bileşiğin yapısını oluşturan fonksiyonel ve karbon gruplarının lipofilikliğini tanımlar (Manners ve ark 1988). Log *P* >1 olması ilacın lipofilitesini belirtir (Grabowski ve Jaroszewski 2009).

Sütteki yağ konsantrasyonu, ilaçların yanında 2,3,7,8-tetraklorodibenzo- p-dioksin gibi aşırı derecede toksik ksenobiyotiklerin de sütle atılımında önemli rol oynar (Rogan ve ark 1980, Jensen ve Hummel 1982). Syversen ve Ratkje (1985) yaptıkları çalışmada diazepam ve daha az oranda fenitoinin sütün yağlı kısmında konsantre olduğunu, disopiramid, fenobarbital ve varfarinin ise sütün yağlı ve yağsız kısmında eşit olarak dağıldığını ortaya koymuşlardır. Diazepam, fenitoin ve varfarin plazma proteinlerine % 90'dan fazla bağlanır. Fenitoin ve özellikle diazepamın plazma proteinlerine bağlanma oranlarıyla sütün yağlı kısmında konsantre olmaları (sırasıyla 0,13 ve 0,62) arasında ilişki olabileceği belirtilmiştir. Fenobarbital ile disopiramidin hem plazma proteinlerine bağlanma oranı hem de sütün yağlı kısmına dağılım oranı düşük bulunmuştur. Mann ve ark (1950) diklorodifenil trikloretan (DDT) ile beslenen ineklerin sütünde DDT miktarını tam süt ve tereyağında sırasıyla 7,5 ve 150 ppm olarak belirlemişlerdir. Sekiz ppm düzeyinde DDT içeren otu yiyen hayvanların sütlerinde 3 ppm ve bu sütlerden hazırlanan tereyağlarında ise 65 ppm'e kadar DDT bulunabilmektedir (Kaya ve ark 2002). İnek süt ve süt ürünlerinde triklabendazol kalıntılarının araştırıldığı çalışmada tam sütte triklabendazol ve metabolitlerinin konsantrasyonu 1.082, kremada 7.589, tereyağında 9.177 ve yağsız sütte ise 423 µg/kg olarak tespit edilmiştir (Power ve ark 2013a). Laktasyondaki ineklere nitroksinil ve oksiklozanid-levamizol kombinasyonu uygulanarak, bu ilaçların sütün krema ve yağsız süt kısımlarındaki konsantrasyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmada, nitroksinil ≥ % 95, oksiklozanid > % 95 ve levamizol % 97 oranında yağsız sütte konsantre olmuştur (Power ve ark 2012).

Başka bir araştırmada, laktasyondaki ineklere deri altı yolla klosantel uygulandıktan sonra iki farklı zamanda krema ve yağsız sütte klosantel konsantrasyonu belirlenmiş, sonuçta her iki zaman noktasında da klosantelin kremada daha fazla akümüle olduğu tespit edilmiştir (Power ve ark 2013c). Power ve ark (2014) inek sütünde florfenikolün kremaya göre yağsız sütte daha fazla konsantre olduğunu belirlemişlerdir. Laktasyondaki ineklerde yapılan çalışmada, rafoksanid tam süte göre peynir ve tereyağı gibi yağ bazlı süt ürünlerinde sırasıyla 6 ve 14 kat daha fazla bulunmuştur (Power ve ark 2013b).

Laktasyondaki keçilere meme ve kas içi yolla uygulanan benzilpenisilin, spiramisin, kloramfenikol, dihidrostreptomisin ve tetrasiklinin yağsız süt, kazein ve kremadaki konsantrasyonları ölçülmüş sonuçta, lipofilik özellikteki kloramfenikol ve tetrasiklinin, benzilpenisilin ve dihidrostreptomisine göre kremada daha fazla akümüle olduğu, sütün bu kısımlarındaki oranın uygulama yoluna bağlı olduğu ayrıca kazeindeki miktarın uygulama yolundan bağımsız olduğu, dihidrostreptomisin ve tetrasiklin kazeinde yüksek, benzilpenisilin ise düşük oranda biriktiği tespit edilmiştir (Ziv ve Rasmussen 1975).

İn vitro olarak yürütülen çalışmada oksitetrasiklin, penisilin G, eritromisin, sülfadimetoksin, ketoprofen, tiyabendazol ve ivermektinin yağsız süt ve kremadaki birikme özellikleri araştırılmış sonuçta; ilaçların yağsız süt/tam süt ve krema/tam süt oranları sırasıyla oksitetrasiklin için 1,05 – 0,20; penisilin G için 1,03 – 0,26; eritromisin için 1,01 – 0,34; sülfadimetoksin için 0,97 – 1,10; ketoprofen için 1,04 – 1,10; tiyabendazol için 0,82 – 4,73 ve ivermektin için 0,14 – 18,42 olarak belirlenmiştir (Hakk ve ark 2015).

1.4.1. Amoksisilin

Amoksisilin; klinikte sodyum ve trihidrat tuzu şeklinde kullanılmakta olup, amoksisilin trihidrat beyaz renkte, kokusuz, kristalize toz halindedir (Kaya ve ark 2007). Moleküler formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, moleküler ağırlığı amoksisilinin 365,40; amoksisilin trihidratın 419,4; pKa1 (asit) değeri 3,2; pKa2 (primer amin) değeri 11,7; log *P* değeri ise 0,75'dir (Ramos ve ark 2018). Amoksisilinin iki ana metaboliti vardır bunlar; amoksilloik asit ve amoksisilin piperazin-2,5-dion (diketopiperazin)'dur. Bu metabolitlerin antibakteriyel etkisi yoktur ancak amoksilloik asit alerjik reaksiyonlara neden olabilir (Reyns ve ark 2007).

Amoksisilin, β-laktam grubundan gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili yarı-sentetik bir antibiyotiktir. Gastrointestinal sistemde kararlı yapıya sahiptir ve oral yolla alındığında, diğer aminopenisilinlere göre daha fazla absorpsiyona uğrar. Solunum, gastrointestinal, üriner sistem ve derideki bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi için beşeri ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılır. Amoksisilin, bakteri kaynaklı β-laktamaz ve penisilinazlar tarafından etkisizleştirildiğinden, penisilinaz inhibitörü olan klavulanik asit ile hazırlanmış formülasyonları yaygın kullanılır (Ramos ve ark 2018).

Amoksisilin oral uygulandıktan sonra atlar hariç diğer hayvanlarda sindirim kanalından çok iyi emilir ve 2 saat içinde plazmada maksimum konsantrasyona erişir. Kas içi uygulandığında, uygulama yerinden % 60-80 oranında emilir. 10 mg/kg dozda uygulandığında 24 saat süre ile plazmada amoksisilin konsantrasyonu 0,5 µg/mL'nin üzerinde kalır. Uzun etkili formülasyonlarda bu süre 48 saate kadar uzar. Plazma proteinlerine % 30 oranında bağlanır. Amoksisilinin sığırlarda biyolojik yarı ömrü hakkında sağlıklı bir veri olmamasına rağmen, kas içi uygulama sonrası bu farmakokinetik parametre 8,8 saat olarak bulunmuştur (Nouws ve ark 1986). Dağılım hacmi sığırlarda 0,4-0,55 L/kg dolayındadır. Vücuda giren amoksisilinin yaklaşık % 50'si değişmemiş halde idrarla atılır (Kaya ve ark 2007).

Amoksisilin ineklere meme içi (5 g) uygulandıktan sonra süt örnekleri 3, 4, 5 ve 6. gün toplanmıştır. Uygulamadan sonraki 3.gün sütte 2,7 ng/mL amoksisilin tespit edilirken, 6.gün sütte amoksisilin konsantrasyonu 1,2 ng/mL'ye düşmüştür (Bruno ve ark 2001). Laktasyondaki bir hayvana meme içi, her bir meme bölümüne toplamda 250 mg amoksisilin trihidrat (62,5 mg/10 mL) uygulanmış, 72.saatte sütte ilaç konsantrasyonu tespit limitinin altına düşmüş ve tespit limiti 1,1 ng/mL olarak belirlenmiştir (Ang ve ark 1997). Amoksisilin trihidrat beş gün süre ile günde bir kere, kas içi, 11 mg/kg dozda beş sütçü ineğe uygulandıktan sonra süt örnekleri 12 saat ara ile dört gün süre ile alınmıştır. Sütte amoksisilin konsantrasyonu 36 ve 48.saatte yüksek belirlenmiştir (Ramos ve ark 2018). Bir başka çalışmada ineklere 24 saat ara ile 5 gün süreyle 7 mg/kg amoksisilin kas içi uygulanmıştır. Süt örnekleri 12 saat ara ile 8 gün toplanmıştır. Ortalama amoksisilin konsantrasyonu ilk ilaç uygulamasından 12 saat sonra 9,24; 24 saat sonra ise 3,17 µg/kg belirlenmiştir. Sütte amoksisilin konsantrasyonu tekrarlanan dozlarda artarken her ilaç uygulamasından

24 saat sonra ise hızla 4 µg/kg'ın altına düşmüştür. Son uygulamadan 12 saat sonra sütte amoksisilin konsantrasyonu 5,84; 36 saat sonra < 4 ve 72 saat sonra yaklaşık 0,46 µg/kg ölçülmüştür (Ramos ve ark 2018). Amoksisilin trihidrat ineklere yüksek doz (22 mg/kg), kas içi uygulandıktan sonra süt örnekleri 156.saate kadar alınmış ve sütte amoksisilin konsantrasyonunun yasal arınma süresince (96 saat) 10 µg/L'yi geçmediği belirlenmiştir (Anderson ve ark 1996). Koyunlarda yapılan çalışmada amoksisilin 24 saat ara ile 5 gün süreyle 7 mg/kg dozda kas içi uygulanmıştır. Sütte amoksisilin konsantrasyonu ilk ilaç uygulamasından 12 saat sonra 23,1; ikinci dozdan sonra 12 saat sonra 33,0 µg/kg belirlenmiştir. Son ilaç uygulamasının ardından sütte amoksisilin konsantrasyonu hızla düşmüş ve 60 saat sonra sütte ortalama amoksisilin konsantrasyonu < 4 µg/kg tespit edilmiştir (Ramos ve ark 2018). Bir başka çalışmada koyunlara 140 mg amoksisilin trihidrat ve 35 mg klavulanik asit içeren çözelti kas içi, 24 saat ara ile, ayrıca her meme bölmesine 5 ardışık sağım boyunca amoksisilinin lokal formülasyonu uygulanmıştır. Tedaviden sonra süt örnekleri 24 saat ara ile 8 gün süreyle alınmış ve 192.saatte ortalama 4 µg/kg amoksisilin belirlenmiştir (Pengov ve Kirbis 2009). Benzer bir çalışmada koyunlara amoksisilin trihidrat + potasyum klavulanat + prednizolon içeren formülasyon meme içi uygulanmış, uygulamadan 120 saat sonra ortalama amoksisilin konsantrasyonu 0,0; son örnekleme zamanında (168. saatte) ise 0,0025 µg/mL ölçülmüştür (Buswell ve Barber 1989). Keçilerde yapılan çalışmada amoksisilin 8 saat ara ile üç kez meme içi uygulanmasını takiben sütte en yüksek amoksisilin konsantrasyonu son infüzyondan 16 saat sonra 83,3; 64 saat sonra ise 0,06 µg/mL tespit edilmiştir (Buswell ve ark 1989).

Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'na göre amoksisilinin sütte bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limit (MRL) değeri 4 µg/kg ve parenteral uygulama sonrası sütün kullanımı için yasal bekleme süresi 4 gün (8 sağım) dür (Commission ve No 2010).

1.4.2. Tilozin

Makrolid grubundan bir antibiyotik olan tilozin; 1960'da Mac Fuire tarafından *Strep. fradie* kültürlerinden elde edilmiştir. Farmasötik ürünlerinde baz, tartarat ve fosfat halinde bulunur. Beyaz, kirli-beyaz renkte, kuru toz halindedir. Zayıf bazik tepkimelidir ve asitlerle tuz oluşturur (Kaya ve ark 2007). Suda çok az, alkol dahil

diğer organik çözücüler ve yağda iyi çözünür (Dudrikova ve ark 1999). Moleküler formülü $C_{46}H_{77}NO_{12}$, moleküler ağırlığı 916,1; pKa değeri 7,1, log *P* değeri 1,93'tür (Gingerich ve ark 1977, Lewicki 2006). Tedavide kullanılan tilozin yaklaşık ≥ % 80 tilozin A'dan oluşmakla birlikte cüzi miktarda desmikosin (tilozin B), makrosin (tilozin C), relomisin (tilozin D) gibi minör bileşikleri de ihtiva eder ve laktenosin (tilozin L), 5-O-mikaminosiltilonolid (OMT) ve desmisinosil tilozin (DMT) gibi metabolitleri vardır (Kirst ve ark 1988, Debono ve ark 1989, Kirst ve ark 1989, Roets ve ark 1993, Kanfer ve ark 1998, Fletouris 2000).

Tilozin, *Mycoplasma* ve Gram pozitif bakterilere karşı bakteriyostatik etkili bir antibiyotiktir. Sığır ve danalarda uterus, akciğer hastalıkları ve çatal çürüğü, koyun ve keçilerde akciğer, göğüs zarı hastalıkları ve abort gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Marsteller ve ark 2001). Besi ve laktasyonda olmayan sütçü sığırlarda *Fusobacterium necrophorum* ve *Actinomyces pyogenes*'in neden olduğu difteri, metritis, mastitis, pododermatitis ve hepatik apselerin tedavisinde kullanılır (Kaya ve ark 2007).

Oral ve parenteral uygulamadan sonra iyi emilir ancak atılımı yavaştır. Tilozin % 25-47 oranında plazma ve % 15 oranında süt proteinlerine bağlanır (Ziv ve Sulman 1973, Gingerich ve ark 1977). Birçok hayvan türünde tilozinin yarı ömrü 3-4 saat, dağılım hacmi 1-7 L/kg arasında değişir. Dolaşıma geçen ilaç, beyin omurilik sıvısı hariç tüm vücut kesimlerine etkili olabilecek yoğunluklarda geçer. Tilozin süte de kolay geçer; sütteki konsantrasyonu plazmadakinin 5 katına çıkabilir. Vücudu başlıca safra, süt ve idrarla terk eder (Kaya ve ark 2007).

Laktasyondaki ineklerde yapılan bir çalışmada tilozin damar içi, 12,5 mg/kg/gün dozunda uygulanmış ve sütteki tilozin konsantrasyonunun örnekleme süresince plazmadan 5 kat yüksek olduğu belirlenmiştir (Gingerich ve ark 1977). Ziv ve Sulman (1973), koyun ve ineklerde bu ilacın kas içi farmakokinetiğinin benzer olduğunu ayrıca ilaç uygulamasından 90 dakika sonra sütteki tilozin konsantrasyonunun plazmadan yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Koyunlarda yapılan bir başka çalışmada yukarıdaki çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiş ve ilacın sütteki t_{max} değeri 6 saat bulunmuştur (Al Wabel 2008). Keçilere 15 mg/kg tilozini damar içi ve kas içi uygulayarak dağılım kinetiğini karşılaştıran Atef ve ark

(1991), kas içi ve damar içi uygulamalar sonrasında sütte tilozin konsantrasyonunu plazmadan sırasıyla 6. ve 1.saatte yüksek tespit etmişlerdir.

EMA'ya göre tilozinin sütte bulunmasına izin verilen MRL değeri 50 µg/kg ve parenteral uygulamalarda sığır, koyun ve keçide süt tüketimi için yasal arınma süresi 4 gün (8 sağım) dür (Commission ve No 2010).

1.5. Sütte Kalıntı ve Ekonomik Yönden Önemi

Gıda amaçlı üretilen hayvanlarda veteriner ilaçların kullanımı, besin değeri taşıyan doku ve organlar ile bunlardan elde edilen ürünlerde insanlarda sağlık problemine neden olabilen kalıntılara neden olur. İnsan sağlığını korumak amacıyla her ilaç için hayvansal doku ve ürünlerde resmi kuruluşlarca MRL diye tanımlanan zararsız ilaç düzeyleri ve yasal arınma süreleri belirlenmiştir. Hayvansal gıdalarda ilaç kalıntılarının en büyük nedeni olarak etiket dışı ilaç kullanımı gösterilmektedir (Chevance ve ark 2017).

Süt ve süt ürünleri hayvansal gıdalar içerisinde en yaygın tüketilen grubu oluşturur. Sütte bulunan ilaç kalıntıları penisilin alerjisi olgusunda olduğu gibi duyarlı kişilerde ölümle sonuçlanabilen sağlık problemleri yanında, peynir gibi süt ürünleri yapımında kullanılan starter kültürleri olumsuz etkileyerek süt ürünlerinde kalite bozulmasına ve dolayısıyla ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Hayvansal ürünlerdeki çeşitli ısıl ve pişirme işlemlerine dirençli ilaç ve kimyasal madde kalıntıları mutajenik, karsinojenik, teratojenik etkilere, cinsiyet özelliklerinde ve davranışlarında değişikliklere, üreme bozukluklarına, bakteri, parazit ve protozoa türleri arasında dirençli tür ve suşların ortaya çıkmasına böylece ilaçların sağaltıcı ve kullanım süresinde kısalmaya ve konakçı sindirim kanalı mikroflorasının bozulmasına neden olurlar (De Vries 1996, Gaylor ve ark 1997, Schwarz ve ark 2001, Claycamp ve Hooberman 2004, Samanidou ve Nisyriou 2008).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Derin dondurucu (-80 °C, VWR, ABD)
- pH metre (İnolab, WTW series, Terminal 740, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Gerhardt Bonn, Almanya)
- Saf su sistemi (aqua Max-Ultra System, Younglin Instrument Co. Ltd, Kore)
- Santrifüj (Sigma, 3K 18, Almanya)
- Hassas terazi (Metler Toledo, AG204, İsviçre)
- Ultrasonik su banyosu (Elma, Transsonic Digital, ST 840 DH, Almanya)
- Vorteks (VWR, ABD)
- Solid faz ekstraksiyon için vakum manifold sistem (Alltech, ABD)
- UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-UV, CBM-20A sistem denetleyicili LC-20AD, DGU-14A degasser, SIL 20AD autosampler, CTO 10A kolon fırını, SPD-10A UV-VIS dedektör, Shimadzu, Japonya)
- Kolon (Gemini C18, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, ABD)
- SPE kartuş (Strata X, Phenomenex, ABD)

2.2. Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve İlaçlar

- Asetonitril (VWR, ABD), metanol (VWR, ABD), hidroklorik asit (Carlo Erba, İspanya), trifloroasetik asit (Merck, Almanya), amonyum asetat (Merck, Almanya), ultra saf su (18,2 mΩ), amoksisilin trihidrat (% 100,2; Anadolu İlaç ve Kimya San. A.Ş, Türkiye), tilozin baz (% 97,5; Anadolu İlaç ve Kimya San. A.Ş, Türkiye)
- Hayvanlara uygulama için amoksisilin trihidrat preparatı olarak Synulox® enjeksiyonluk süspansiyon (Amoksisilin trihidrat 140 mg/mL, klavulanik asit 35 mg/mL, 100 mL, Pfizer, Türkiye), tilozin baz preparatı olarak da Tylan® 200 enjeksiyonluk çözelti (Tilozin baz 200 mg/mL, 100 mL, Lilly, Türkiye)
- Mobil Faz A: % 0,1 trifloroasetik asit solüsyonu hazırlandı ve degaze edildi.
- Mobil Faz B: % 100 asetonitril degaze edildi.
- 1 M hidroklorik asit su ile hazırlandı.
- 0,1 M amonyum asetat metanolde hazırlandı.

- % 0,1'lik trifloroasetik asit su ile hazırlandı.
- % 25'lik asetonitril su ile hazırlandı.
- % 20'lik asetonitril su ile hazırlandı.
- % 50'lik metanol su ile hazırlandı.
- Amoksisilin stok solüsyonu 1000 µg/mL olacak şekilde % 20'lik asetonitrilde, tilozin stok solüsyonu 1000 µg/mL olacak şekilde % 50'lik metanolde çözdürülerek hazırlandı ve çalışma süresince ışıktan korunarak -20 °C'de bekletildi.
- Amoksisilin için çalışma stok solüsyonları 0,004-0,04-0,1-0,2-0,4-1-2-4-10-40-100 ve 400 µg/mL, tilozin için çalışma stok solüsyonları 0,05-0,1-0,25-0,5-1-2,5-5-10-25-50 ve 100 µg/mL olacak şekilde örnek dilüsyonlar hazırlandı.

2.3. Hayvan Materyali

Çalışma, mikroskobik sayım yöntemi ile sütlerinde somatik hücre sayısı ≤ 250.000 olan sağlıklı 6 adet sütçü inek (Holstein, 450-500 kg, 2-4 yaşında, ortalama süt verimi 20-25 kg) üzerinde gerçekleştirildi.

Hayvanlara herhangi bir ilaç uygulamasını önlemek için 1 ay süreyle aynı şartlarda bakım ve beslemeye alındı. Çalışma süresince ineklere karma yem, yonca, saman ve su verildi.

Deneysel uygulamalar özel bir işletmede (Çarıklar, Konya) gerçekleştirildi.

Çalışmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay (No: 2016/056) alındı (Bkz. EK A).

2.4. Deneysel Uygulamalar

Çalışma *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi.

İn vivo çalışma, çapraz dizayna göre gerçekleştirildi. Uygulamalar sabah sağımından sonra 06.00-07.30 saatleri arasında yapıldı. İlk aşamada her bir hayvana 14 mg/kg dozunda amoksisilin (Synulox® enj.) boyun bölgesi dorsolateralinden kas içi yolla uygulandı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takip eden 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde, her örnekleme zamanında meme tamamen boşaltılarak steril tüplere süt örnekleri (100 mL) toplandı. Arınma süresinin ardından (4 gün) her bir hayvana 15 mg/kg dozunda tilozin (Tylan® 200 enj.) boyun bölgesi

dorsolateralinden kas içi yolla uygulandı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takip eden 24, 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde, her örnekleme zamanında meme tamamen boşaltılarak steril tüplere süt örnekleri (100 mL) toplandı. Her iki uygulama sonrası süt numuneleri 4 – 8 ℃ aralığında laboratuvara getirilerek, analiz edilene kadar -80 °C'de saklandı.

Amoksisilinin analiz yöntemi ve süte geçişi hakkında yeterli bilgi olmaması ayrıca birçok literatürde ilaç uygulamasını takiben 24 saat sonra ilacın tespit edilemediği bildirildiği için amoksisilin uygulandıktan sonra sık örnekleme yapılmıştır.

Çalışmanın *in vitro* aşamasında, *in vivo* çalışmadan önce ineklerden alınan ilaç içermeyen süt örneklerine 0,004 – 400 µg/g amoksisilin trihidrat ve 0,05 – 50 µg/g tilozin baz eklendi. Bu konsantrasyonlar amoksisilin ve tilozinin MRL ve sütteki C_{max} değerlerine göre belirlendi (Commission ve No 2010, Avci ve Elmas 2014, Li ve ark 2014). Daha sonra süt örnekleri 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi.

2.5. Sütlerde Somatik Hücre Sayımı

Somatik hücre sayımı Breed Metoduna (ISO 13366-1:2008) göre yapıldı. Lam üzerine 10 µl süt eklenip 1 cm^2 alana yayıldı. Kuruduktan sonra 15 dakika boyunca metilen mavisinde bekletildi. Preparat kuruduktan sonra metilen mavisi saf su ile yıkandı. Preparat tekrar kurumaya bırakıldı, daha sonra mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Örneklerdeki somatik hücre sayısı (adet/mL) aşağıdaki formül ile hesaplandı:

S = M × ÇF × 100 (S: Somatik hücre sayısı, M: Görüş sahasındaki ortalama hücre sayısı, ÇF: Kullanılan mikroskobun çalışma faktörü).

2.6. Tam Sütün Yağsız Süt, Krema ve Kazeine Ayrılması

Krema, sütten Morton (1954) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek ayrıldı. Tam süt (50 g) 35 °C'de 45 dakika süreyle 4000 × *g*'de santrifüj edildi. Krema ayrıldıktan sonra elde dilen yağsız süt, proteinleri homojenize etmek için 3 dakika süreyle vortekslendi.

Kazein, Ziv ve Rasmussen (1975) ve Morton (1954) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek elde edildi. Kazein yağsız sütten (10±0,1 g); 4000 × g, 2 °C, 45 dakika süreyle 3 kez santrifüj edilerek ayrıldı. Elde edilen kazein saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra kurutma kağıdı üzerinde kurutularak elde edildi.

2.7. Süt ve Süt Kısımlarının Analiz İçin Hazırlanması

Amoksisilin ve tilozinin ekstraksiyonu için; 10 g (± 0,1 g) tam ve yağsız süt örnekleri 50 mL'lik santrifüj tüplerine tartıldı. Krema ve kazein örnekleri ise 1±0,01 g 50 mL'lik santrifüj tüplerine tartılarak üzerine 9 mL ultra saf su ilave edildi. Daha sonra homonejize etmek için vortekslendi.

Amoksisilinin tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinden ekstraksiyonu 1 M hidroklorik asit (10 mL) kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra Strata X kartuşları kullanılarak katı faz ekstraksiyon (SPE) metoduna geçildi. Kartuşlar 3 mL metanol ve 3 mL su ile şartlandırıldı. Örnekler kartuşa uygulandı ve akış hızı en fazla 8 mL/dk olacak şekilde ayarlandı. Kartuş 3 mL su ile yıkandıktan sonra analitler 1 mL % 0,1 trifloroasetik ve asetonitril karışımı (92:8, v/v) ile elüte edildi. Elde edilen analitler likit kromatografi viyallerine alındı ve 50 µL'si sisteme enjekte edildi.

Tilozinin tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinden ekstraksiyonu 30 mL asetonitril Daha sonra Strata X kartuşları kullanılarak katı faz ekstraksiyon (SPE) metoduna geçildi. Kartuşlar 10 mL metanol ve 10 mL su ile şartlandırıldı. Örnekler kartuşa uygulandı ve akış hızı en fazla 8 mL/dk olacak şekilde ayarlandı. Kartuş önce 10 mL su sonra 10 mL % 25'lik asetonitril ile yıkandı. Yıkama sonrası kartuşlar 1 dakika süreyle kurutulduktan sonra 1 mL 0,1 M amonyum asetatla analitler elüte edildi. Elde edilen analitler likit kromatografi viyallerine alındı ve 50 µL'si sisteme enjekte edildi.

2.8. Amoksisilin ve Tilozinin Süt ve Süt Kısımlarında Miktar Tayinleri

Amoksisilin ve tilozinin kantitatif tayinleri sırasıyla Karageorgou ve Samanidou (2011) ve Avci ve Elmas (2014) tarafından belirtilen metotlar modifiye edilerek HPLC-UV'de gerçekleştirildi.

Amoksisilin için;

Kolon	: Gemini 5 µm C18 column 250 mm × 4.6 mm
Kolon Sıcaklığı	: 23 ℃
Mobil Faz	: Mobil Faz A: % 0,1 Trifloroasetik asit
	: Mobil Faz B: Asetonitril (92:8, v/v)
Analiz Süresi	: 25 dakika
Akış Hızı	: 1 mL/dk
Dalga Boyu	: 225 nm
Dedektör	: UV
Enjeksiyon Hacmi	: 50 µL
Alıkonma Zamanı	: ∼13 dakika

Tilozin için;

Kolon	: Gemini 5 µm C18 column 250 mm × 4.6 mm
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C
Mobil Faz	: Mobil Faz A: % 0,1 Trifloroasetik asit
	: Mobil Faz B: Asetonitril (65:35, v/v)
Analiz Süresi	: 15 dakika
Akış Hızı	: 1 mL/dk
Dalga Boyu	: 287 nm
Dedektör	: UV
Enjeksiyon Hacmi	: 50 µL
Alıkonma Zamanı	: ~ 9 dakika

2.9. Tam Süt, Yağsız Süt ve Kremada Total Protein Tayini

Tam süt, yağsız süt ve kremada protein analizi tam otomatik protein cihazı (OPSIS KjelROC Analyzer, İsveç) kullanılarak Kjeldahl yöntemine göre gerçekleştirildi.

2.10. Metot Validasyon

Özgünlük, doğrusallık, duyarlılık (tespit limiti ve hesaplanabilir limit), geri kazanım, kesinlik ve gerçeklik metot validasyonunun belirlenmesinde performans ölçütleri olarak alındı.

2.10.1. Özgünlük (Specificity)

Özgünlük, bulunması muhtemel diğer bileşenlerin varlığında, tayin edilecek analiti açık bir şekilde gözlemleyebilme yeteneğidir. Metodun seçiciliği ana maddeyi içermeyen inek süt ve süt kısımları kullanılarak kromatogramlarda amoksisilin ve tilozinin alıkonma zamanlarında süt, süt kısımları ve diğer kaynaklı piklerin bulunup bulunmadığı incelendi.

2.10.2. Doğrusallık (Linearity)

Bir analitik prosedürün doğrusallığı ölçülen analitin miktarı ile dedektör cevabının ne derece doğru orantılı olduğu ile belirlenir. Çalışma boyunca kullanılan amoksisilin ve tilozin standartları, amoksisilin stok solüsyonunun (1 mg/mL) 0,004-400 µg/g ve tilozin stok solüsyonunun 0,05-100 µg/g'lık dilüsyonları şeklinde günlük olarak hazırlandı. Bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri tayin edilerek kalibrasyon eğrisi çizildi ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

2.10.3. Duyarlılık (Sensitivity)

Tespit limiti (limit of detection, LOD) bir örnekte sinyal/gürültü oranının 3 olarak belirlendiği süt ve süt kısımlarında tespit edilebilen en düşük analit miktarı olarak tanımlanır. Hesaplanabilir limit (limit of quanification, LOQ) ise sinyal/gürültü oranının 6 olduğu süt ve süt kısımlarındaki analitin hesaplanabilir en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır.

2.10.4. Kesinlik (Precision) ve Gerçeklik (Accuracy)

Kesinlik; bir analitik metodun birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesinin ifadesidir. Kesinlik parametresi varyasyon katsayısıyla ifade edilir. Analitik yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için istatistiksel açıdan yeterli sayıda aynı konsantrasyona sahip örnekler kullanılarak ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları tayin edilir.

Bir analitik metodun gerçekliği ölçülen değer (konsantrasyon) ile gerçek değerin yakınlığını gösterir. Gerçeklik genellikle, eklenmiş miktar veya ortalama değer ile gerçek değer arasındaki farkın güven aralıkları olarak rapor edilir.

Kesinlik için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ölçüt olarak kullanıldı. Gün içi ve günler arası farklılığın tespiti için standart solüsyonların ölçüm aralığında yer alan düşük, orta ve yüksek düzeyleri ana madde içermeyen süt ve süt kısımlarına eklendi. Bu düzeyler amoksisilin için sırasıyla 0,4; 4 ve 40 µg/g; tilozin için sırasıyla 0,5; 5 ve 50 µg/g olarak belirlendi. Her düzeyde 3 tekrarlı analiz yapıldı. Bu düzeyler 3 farklı günde tekrarlandı. Gün içi ve günler arası kesinlik % varyasyon katsayısıyla ve gerçeklik ise % bias değeri ile belirlendi.

2.10.5. Geri Kazanım (Recovery)

Standart solüsyonların düşük, orta ve yüksek düzeyleri süt ve süt kısımlarına eklenerek kalite kontrol örnekleri hazırlandı. Bu düzeyler amoksisilin için sırasıyla 0,4; 4 ve 40 µg/g; tilozin için sırasıyla 0,5; 5 ve 50 µg/g olarak belirlendi. Geri kazanımlar herhangi bir örnek gibi değerlendirilen süt ve süt kısımlarından ÷karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

2.10.6. Veri ve İstatistiksel Analiz

HP PC kontrollü LC solution software program (LC solution software, version 1,25; Shimadzu, Kyoto, Japonya) veri analizinde kullanıldı.

İn vivo ve *in vitro* çalışmalarda, 1 g tam sütten elde edilen yağsız süt, krema ve kazeindeki amoksisilin ve tilozin konsantrasyonu µg olarak hesaplandı. Çalışmanın her iki aşamasında süt bileşenlerindeki yüzde dağılım oranları yağsız süt, krema ve kazein için aşağıda verilen formül üzerinden hesaplandı:

(Süt Bileşenindeki İlaç Konsantrasyonu ÷ Tam Sütteki İlaç Konsantrasyonu) × 100

Tüm veriler arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 23,0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, Il., ABD) istatistik paket programı kullanılarak belirlendi. Elde edilen tüm verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine bakıldı ve normal dağılım göstermeyenlere Friedman Two-way analysis of variance yapıldı. Tüm değerler ortalama ± standart sapma (SS) olarak gösterildi.

Amoksisilin ve tilozin için metot validasyon parametreleri olan gerçeklik, gün içi ve günler arası farklılıkların ifadesi olarak standart sapma, % varyasyon katsayısı ve bias dikkate alındı. Tekrarlı analizlerde belirlenen konsantrasyonlar üzerinden tanımlayıcı istatistik yapılarak ortalama±SS, bias ve % varyasyon katsayısı hesaplandı. Yüzde varyasyon katsayısı; (standart sapma/ortalama)×100, yüzde bias değeri ise [(hesaplanan konsantrasyon − teorik konsantrasyon) ÷ teorik konsantrasyon] × 100 formülüyle hesaplandı. Kesinlik ve gerçeklik için kabul edilen varyasyon katsayısı ≤ % 15, bias ise ± % 15 aralığında olmalıdır. Tüm analizlerde güven aralığı % 95 olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamda önemlilik sınırı $P < 0,05$ olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Sütlerdeki Somatik Hücre Sayısı

Çalışma için seçilen özel işletmede, sağmal ineklerden alınan süt örnekleri 4 – 8 °C aralığında laboratuvara getirilerek somatik hücre sayısı belirlendi. Çiğ süt örneklerindeki ortalama somatik hücre sayısı "ISO 13366-1:2008" de belirtilen metoda göre değerlendirildi. Somatik hücre sayısı ≤ 250.000 olan inekler çalışma için seçildi.

3.2. Tam Süt, Yağsız Süt ve Kremada Toplam Protein Yüzdesi

Tam süt, yağsız süt ve kremada toplam protein sırasıyla % 3,10±0,10; % 3,19±0,11 ve % 1,68±0,07 belirlendi.

3.3. Metot Validasyonu

3.3.1. Özgünlük (Specificity)

Ana madde ve metabolitlerini içermeyen süt ve süt kısımlarının HPLC sistemine uygulanması sonrasında kromatogram üzerinde amoksisilin ve tilozin alıkonma zamanlarında süt ve süt kısımlarından kaynaklanan piklere rastlanmadı.

3.3.2. Doğrusallık (Linearity)

Amoksisilin ve tilozin için çalışma standartları stok solüsyonlarından amoksisilin için 0,004-400 µg/mL, tilozin için 0,05-100 µg/mL'lik dilüsyonları şeklinde hazırlandı. Bu dilüsyonların süt ve süt kısımlarına eklendikten sonra yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen süpernatantın 10 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve korelasyon katsayısı (R^2) hesaplandı. Amoksisilin ve tilozinin süt ve süt kısımlarında R^2 değeri > 0,9996 olarak bulundu.

3.3.3. Geri Kazanım (Recovery)

Amoksisilin içermeyen süt ve süt kısımlarına düşük (0,4 µg/g), orta (4 µg/g) ve yüksek (40 µg/g) düzeyde ekleme yapılarak kalite kontrol örneklerinden hesaplanan ortalama geri kazanım değeri % 84,75 belirlendi.

Tilozin içermeyen süt ve süt kısımlarına düşük (0,5 µg/g), orta (5 µg/g) ve yüksek (50 µg/g) düzeyde yükleme yapılarak kalite kontrol örneklerinden hesaplanan ortalama geri kazanım değeri % 92,17 belirlendi.

3.3.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Amoksisilin için;

LOD: S/G oranı 3'den büyük olan en düşük konsantrasyon tam süt, yağsız süt, krema için 0,01 µg/g; kazein için 0,0015 µg/g belirlendi.

LOQ: S/G oranı 6'dan büyük olan en düşük konsantrasyon tam süt, yağsız süt, krema için 0,02 µg/g; kazein için 0,003 µg/g belirlendi.

Tilozin için;

LOD: S/G oranı 3'den büyük olan en düşük konsantrasyon tam süt, yağsız süt, krema ve kazein için 0,004 µg/g belirlendi.

LOQ: S/G oranı 6'dan büyük olan en düşük konsantrasyon tam süt, yağsız süt, krema ve kazein için 0,008 µg/g belirlendi.

3.3.5. Kesinlik (Precision) ve Gerçeklik (Accuracy)

Metodun kesinliği ve gerçekliği amoksisilin için düşük (0,4 µg/g), orta (4 µg/g) ve yüksek (40 µg/g); tilozin için düşük (0,5 µg/g), orta (5 µg/g) ve yüksek (50 µg/g) konsantrasyonlarda hazırlanan kalite kontrol örnekleri ile değerlendirildi. Amoksisilin ve tilozin için süt ve süt kısımlarındaki pik alanlara göre belirlenmiş konsantrasyonlar üzerinden hesaplanan ortalama, standart sapma, % varyasyon katsayısı, % geri kazanım ve % bias değerleri Çizelge 3.1'de gösterildi.

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Amoksisilinin *in vitro* ve *in vivo* aşamalarda, süt ve süt kısımlarındaki yüzde dağılımları sırasıyla Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de sunuldu. Çalışmanın her iki aşamasında amoksisilinin yağsız sütteki konsantrasyonu krema ve kazeinden daha yüksek belirlendi. Amoksisilin, süt ve süt kısımlarında 24. saat ve sonraki örnekleme zamanlarında ölçülemedi. Ayrıca *in vitro* aşamada 0,04 µg/g düzeyinde amoksisilin krema ve kazeinde belirlenemedi.

Tilozinin *in vitro* ve *in vivo* aşamalarda, süt ve süt kısımlarındaki yüzde dağılımları sırasıyla Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de sunuldu. Çalışmanın *in vitro* aşamasında tam ve yağsız sütteki tilozin konsantrasyonu yaklaşık olarak eşit ve krema ile kazeinden daha yüksek belirlenirken, *in vivo* aşamada kremadaki tilozin konsantrasyonu yağsız süt ve kazeinden daha yüksek belirlendi. Tilozin süt ve süt kısımlarında 120. saat ve sonraki örnekleme zamanında belirlenemedi. Ayrıca *in vitro* aşamada 0,05 µg/g düzeyinde tilozin krema ve kazeinde belirlenemedi.

Çizelge 3.1. Tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinde amoksisilin ve tilozinin validasyon değerleri

	Amoksisilin (µg/g)			Tilozin (µg/g)		
	0,4	4	40	0,5	5	50
Tam Süt						
Ortalama (µg/g)	0,44	4,33	40,74	0,48	4,75	47,80
SS	0,01	0,01	0,95	0,01	0,02	1,06
VK (%)	2,27	0,23	2,33	2,08	0,42	2,21
Geri kazanım (%)	82	87	82	96	95	96
Bias (%)	11	8,19	1,85	-3,40	-5,07	-4,39
Yağsız Süt						
Ortalama (µg/g)	0,39	3,99	39,90	0,46	4,55	47,16
SS	0,003	0,04	0,44	0,004	0,03	0,36
VK (%)	0,76	1,00	1,10	0,86	0,65	0,76
Geri kazanım (%)	88	86	86	92	91	94
Bias (%)	-2,5	-0,25	-0,25	-8,92	-8,92	-5,68
Krema						
Ortalama (µg/g)	0,401	3,98	39,82	0,45	4,52	46,43
SS	0,007	0,05	0,5	0,003	0,04	0,47
VK (%)	1,74	1,25	1,25	0,66	0,88	1,01
Geri kazanım (%)	85	86	84	90	90	93
Bias (%)	0,31	-0,5	-0,45	-10,84	-9,67	-7,13
Kazein						
Ortalama (µg/g)	0,402	4,00	40,16	0,44	4,51	45,56
SS	0,004	0,04	0,42	0,002	0,04	0,46
VK (%)	0,99	1,17	1,04	0,45	0,88	1,00
Geri kazanım (%)	83	85	83	88	90	91
Bias (%)	0,67	0,02	0,40	-12,30	-9,82	-8,88

SS: Standart sapma. VK: Varyasyon katsayısı.

Çizelge 3.2. Farklı konsantrasyonlarda süte amoksisilin ilave edildikten sonra süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Konsantrasyon (µg/g)	N	Tam Süt	Yağsız Süt*	% Yağsız Süt	Krema*	% Krema	Kazein*	% Kazein
0,04	9	0,04±0,001	0,035±0,006	87,53±3,19^{a}	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
0,4	9	0,44±0,01	0,39±0,02	88,63±2,28^{ab}	0,05±0,01	11,37±2,40^{ab}	0,003±0,000	0,68±0,09^{a}
4	9	4,33±0,01	3,98±0,07	91,30±2,25^{b}	0,35±0,09	8,06±2,37^{b}	0,03±0,004	0,69±0,13^{a}
40	9	40,74±0,95	39,90±0,83	97,35±0,87^{c}	0,84±0,33	2,05±0,92^{c}	0,32±0,002	0,78±0,09^{a}
400	9	400,08±4,48	387,64±3,14	97,01±0,23^{c}	12,44±0,89	3,10±0,35^{c}	4,51±0,12	1,12±0,05^{b}
Ortalama ± SS				**92,36±6,34**		**7,42±6,37**		**0,82±0,14**

*: 1 g tam sütten elde edilen yağsız süt, krema ve kazein içerisindeki amoksisilin düzeyi (µg)
^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P< 0,05).

Çizelge 3.3. İneklere amoksisilin (tek doz, 14 mg/kg, IM) uygulandıktan sonra farklı örnekleme zamanlarında süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Örnekleme Zamanı (saat)	N	Tam Süt	Yağsız Süt*	% Yağsız Süt	Krema*	% Krema	Kazein*	% Kazein
1	6	0,06±0,01	0,05±0,01	76,19±13,37^{abc}	0,02±0,01	25,10±14,09^{abc}	0,05±0,01	81,75±17,57^{a}
3	6	0,26±0,02	0,22±0,02	82,29±7,07^{a}	0,05±0,02	18,67±7,45^{a}	0,017±0,002	6,72±1,15^{b}
6	6	0,36±0,03	0,27±0,03	75,09±6,46^{b}	0,10±0,03	26,25±6,81^{b}	0,04±0,003	10,19±1,72^{c}
9	6	0,09±0,00	0,06±0,01	67,66±8,29^{c}	0,03±0,01	34,08±8,73^{c}	0,016±0,002	17,66±3,25^{d}
12	6	0,06±0,01	0,04±0,01	64,43±3,10^{c}	0,02±0,00	37,50±3,27^{c}	0,006±0,002	9,69±2,85^{bc}
Ortalama ± SS		**0,17±0,14**	**0,13±0,11**	**73,13±7,12**	**0,04±0,03**	**28,32±7,51**	**0,03±0,02**	**25,20±31,87**

*: 1 g tam sütten elde edilen yağsız süt, krema ve kazein içerisindeki amoksisilin düzeyi (µg)
^{a,b,c,d}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P< 0,05).

Çizelge 3.4. Farklı konsantrasyonlarda süte tilozin ilave edildikten sonra süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Konsantrasyon (µg/g)	N	Tam Süt	Yağsız Süt*	% Yağsız Süt	Krema*	% Krema	Kazein*	% Kazein
0,05	9	0,05±0,00	0,04±0,00	93,52±0,87[a]	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
0,5	9	0,48±0,01	0,45±0,01	93,43±0,97[a]	0,03±0,01	6,93±1,02[a]	0,01±0,00	2,33±0,14[a]
5	9	4,75±0,02	4,49±0,03	94,64±0,72[b]	0,27±0,04	5,65±0,76[b]	0,09±0,01	2,00±0,12[b]
50	9	47,80±1,06	44,95±0,55	94,05±1,29[ab]	3,01±0,71	6,27±1,36[ab]	0,96±0,01	2,01±0,05[ab]
Ortalama ± SS				**93,91±0,56**		**6,42±0,59**		**2,11±0,58**

*: 1 g tam sütten elde edilen yağsız süt, krema ve kazein içerisindeki tilozin düzeyi (µg)
[a,b,c]: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P< 0,05).

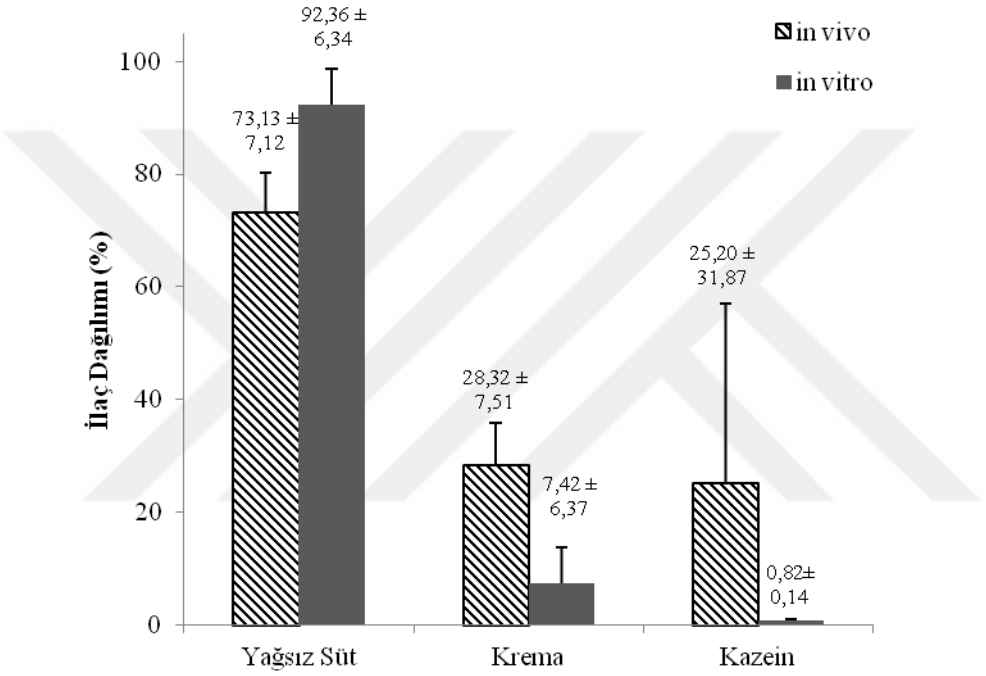
Çizelge 3.5. İneklere tilozin (tek doz, 15 mg/kg, IM) uygulandıktan sonra farklı örnekleme zamanlarında süt ve süt kısımlarında ilaç dağılımı (%) (ortalama ± SS)

Örnekleme Zamanı (saat)	N	Tam Süt	Yağsız Süt*	% Yağsız Süt	Krema*	% Krema	Kazein*	% Kazein
24	6	0,14±0,001	0,08±0,001	56,88±2,11[a]	0,06±0,005	45,44±2,22[a]	0,05±0,002	34,61±15,07
48	6	0,09±0,001	0,04±0,002	44,65±2,22[ab]	0,05±0,001	58,34±2,34[ab]	0,016±0,001	18,59±14,76
72	6	0,06±0,003	0,02±0,002	36,28±2,22[bc]	0,04±0,001	67,16±2,34[bc]	0,019±0,004	29,55±6,42
96	6	0,047±0,002	0,01±0,001	21,81±2,35[c]	0,039±0,001	82,41±2,47[c]	0,013±0,001	28,36±16,21
Ortalama ± SS		**0,08±0,004**	**0,04±0,003**	**39,90±14,74**	**0,05±0,001**	**63,34±15,53**	**0,02±0,001**	**27,78±6,70**

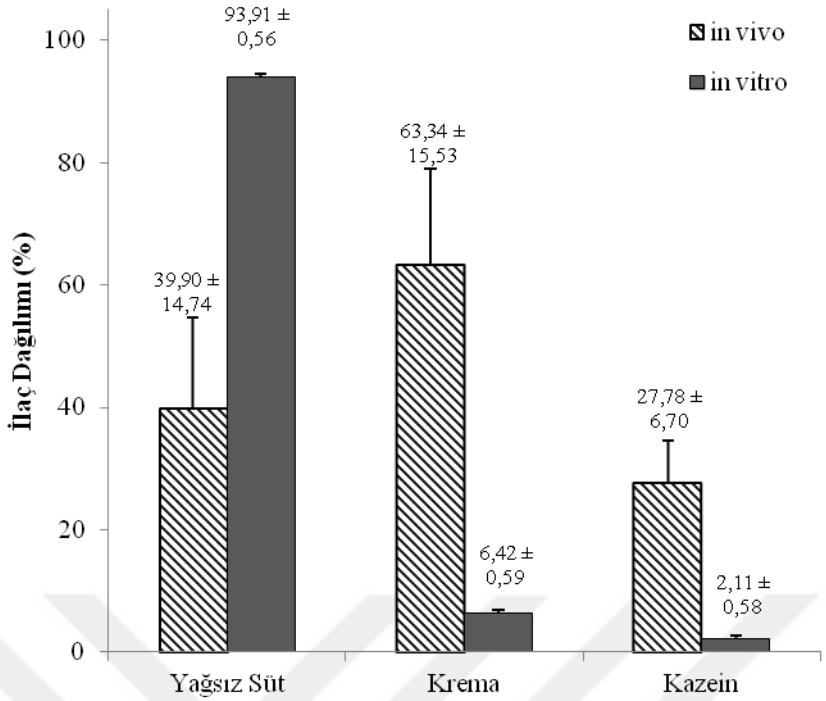
*: 1 g tam sütten elde edilen yağsız süt, krema ve kazein içerisindeki tilozin düzeyi (µg)
[a,b,c]: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır (P< 0,05).

Çalışmanın hem *in vitro* hem de *in vivo* aşamasında yağsız süt, krema ve kazein içerisinde amoksisilin ve tilozinin yüzde dağılım bar grafikleri sırasıyla Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de sunuldu. *İn vitro* veri ile kıyaslandığında, *in vivo* aşamada amoksisilin ve tilozin krema ve kazein içerisinde daha fazla dağıldı. Tilozinin *in vitro* ortamda yağsız sütte dağılımı *in vivo* ortama göre daha fazlaydı.

Amoksisilin ve tilozinin kazeindeki dağılım oranı çalışmanın her iki aşamasında da konsantrasyona göre farklılık gösterdi.



Şekil 3.1. Çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* aşamasında amoksisilinin yağsız süt, krema ve kazeinde dağılımı (%) (ortalama ± SS)



Şekil 3.2. Çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* aşamasında tilozinin yağsız süt, krema ve kazeinde dağılımı (%) (ortalama ± SS)

4. TARTIŞMA

4.1. Metot

Çalışmada, hidrofilik özellikteki β-laktam ve lipofilik özellikteki makrolid grubu antibiyotiklerden amoksisilin ve tilozinin, klinik olarak sağlıklı Holstein ırkı ineklerin süt ve süt kısımlarında (yağsız süt, krema ve kazein) dağılımı belirlendi. Ayrıca bu ilaçların süt ve süt kısımlarında metot validasyonu yapılmış analiz yöntemleri ile HPLC-UV'de düzeyleri belirlendi. Genel olarak metodun kesinliği için kabul edilen kriter olan varyasyon katsayısının % 15'den düşük, ve gerçeklik için kabul edilen bias aralığının ise ±% 15 değerleri içinde olması gerekir (EMEA 2009).

Amoksisilin ve tilozinin tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinde tayini sırasıyla Karageorgou ve Samanidou (2011) ve Avci ve Elmas (2014) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek gerçekleştirildi. Belirtilen yöntemlerin süt ve süt kısımlarında amoksisilin ve tilozin tayini için kullanılabilir olduğu ortaya kondu. Metodun süt ve süt kısımlarında amoksisilin ve tilozin için ortalama geri kazanımlarının (sırasıyla % 84,75; % 92,17), tespit (amoksisilinin tam süt, yağsız süt, kremada 0,01; kazeinde 0,0015 µg/g; tilozinin tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinde 0,004 µg/g) ve hesaplanabilir (tam süt, yağsız süt, kremada 0,02; kazeinde 0,003 µg/g; tilozinin tam süt, yağsız süt, krema ve kazeinde 0,008 µg/g) limitlerinin düşük, tekrar edilebilirliklerinin (her bir ilaç ve örnek için VK < % 15) ve bias değerlerinin (± % 15 arasında) kabul edilen sınırlar içinde olması metodun süt ve süt kısımlarında amoksisilin ve tilozin tayininde kullanılabilir olduğunu gösterdi.

4.2. Amoksisilinin Süt Kısımlarındaki Dağılımı

Çalışmanın *in vivo* aşamasında amoksisilinin yağsız sütte krema ve kazeine oranla daha fazla dağıldığı belirlendi. Bu sonuç, benzilpenisilin, levamizol gibi hidrofilik ilaçların yağsız sütte daha fazla dağılması ile sonuçlanan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Ziv ve Rasmussen 1975, Power ve ark 2012). Amoksisilinin örnekleme zamanlarına göre kazeinde yüzde dağılımları farklılık gösterdi. Bu farklılığa; ilk örnekleme saatlerinde süt miktarının az, dağılım oranının yüksek ve örnekleme zamanı ilerledikçe süt miktarının fazla dolayısıyla ilacın kazein içerisindeki konsantrasyonunun azalması neden olabilir. Ziv ve Rasmussen (1975)

yaptıkları çalışmada fizikokimyasal özelliğe bağlı olmaksızın kazeine yüksek oranda bağlanan ilaçların, yağsız sütte daha fazla akümüle olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada amoksisilinin kazein/tam süt oranı ortalama % 25 olmasına rağmen yağsız süt/tam süt oranı ortalama % 73 oranında belirlendi. Yağsız sütte amoksisilinin daha fazla dağılması, hidrofilik özelliği ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca amoksisilinin örnekleme zamanlarına göre yağsız süt, krema ve kazeindeki konsantrasyonları dalgalanma gösterdi. Bu dalgalanmanın nedeni amoksisilinin absorbsiyonunun hızlı, atılımının yavaş olmasından kaynaklanabilir (Ramos ve ark 2018). Çalışmanın ilk örnekleme zamanlarında gözlenen değişkenliğin bir diğer sebebi; ilaçların kromatografik metotlarla belirlenmesinde düşük konsantrasyonlarda varyasyonların daha fazla meydana gelmesinden kaynaklanabilir (Viswanathan ve ark 2007).

Sağım aralıkları eşit olduğunda yağ hariç sütün genel bileşiminde çok büyük değişiklikler oluşmaz. Eşit zaman aralıklarında yapılmayan sağımlarda en kısa zaman aralığında sağılan süt, diğerlerine göre daha fazla yağ içerir (Wheelock 1980, Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2004). Amoksisilinin fizikokimyasal özelliği ve yağsız sütte daha fazla birikme eğilimi göz önüne alındığında, 1. ve 3. saatte diğer örnekleme zamanlarına göre daha fazla yağsız sütte birikmesi yukarıda bahsedilen sağım sıklığının süt bileşimine etkisi ile açıklanabilir.

Sütçü ineklerde Power ve ark (2012) oksiklozanid ve levamizolun yağsız süte kremaya oranla daha fazla geçtiğini belirlemiştir. Oksiklozanidin yağsız sütte daha fazla dağılma nedeninin, süt proteinlerine bağlanmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Whelan ve ark 2010). Lipofilik özellikte florfenikol ile yapılan çalışmada ilacın yağsız sütte (Power ve ark 2014), hidrofilik özellikte dihidrostreptomisin ile yapılan çalışmada ilacın kremada (Ziv ve Rasmussen 1975) daha fazla dağıldığı ortaya konulmuştur. Bu iki çalışma bulguları arasındaki fark ilaçların süt proteinlerine bağlanma oranı ile ilişkili olabilir.

Çalışmanın *in vitro* aşamasında elde edilen sonuçlar ile *in vivo* aşamadan elde edilen sonuçlar paraleldi. Amoksisilin yağsız sütte, krema ve kazeine göre daha fazla akümüle oldu. Amoksisilin yüksek konsantrasyonlarda kremada daha az birikti. Bunun nedeni yüksek konsantrasyonlarda ilacın kremadaki dağılımının doyurulması olabilir. Kazeinde ise amoksisilinin yüzde dağılımı kremanın aksine yüksek konsantrasyonda (400 µg/g) daha fazla oldu. Elde edilen sonuçlara benzer olarak

Hakk ve ark (2015) yaptıkları *in vitro* çalışmada hidrofilik ilaçlardan oksitetrasiklin ve penisilin G'nin yağsız sütte daha fazla akümüle olduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada sülfadimetoksin ve ketoprofen hidrofilik olmasına rağmen yağsız süt ve kremaya eşit dağılım göstermiştir.

4.3. Tilozinin Süt Kısımlarındaki Dağılımı

Çalışmanın *in vivo* aşamasında tilozin yağsız süt ve kazeine oranla kremada daha fazla akümüle oldu. Örnekleme zamanı ilerledikçe yağsız sütte tilozin konsantrasyonu azalırken kremada artmıştır. Bunun nedeni ilerleyen sağımları takiben sütle atılan ilaç konsantrasyonunun azalması ve ilacın fizikokimyasal özelliği ile ilişkili olarak kremada birikme eğilimi olabilir. Elde edilen sonuçlara benzer şekilde, inek ve keçilerde yapılan çalışmalarda triklabendazol, klosantel, kloramfenikol ve rafoksanid gibi lipofilik ilaçların kremada daha fazla akümüle olduğu belirlenmiştir (Ziv ve Rasmussen 1975, Power ve ark 2013a, Power ve ark 2013b, Power ve ark 2013c). Ayrıca Power ve ark (2013a) krema ve tereyağında triklabendazol ve metabolitlerinin doza bağlı olarak biriktiğini ortaya koymuşlardır. Mevcut çalışmada tilozinin kremada daha fazla oranda akümüle olduğu bulunmasına rağmen bu oran öngörülenden daha azdı. Bunun nedeni tilozinin kazeine bağlanma oranı ve zwitterion özelliği ile ilişkili olabilir (Ashraf ve Aqma 2017). Zwitterion bileşiklerin hem hidrofilik hem de lipofilik ortamda davranışı benzerdir ve diğer bileşiklerden farklı olarak tüm pH değerlerinde iyonize olabilirler (Manners ve ark 1988). Çalışmada kazein bileşenindeki ilaç konsantrasyonunun tam sütteki ilaç konsantrasyonuna oranı % 28 olarak belirlendi. Ziv ve Sulman (1973) yaptıkları çalışmada tilozinin süt proteinlerine bağlanma oranını % 15 bildirmişlerdir. Süt proteinlerinin çok büyük oranını kazeinin oluşturması (Davies ve ark 1983, Jenness 1985), kazeindeki ilaç düzeyinin ilacın süt proteinlerindeki konsantrasyonu hakkında yeterli bilgi sunabilir. Sütte tilozin için belirlenen MRL 50 µg/kg'dır (Commission ve No 2010). *İn vivo* çalışmanın sonuçlarına göre yağsız süt ve kremada 48. saatte, 24. saatte ise kazeinde tilozin konsantrasyonu ≤ 50 µg/kg belirlendi.

Çalışmanın *in vitro* aşamasında ise öngörülenin aksine tilozinin tam ve yağsız sütte konsantrasyonları yaklaşık olarak aynı belirlenirken, bu konsantrasyonlar krema ve kazeinden önemli ölçüde yüksekti. Hakk ve ark (2015) çalışmamızın aksine tiyabendazol ve ivermektinin *in vitro* ortamda kremada daha fazla akümüle olduğunu

belirlemişlerdir. Çalışmamızla belirtilen çalışma sonuçları arasındaki farklılık, kullanılan ilaçların lipofilik özellikleri dışında diğer özelliklerinden (zwitterion) kaynaklanabilir. Total protein analizi sonucu tam (% 3,10) ve yağsız sütün (% 3,19) kremaya (% 1,68) göre daha fazla protein içerdiği görüldü. Tilozinin kremaya oranla yağsız sütte daha fazla akümüle olmasının bir diğer nedeni, süt proteinlerine yüksek oranda bağlanması ile ilişkili olabilir. Ayrıca Al Wabel (2008) *in vitro* ortamda tilozinin plazma proteinlerine oranla süt proteinlerine daha fazla bağlandığını belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise kazeine bağlanabilen ilaçların yağsız sütte daha fazla birikebileceği bildirilmektedir (Ziv ve Rasmussen 1975). Lipofilik ilaçlar sadece plazma proteinlerine değil aynı zamanda doku proteinlerine de yüksek oranda bağlanır ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Marczak ve ark (2015) yaptıkları çalışma ile lipofilik ilaçların yağ oranı yüksek doku ve hayvansal gıdalardaki düzeylerinin mutlak aynı oranda olmayabileceğini belirtmişlerdir. Atkinson ve Begg (1990) ise lipofilik ilaçların süt ve plazma proteinlerine bağlanma oranlarının farklı olabileceğini bildirmiştir.

4.4. Amoksisilin ve Tilozinin Kazeindeki Düzeyleri

Amoksisilin ve tilozinin kazeindeki düzeyleri hem *in vitro* ve hem de *in vivo* aşamalarda benzer bulundu. Çalışma sonucunda amoksisilin ve tilozinin kazeindeki oranları, Ziv ve Rasmussen (1975) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik gösterdiği belirlendi. İlaçların kazeinde düzeylerinin sütteki ilaç konsantrasyonuyla ilişkili olduğu tespit edildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışma ve bu alandaki diğer çalışmalara ait sonuç ve bilgiler birlikte değerlendirildiğinde;

- Laktasyon dönemindeki ilaç kullanımlarında yasal arınma süresince sütün farklı kısımlarının kullanımını sağlamak için ilaçların bu kısımlardaki dağılımının bilinmesi gerekir.
- Genellikle hidrofilik ve/veya kazeine yüksek oranda bağlanan ilaçların sütün yağsız kısmında, lipofilik ilaçların ise krema ve tereyağında daha fazla dağılım eğiliminde olduğu anlaşılmaktadır.
- Çalışmanın her iki aşamasında amoksisilin yağsız sütte, tilozin ise farklı kısımlarda dağıldığı için; konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda sütün farklı kısımlarına ilaçların dağılımını belirlemek için çalışmaların *in vivo* yürütülmesi gerekir.
- Amoksisilinin krema ve kazeinde arınma süresini belirlemek için HPLC-MS gibi daha hassas kromatografik yöntemlerle ek çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Kremanın % 30'unun süt olduğu düşünülürse, amoksisilin içeren kremadan elde edilen tereyağında ilaç konsantrasyonu daha da düşük olabilir.
- Tilozin için tam sütte belirtilen MRL (50 µg/kg) 4 günlük yasal arınma süresince sağlanırken çalışmada; yağsız süt ve kremada 48. saatte kazeinde ise 24. saatte ≤ 50 µg/kg olarak tespit edildi.
- İlaçların süt proteinine bağlanma oranı (affinitesi) ilaçların yağsız süt ve peynir altı suyu gibi proteince zengin kısımlardaki düzeyini etkileyeceğinden, ilaçların süt proteinlerine bağlanma oranının belirlenmesi farklı süt kısımlarının kullanımına katkı sağlayarak ekonomik kayıpları azaltacaktır. Ayrıca süt protein oranı türler arasında farklılık gösterdiğinden, süt proteinindeki ilaç düzeyleri türlere göre değişebilir.
- Bu çalışmayla elde edilen bulgular süt ve süt ürünlerinin MRL ve yasal arınma süresine bağlı ekonomik kayıpları önlemeye katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Agatonovic-Kustrin S, Ling L, Tham S, Alany R, 2002. Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29, 1, 103-19.

Al Wabel N, 2008. The pharmacokinetics and milk residual behaviour of tylosin in lactating Najdi ewes. Iranian Journal of Veterinary Research, 9, 2, 138-143.

Alcorn J, Lu X, Moscow J, McNamara P, 2002. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 303, 2, 487-96.

Amos H, Kiser T, Loewenstein M, 1985. Influence of milking frequency on productive and reproductive efficiencies of dairy cows. Journal of Dairy Science, 68, 3, 732-9.

Anderson K, Moats W, Rushing J, Wesen D, Papich M, 1996. Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using microbial receptor assay (Charm II) and liquid chromatography methods, after extra-label administration of the drugs to lactating cows. American Journal of Veterinary Research, 57, 1, 73-8.

Ang CY, Luo W, Call VL, Righter HF, 1997. Comparison of liquid chromatography with microbial inhibition assay for determination of incurred amoxicillin and ampicillin residues in milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 11, 4351-6.

Ashraf MA, Aqma WS, 2017. Environmental Conservation, Clean Water, Air & Soil (CleanWAS), IWA Publishing.

Atef M, Youssef S, Atta A, El-Maaz A, 1991. Disposition of tylosin in goats. DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift, 98, 12, 451-3.

Atkinson H, Begg E, 1988a. Prediction of drug concentrations in human skim milk from plasma protein binding and acid-base characteristics. British Journal of Clinical Pharmacology, 25, 4, 495-503.

Atkinson HC, Begg EJ, 1988b. Relationship between human milk lipid–ultrafiltrate and octanol-water partition coefficients. Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 9, 796-8.

Atkinson U, Begg EJ, 1990. Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics. Clinical Pharmacokinetics, 18, 2, 151-67.

Avci T, Elmas M, 2014. Milk and blood pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin following parenteral administrations to cows. The Scientific World Journal, 2014.

Banerjee N, Miller G, Stowe C, 1967. Excretion of aminopyrine and its metabolites into cows' milk. Toxicology and Aapplied Pharmacology, 10, 3, 604-12.

Banks W, Clapperton J, Steele W, 1983. Dietary manipulation of the content and fatty acid composition of milk fat. Proceedings of the Nutrition Society, 42, 3, 399-406.

Barłowska J, Szwajkowska M, Litwińczuk Z, Król J, 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 6, 291-302.

Barrera B, Gonzalez-Lobato L, Otero JA, Real R, Prieto JG, Alvarez AI, Merino G, 2013. Effects of triclabendazole on secretion of danofloxacin and moxidectin into the milk of sheep: role of triclabendazole metabolites as inhibitors of the ruminant ABCG2 transporter. Veterinary Journal, 198, 2, 429-36.

Bauman DE, Eppard PJ, DeGeeter MJ, Lanza GM, 1985. Responses of High-Producing Dairy Cows to Long-Term Treatment with Pituitary Somatotropin and Recombinant Somatotropin1, 2. Journal of Dairy Science, 68, 6, 1352-62.

Bengtsson B, Jacobsson S, Luthman J, Franklin A, 1997. Pharmacokinetics of penicillin-G in ewes and cows in late pregnancy and in early lactation. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 20, 4, 258-61.

Bitzen P-O, Gustafsson B, Jostell K, Melander A, Wåhlin-Boll E, 1981. Excretion of paracetamol in human breast milk. European Journal of Clinical Pharmacology, 20, 2, 123-5.

Bobe G, Lindberg G, Freeman A, Beitz D, 2007. Composition of Milk Protein and Milk Fatty Acids Is Stable for Cows Differing in Genetic Merit for Milk Production1. Journal of Dairy Science, 90, 8, 3955-60.

Bruno F, Curini R, Corcia AD, Nazzari M, Samperi R, 2001. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography– mass spectrometry for trace determination of β-lactam antibiotics in bovine milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 7, 3463-70.

Brzostowski H, Milewski S, Wasilewska A, Tański Z, 1995. The influence of the reproductive cycle on levels of some metabolism indices in ewes. Archivum Veterinarium Polonicum, 35, 1-2, 53-62.

Burmanczuk A, Rolinski Z, Kowalski C, Zan R, 2011. Concentration of cefacetril in milk after its intramammary administration to cows with healthy and inflammed mammary gland. Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy, 55, 685-8.

Buswell J, Barber D, 1989. Antibiotic persistence and tolerance in the lactating sheep following a course of intramammary therapy. British Veterinary Journal, 145, 6, 552-7.

Buswell J, Knight C, Barber D, 1989. Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy. The Veterinary Record, 125, 11, 301-3.

Carceles C, Diaz M, Vicente M, Sutra J, Alvinerie M, Escudero E, 2001. Milk kinetics of moxidectin and doramectin in goats. Research in Veterinary Science, 70, 3, 227-31.

Chen Z-S, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren X-Q, Sugimoto Y, Ross DD, Bates SE, Kruh GD, 2003. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17β-estradiol 17-(β-d-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. Cancer Research, 63, 14, 4048-54.

Chevance A, Jacques AM, Laurentie M, Sanders P, Henri J, 2017. The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: focus on heterogeneous, nonmonotonic data. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 40, 3, 218-30.

Christie W, 1979. The effects of diet and other factors on the lipid composition of ruminant tissues and milk. Progress in Lipid Research, 17, 3, 245-77.

Claycamp HG, Hooberman BH, 2004. Antimicrobial resistance risk assessment in food safety. Journal of Food Protection, 67, 9, 2063-71.

Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loor JJ, Everts-van der Wind A, Lee J-H, Drackley JK, Band MR, Hernandez A, Shani M, 2005. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. Genome Research, 15, 7, 936-44.

Commission EU, No R, 2010. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Communities.

Council NR, 1988. Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows. National Research Council.

Craig, CR, Stitzel RE, 2004. Modern Pharmacology with Clinical Applications. Fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 45.

Çetinkaya F, Muş TE, 2010. Hayvansal Gıdalarda Hormon Kalıntıları, Tüketici Sağlığına Yönelik Riskler ve İlgili Yasal Düzenlemeler. Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 29, 2, 77-82.

Davies D, Holt C, Christie W, 1983. The composition of milk. Biochemistry of lactation, 71-117.

Davis C, 1978. The use of buffers in the rations of lactating dairy cows [Milk fat percent]. Regulation of Acid Base Balance.

De Vries J, 1996. Food safety and toxicity, CRC press.

Dean M, Hamon Y, Chimini G, 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of Lipid Research, 42, 7, 1007-17.

Debono M, Willard KE, Kirst HA, Wind JA, Crouse GD, Tao EV, Vicenzi JT, Counter FT, Ott JL, Ose EE, 1989. Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxo-20-(3, 5-dimethylpiperidin-l-yl) desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives. The Journal of Antibiotics, 42, 8, 1253-67.

DePeters E, Smith N, Acedo-Rico J, 1985. Three or two times daily milking of older cows, and first lactation cows for entire lactations. Journal of Dairy Science, 68, 1, 123-32.

Dudrikova E, Jozef S, Jozef N, 1999. Liquid chromatographic determination of tylosin in mastitic cow's milk following therapy. Journal of AOAC International, 82, 1303-7.

El-Sherif M, Assad F, 2001. Changes in some blood constituents of Barki ewes during pregnancy and lactation under semi arid conditions. Small Ruminant Research, 40, 3, 269-77.

El-Sooud KA, 2003. Influence of albendazole on the disposition kinetics and milk antimicrobial equivalent activity of enrofloxacin in lactating goats. Pharmacological Research, 48, 4, 389-95.

EMEA, 2009. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 32, 515-33.

Eppard PJ, Bauman DE, Bitman J, Wood DL, Akers RM, House WA, 1985. Effect of Dose of Bovine Growth Hormone on Milk Composition: α-Lactalbumin, Fatty Acids, and Mineral Elements1, 2. Journal of Dairy Science, 68, 11, 3047-54.

Fernández-Varón E, Villamayor L, Escudero E, Espuny A, Cárceles CM, 2006. Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intravenous and subcutaneous administration to lactating goats. The Veterinary Journal, 172, 2, 302-7.

Fletouris DJ, 2000. Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis.

Fromm MF, 2004. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. Trends in Pharmacological Sciences, 25, 8, 423-9.

Gaylor D, Axelrad J, Brown R, Cavagnaro J, Cyr W, Hulebak K, Lorentzen R, Miller M, Mulligan L, Schwetz B, 1997. Health risk assessment practices in the US Food and Drug Administration. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 26, 3, 307-21.

Gehring R, Smith G, 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29, 4, 237-41.

Gerk PM, Hanson L, Neville MC, McNamara PJ, 2002. Sodium dependence of nitrofurantoin active transport across mammary epithelia and effects of dipyridamole, nucleosides, and nucleobases. Pharmaceutical Research, 19, 3, 299-305.

Gerk PM, Kuhn RJ, Desai NS, McNamara PJ, 2001a. Active transport of nitrofurantoin into human milk. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 21, 6, 669-75.

Gerk PM, Oo CY, Paxton EW, Moscow JA, McNamara PJ, 2001b. Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 296, 1, 175-80.

Gingerich D, Baggot J, Kowalski J, 1977. Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows. The Canadian Veterinary Journal, 18, 4, 96.

Gisi D, DePeters E, Pelissier C, 1986. Three times daily milking of cows in California dairy herds. Journal of Dairy Science, 69, 3, 863-8.

Grabowski T, Jaroszewski J, 2009. Bioavailability of veterinary drugs in vivo and in silico. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 32, 3, 249-57.

Grappin R, Packard V, Ginn R, 1981. Variability and interrelationship of various herd milk components. Journal of Food Protection, 44, 1, 69-72.

Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V, 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Advanced Drug Delivery Reviews, 50, 3, 245-59.

Hakk H, Shappell NW, Lupton SJ, Shelver WL, Fanaselle W, Oryang D, Yeung CY, Hoelzer K, Ma Y, Gaalswyk D, 2015. Distribution of animal drugs between skim milk and milk fat fractions in spiked whole milk: Understanding the potential impact on commercial milk products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64, 1, 326-35.

Hall B, 1975. Changing composition of human milk and early development of an appetite control. The Lancet, 305, 7910, 779-81.

Higgins CF, 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. Annual Review of Cell Biology, 8, 1, 67-113.

Hytten F, 1954. Clinical and Chemical Studies in Human Lactation—IV and V. British Medical Journal, 1, 4856, 249.

Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y, 2004. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. Cancer Research, 64, 12, 4346-52.

Imperiale F, Lifschitz A, Sallovitz J, Virkel G, Lanusse C, 2004. Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration. Journal of Dairy Research, 71, 04, 427-33.

Imperiale FA, Mottier L, Sallovitz JM, Lifschitz AL, Lanusse CE, 2003. Disposition of doramectin milk residues in lactating dairy sheep. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 10, 3185-90.

Ito S, Alcorn J, 2003. Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. Advanced Drug Delivery Reviews, 55, 5, 653-65.

Jenness R, 1985. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum. Lactation/edited by Bruce L. Larson; written by Ralph R. Anderson.

Jensen D, Hummel R, 1982. Secretion of TCDD in milk and cream following the feeding of TCDD to lactating dairy cows. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 29, 4, 440-6.

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plösch T, Kuipers F, Elferink RPO, Rosing H, 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 24, 15649-54.

Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel AH, 2005. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nature Medicine, 11, 2, 127-9.

Jonker JW, Musters S, Vlaming ML, Plösch T, Gooijert KE, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Verkade HJ, Schinkel AH, 2007. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) is expressed in the harderian gland and mediates transport of conjugated protoporphyrin IX. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 292, 6, C2204-C12.

Kanfer I, Skinner MF, Walker RB, 1998. Analysis of macrolide antibiotics. Journal of Chromatography A, 812, 1-2, 255-86.

Karageorgou EG, Samanidou VF, 2011. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. Journal of Separation Science, 34, 15, 1893-901.

Karapehlivan M, Atakisi E, Atakisi O, Yucayurt R, Pancarci S, 2007. Blood biochemical parameters during the lactation and dry period in Tuj ewes. Small Ruminant Research, 73, 1, 267-71.

Kari FW, Weaver R, Neville MC, 1997. Active Transport of Nitrofurantoin Across the Mammary EpitheliumIn Vivo. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 280, 2, 664-8.

Kaya S, Pirinçci İ, Ünsal A, Traş B, Bilgili A, Akar F, 2007. Veteriner Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 4. Ankara, Medisan, s. 361-401.

Kaya S, Pirinçci İ, Traş B, Ünsal A, Bilgili A, Akar F, Doğan A, Yarsan E, 2002. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Ankara, Medisan, s. 812.

Keown J, Everett R, Empet N, Wadell L, 1986. Lactation curves. Journal of Dairy Science, 69, 3, 769-81.

Kernohan EA, Wadsworth J, Lascelles A, 1971. Changes in the composition of bovine milk fat during milking. Journal of Dairy Research, 38, 1, 65-8.

Kirst H, Ose E, Toth J, Willard K, Debono M, Felty-Duckworth A, Pekarek R, 1988. In vitro and in vivo evaluation of C-20-and C-23-modified derivatives of tylosin against veterinary pathogens. The Journal of Antibiotics, 41, 7, 938-48.

Kirst H, Willard K, Debono M, Toth J, Truedell B, Leeds J, Ott J, Felty-Duckworth A, Counter F, Ose E, 1989. Structure-activity studies of 20-deoxo-20-amino derivatives of tylosin-related macrolides. The Journal of Antibiotics, 42, 11, 1673-83.

Kitchen BJ, 1981. Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. Journal of Dairy Research, 48, 1, 167-88.

Knutsson P, Sperber I, 1961. Distribution and recovery of polyethylene glycol after injection into the udder of the goat. Kungliga Lantbrukshogskolans Annaler, 27, 33-40.

Kroeker E, Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, 1985. Effect of β-lactoglobulin variant and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins. Journal of Dairy Science, 68, 7, 1637-41.

Lespine A, Alvinerie M, Vercruysse J, Prichard RK, Geldhof P, 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. Trends in Parasitology, 24, 7, 293-8.

Lewicki J, 2006. Tylosin A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. United Nations Food and Agriculture Organization.

Li H, Wu G, Tang S, Xiao X, Li J, 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel amoxicillin/sulbactam/prednisolone intramammary infusion in lactating cows after repeated administrations. Veterinarni Medicina, 59, 5.

Lundquist R, Linn J, Otterby D, 1983. Influence of Dietary Energy and Protein on Yield and Composition of Milk from Cows Fed Methionine Hydroxy Analog1. Journal of Dairy Science, 66, 3, 475-91.

Mahnke H, Ballent M, Baumann S, Imperiale F, von Bergen M, Lanusse C, Lifschitz AL, Honscha W, Halwachs S, 2016. The ABCG2 efflux transporter in the mammary gland mediates veterinary drug secretion across the blood-milk barrier into milk of dairy cows. Drug Metabolism and Disposition, 44, 5, 700-8.

Mann H, Carter R, Ely R, 1950. The DDT content of milk products. Journal of Milk and Food Technology, 13, 6, 340-41.

Manners CN, Payling DW, Smith DA, 1988. Distribution coefficient, a convenient term for the relation of predictable physico-chemical properties to metabolic processes. Xenobiotica, 18, 3, 331-50.

Manzini L, Halwachs S, Girolami F, Badino P, Honscha W, Nebbia C, 2017. Interaction of mammary bovine ABCG2 with AFB1 and its metabolites and regulation by PCB 126 in a MDCKII in vitro model. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 40, 6, 591-598.

Marczak M, Okoniewska KM, Okoniewski J, Grabowski T, Jaroszewski JJ, 2015. Indirect relationship between lipophilicity and maximum residue limit of drugs determined for fatty tissue. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 59, 3, 383-91.

Marsteller T, Winkelman N, Gebhart C, Armbruster G, Weldon W, Muller P, Weatherford P, Symanowski J, 2001. Efficacy of intramuscular tylosin for the treatment and control of porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis. Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine, 2, 1, 51-60.

Martinez M, Modric S, 2010. Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 33, 3, 213-26.

McNamara P, Burgio D, Yoo S, 1992. Pharmacokinetics of cimetidine during lactation: species differences in cimetidine transport into rat and rabbit milk. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 261, 3, 918-23.

McNamara PJ, Meece JA, Paxton E, 1996. Active transport of cimetidine and ranitidine into the milk of Sprague Dawley rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 277, 3, 1615-21.

Merino G, Perez M, Real R, Egido E, Prieto JG, Alvarez AI, 2010. In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in Bcrp1 (-/-) mice. Pharmaceutical Research, 27, 10, 2098-105.

Mestorino N, Errecalde JO, 2012. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Considerations for Bovine Mastitis Treatment. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine 423-472.

Morton R, 1954. The lipoprotein particles in cow's milk. Biochemical Journal, 57, 2, 231.

Needs EC, Anderson M, 1984. Lipid composition of milks from cows with experimentally induced mastitis. Journal of Dairy Research, 51, 2, 239-49.

Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, Monardes H, 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. Journal of Dairy Science, 65, 10, 1993-8.

Ni Z, Bikadi Z, F Rosenberg M, Mao Q, 2010. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Current drug metabolism, 11, 7, 603-17.

Nouws J, Guelen P, Mevius D, Driessens F, 1986. Age difference in pharmacokinetics of an amoxycillin trihydrate-15 % formulation administered intramuscularly to ruminants. Veterinary Quarterly, 8, 4, 339-42.

Oo CY, Kuhn RJ, Desai N, McNamara PJ, 1995. Active transport of cimetidine into human milk. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 58, 5, 548-55.

Otero JA, Real R, de la Fuente Á, Prieto JG, Marqués M, Álvarez AI, Merino G, 2013. The bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2 Tyr581Ser single-nucleotide polymorphism increases milk secretion of the fluoroquinolone danofloxacin. Drug Metabolism and Disposition, 41, 3, 546-9.

Peel C, Sandles L, Quelch KJ, Herington A, 1985. The effects of long-term administration of bovine growth hormone on the lactational performance of identical-twin dairy cows. Animal Science, 41, 2, 135-42.

Pengov A, Kirbis A, 2009. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. Analytica Chimica Acta, 637, 1-2, 13-7.

Perez M, Blazquez AG, Real R, Mendoza G, Prieto JG, Merino G, Alvarez AI, 2009. In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. Chemico-Biological Interactions, 180, 1, 106-12.

Perez M, Otero JA, Barrera B, Prieto JG, Merino G, Alvarez AI, 2013. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. Veterinary Journal, 196, 2, 203-8.

Perez M, Real R, Mendoza G, Merino G, Prieto J, Alvarez A, 2009. Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones1. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 32, 5, 498-502.

Poutrel B, Caffin J, Rainard P, 1983. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. Journal of Dairy Science, 66, 3, 535-41.

Power C, Danaher M, Sayers R, O'Brien B, Clancy C, Furey A, Jordan K, 2013a. Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. Journal of Dairy Science, 96, 10, 6223-32.

Power C, Danaher M, Sayers R, O'Brien B, Whelan M, Furey A, Jordan K, 2013b. Investigation of the persistence of rafoxanide residues in bovine milk and fate during processing. Food Additives & Contaminants: Part A, 30, 6, 1087-95.
Power C, Sayers R, Danaher M, Moloney M, O'Brien B, Furey A, Jordan K, 2014. Investigation of the persistence of florfenicol residues in bovine milk and fate during processing. International Dairy Journal, 39, 2, 270-5.
Power C, Sayers R, O'Brien B, Bloemhoff Y, Danaher M, Furey A, Jordan K, 2012. Partitioning of nitroxynil, oxyclozanide and levamisole residues from milk to cream, skim milk and skim milk powder. International Journal of Dairy Technology, 65, 4, 503-6.
Power C, Sayers R, O'Brien B, Clancy C, Furey A, Jordan K, Danaher M, 2013c. Investigation of the persistence of closantel residues in bovine milk following lactating-cow and dry-cow treatments and its migration into dairy products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 36, 8703-10.
Pulido MM, Molina AJ, Merino G, Mendoza G, Prieto JG, Alvarez AI, 2006. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29, 4, 279-87.
Ramos F, Boison J, Friedlander LG, 2018. Amoxicillin, Erişim tarihi 25 Mart 2018. Erişim adresi, http://www.fao.org/3/a-at880e.pdf.
Rasmussen F, 1968a. Active mammary excretion of N4-acetylated p-aminohippuric acid. Acta Veterinaria Scandinavica, 10, 2, 193-4.
Rasmussen F, 1968b. Active mammary excretion of N4-acetylated sulphanilamide. Acta Veterinaria Scandinavica, 10, 4, 402-3.
Real R, Egido E, Perez M, Gonzalez-Lobato L, Barrera B, Prieto JG, Alvarez AI, Merino G, 2011. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 34, 4, 313-21.
Reyns T, De Boever S, De Baere S, De Backer P, Croubels S, 2007. Tissue depletion of amoxicillin and its major metabolites in pigs: influence of the administration route and the simultaneous dosage of clavulanic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 2, 448-54.
Roets E, Beirinckx P, Quintens I, Hoogmartens J, 1993. Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 630, 1-2, 159-66.
Rogan WJ, Bagniewska A, Damstra T, 1980. Pollutants in breast milk. New England Journal of Medicine, 302, 26, 1450-3.
Rogers G, Stewart J, 1982. The effects of some nutritional and non-nutritional factors on milk protein concentration and yield. Australian Journal of Dairy Technology, 37, 1, 26.
Rolleri G, Larson B, Touchberry R, 1956. Protein production in the bovine. Breed and individual variations in the specific protein constituents of milk. Journal of Dairy Science, 39, 1683-9.
Samanidou V, Nisyriou S, 2008. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. Journal of Separation Science, 31, 11, 2068-90.
Santschi E, Papich M, 2000. Pharmacokinetics of gentamicin in mares in late pregnancy and early lactation. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 23, 6, 359-63.
Schadewinkel-Scherkl AM, Rasmussen F, Merck CC, Nielsen P, Frey HH, 1993. Active Transport of Benzylpenicillin Across the Blood-Milk Barrier. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 73, 1, 14-9.
Schinkel AH, Jonker JW, 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Advanced Drug Delivery Reviews, 55, 1, 3-29.
Schultz L, 1977. Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. Journal of Food Protection, 40, 2, 125-31.
Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh T, 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. International Journal of Antimicrobial Agents, 17, 6, 431-7.
Sezgin A, Tras B, 2016. Effects of Mastitis on Pharmacokinetics of Elimination with Milk of Benzimidazole Anthelmintics. British Journal of Pharmacology and Toxicology, 7, 3, 31-5.
Shem-Tov M, Rav-Hon O, Ziv G, Lavi E, Glickman A, Saran A, 1998. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 21, 3, 209-13.
Shem-Tov M, Ziv G, Glickman A, Saran A, 1997. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes. Veterinary Research, 28, 6, 571-80.
Sisodia C, Stowe C, 1964. The mechanism of drug secretion into bovine milk. Annals of the New York Academy of Sciences, 111, 2, 650-61.

Sutton J, 1980. Influence of nutritional factors on the yield and content of milk fat: dietary components other than fat. Bulletin, International Dairy Federation, 125, 126-34.
Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y, 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. Journal of Biological Chemistry, 278, 25, 22644-9.
Syversen GB, Ratkje SK, 1985. Drug distribution within human milk phases. Journal of Pharmaceutical Sciences, 74, 10, 1071-4.
Tekinşen OC, Nizamlıoğlu M, 2004. Süt Kimya, Konya, S.Ü. Basımevi, p. 15-25.
Tras B, 2016. Kedi ve Köpeklerde Davranış Bozuklukları, Konya, Olgun-Çelik Ofset Matbaa Ltdi Sti, p. 359.
van Herwaarden AE, Schinkel AH, 2006. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. Trends in Pharmacological Sciences, 27, 1, 10-6.
van Herwaarden AE, Schinkel AH, 2006. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. Trends in Pharmacological Sciences, 27, 1, 10-6.
van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH, 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. Molecular and Cellular Biology, 27, 4, 1247-53.
Viswanathan C, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R, 2007. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. Pharmaceutical Research, 24, 10, 1962-73.
Wassermann L, Halwachs S, Baumann D, Schaefer I, Seibel P, Honscha W, 2013. Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood–milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model. Archives of Toxicology, 87, 9, 1671-82.
Weikard R, Widmann P, Buitkamp J, Emmerling R, Kuehn C, 2012. Revisiting the quantitative trait loci for milk production traits on BTA6. Animal Genetics, 43, 3, 318-23.
Wheelock J, 1980. Influence of physiological factors on the yields and contents of milk constituents. Bulletin, International Dairy Federation, 125, 83-7.
Whelan M, Chirollo C, Furey A, Cortesi ML, Anastasio A, Danaher M, 2010. Investigation of the persistence of levamisole and oxyclozanide in milk and fate in cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 23, 12204-9.
Whittem T, Whittem J, Constable P, 2012. Modelling the concentration–time relationship in milk from cattle administered an intramammary drug. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 35, 5, 460-71.
Woodford J, Jorgensen N, Barrington G, 1986. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows1. Journal of Dairy Science, 69, 4, 1035-47.
Wu HJ, Luo J, Wu N, Matand K, Zhang LJ, Han XF, Yang BJ, 2008. Cloning, sequence and functional analysis of goat ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2). Molecular Biotechnology, 39, 1, 21-7.
Yurchak AM, Jusko WJ, 1976. Theophylline secretion into breast milk. Pediatrics, 57, 4, 518-20.
Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP, 2002. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 19, 12339-44.
Ziv G, 1980. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. III. Intramammary treatment. VM/SAC [Veterinary Medicine & Small Animal Clinician], 75, 4, 657-70.
Ziv G, Rasmussen F, 1975. Distribution of Labeled Antibiotics in Different Components of Milk Following Intramammary and Intramuscular Administrations®. Journal of Dairy Science, 58, 6, 938-46.
Ziv G, Sulman F, 1973. Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes. American Journal of Veterinary Research.
Ziv G, Sulman F, 1975. Absorption of antibiotics by the bovine udder. Journal of Dairy Science, 58, 11, 1637-44.

7. EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	29.06.2016	Toplantı Sayısı	2016/06	Karar Sayısı	2016/56

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. BÜNYAMİN TRAŞ tarafından sunulan "**Hidrofilik ve lipofilik özellikteki antibakteriyel ilaçların sütün yağlı ve yağsız kısmında davranışlarının belirlenmesi**" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Bu araştırma ile, hidrofilik ilaçların sütün yağsız kısmında lipofilik ilaçların ise sütün krema kısmında birikeceği öngörülerek yasal arınma süresi beklenilmeden kullanılacak ilaca bağlı olarak sütün krema veya yağsız kısmının tüketilebileceğinin ortaya konulmasının amaçlandığı belirtilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan	Doç. Dr. Çağrı ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye	Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye

Doç. Dr. Mustafa GARİP Üye	Ayşegül ÖZTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi	Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye (Katılmadı)

EK B: Tezden Üretilmiş Yayın / Yayınlar



INTERNATIONAL CONFERENCE ON RAW MATERIALS TO PROCESSED FOODS
11-13 APRIL 2018
ANTALYA, TURKEY
E-mail: rpfoods2018@gmail.com Url: rpfoods2018.org

ACCEPTANCE LETTER

Dear Zeynep OZDEMIR,

We are pleased to inform you on behalf of the Organization Committee that your abstract entitled **"Determination of Behaviors of the Hydrophilic and Lipophilic Antibacterial Drugs in Skim Milk and Cream"** has been **accepted for oral presentation** at International Conference on Raw Materials to Processed Foods (RP-Foods 2018) after peer review.

Thank you in advance for your contribution to RP-Foods 2018; if you have any questions, please do not hesitate to contact us at rpfoods2018@gmail.com

We look forward to welcome you in Antalya as a part of RP-Foods 2018.

Abstract Title: Determination of Behaviors of the Hydrophilic and Lipophilic Antibacterial Drugs in Skim Milk and Cream

Presentation Type: Oral Presentation

Prof.Dr. SERKAN SELLİ
Conference Chairman

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2013 yılında mezun oldu. Aynı sene Anadolu İlaç ve Kimya Sanayi'de "Ruhsatlandırma" biriminde çalışmaya başladı. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen Anadolu İlaç ve Kimya Sanayi'de görevini sürdürmektedir.