Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۲، ۱۰۱-۹۵

فارماکوکینتیک فلورفنیکل در گوساله‌ها متعاقب یک تزریق زیر جلدی

علی رسولی [۱*] پیتر لیز [۲] پریتم سیدهو [۲]

۱) بخش فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۲) گروه علوم پایه، کالج سلطنتی دامپزشکی دانشگاه لندن، لندن- انگلستان.

(دریافت مقاله: ۱۵ تیر ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۴ دی ماه ۱۳۸۹)

چکیده

فلورفنیکل یک آنتی بیوتیک وسیع الطیف و مشابه کلرامفنیکل است که مصرف آن در حیوانات مولد غذا تایید شده است. این مطالعه بخشی از یک پروژه بزرگتر است که با استفاده از مدلسازی فارماکوکینتیک- فارماکودینامیک برای ارزیابی داروهای ضدمیکروبی در پنومونی گوساله‌ها انجام شد. ۱۰ رأس گوساله سالم، داروی فلورفنیکل را بصورت یک تزریق زیر جلدی با دوز ۴۰ میلیگرم بازای کیلوگرم وزن دریافت کردند و در زمانهای مشخص (۰- ۱۲۰ ساعت) نمونه‌های سرم و همچنین نمونه‌های اکسودا و ترانسودا با استفاده از یک مدل محفظه بافتی، جمع‌آوری گردید. غلظت فلورفنیکل در نمونه‌ها به کمک یک روش معتبر کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا تعیین مقدار و پارامترهای فارماکوکینتیک فلورفنیکل در مایعات بیولوژیک گوساله‌ها محاسبه گردید. سپس یافته‌های فارماکوکینتیک برای تلفیق فارماکوکینتیک- فارماکودینامیک و برای تعیین نسبت‌های عیار متوسط به حداقل غلظت مهاری (Cave/MIC) اجرام مانهمیا هموليتیکا و پاستورلا مولتوسیدا در دوره‌های ۲۴ ساعته پس از تزریق، بکار گرفته شد. در مدلسازی فارماکوکینتیک، یک مدل دو بخشی برای نمونه‌های سرم و یک مدل یک بخشی برای نمونه‌های اکسودا و ترانسودا استفاده شد. مقایسه داده‌های فارماکوکینتیک سه مایع بیولوژیک، نشانگر آن بود که میانگین ماکزیمم عیار (Cmax) سرم، ۵/۹۱ میکروگرم در میلی لیتر، و میانگین زمان رسیدن به ماکزیمم عیار (Tmax)، ۲/۲۸ ساعت، بترتیب بیشتر و بسیار کمتر از مقادیر مربوطه در اکسودا (۳/۳۹ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۷/۲ ساعت) و ترانسودا (۲/۸۴ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۷/۹ ساعت) بود. این نتایج حاکی از آن است که فلورفنیکل براحتی به مایعات بینابینی نفوذ کرده و انتشار می‌یابد و عیارهایی در حدود نصف عیارهای سرمی را در مایعات محفظه بافتی ایجاد می‌کند. تلفیق فارماکوکینتیک- فارماکودینامیک فلورفنیکل در سرم گوساله‌ها، مقادیر مطلوبی را برای نسبت سطوح زیر منحنی ۰-۲۴ ساعت به حداقل غلظت مهاری (AUC 0-24 h /MIC) اجرام مانهمیا هموليتیکا و پاستورلا مولتوسیدا، بترتیب ۱۵۱/۸ و ۱۸۳/۳ ساعت، و برای مدت زمان حضور عیارهای بالاتر از حداقل غلظت مهاری (T>MIC)، حداقل ۷۲ ساعت، نشان داد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، عیارهای درمانی فلورفنیکل با یکبار تجویز زیر جلدی حداقل بمدت ۷۲ ساعت حفظ می‌شود با این حال ضروری است کفایت این رژیم درمانی در پنومونی گوساله‌ها در کارآزمایی‌های بالینی مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فلورفنیکل، فارماکوکینتیک، تلفیق فارماکوکینتیک- فارماکودینامیک، گوساله، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا.

مقدمه

فلورفنیکل یک آنتی بیوتیک وسیع الطیف و آنالوگ داروی کلرامفنیکل است که در درمان عفونت‌های مختلف دامی به‌ویژه در بیماری‌های عفونی تنفسی گوساله‌ها بکار می‌رود. برای سالیان طولانی کلرامفنیکل به‌عنوان یک داروی آنتی بیوتیک ایده آل در دامپزشکی مطرح بود به‌خاطر این‌که علاوه بر ارزان بودن و سمیت نسبتاً پایین در حیوانات، طیف اثر وسیع ضد میکروبی و به‌واسطه حلالیت در چربی بالا، قدرت نفوذ بافتی بالایی داشت. با وجود این، دو مسئله کاربرد کلرامفنیکل را در دامپزشکی محدود نمود: یکی احتمال بروز عارضه آنمی آپلاستیک مهلک و غیر وابسته به دوز در انسان و دیگری گسترش مقاومت‌های باکتریایی در برابر آن (۲). فلورفنیکل ضمن برخورداری از ویژگی‌های مفید کلرامفنیکل شامل طیف اثر وسیع و قدرت نفوذ بافتی بالا، دارای نیمه عمر حذفی طولانی تری است. از طرف دیگر مهم‌ترین مکانیسم بروز مقاومت میکروبی در برابر کلرامفنیکل غیر فعال شدن آنزیماتیک از طریق استیلاسیون دارو توسط انواع مختلف کلرامفنیکل استیل ترانسفرازها می‌باشد. به‌خاطر جایگزینی اتم فلوئور بجای هیدروکسیل در ساختمان شیمیایی فلورفنیکل، این دارو پایداری بیشتری در برابر غیرفعال شدن آنزیمی دارد و در نتیجه روی بسیاری از سویه‌های باکتریایی مقاوم به کلرامفنیکل موثر است (۱،۱۴). علاوه بر موارد فوق، مزیت مهم‌تر فلورفنیکل جایگزینی گروه سولفومتیل بجای گروه پارا- نیترو در حلقه آروماتیک ساختمان شیمیایی خود و در نتیجه عدم ایجاد عارضه کشنده آنمی آپلاستیک غیر وابسته به دوز در انسان است و لذا کاربرد آن در حیوانات مولد غذا توسط سازمانهای نظارت بر بهداشت مواد غذایی از جمله سازمان غذا و داروی آمریکا تایید شده است (۳).

بهینه سازی مصرف داروها و تنظیم دوزاژ بر اساس یافته‌های فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک داروهای ضدمیکروب از جمله موارد با اهمیت در تحقیقات دهه اخیر در زمینه فارماکوزی به‌شمار می‌روند. در این راستا برای مطالعات اثربخشی و کارآیی داروها در حیوانات هدف، به‌جای استفاده از تعداد زیادی حیوان با دوزها و یا فواصل تجویز مختلف دارو از

(*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۸۶-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: arasooli@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

روشهای علمی تلفیق و مدلسازی فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک (PK-PD integration/ modelling) کمک گرفته می‌شود (۷). در این راستا استفاده از مدل محفظه بافتی (Tissue cage model) ابزاری را برای مطالعه چگونگی پخش یک دارو در مایعات خارج سلولی از نظر سرعت و میزان آن فراهم می‌کند. از ای طریق می توان علاوه بر اطلاع از نحوه پخش دارو در مایعات بینابینی در وضعیت طبیعی، در شرایط التهاب تجربی نیز نحوه انتشار یک دارو را به این محفظه بررسی نمود (۱۲).

مطالعات متنوعی در مورد فارماکوکینتیک فلورفنیکل و یا متابولیت‌های آن در گونه‌های مختلف حیوانی (گوساله، گوسفند، سگ، خرگوش و طیور) متعاقب تزریق وریدی، عضلانی، زیر جلدی و یا خوراکی با دوزاژ مختلف انجام شده است (۱۳،۱۰،۹،۸،۶،۵،۳).

با عنایت به این که در یک مطالعه بالینی تأثیر درمانی یک بار تزریق زیر جلدی ۴۰ میلی‌گرم بازای کیلوگرم فلورفنیکل به اندازه دو تزریق داخل عضلانی ۲۰ میلی‌گرم بازای کیلوگرم وزن به‌فاصله ۴۸ ساعت در درمان بیماری تنفسی گوساله‌ها نشان داده شده بود (۱۴) در مطالعه حاضر، فارماکوکینتیک فلورفنیکل بعد از یک تزریق زیرجلدی با استفاده نمونه‌های سرم و مایعات بیولوژیک حاصل از محفظه بافتی (اکسودا و ترانسودا) مورد بررسی قرار گرفت. از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) برای تعیین مقدار دارو در نمونه‌های مایعات بیولوژیک جمع‌آوری شده در زمان‌های مختلف پس از تجویز دارو استفاده گردید و در نهایت تلفیق یافته‌های فارماکوکینتیک با داده‌های فارماکودینامیکی حاصل از مطالعات میکروبیولوژیک این دارو در شرایط خارج بدن روی اجرام متداول مولد بیماری فوق ـ مانهمیا هموليتیکا و پاستورلا مولتوسیدا ـ صورت گرفت.

مواد و روش کار

تجویز دارو و نمونه برداری: از داروی فلورفنیکل (فرآورده تزریقی ۳۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر، با نام تجاری ®Nuflor ـ ساخت شرکت (Health Schering Plough Animal در ۱۰ راس گوساله نر ۵- ۳ ماهه به میزان ۴۰ میلیگرم بازای کیلوگرم وزن بطور زیر جلدی در ناحیه گردن تزریق شد. نمونه‌های خون در زمان‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۲۹، ۳۳، ۴۸، ۵۴، ۷۲، ۸۰، ۹۶، ۱۲۰ ساعت متعاقب تجویز و نمونه‌های اکسودا و ترانسودای حاصل از محفظه‌های بافتی همان حیوانات در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۲۹، ۳۳، ۴۸، ۵۴، ۷۲، ۸۰، ۹۶، ۱۲۰ ساعت متعاقب تجویز جمع آوری گردید. سپس سرم نمونه‌های خون و نمونه‌های اکسودا و ترانسودا تا زمان آنالیز در فریزر ۷۰- سانتیگراد نگهداری شد. مشخصات و نحوه نصب محفظه بافتی و ایجاد التهاب تجربی توسط Sidhu و همکاران در سال ۲۰۰۳ شرح داده شده است: بطور مختصر در این مدل، محفظه‌های بافتی با استفاده از لوله لاستیکی از جنس سیلیکون (با کاربرد طبی) و مسدود کردن دو طرف آن بوسیله چسب مخصوص سیلیکون، محفظه استوانه ای شکل با حجم داخلی ۱۵ میلی لیتر تهیه و در هر انتها ۱۰ سوراخ با قطر ۶ میلیمتر ایجاد شد. پس از انجام مقدمات لازم برای عمل جراحی، محفظه‌های بافتی بصورت زیرجلدی در ناحیه پهلو در دو طرف بدن حیوان نصب گردید و بعد از گذشت شش هفته به‌منظور دادن فرصت برای التیام زخم و رشد بافت جوانه‌ای در اطراف محفظه‌های بافتی، مطالعه فارماکوکینتیک انجام گرفت. برای ایجاد یک واکنش التهابی حاد، در یکی از محفظه‌ها ۰/۵ میلی لیتر محلول ۱درصد کاراژینان تزریق شد. بدین ترتیب مایعات حاصل از این محفظه بافتی بنام اکسودا و مایعات حاصل از محفظه بافتی بدون تزریق کاراژینان بعنوان ترانسودا مطرح شد (۱۲).

تعیین مقدار فلورفنیکل در مایعات بیولوژیک: فلورفنیکل موجود در نمونه‌های فوق با استفاده از روش استخراج مایع ـ مایع، استخراج شد و با بهره‌گیری از یک روش HPLC (۱،۱۳) و اصلاح آن تعیین مقدار گردید.

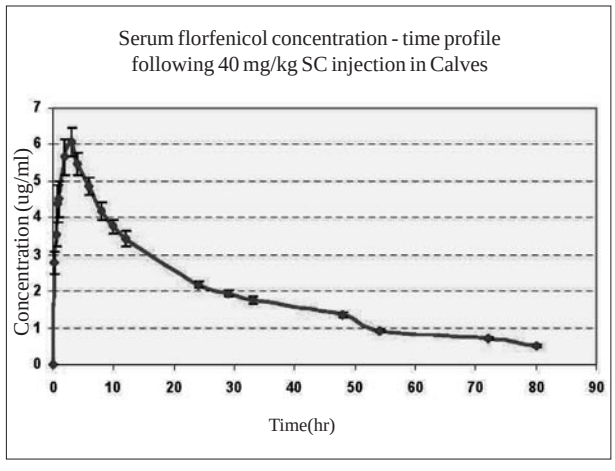
به‌طور خلاصه، ۲۵۰ میکرو لیتر نمونه با افزودن محلول استاندارد کلرامفنیکل به‌عنوان استاندارد داخلی و اضافه کردن ۲۵۰ میکرو لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار در یک لوله مخلوط شده و با افزودن ۲/۵ میلی لیتر اتیل استات و با استفاده از دستگاه همزن ورتکس و دستگاه حمام اولتراسوند داروی مورد نظر وارد فاز آلی شده و پس از سانتریفیوژ لوله، فاز اتیل استات جدا و تحت جریان گاز ازت تبخیر و خشک شد. در نهایت با استفاده از ۲۵۰ میکرو لیتر حلال فاز متحرک، بقایای ته لوله حل شده و بخشی از محلول به‌دست آمده به سیستم کروماتوگرافی مایع تزریق می‌شد. عمل کروماتوگرافی با استفاده از فاز متحرک متانول ـ آب (۵۰- ۵۰) و گاز هلیوم برای خارج کردن گازها و ستون C18 و آشکارساز ماورای بنفش (UV) در طول موج ۲۲۴ نانومتر انجام گرفت. میزان تزریق به سیستم کروماتوگرافی مایع، ۲۰ میکرولیتر و میزان جریان فاز متحرک یک میلی لیتر در دقیقه بود. نرم افزار Beckman System Gold Nouveau برای اخذ داده ها و محاسبه سطوح زیر منحنی (Peak area) فلورفنیکل و استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

در نهایت مقادیر فلورفنیکل نمونه‌ها با استفاده از داده‌های HPLC آنها و منحنی کالیبراسیون با کمک نرم افزار Excel 2003 میکروسافت آفیس محاسبه گردید.

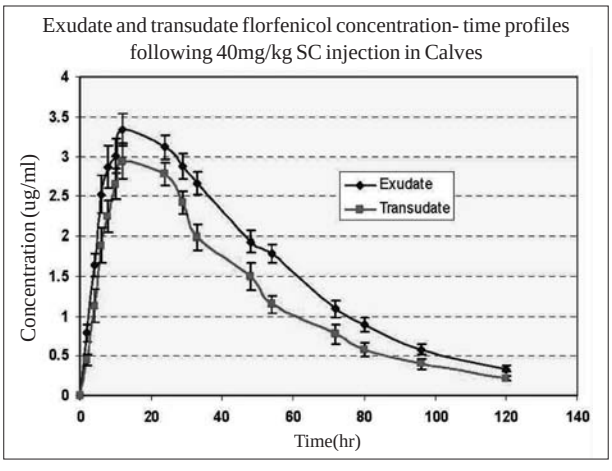
آنالیز پارامترهای فارماکوکینتیک: منحنی‌های غلظت دارو در برابر زمان در مایعات مختلف بیولوژیک (سرم، اکسودا و ترانسودا) با کمک نرم افزار فوق رسم گردید. سپس پارامترهای فارماکوکینتیک با استفاده از نرم افزار WinNonlin 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) محاسبه گردید. در مدلسازی فارماکوکینتیک، تعداد بخش‌ها (کومپارتمان) بر اساس بررسی مقایسه ای منحنی‌های غلظت- زمان مشاهده شده / پیش بینی شده هر سری از مایعات بیولوژیک در تک تک حیوانات و در نظر گرفتن حداقل مقادیر (Akaike Information Criterion) AIC انتخاب شد. یافته‌های فارماکوکینتیک فلورفنیکل در

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱ ـ نمودارغلظت فلورفنیکل در برابر زمان در نمونه‌های سرم گوساله‌ها (میانگین و خطای معیار، تعداد ۱۰ نمونه).



تصویر ۲ ـ نمودارغلظت فلورفنیکل در برابر زمان در نمونه‌های اکسودا و ترانسودای گوساله‌ها (میانگین و خطای معیار، تعداد ۱۰ نمونه).

مایعات بیولوژیک برای تلفیق فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک و تعیین نسبت غلظت میانگین سرمی در دوره‌های ۲۴ ساعته بعد از تجویز دارو به حداقل غلظت مهاری فلورفنیکل روی اجرام مانهمیا هموليتیکا و پاستورلا مولتوسیدا در محیط کشت آبگوشت مولر ـ هینتون و سرم بکار گرفته شد.

بررسی آماری: محاسبات آمار توصیفی داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Excel 2003 انجام گردید و نتایج به‌صورت میانگین و خطای معیار بیان گردید.

نتیجه

پروفایل میانگین غلظت فلورفنیکل در برابر زمان مربوط به سرم در تصویر ۱ و پروفایل‌های مربوط به اکسودا و ترانسودا در تصویر ۲ نشان داده شده است.

در مدلسازی فارماکوکینتیک برای داده‌های سرم مدل دو بخشی با کینتیک درجه یک و برای داده‌های اکسودا و ترانسودا مدل یک بخشی همخوانی و مطابقت بهتری نشان داد. پارامترهای فارماکوکینتیک فلورفنیکل بر اساس مدل‌های فوق برای مایعات بیولوژیک مختلف در جداول ۳-۱ آمده است. لازم به ذکر است که مقادیر حجم پخش و کلیرانس برحسب F (میزان زیست فراهمی دارو) ذکر شده است.

نتایج تلفیق فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک داده‌های مربوط به سرم در جدول ۴ آمده است. نتایج مربوط به محاسبه نسبت غلظت‌های میانگین فلورفنیکل در مایعات بیولوژیک به حداقل غلظت مهاری دارو در محیط کشت میکروبی در جداول ۵، ۶ و ۷ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود غلظت‌های میانگین سرمی دارو تا ۷۲ ساعت بالاتر از حداقل غلظت مهاری (T>MIC) در محیط اکشت و در مورد اکسودا و ترانسودا این زمان تا ۹۶ ساعت نشان داده شد.

بحث

فلورفنیکل به‌عنوان یک داروی آنتی بیوتیک وسیع الطیف برای درمان عفونت‌های ناشی از اجرام باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی و باکتریهای بی هوازی و همچنین کلامیدیا و ریکتزیا در دستگاه تنفسی، ادراری، پوست، بافت‌های نرم، پوست و دستگاه اعصاب مرکزی مطرح است. استفاده نادرست از این دارو همانند سایر آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند بالقوه منجر به بروز مقاومت‌های باکتریایی و خارج شدن آن از ابزارهای مفید دامپزشکان برای مقابله با بیماری‌های میکروبی شود(۱). در این راستا مطالعات فارماکوکینتیک و مشخص شدن تغییرات عیارهای پلاسمایی دارو در گذر زمان می‌تواند به انتخاب رژیمهای دوزاژ این آنتی بیوتیک برای رسیدن به حداکثر کارآیی درمانی و به حداقل رساندن بروز مقاومت‌های باکتریایی مورد لزوم و توجه است.

براساس توصیه‌های مرتبط با داروهای باکتریواستاتیک که اثر ضد میکروبی آنها وابسته به زمان است، حفظ عیارهای پلاسمایی دارو بالاتر از حداقل غلظت مهاری برای باکتری بیماری‌زا در طول فاصله دو تزریق لازم است. به‌علاوه نتایج مطالعات مختلف مقادیر حداقل غلظت مهاری برای مهار ۹۰درصد (MIC90) جدایه‌های میکروبی حاصل از ماهی، خوک، گاو و انسان را بین ۰/۲۵ و ۲ میکروگرم در هر میلی لیتر اعلام کرده‌اند به‌طوری که کارآیی بالا برای اکثر اجرام باکتریایی در مقادیر ۱/۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان داده شده است (۱). بنابراین حفظ این عیار پلاسمایی برای اثر بخشی دارو لازم است.

از طرف دیگر تزریق زیر جلدی داروها دوام اثر آنها را از طریق طولانی کردن زمان جذب و در نتیجه گسترده نمودن منحنی غلظت خونی در برابر زمان فراهم می‌کنند. چنانچه غلظت خونی به‌دست آمده به مدت طولانی تری بالاتر از حداقل غلظت مهاری باشد و در نتیجه ممانعت طولانی تری از تکثیر اجرام میکروبی مورد نظر ایجاد نماید روش مناسب و اقتصادی تری در امر درمان با داروهای ضدمیکروبی محسوب می‌شود. براساس نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ ـ پارامترهای فارماکوکینتیک فلورفنیکل در سرم گوساله‌ها با استفاده از مدل ۲ بخشی. مقادیر کلیرانس و حجم پخش بر حسب F (میزان زیست فراهمی) می‌باشد.

غلظت حداکثر	زمان رسیدن به غلظت حداکثر	حجم پخش محیطی	حجم پخش مرکزی	کلیرانس	نیمه عمر حذف	نیمه عمر جذب	سطح زیر منحنی	شماره حیوان
(mg/ml)	(h)	(ml/kg)	(ml/kg)	(ml/h/kg)	(h)	(h)	(h*µg/ml)	
۶/۴۶	۲/۷۶	۶۵۷۹/۰	۲۶۳۱/۰	۲۲۹/۶	۷/۹۴	۱/۵۶۲	۱۷۴/۲	۱
۵/۲۷	۲/۴۴	۵۹۰۱/۷	۶۶۴۲/۷	۱۹۸/۸	۲۳/۱۶	۰/۵۰۲	۲۰۱/۲	۲
۴/۹۶	۱/۶۸	۴۱۶۱/۷	۷۴۲۶/۴	۲۲۰/۳	۲۳/۳۶	۰/۲۹۴	۱۸۱/۶	۳
۵/۴۰	۱/۹۸	۸۱۳/۹	۶۹۱۱/۰	۱۹۴/۸	۲۴/۵۹	۰/۳۲۷	۲۰۵/۳	۴
۵/۶۸	۲/۶۳	۳۷۵۹/۶۷	۵۳۱۸/۰	۲۳۰/۸	۱۵/۹۷	۰/۷۳۰	۱۷۳/۳	۵
۶/۰۳	۲/۵۰	۳۵۲/۲	۶۰۷۲/۹	۲۱۲/۲	۱۹/۸	۰/۴۴۹	۱۸۸/۵	۶
۵/۹۰	۲/۰۰	۵۵۵۰/۸	۶۱۲۱/۵	۱۸۵/۸	۲۲/۸	۰/۳۷۶	۲۱۵/۲	۷
۵/۴۸	۲/۴۷	۸۵۲۰/۹	۶۶۸۳/۴	۱۶۳/۸	۲۸/۵	۰/۴۴۱	۲۴۵/۸	۸
۴/۰۸	۲/۶۹	۴۷۶۵/۹	۷۰۴۰/۱	۲۷۲/۳	۱۷/۹۳	۰/۷۹۵	۱۴۶/۹	۹
۹/۸۲	۱/۶۲	۴۷۷۸/۲	۳۱۲۵/۰	۲۱۳/۱	۱۰/۲	۰/۴۴۱	۱۸۷/۷	۱۰
۵/۹۱	۲/۲۸	۴۴۸۶/۷	۵۷۹۷/۳	۲۱۲/۰	۱۹/۴	۰/۵۹۲	۱۹۲/۰	میانگین
۰/۴۸۱	۰/۱۳	۸۰۲/۰	۵۲۱/۹	۹/۳۹	۲/۰۶	۰/۱۱۹	۸/۵۲	خطای معیار

مطالعه حاضر، با یکبار تزریق زیر جلدی ۴۰ میلی‌گرم فلورفنیکل بازای کیلوگرم وزن گوساله‌ها پروفایل‌های سرمی و همچنین مایعات بیولویک بدست آمده از مدل محفظه بافتی نتایج مطلوبی را به نمایش گذاشت.

پارامترهای فارماکوکینتیک دارو در نمونه‌های سرم در مقایسه با اکسودا و ترانسودا نشانگر آن است که میانگین ماکزیمم عیار سرم (Cmax)، ۵/۹۱ میکروگرم در میلی لیتر، بالاتر از مقادیر مربوطه در اکسودا، ۳/۳۹ میکروگرم در میلی لیتر، و ترانسودا، ۲/۸۴ میکروگرم در میلی لیتر، بوده است. در حالی که میانگین زمان رسیدن به این ماکزیمم غلظت (Tmax) در سرم، ۲/۲۸ ساعت، بسیار کوتاهتر از زمان‌های مربوطه در اکسودا، ۱۷/۲ ساعت، و ترانسودا، ۱۷/۹ ساعت، بوده است. این نتایج حاکی از آن است که داروی فلورفنیکل براحتی در بافت‌ها نفوذ و در مایعات بینابینی انتشار می‌یابد به‌طوری که میانگین ماکزیمم غلظت‌های دارو در مایعات بیولوژیک محفظه بافتی در حدود نصف عیارهای سرمی بوده است.

میانگین ماکزیمم عیار سرم (Cmax) در این مطالعه قابل مقایسه به داده‌های گزارش شده توسط Varma و همکاران در سال ۱۹۹۸ است. این محققین میانگین ماکزیمم عیار سرم (Cmax) معادل ۵/۳۶ میکروگرم در میلی لیتر را با استفاده از همین فرآورده دارویی و همین دوز و راه تجویز در ۸ گوساله ماده گزارش کرده بودند. با وجود این میانگین زمان رسیدن به ماکزیمم عیار سرم در مطالعه حاضر، ۲/۲۸ ساعت، بسیار کوتاه تر از میانگین نتایج مطالعه مذکور، ۵/۳۴ ساعت (با دامنه بین ۰/۵ تا ۱۲ ساعت) بود (۱۴).

همانطور که در نگاره ۲ نشان داده شده است میانگین عیارهای فلورفنیکل در نمونه‌های اکسودا در تمامی زمانهای سنجش شده بالاتر از مقادیر مربوط به ترانسودا بوده است (۵/۰ ± ۳۶/۲ درصد تفاوت). این تفاوت حاکی از این است فرآیندهای التهابی همچون افزایش جریان خون و/یا حضور مقادیر بالاتر پروتئین در اکسودا و در نتیجه ظرفیت بالاتر اتصال به پروتئین ممکن است به این تفاوت غلظت دارو در اکسودا و ترانسودا کمک کرده باشد.

سطح زیر منحنی غلظت دارو در برابر زمان (AUC) که نشانگر مواجهه کلی بدن با دارو در گذر زمان است یک پارامتر بسیار با اهمیت در تلفیق فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک و بهینه کرده دوز داروی ضد میکروبی بشمار می‌رود (۵). به‌طوری که نسبت سطح زیر منحنی به حداقل غلظت مهاری (AUC/MIC) کم و بیش بعنوان شاخص عمومی و پذیرفته شده برای کارآیی اثر داروی ضدمیکروب محسوب می‌شود. در این مطالعه، میانگین سطح زیر منحنی غلظت دارو در برابر زمان در مورد سرم، ۱۹۲/۰ میکروگرم × ساعت بر میلی لیتر، بدست آمد که در مقایسه با نتایج گزارش شده Varma و همکاران در سال ۱۹۹۸، ۲۲۴/۵ میکروگرم × ساعت بر میلی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ ـ پارامترهای فارماکوکینتیک فلورفنیکل در اکسودای گوساله‌ها با استفاده از مدل یک بخشی.

غلظت حداکثر	زمان رسیدن به غلظت حداکثر	حجم پخش	کلیرانس	نیمه عمر حذفی	نیمه عمر ورود به محفظه	سطح زیر منحنی	شماره حیوان
(μg/ml)	(h)	(ml/kg)	(ml/h/kg)	(h)	(h)	(h*μg/ml)	
۳/۰۶	۱۷/۹	۹۳۷۳/۵	۱۷۴/۳	۳۷/۳	۵/۵۶	۲۲۹/۵	۱
۳/۲۵	۱۸/۲	۸۰۴۲/۶	۱۸۸/۵	۲۹/۶	۶/۴۹	۲۱۲/۲	۲
۳/۱۶	۱۳/۹	۹۱۱۹/۳	۲۱۵/۸	۲۹/۳	۴/۲۸	۱۸۵/۴	۳
۳/۷۴	۲۰/۳	۶۳۷۸/۹	۱۶۲/۵	۲۷/۲	۸/۱۹	۲۴۶/۱	۴
۲/۶۵	۲۰/۳	۹۱۸۵/۶	۲۲۵/۱	۲۸/۳	۸/۰۰	۱۷۷/۷	۵
۳/۷۰	۱۶/۴	۳۹۷۱/۲	۲۴۲/۷	۱۱/۳	۱۱/۴	۱۶۴/۸	۶
۳/۶۰	۱۵/۵	۷۵۷۱/۷	۱۸۸/۳	۲۷/۹	۵/۱۹	۲۱۲/۴	۷
۳/۹۴	۱۷/۱	۶۴۱۸/۵	۱۷۲/۶	۲۵/۸	۶/۳۷	۲۳۱/۷	۸
۲/۲۴	۱۸/۶	۱۲۲۶۵/۵	۲۴۹/۲	۳۴/۱	۶/۱۵	۱۶۰/۵	۹
۴/۵۸	۱۳/۸	۶۰۰۵/۶	۱۵۳/۴	۲۸/۰	۴/۳۵	۲۶۰/۶	۱۰
۳/۳۹	۱۷/۲	۷۸۵۳/۲	۱۹۷/۲	۲۷/۹	۶/۶۰	۲۰۸/۱	میانگین
۰/۲۱۲	۰/۷۳۳	۷۲۴/۹	۱۰/۷	۲/۱۴	۰/۶۷۷	۱۰/۹۸	خطای معیار

جدول ۳ ـ پارامترهای فارماکوکینتیک فلورفنیکل در ترانسودای گوساله‌ها با استفاده از مدل یک بخشی. مقادیر کلیرانس و حجم پخش بر حسب F (میزان زیست فراهمی) می‌باشد.

غلظت حداکثر	زمان رسیدن به غلظت حداکثر	حجم پخش	کلیرانس	نیمه عمر حذفی	نیمه عمر ورود به محفظه	سطح زیر منحنی	شماره حیوان
(μg/ml)	(h)	(ml/kg)	(ml/h/kg)	(h)	(h)	(h*μg/ml)	
۲/۶۹	۱۶/۹	۸۴۵۳/۲	۲۸۲/۳	۲۰/۷۵	۷/۲۶	۱۴۱/۷	۱
۲/۸۰	۱۹/۴	۷۸۹۱/۶	۲۴۱/۴	۲۲/۶۶	۸/۶۴	۱۶۵/۷	۲
۲/۴۴	۱۸/۴	۶۶۵۱/۸	۳۲۵/۲	۱۴/۱۸	۱۱/۵۹	۱۲۳/۰	۳
۳/۳۲	۲۳/۶	۵۶۰۳/۵	۱۸۱/۸	۲۱/۳۶	۱۲/۸۰	۲۲۰/۰	۴
۲/۴۶	۲۱/۳	۸۰۸۶/۸	۲۶۴/۷	۲۱/۱۸	۱۰/۷۴	۱۵۱/۱	۵
۳/۲۱	۱۶/۶	۴۵۹۸/۹	۲۷۵/۶	۱۱/۵۷	۱۱/۵۰	۱۴۵/۲	۶
۲/۹۹	۱۶/۸	۸۰۹۲/۴	۲۴۱/۸	۲۳/۲۰	۶/۶۴	۱۶۵/۴	۷
۲/۷۵	۱۵/۷	۸۲۰۹/۶	۳۰۰/۰	۱۸/۹۷	۶/۸۰	۱۳۳/۳	۸
۱/۹۲	۱۹/۴	۱۳۵۰۲/۲	۳۰۳/۷	۳۰/۸۲	۷/۰۰	۱۳۱/۷	۹
۳/۸۱	۱۰/۷	۵۶۸۵/۰	۳۲۴/۶	۱۲/۱۴	۴/۸۹	۱۲۳/۲	۱۰
۲/۸۴	۱۷/۹	۷۶۷۷/۵	۲۷۴/۱	۱۹/۶۸	۸/۷۸	۱۵۰/۰	میانگین
۰/۱۶۸	۱/۱۰	۲۴۴۹/۴	۱۳/۹	۱/۸۴	۰/۸۴۶	۹/۱۵	خطای معیار

لیتر (با دامنه بین ۱۸۳ تا ۳۵۵)، اندکی کمتر بود (۱۴).

یافته‌های Lobell و همکاران، سال ۱۹۹۴، حاصل از یکبار تجویز داخل عضلانی ۲۰ میلی گرم بازای کیلوگرم وزن در ۱۰ راس گوساله میانه Cmax برابر با ۳/۰۷ میکروگرم در میلی لیتر (با دامنه ۵/۶۰-۱/۴۳) و میانه Tmax ۳/۳۳ ساعت (با دامنه ۸/۰۰-۰/۷۵) با نیمه عمر حذف ۱۸/۳ ساعت (با دامنه ۴۴/۰ - ۸/۳۰) و همچنین میانه AUC ۷۰/۷ میکروگرم ـ ساعت در میلی لیتر با دامنه (۱۰۴/۲ - ۵۳/۳) و با میانه فراهمی زیستی ۷۸/۵ درصد را نشان داد (۸). از طرف دیگر نتایج مطالعه De Craene و همکاران ۱۹۹۷ با یکبار تزریق داخل وریدی ۲۰ میلی گرم بازای کیلوگرم در ۶ راس گوساله با وزن متوسط ۱۵۴ کیلوگرم، میانگین نیمه عمر حذفی ۳/۱۸ ساعت، میانگین AUC ۹۷/۵ میکروگرم ـ ساعت در میلی لیتر، میانگین حجم پخش ۰/۹۵ لیتر بازای کیلوگرم و میانگین پاک سازی ۰/۲۲ لیتر در ساعت بازای کیلوگرم را نشان داد (۳).

این یافته‌ها همراه با داده‌های مطالعه Varma و همکاران در سال ۱۹۹۸، که میانگین AUC ۲۲۶/۶ میکروگرم ـ ساعت در میلی لیتر (با دامنه ۲۷۸/۰ - ۱۹۲/۰) حاصل از دو بار تجویز داخل عضلانی ۲۰ میلی گرم بازای کیلوگرم وزن با فاصله ۴۸ ساعت را در ۱۶ راس گوساله گزارش کردند حاکی از این است که مقادیر و تداوم عیار سرمی فلورفنیکل حاصل از تجویز زیر جلدی ۴۰ میلی گرم بازای کیلوگرم وزن در گوساله‌ها در این مطالعه با دو بار تجویز داخل عضلانی قابل مقایسه است (۱۴).

یافته‌های Varma و همکاران در سال ۱۹۹۸، با یکبار تجویز زیر جلدی ۴۰ میلی گرم بازای کیلوگرم در گوساله‌ها، تداوم عیار سرمی بالای ۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ ـ تلفیق فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک فلورفنیکل در سرم گوساله‌ها(۱۱).

پارامتر	پاستورلا مولتوسیدا	مانهمیا هموليتيكا
MIC (μg/ml) (n=6 strains)	۰.۴۸	۰.۵۸
C_{max}/MIC	۱۲.۳۱	۱۰.۱۹
T>MIC (h)	۷۲	۷۲
AUC 0-24/MIC (h)	۱۸۳.۴	۱۵۱.۸
AUC 0-∞MIC (h)	۳۹۹.۹۶	۳۳۱.۰۰

جدول۶ ـ نسبت غلظت میانگین فلورفنیکل در اکسودا به حداقل غلظت مهاری (Cave/MIC) در دوره‌های ۲۴ ساعته متعاقب تجویز زیر جلدی دارو.

		C_{ave}/MIC			
		72-96 (h)	48-72(h)	24-48(h)	0-24(h)
مانهمیا هموليتيكا	براساس MIC درمحیط کشت (0.52 μg/ml)	4.75	4.79	2.96	1.58
	براساس MIC درسرم (0.58 μg/ml)	4.26	4.29	2.66	1.41
پاستورلا مولتوسیدا	براساس MIC درمحیط کشت (0.39 μg/ml)	6.33	6.38	3.95	2.10
	براساس MIC درسرم (0.48 μg/ml)	5.15	5.19	3.21	1.71

میکروگرم در میلی لیتر را بمدت حدود ۱۲۰ ساعت و بالای ۱/۰ میکروگرم در میلی لیتر بمدت حدود ۶۵ ساعت نشان داد (۱۴). در مطالعه حاضر نیز عیارهای سرمی بیش از ۷۲ ساعت بالاتر ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر و بیش از ۴۸ ساعت بالاتر از ۱/۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. در حالی که با تجویز داخل عضلانی ۲۰ میلی‌گرم بازای کیلوگرم در مطالعه Lobell و همکاران، سال ۱۹۹۴، در اکثر دامها عیار سرمی بالاتر ۰/۱۹ میکروگرم در میلی لیتر بمدت ۶۰ ساعت مشاهده شد (۸).

با توجه یافته‌های فوق، تجویز زیر جلدی فلورفنیکل عیار بالای سرمی و در نتیجه عیار بافتی را بمدت طولانی تری نسبت به روش داخل عضلانی حفظ می‌کند و در این میان بویژه افزایش حجم پخش دارو با این روش تجویز، سبب تداوم بیشتر عیار بالاتر سرمی دارو و در نتیجه اثر درمانی آن می شود.

یافته‌های بالینی حاصل از یکبار تجویز زیر جلدی ۴۰ میلی گرم فلورفنیکل بازای کیلوگرم وزن برای درمان متافیلاکتیک در گله‌های با شیوع طبیعی عفونت تنفسی گوساله‌های زیر ۳ ماه نیز حاکی اثربخشی معادل یا بهتر این دارو در مقایسه با تیل مایکوزین (۱۲/۵ میلی گرم بازای کیلوگرم دو بار در روز بطور خوراکی بمدت ۵ روز) و یا داکسی سایکلین (۱۲/۵ میلی گرم بازای کیلوگرم دو بار در روز بطور خوراکی بمدت ۵ روز) بوده است (۲). همچنین مطالعه Hoar و همکاران در سال ۱۹۹۸، حاکی از تاثیر درمانی بالاتر روش تزریق داخل عضلانی ۲۰ میلی گرم فلورفنیکل

جدول ۵ ـ نسبت غلظت میانگین سرمی فلورفنیکل به حداقل غلظت مهاری (Cave/MIC) در دوره‌های ۲۴ ساعته متعاقب تجویز زیر جلدی دارو.

		C_{ave}/MIC		
		0-24(h)	24-48(h)	48-72(h)
مانهمیا هموليتيكا	براساس MIC درمحیط کشت (0.52 μg/ml)	۷/۰۶	۳/۳۱	۱/۷۱
	براساس MIC درسرم (0.58 μg/ml)	۶/۳۳	۲/۹۷	۱/۵۳
پاستورلا مولتوسیدا	براساس MIC درمحیط کشت (0.39 μg/ml)	۹/۴۱	۴/۴۱	۲/۲۸
	براساس MIC درسرم (0.48 μg/ml)	۷/۶۵	۳/۵۸	۱/۸۵

جدول ۷ـ نسبت غلظت میانگین فلورفنیکل در ترانسودا به حداقل غلظت مهاری (Cave/MIC) در دوره‌های ۲۴ ساعته متعاقب تجویز زیر جلدی دارو.

		C_{ave}/MIC			
		0-24(h)	24-48(h)	48-72(h)	72-96 (h)
مانهمیا هموليتيكا	براساس MIC درمحیط کشت (0.52 μg/ml)	۳/۷۷	۳/۴۴	۱/۸۵	۱/۰۲
	براساس MIC درسرم (0.58 μg/ml)	۳/۳۸	۳/۰۹	۱/۶۶	۰/۹۱
پاستورلا مولتوسیدا	براساس MIC درمحیط کشت (0.39 μg/ml)	۵/۰۳	۴/۵۹	۲/۴۶	۱/۳۶
	براساس MIC درسرم (0.48 μg/ml)	۴/۰۸	۳/۷۳	۲/۰۰	۱/۱۰

بازای کیلوگرم دو بار با فاصله ۴۸ ساعت در مقایسه با یکبار تجویز زیر جلدی ۱۰ میلی گرم تیل مایکوزین بازای کیلوگرم در گوساله‌های مبتلا به عفونت تنفسی متمایز نشده (undifferentiated) در غرب کانادا بوده است (۴).

میانگین مقادیر سطح زیر منحنی غلظت دارو در برابر زمان در مورد اکسودا، ۲۰۸/۱ میکروگرم × ساعت بر میلی لیتر، در مقایسه با ترانسودا، ۱۵۰/۰ میکروگرم × ساعت بر میلی لیتر، بالاتر بود. بنظر می رسد بالاتر بودن ماکزیمم غلظت دارو و پایین تر بودن میزان پاکسازی (کلیرانس) در نمونه‌های اکسودا در مقایسه با ترانسودا، ۱۹۷/۲ در برابر ۲۷۴/۱ میلی لیتربازای کیلوگرم در ساعت، به این تفاوت کمک کرده است.

مقادیر بالاتر از یک برای نسبت متوسط غلظت دارو به حداقل غلظت مهاری (Cave/MIC) برای نمونه‌های سرمی تا مدت ۷۲ ساعت و برای نمونه‌های اکسودا و ترانسودا تا ۹۶ ساعت بدست آمد. این یافته‌ها نشانگر این است که یک تزریق زیر جلدی فلورفنیکل زمان حضور عیارهای بالاتر دارو در مایعات بیولوژیک از حداقل غلظت مهاری (T>MIC) را برای مدت ۳-۴ روز فراهم می سازد که برای درمان اجرام بیماریزای حساس عفونت تنفسی گوساله‌ها کفایت می‌کند.

تلفیق فارماکوکینتیک ـ فارماکودینامیک فلورفنیکل در سرم گوساله‌ها مقادیر مطلوبی را برای شاخص (AUC0-24h/MIC) در مورد اجرام مانهمیا هموليتيكا و پاستورلا مولتوسیدا، به ترتیب ۱۵۱/۸ و ۱۸۳/۳ ساعت، و همچنین برای شاخص (T>MIC) حداقل ۷۲ ساعت نشان داد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، عیارهای درمانی فلورفنیکل با یکبار

www.SID.ir

Archive of SID

تجویز زیر جلدی با دوز ۴۰ میلیگرم بازای کیلوگرم وزن در گوساله‌ها حداقل بمدت ۷۲ ساعت حفظ می‌شود با این حال ضروری است یافته‌های بالقوه مطلوب این مطالعه و کفایت این رژیم درمانی در عفونت تنفسی گوساله‌ها در کارآزمایی‌های بالینی مورد بررسی و تایید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه تهران به‌خاطر فراهم نمودن امکان سفر و تامین بخشی از هزینه‌های مالی ماموریت پژوهشی مولف در انگلستان تشکر و تقدیر به‌عمل می‌آید. همچنین نگارندگان از دانشجویان تخصصی و همکاران دیگر گروه علوم پایه کالج سلطنتی دامپزشکی دانشگاه لندن به‌ویژه pelligand, Z. Cheng, T. Potter, J. Illambas L. قدردانی می‌نمایند.

References

1. Anadon, A., Martinez, M. A., Martinez, M., Rios, A., Caballero, V., Ares, I., Martinez-Larranaga, R. M. (2008) Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. J. Agric. Food Chem. 56: 11049-11056.
2. Catry, B., Duchateau, L., Van De Ven, J., Laevens, H., Opsomer, G., Haesebrouck, F., De Kruif, A. (2008) Efficacy of metaphylactic florfenicol therapy during natural outbreaks of bovine respiratory
3. disease. J. Vet. Pharmacol. Therap. 31: 479-487.
De Craene, B. A., Deprez, P., D'Haese, E., Nelis, H. J., Bossche, W. V., De Leenheer, A. P. (1997) Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1991-95.
4. Hoar, B. R., Delinski, M. D., Ribble, C. R., Janzen, E. D., Johnson, J. C. (1998) A comparison of the clinical field efficacy and safety for the treatment of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. Can. Vet. J. 39: 161- 166.
5. Koc, F., Ozturk, M., Kadioglu, Y., Dogan, e., Yanmaz, L. E., okumus, Z. (2009) Pharmacokinetics of florfenicol after intravenous and intramuscular administration in New Zealand White rabbits. Res. Vet. Sci. 87: 102-105.
6. Lane, V.M., Wetzlich, S., Clifford, a., Taylor, I., Criagmill, A. L.(2004) Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of florfenicol in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 27: 191-196.
7. Lees, P., Shojaee Aliabadi, F., Toutain, P. L. (2004) PK-PD modelling: An alternative to dose titration studies for antimicrobial drug dosage selection. RAJ Pharma. March: 175-180.
8. Lobell, R. D., Varma, K. J. Johnson, J. C., Sam, R. A., Gerken, D. F., Ashcraft S. M. (1994) Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattel. J. Vet. Pharmacol. Therap. 17: 253-258.
9. Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M.S., Hwang, Y. H, Yun, H. I. (2008) Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. Res. Vet. Sci. 84: 85-89.
10. Shen, J., Hu, D., Wu, X., Coats, J. R. (2003) Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. J. Vet. Pharmacol. Therap. 26:337-341.
11. Sidhu PK., Illambas, J., Potter, T., Rycroft, A., Lees, P., (2009) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of florfenicol in calves. J. Vet. Pharmacol. Therap. 32 (Suppl. 1), 67-67.
12. Sidhu, P., Shojaee Aliabadi, F., Andrews, M., Lees, P. (2003) Tissue chamber model of acute inflammation in farm animal species. Res. Vet. Sci. 74:67-77.
13. Varma, K. J., Adams, P. E., Powers, T. E., Powers, J. D., Lamendola, J. F. (1986) Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. J. Vet. Pharma. Therap. 9: 412-425.
14. Varma, K. J., Lockwood, P. W., Cosgrove, S. B., Rogers, E. R. (1998) Pharmacology safety and clinical efficacy of Nuflor (florfenicol) following subcutaneous administration to cattle. Cattle Pract. 6: 281-286.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Vet. Res. 66, 2:95-101, 2011

FLORFENICOL PHARMACOKINETICS IN CALVES FOLLOWING A SINGLE SUBCUTANEOUS INJECTION

Rassouli, A.[1*], Lees, P.[2], Sidhu, P.[2]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*Deparment of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, University of London, London- UK.*

(Received 6 July 2010 , Accepted 24 December 2010)

Abstract:

This study was a part of a larger project using pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modelling to evaluate antimicrobial drugs in calf pneumonia. Ten healthy animals received 40 mg/kg florfenicol by a single subcutaneous (SC) injection and at pre-determined time points (0-120 h), serum, exudate and transudate samples were collected using a tissue cage model. Florfenicol concentrations in samples were determined by a validated HPLC method and then PK parameters of florfenicol in biological fluids of calves were calculated. Florfenicol PK data were used for PK-PD integration and for determination of average concentrations/minimal inhibitory concentration (Cave/MIC) ratios of *M. hemolytica* and *P. multocida* in 24 h periods following injection. In PK modelling, a two-compartmental model for serum and a one-compartmental model for exudate and transudate were used. Comparing the PK parameters of three biological fluids indicated that mean serum Cmax (5.91 µg/ml) was higher and mean serum Tmax (2.28 h) was much shorter than those of exudate (3.39 µg/ml, 17.2 h) and transudate (2.84 µg/ml, 17.9 h). These results suggest that florfenicol readily penetrates and distributes in interstitial fluids and achieves concentrations about half of the serum levels in tissue cage fluids. PK- PD integration of florfenicol in serum of calves showed desirable values for AUC 0-24 h/MIC in *M. hemolytica* and *P. multocida*, 151.8 and 183.3 h, respectively and T>MIC was at least 72 h. In conclusion, florfenicol therapeutic concentration in calves is achieved at least for 72 h by a single SC injection, though the efficacy of this dosage regimen in calf pneumonia should be confirmed in clinical field trials.

Key words: Florfenicol, Pharmacokinetics, PK-PD integration, calf, HPLC.

***Corresponding author's email: arasooli@ut.ac.ir, Tel: 021-61117086, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir