

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.4

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ВЕСТНИК ВЕТЕРИНАРИИ

№4

International bulletin
of Veterinary Medicine



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2023

www.spbguvvm.ru

№1/2023

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ВЕСТНИК ВЕТЕРИНАРИИ

СОДЕРЖАНИЕ

Инфекционные болезни	•Иммунохроматографический тест для выявления противотуберкулезных антител. Хаммадов Н.И., Хаертынов К.С., Ахмадеев Р.М., Шангарав Р.И., Усольцев К.В., Хамидуллина А.И., Галеева А.Г.	14
	•Формирование специфического иммунитета у поросят при вакцинации против цирковирусной инфекции. Шахов А.Г., Сашина Л.Ю., Владимирова Ю.Ю., Акулова К.О., Никоненко Г.В.	21
	•Характер экспрессии генов иммунитета птиц при инфицировании GALLID ALPHANERPESVIRUS 2 и MELEAGRID-ALPHANERPESVIRUS 1. Тарлавин Н.В., Веретенников В.В., Джавадов Э.Д., Красков Д.А., Сидоренко К.В., Махнин И.А.	30
	•Роль нейтрофильных гранулоцитов и катионных белков в качестве биомаркеров тяжести течения инфекционных и неинфекционных заболеваний животных. Пименов Н.В., Лаптев С.В., Пермьякова К.Ю., Марзанова С.Н., Иванникова Р.Ф.	37
	•Влияние уровня компартиментализации на экспортный потенциал региона, в разрезе Новосибирской и Томской областей. Сенина М.А., Кривецкий К.И., Архипенко Е.В.	49
	•Изучение эффективности кормовой добавки для сельскохозяйственной птицы «ВИТАСИЛ 2 ПЛЮС». Джавадов Э.Д., Новикова О.Б., Веретенников В.В., Тарлавин Н.В., Красков Д.А., Ярыгина Н.А.	57
	•Молекулярная характеристика Cryptosporidium scrofarum в свиноводческих хозяйствах Вологодской области Северо-Западного Федерального округа РФ. Кряжев А.Л., Новиков А.С.	68
	•Оценка IN VITRO пробиотических свойств и бактериоциногенного потенциала штаммов микроорганизмов L. Acidophilus 13, E. Faecium K-50 и их композиции. Живодерова А.И., Самойленко В.С.	78
	•Патогенные Escherichia coli: факторы вирулентности, распространение, проблемы диагностики. Забровская А.В.	87
	•Эффективность научно-обоснованных программ мониторинга и лечебно-профилактических мероприятий при управляемых инфекционных болезнях животных. Порываева А.П., Печура Е.В., Петрова О.Г., Безбородова Н.А. –Лысова Я.Ю., Белоусова Д.А.	96
Инвазионные болезни	•Биоразнообразие гельминтов домашних северных оленей в Мурманской области. Логинова О.А., Плотникова Ю.К.	111
	•Мониторинг эпизоотической ситуации клещевой инвазии на территории г. Ставрополь. Проскурин Д.А., Дилекова О.В.	117
Фармакология, токсикология, фармация	•Влияние различных препаратов на темпы роста личинок стерляди. Кузьмичева С.В., Микряков Д.В., Новиков Д.А., Салов С.Р.	126
	•Морфофункциональные изменения в органах репродукции самок на фоне применения фитопрепарата (экспериментальное исследование). Огурной И.В., Бойко Т.В., Кошкарев М.В.	133
	•Изучение биоэквивалентности препаратов Докситрон жевательные таблетки и Ронаксан при применении собакам. Комаров А.А., Енгатиев С.В., Селимов Р.Н., Мироненко А.В., Гончарова Е.Н., Габидуллина Д.Э.	143

УДК: 619-615.33

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.127

ИЗУЧЕНИЕ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДОКСИТРОН ЖЕВАТЕЛЬНЫЕ ТАБЛЕТКИ И РОНАКСАН ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СОБАКАМ

Комаров А.А.^{1*} – д-р биол. наук, проф. РАН, (ORCID 0000-0003-2799-6760); **Енгашев С.В.**² – д-р ветеринар. наук, акад. РАН, проф., (ORCID 0000-0002-7230-0374); **Селимов Р.Н.**³ – канд. ветеринар. наук, зав. лабораторией изучения фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств; **Мироненко А.В.**⁴ – канд. ветеринар. наук, магистр Института биохимической технологии и нанотехнологии, (ORCID 0000-0002-9701-3822); **Гончарова Е.Н.**³ – канд. хим. н., ст. науч. сотр. лаборатории изучения фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств, (ORCID:0000-0002-2207-3257); **Габидуллина Д.Э.**³ – ст. науч. сотр. лаборатории изучения фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств, (ORCID:0009-0007-8722-9009).

¹ ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

³ ООО «МИП «Академия инноваций»

⁴ ФГБОУ ВО «РУДН имени Патриса Лумумбы»

*komarov.a@vetmag.ru

Ключевые слова: Докситрон жевательные таблетки, Ронаксан, доксициклин, биоэквивалентность, фармакокинетика.

Key words: Doxytron chewable tablets, Ronaxan, doxycycline, bioequivalence, pharmacokinetics.

Поступила: 06.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 05.12.2023



РЕФЕРАТ

Проведено исследование по изучению биоэквивалентности препаратов «Докситрон жевательные таблетки» и «Ронаксан» при применении собакам. Было сформировано 2 группы животных по 4 собаки в каждой. Для опыта использовался перекрестный дизайн исследования. Отбор биологического материала (кровь) проводили до введения препаратов, и через 15, 30, 45 мин, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 ч после введения препаратов. В процессе исследования контролировали следующие параметры: концентрации действующего вещества препаратов в плазме крови собак. В статье подробно описана схема опыта, реактивы и стандартные образцы, процесс пробоподготовки образцов плазмы крови и ВЭЖХ-МС/МС анализ. Дана оценка биоэквивалентности препаратов «Докситрон жевательные таблетки» и «Ронаксан». Время достижения максимальной плазменной концентрации (T_{max}) в среднем составило 3.0 ч для исследуемого препарата «Докситрон жевательные таблетки» и 3.0 ч для референтного препарата «Ронаксан». Максимальная плазменная концентрация (C_{max}) составила $4007,4 \pm 964,4$ нг/мл для исследуемого препарата «Докситрон жевательные таблетки» и $3794,9 \pm 1121,5$ нг/мл для референтного препарата «Ронаксан». 90% доверительные интервалы соотношений C_{maxT}/C_{maxR} и AUC_{0-T}/AUC_{0-TR} доксициклина находятся в пределах диапазона 80-125 %. Препараты «Докситрон жевательные таблетки» и «Ронаксан» являются биоэквивалентными.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Современную ветеринарную медицину невозможно представить без антибиотикотерапии [4]. Тетрациклины известны человечеству после пенициллинов. Первый тетрациклин имел название – хлортетрациклин и был открыт в 1945 г. В середине 20 века синтезировали доксициклин, который в отличие от других тетрациклинов практически не угнетает микрофлору кишечника, имеет хорошую биодоступность. В настоящее время антибиотики на основе доксициклина остаются актуальными и препаратами выбора при лечении многих заболеваний домашних животных, вызванных бактериями, спирохетами, риккетсиями и хламидиями [1; 3; 6-11].

Лекарственный препарат «Докситрон жевательные таблетки» (далее – исследуемый препарат), разработанный ООО «НВЦ Агроветзащита», выпускается в двух модификациях, содержащих в качестве действующих веществ в 1 таблетке: 20 мг и 100 мг доксициклина гиклата и вспомогательные вещества.

Препарат «Ронаксан» (далее – референтный препарат), производимый «Boehringer Ingelheim Animal Health France SCS», выпускается в двух модификациях, содержащих в качестве действующих веществ в 1 таблетке: 20 мг и 100 мг доксициклина гиклата и вспомогательные вещества. Выпускается в виде таблеток.

Доксициклина гиклат, входящий в состав препарата, относится к полусинтетическим антибиотикам третьего поколения тетрациклиновой группы. Обладает широким спектром антимикробного действия в отношении микоплазм, спирохет, хламидий, риккетсий, активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Механизм бактериостатического действия доксициклина связан с угнетением энзимов, катализирующих связывание аминоацетил-РНК с рибосомальными акцепторами, что приводит к блокированию взаимодействия аминоацилтранспортной РНК с 30S-субъединицей рибо-

сомальной мембраны и нарушению синтеза белка микробной клетки [5; 11-14].

Цель исследования – изучить фармакокинетическую биоэквивалентность препарата «Докситрон жевательные таблетки» и препарата «Ронаксан» при применении собакам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования выполнялись согласно Приказу Министерства сельского хозяйства РФ от 6 марта 2018 г. N 101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» [2, 15].

Исследование проводилось в период с 2019-2022г. на базе ООО «МИП «Академия инноваций» и ООО «Калининградский областной центр ветеринарной медицины»

Схема опыта

Изучение биоэквивалентности препаратов проводилось на собаках (возраст: 1-2 г., масса: 20-25 кг, пол: ♂ ♀). Собаки не получали никаких лекарственных препаратов в течение 30 суток до начала эксперимента. Группы формировали по принципу аналогов.

Для опыта использовался перекрестный дизайн, что соответствовало требованиям нормативных документов [2; 15]. Схема опыта представлена в таблице 1.

Отбор биологического материала (кровь) проводили до введения препаратов, и через 15, 30, 45 мин, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 ч после введения препаратов. Сразу после получения образцов кровь центрифугировали и отделяли плазму крови. Образцы плазмы крови собак до анализа хранили в замороженном виде при температуре не выше -18°C и транспортировали в лабораторию в термokonейнерах на регулярном авиарейсе, а также при помощи специализированной логистической службы.

Таблица 1 – Схема опыта

	Группа 1 (Т-Р) (4 животных)	Группа 2 (R-T) (4 животных)
Период 1, 48 ч	Введение «Докситрон жевательные таблетки» однократно, перорально, в терапевтической дозе 10 мг препарата на 1 кг массы животного отбор проб в промежутке 0-72 ч	Введение «Ронаксан», однократно, перорально, в терапевтической дозе 10 мг препарата на 1 кг массы животного отбор проб в промежутке 0-72 ч
Период отмывки, 72 ч		
Период 2, 48 ч	Введение «Ронаксан» однократно, перорально, в терапевтической дозе 10 мг препарата на 1 кг массы животного отбор проб в промежутке 0-72 ч	Введение «Докситрон жевательные таблетки», однократно, перорально, в терапевтической дозе 10 мг препарата на 1 кг массы животного отбор проб в промежутке 0-72 ч

Таблица 2 – Параметры масс-спектрометрического определения веществ

Вещество	Ион пре- курсор, m/z	Поляр- ность	Ион про- дукт, m/z	Dwell time	Q1	CE	Q3
Доксициклин	445,1	+	428,0*	100	-20	-20	-17
			410,0	100	-20	-24	-16
Доксициклин-ДЗ	448,0	+	431,0*	50	-20	-20	-17
			413,0	50	-12	-23	-30

Примечание: *более интенсивный MRM-переход.

В процессе исследования контролировали следующие параметры: концентрации действующего вещества препаратов в плазме крови собак.

Реактивы и стандартные образцы

В исследовании использовали стандартные образцы доксициклина гикалата (99,3%, LGC STANDARDS, Великобритания) и доксициклин-ДЗ гикалата (97%, TRC, Канада) в качестве внутреннего стандарта. Исходные растворы стандартных образцов с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точной навески аналита в соответствующем объеме метанола (для ВЭЖХ, J.T.Baker, США) в пересчете на чистый доксициклин. В пробоподготовке использовали гидрофосфат натрия (99%, Acros, Бельгия), лимонную кислоту (99%, PanReac Applichem, Испания), трилон Б (99%, PanReac Applichem, Испания), картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) с собентом HLB 60 мг/30 мл (Biosomma Limited, Китай), муравьиную кислоту (98%, Scharlau, Испания). Деионизованную воду для проведе-

ния анализа получали с помощью системы очистки воды Millipore Direct-Q (Merk KGaA, Германия).

ВЭЖХ-МС/МС анализ

Для анализа образцов использовали хромато-масс-спектрометр Shimadzu LCMS-8050 (Япония), хроматографическую колонку ZORBAX Eclipse Plus C18 2,1 x 100 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США) с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18 2,1 x 12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США). В качестве подвижных фаз использовали 0,5% муравьиную кислоту в воде (подвижная фаза А) и в метаноле (подвижная фаза Б). Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме в течение 7 минут от 100% подвижной фазы А до 100% подвижной фазы Б. температура хроматографической колонки составляла 30°C, скорость потока – 0,3 мл/мин. Для детектирования аналитов использовали метод «регистрации выбранных реакций» (MRM) согласно таблице 2. Для количественного определения использо-

вали наиболее интенсивный MRM-переход.

Пробоподготовка образцов плазмы крови

К плазме крови (0,3 мл) вносили 90 мкл внутреннего стандарта с концентрацией 1 мкг/мл и 3 мл буферного раствора, состоящего из смеси 600 мл раствора лимонной кислоты (0,1М) и 400 мл раствора гидрофосфата натрия (0,2М) с добавкой 37,2 г трилона Б. Полученную смесь перемешивали в течение 10 минут и центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 минут. Супернатант наносили на картридж HLB, предварительно подготовленные 3 мл метанола и 3 мл деионизованной воды. Затем картридж промывали 6 мл деионизованной водой и элюировали аналиты 3 мл подвижной фазы Б. 1 мл полученного экстракта фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр (0,22 мкм) и использовали для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Валидация

Использованный в работе метод анализа был валидирован согласно требованиям международных нормативных документов [20 – 21]. Градуировочная характеристика строилась при помощи матричных градуировочных образцов. Диапазон линейности составил 5-4000 нг/мл плазмы. Правильность составила 6%, а межсерийная перцизионность – 8%. Абсолютная степень извлечения доксициклина составила 94%.

Биоэтическая комиссия и легитимность проведения клинического исследования.

В соответствии с положениями Директивы ЕС 2010/63 «О защите животных, использующихся для научных целей» и Евразийскими клиническими рекомендациями: «Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике» 2016 г. до начала проведения настоящего исследования «Комитетом по клиническим исследованиям ООО «НВЦ Агроветзащита» совместно с практикующими ветеринарными врачами ООО «Калининградский областной центр вете-

ринарной медицины» была проведена биоэтическая комиссия и составлен соответствующий протокол № 04/05/22-КИ от 15.08.2022г.

Проведение настоящего клинического исследования было согласовано и одобрено Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), письмо № ФС-НВ-2\23643 от 06.09.2019г.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013. Расчет фармакокинетических параметров проводили с использованием ПО PKSolver, использовали безкомпарментную модель. Оценку биоэквивалентности проводили с использованием ПО Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Оценка фармакокинетики доксициклина

Графическое изображение усредненных фармакокинетических профилей представлено на рисунке 1.

После перорального введения обоих лекарственных препаратов собакам доксициклин сравнительно быстро всасывается в системный кровоток: доксициклин выявлен в плазме уже через 15 мин после введения, время достижения максимальной концентрации (Tmax) доксициклина в плазме крови собак в среднем составило 3.0 ч для исследуемого препарата «Докситрон жевательный таблетки» и 3.0 ч для референтного препарата «Ронаксан». Максимальная плазменная концентрация для исследуемого препарата «Докситрон» (CmaxT) составила 4007,4±964,4 нг/мл и для референтного препарата «Ронаксан» (CmaxR) – 3794,9±1121,5 нг/мл. Среднее значение периода полувыведения (t1/2) доксициклина из плазмы крови составило 9,2±0,9 ч для исследуемого препарата («Докситрон жевательные таблетки») и 9,2±2,4 ч для референтного препарата («Ронаксан»). В таблицах 3 и 4 приведены значения фармакокинетических параметров для референтного и исследуемого препаратов.

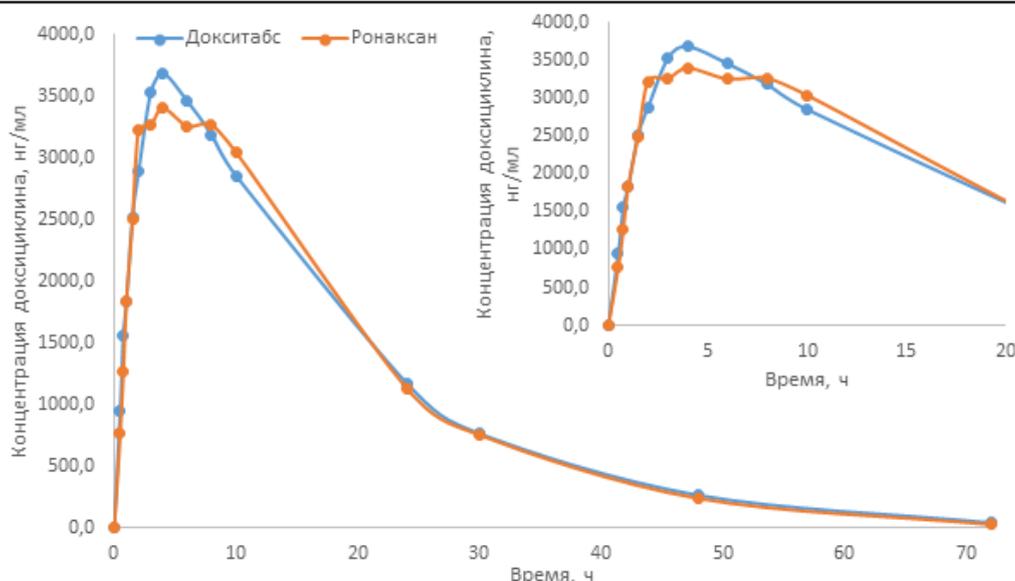


Рисунок 1 – Фармакокинетические профили доксициклина после введения «Докситрон жевательные таблетки» или «Ронаксан», по средним значениям ($n=8$) (оранжевый график – референтный препарат «Ронаксан», синий график – исследуемый препарат «Докситрон жевательные таблетки»).

Минимальные ингибирующие концентрации (МИС) доксициклина против распространенных возбудителей инфекций собак находятся в диапазоне 0,008-1 мкг /мл (8-1000 нг/мл): в том числе *Ehrlichia spp* – 30 нг/мл, *Leptospira interrogans* – 100-400 нг/мл, *Chlamydia spp* – 8-31 нг/мл, *Brucella spp* – 60-1000 нг/мл, *Rickettsia spp.* – 60-125 нг/мл; *Staphylococcus aureus* – 120-250 нг/мл, *Streptococcus pneumonia* – 30-60 нг/мл, *Mycoplasma spp.* – 60-250 нг/мл, *Pasteurella spp.* – 120-250 нг/мл, *S. Pseudintermedius* – 63-125 нг/мл, *B. bronchiseptica* – 120-500 нг/мл [6; 8-10; 13-17].

Из полученных результатов видно, что даже при однократном введении в плазме крови достигаются уровни, превышающие вышеперечисленные МИС. Учитывая, что предусмотрено курсовое введение препаратов, это обеспечит их эффективность против указанных выше возбудителей инфекций собак.

Оценка биоэквивалентности

В перекрестном двухпериодном опыте было задействовано 2 группы по 4 жи-

вотных. Продолжительность каждого периода составила 72 ч.

Период полувыведения доксициклина составил у разных животных от 7,2 до 14,6 ч. Таким образом, продолжительность каждого периода составляла не менее 4 периодов полувыведения действующего вещества и была достаточной. Значение отношения площади под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t к площади под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$) для доксициклина составило не менее 98% для обоих препаратов для всех животных, что свидетельствует о достаточной продолжительности отбора проб.

Время отмывки между периодами составило 72 ч, соответственно время между введениями препаратов в периоде I и периоде II составило 144 ч, что является достаточным, так как это превышает 6 периодов полувыведения каждого дей-

ствующего вещества.

T_{max} доксициклина составила от 1 до 8 ч, при этом выбор моментов времени отбора проб обеспечил получение не менее 3-х точек для фазы первоначального возрастания концентрации и не менее 5 точек для фазы ее снижения во всех случаях.

Нижний предел количественного определения (НПКО) аналитической методики составлял 5 нг/мл и соответствовал критерию «не более 5 % от C_{max} », поскольку C_{max} доксициклина составила не

менее 2086 нг/мл.

С учетом указанного выше, дизайн исследования отвечал требованиям нормативных документов [2].

Полученные при фармакокинетическом анализе значения C_{max} и AUC_{0-t} были подвергнуты логарифмическому преобразованию. Оценка нормальности распределения значений с использованием критерия Шапиро-Уилка показала, что значения C_{max} и AUC_{0-t} характеризуются логнормальным распределением ($p > 0,05$), гистограммы приведены на рисунках 2-3.

Таблица 3 – Индивидуальные и усредненные значения фармакокинетических параметров^a доксициклина у собак при введении Исследуемого препарата («Докситрон жевательные таблетки»)

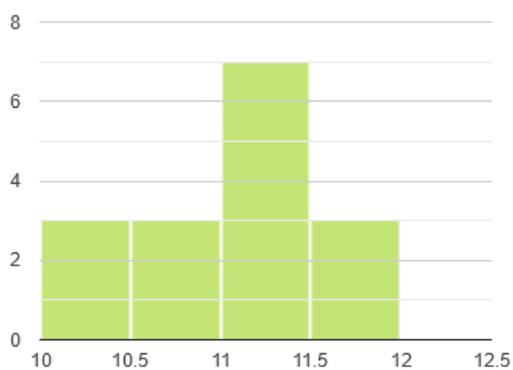
№ животного	Период	Послед-сть	C_{max} (нг/мл)	AUC_{0-t} (нг/мл*ч)	$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	T_{max} (ч)	k_{el}	$t1/2\beta$ (ч)
1	I	И-Р	3982,0	43055	43189	1,00	6	0,09	8,0
2	I	И-Р	2692,9	34511	34630	1,00	3	0,09	7,8
3	I	И-Р	4637,6	104805	105837	0,99	3	0,07	9,4
4	I	И-Р	4862,5	86894	87810	0,99	4	0,07	10,0
5	II	Р-И	2337,9	33114	33251	1,00	1,5	0,07	9,8
6	II	Р-И	4608,7	124872	126205	0,99	6	0,07	10,2
7	II	Р-И	4668,0	83085	83488	1,00	3	0,08	8,8
8	II	Р-И	4269,4	69171	69606	0,99	4	0,07	9,8
Среднее			4007,4	72439	73002	0,99	3	0,08	9,2
СКО			964,4	33760	34207	0,00	1,6	0,01	0,9
ОСКО			24	47	47	0	41	10	10

^a k_e – константа скорости элиминации, T_{max} – время достижения максимальной концентрации в плазме, C_{max} – максимальная концентрация в плазме, AUC_{0-t} – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t , $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности, $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ – соотношение значений AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$, $t1/2\beta$ – период полувыведения.

Таблица 4 – Индивидуальные и усредненные значения фармакокинетических параметров^a доксициклина у собак при введении Референтного препарата («Ронаксан»)

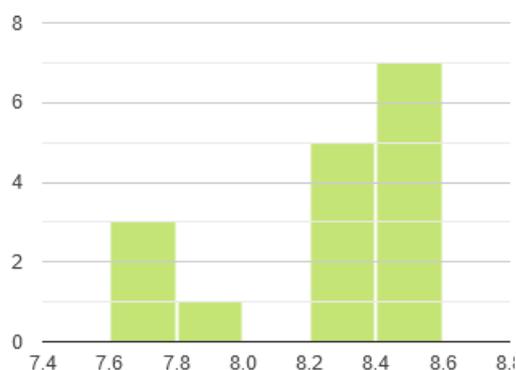
№ жив-ого	Пери-од	По-след-сть	C_{max} (нг/мл)	AUC_{0-t} (нг/мл*ч)	$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$	T_{max} (ч)	k_{el}	$t_{1/2\beta}$ (ч)
1	II	И-Р	3684,4	58398	58519	1,00	6	0,09	7,8
2	II	И-Р	2086,2	39967	40172	0,99	1	0,08	8,6
3	II	И-Р	4800,3	83023	83245	1,00	2	0,09	8,0
4	II	И-Р	4701,0	84416	84612	1,00	2	0,10	7,2
5	I	Р-И	2127,3	32790	32913	1,00	4	0,07	9,5
6	I	Р-И	3833,9	120474	122471	0,98	3	0,05	14,6
7	I	Р-И	4761,1	77444	77851	0,99	8	0,07	10,1
8	I	Р-И	4364,6	74741	74949	1,00	3	0,09	8,0
Сред-нее			3794,9	71407	71842	0,99	3	0,08	9,2
СКО			1121,5	27796	28279	0,00	2,3	0,02	2,4
ОСКО			30	39	39	0	64	20	26

^a k_e – константа скорости элиминации, T_{max} – время достижения максимальной концентрации в плазме, C_{max} – максимальная концентрация в плазме, AUC_{0-t} – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t , $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности, $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ – соотношение значений AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2\beta}$ – период полувыведения.



$pSW=0,0987$

Рисунок 2 – Распределение логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} доксициклина



$pSW=0,0726$

Рисунок 3 – Распределение логарифмически преобразованных значений C_{max} доксициклина

Таблица 5 – Результаты дисперсионного анализа ANOVA (доксциклин)

	$C_{\max T}/C_{\max R}$	AUC_{0-tT}/AUC_{0-tR}
Влияние последовательности	P=0.671 последовательность не оказывает влияния	P=0.110 последовательность не оказывает влияния
Влияние периода	P=0.773 период не оказывает влияния	P=0.651 период не оказывает влияния
Среднеквадратическая ошибка (MSE)	0.006	0.014
90% доверительный интервал соотношения T/R, логарифмически преобразованный	[-0.006; 0,1482]	[-0.135; 0.098]
90% доверительный интервал соотношения T/R, арифметический, в %	[99.4; 116.0]	[87.3; 110.3]

Далее результаты были подвергнуты дисперсионному анализу ANOVA, с оценкой влияния периода и последовательности, расчетом среднеквадратической ошибки и расчетом 90% доверительного интервала для отношения максимальных концентраций исследуемого и референтного препаратов ($C_{\max T}/C_{\max R}$) и отношения площадей под фармакокинетическими кривыми исследуемого и референтного препаратов (AUC_{0-tT}/AUC_{0-tR}), результаты представлены в таблице 5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 90% доверительные интервалы соотношений $C_{\max T}/C_{\max R}$ и AUC_{0-tT}/AUC_{0-tR} доксициклина находятся в пределах диапазона 80-125 %, и, следовательно, исследуемый и референтный препарат являются биоэквивалентными.

ВЫВОДЫ / CONCLUSIONS

Время достижения максимальной плазменной концентрации (T_{\max}) в среднем составило 3.0 ч для исследуемого препарата «Докситрон жевательные таблетки» и 3.0 ч для референтного препарата «Ронаксан». Максимальная плазменная концентрация (C_{\max}) составила 4007,4±964,4 нг/мл для исследуемого препарата «Докситрон жевательные таблетки» и 3794,9±1121,5 нг/мл для референтного препарата «Ронаксан». 90% доверительные интервалы соотношений $C_{\max T}/C_{\max R}$ и AUC_{0-tT}/AUC_{0-tR} доксициклина

находятся в пределах диапазона 80-125 %. Препараты «Докситрон жевательные таблетки» и «Ронаксан» являются биоэквивалентными.

BIOEQUIVALENCE STUDY OF DOXITRON CHEWABLE TABLETS AND RONAXAN FOR DOGS

Komarov A.A.¹ – Doctor of Biological Sciences, Professor of the RAS; **Engashev S.V.**² – Doctor in Veterinary Science, Academician of the RAS, Professor; **Selimov R.N.**³ – Candidate in Veterinary Science, Head of the Laboratory for the Study of Pharmacokinetics and Metabolism of Drugs; **Mironenko A.V.**⁴ – Candidate in Veterinary Science, Master of the Institute of Biochemical Technologies and Nanotechnologies; **Goncharova E.N.**³ – Candidate in Chemistry Science, Senior Researcher, Laboratory for the Study of Pharmacokinetics and Metabolism of Drugs; **Gabidullina D.E.**³ – Senior Researcher, Laboratory for the Study of Pharmacokinetics and Metabolism of Drugs.

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH)»

² Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Scriabin

³ MIP Academy of Innovations LLC

⁴ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba

*komarov.a@vetmag.ru

ABSTRACT

A study was carried out to investigate the bioequivalence of the drugs "Doxitron chewable tablets" and "Ronaxan" when administered to dogs. Two groups of animals were formed with 4 dogs in each group. A cross-sectional study design was used for the experiment. Biological material (blood) was sampled before drug administration, and 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 8, 10, 24, 30, 48, 72 h after drug administration. In the course of the study the following parameters were controlled: concentrations of the active substance of the preparations in the blood plasma of dogs. The article describes in detail the scheme of the experiment, reagents and standard samples, the process of sample preparation of blood plasma samples and HPLC-MS/MS analysis. The bioequivalence of the preparations "Doxitron chewable tablets" and "Ronaxan" is evaluated. The time to reach the maximum plasma concentration (T_{max}) averaged 3.0 h for the investigational drug "Doxitron chewable tablets" and 3.0 h for the reference drug "Ronaxan". The maximum plasma concentration (C_{max}) was 4007.4 ± 964.4 ng/ml for the study drug Doxitron Chewable Tablets and 3794.9 ± 1121.5 ng/ml for the reference drug Ronaxan. The 90% confidence intervals of C_{maxT}/C_{maxR} and AUC_{0-T}/AUC_{0-R} ratios of doxycycline were within the range of 80-125%. The preparations "Doxitron chewable tablets" and "Ronaxan" are bioequivalent.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мирошникова М. С. Тетрациклиновые антибиотики в животноводстве и ветеринарии // Шаг в науку. – 2021. – №. 2. – С. 10-20.
2. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 21.01.2022 N 1 «О Правилах регулирования обращения ветеринарных лекарственных средств на таможенной территории Евразийского экономического союза».

3. Ришко О. Тетрациклины: взгляд из прошлого в будущее // Животноводство России. – 2019. – №. 1. – С. 36-37.

4. Енгашев С.В., Енгашева Е.С., Мироненко А.В. Способ лечения респираторных и желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных. Патент на изобретение 2796827 C1, 29.05.2023.

5. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition. Edited by Steeve Giguère, John F. Prescott and Patricia M. Dowling. 2013 John Wiley & Sons, Inc.

6. Davoust B, Keundjian A, Rous V, et al. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. Vet Microbiol 2005; 107: 279–283.

7. Ganiere JP, Medaille C, Mangion C. Antimicrobial drug susceptibility of Staphylococcus intermedius clinical isolates from canine pyoderma. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52: 25–31.

8. Holmes N, Charles P. Safety and efficacy review of doxycycline. Clin Med Ther 2009; 1: 471–482.

9. Maaland MG, Papich MG, Turnidge J, Guardabassi L. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against Staphylococcus pseudintermedius: proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. J Clin Microbiol. 2013 Nov; 51(11):3547-54.

10. Murray CK, Hospenthal DR. Determination of susceptibilities of 26 Leptospira sp. serovars to 24 antimicrobial agents by a broth microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4002–4005.

11. Papich Handbook of Veterinary Medicine, Fifth Edition. Mark G. Papich. 2021 Elsevier, Inc.

12. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Tenth Edition. Edited by Jim E. Riviere and Mark G. Papich. 2018 John Wiley & Sons.

13. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski N, et al. Brucellosis. N Engl J Med 2005; 352: 2325–2336.

14. Plumb, D.C. (2011). Plumb's veterinary drug handbook. Stockholm, Wis: Pharma-Vet.

15. Приказ Министерств сельского хозяйства РФ от 6 марта 2018 г. N 101 «Об утверждении правил проведения докли-

нического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения».

16. Pudjiatmoko, Fukushi H, Ochiai Y, et al. In vitro susceptibility of *Chlamydia pecorum* to macrolides, tetracyclines, quinolones and beta-lactam. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 61–63.

17. Ross JE, Jones RN. MIC quality control guidelines for doxycycline when testing grampositive control strains by the reference methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 295–297.

18. Speakman AJ, Dawson S, Corkill JE, et al. Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol* 2000; 71: 193–200.

19. Summary of Product Characteristics - Doxycare Flavour 200 mg Tablets for Cats and Dogs.

20. EMA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies.

21. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London (2011).

REFERENCES

1. Miroshnikova M. S. Tetracycline antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine // *Shag v nauki*. - 2021. - №. 2. - С. 10-20.

2. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of 21.01.2022 N 1 "On the Rules for regulating the circulation of veterinary medicines on the customs territory of the Eurasian Economic Union".

3. Rishko O. Tetracyclines: a look from the past to the future // *Livestock of Russia*. - 2019. - №. 1. - С. 36-37.

4. Engashev S.V., Engasheva E.S., Mironenko A.V. Method for treating respiratory and gastrointestinal diseases of farm animals.

Patent for invention 2796827 C1, 05/29/2023.

5. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth Edition. Edited by Steeve Giguère, John F. Prescott and Patricia M. Dowling. 2013 John Wiley & Sons, Inc.

6. Davoust B, Keundjian A, Rous V, et al. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. *Vet Microbiol* 2005; 107: 279–283.

7. Ganiere JP, Medaille C, Mangion C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52: 25–31.

8. Holmes N, Charles P. Safety and efficacy review of doxycycline. *Clin Med Ther* 2009; 1: 471–482.

9. Maaland MG, Papich MG, Turnidge J, Guardabassi L. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius*: proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov; 51(11):3547-54.

10. Murray CK, Hospenthal DR. Determination of susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. serovars to 24 antimicrobial agents by a broth microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4002–4005.

11. *Papich Handbook of Veterinary Medicine*, Fifth Edition. Mark G. Papich. 2021 Elsevier, Inc.

12. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Tenth Edition. Edited by Jim E. Riviere and Mark G. Papich. 2018 John Wiley & Sons.

13. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski N, et al. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352: 2325–2336.

14. Plumb, D.C. (2011). *Plumb's veterinary drug handbook*. Stockholm, Wis: Pharma-Vet.

15. Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dated March 6, 2018 N 101 "On approval of the rules for conducting preclinical studies of a medicinal product for veterinary use, clinical trials of a medicinal product for veterinary use, bioequivalence studies of a medicinal product for veterinary use".

16. Pudjiatmoko, Fukushi H, Ochiai Y, et al.

In vitro susceptibility of *Chlamydia pecorum* to macrolides, tetracyclines, quinolones and beta-lactam. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 61–63.

17. Ross JE, Jones RN. MIC quality control guidelines for doxycycline when testing gram-positive control strains by the reference methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 295–297.

18. Speakman AJ, Dawson S, Corkill JE, et al. Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol* 2000; 71: 193–200.

19. Summary of Product Characteristics - Doxycare Flavour 200 mg Tablets for Cats and Dogs.

20. EMA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies.

21. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London (2011).

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

T – исследуемый препарат «Докситрон жевательные таблетки»

R – референтный препарат «Ронаксан»

ТФЭ – твердофазная экстракция

MRM – метод «регистрации выбранных реакций»

T_{max} – время достижения максимальной плазменной концентрации

C_{maxT} – максимальная плазменная кон-

центрация доксициклина после применения исследуемого препарата «Докситрон»

C_{maxR} – максимальная плазменная концентрация доксициклина после применения референтного препарата «Ронаксан»

$t_{1/2\beta}$ – период полувыведения действующего вещества

k_e – константа скорости элиминации

C_{max} – максимальная концентрация в плазме

AUC_{0-t} – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t

$AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности

$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ – соотношение значений AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$

MIC – минимальные ингибирующие концентрации

НПКО – нижний предел количественного определения

C_{maxT}/C_{maxR} – отношение значений C_{maxT} и C_{maxR}

AUC_{0-tT} – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t для исследуемого препарата

$AUC_{0-\infty R}$ – площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности для референтного препарата

AUC_{0-tT}/AUC_{0-tR} – соотношение значений AUC_{0-tT} и AUC_{0-tR}