

همسنگ زیستی دو نوع بلوس کلوزانتل تولید شده با مواد اولیه مختلف در گوسفند

حسینعلی عرب^{۱*}، مریم جاهدی نیا^۲، علی رسولی^۱، غلامرضا شمس^۱

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

(۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۳ اسفند ۱۳۸۸)

چکیده

مطالعات همسنگ زیستی (بیواکوالانسی)، روش علمی مطمئن برای ارزیابی کیفیت داروهای ژنریک و بررسی خصوصیات فارماکوکینتیکی آنها در مقایسه با داروهای مرجع می باشد. هدف از این مطالعه بررسی همسنگ زیستی دو نوع بلوس کلوزانتل ساخته شده توسط یکی از شرکت های داخلی با مواد اولیه از دو منبع مختلف بوده است. تعداد ۳۰ رأس گوسفند به دو گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند و به علت طولانی بودن نیمه عمر دارو، مطالعه به روش موازی انجام شد. در گروه اول (گروه آزمون) به هر گوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی گرمی کلوزانتل با مواد اولیه یک شرکت اسپانیایی و در گروه دوم (گروه مرجع)، به همان میزان داروی گروه آزمون، داروی کلوزانتل با منشأ سازنده اصلی (یانسن بلژیک) به گوسفندان خوراندند. از تمامی گوسفندان در زمان های ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۲ و ۴۸ ساعت پس از تجویز دارو خونگیری از ورید وداج به عمل آمد. میزان کلوزانتل موجود در سرم گوسفندان توسط سیستم HPLC اندازه گیری گردید. پس از تعیین نمودارهای غلظت خونی برای هر گوسفند، میانگین غلظت خونی هر مرحله خونگیری و شاخص های فارماکوکینتیکی مختلف شامل C_{max} (حداکثر غلظت خونی)، T_{max} (زمان رسیدن به حداکثر غلظت خونی)، AUC (سطح زیر منحنی) $t_{1/2}$ (نیمه عمر) و K_{el} (ثابت حذف) برای هر دارو محاسبه گردید. برای تعیین همسنگ زیستی دو دارو، از مقایسه AUC ، C_{max} و T_{max} و آزمون فاصله اطمینان استفاده شد. همچنین مقایسه این پارامترها با آزمون *t-student* نشان داد که تفاوت معنی داری بین شاخص های فارماکوکینتیکی دو دارو وجود ندارد و این شاخص ها در فاصله اطمینان ۱۲۰-۸۰ قرار داشتند. با توجه به این که بین پارامترهای فارماکوکینتیک گروه آزمون و مرجع از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت و پارامترهای مورد نظر در فاصله اطمینان قابل قبول از نظر مراجع بین المللی قرار داشتند، می توان ادعا کرد که دوداروی کلوزانتل تهیه شده با مواد اولیه از دو منبع مختلف، با یکدیگر زیست همسنگ هستند.

واژه های کلیدی: همسنگ زیستی (بیواکوالانسی)، فارماکوکینتیک، کلوزانتل، گوسفند.

همگن صورت گیرد، به این مفهوم که همگی سالم بوده و از نظر سن، شرایط محیطی، جیره غذایی و میزان تولید در یک حد باشند. همچنین تعداد دام های مورد مطالعه باید به حدی باشد که بر آورد آماری بر روی کل جمعیت قابل انجام و از نظر آماری قابل تعمیم به کل جمعیت دام ها باشد. نحوه انجام مطالعه می تواند معمولاً به دو صورت متقاطع و موازی باشد. لیکن در مواردی چون القاء آنزیمی یا تغییرات فیزیولوژیکی که توسط دارو در بدن ممکن است بوجود آید، نیمه عمر بسیار طولانی دارو و یا جذب تاخیری یا طولانی مدت دارو، به جای مطالعه متقاطع از مطالعه موازی استفاده می شود (۲،۴). تعداد کل نمونه های مورد نیاز برای بررسی سطح خونی دارو، بستگی به اهمیت متغیرهایی دارد که با داده های همسنگی زیستی در ارتباط هستند. از جمله این متغیرها می توان پارامترهای فارماکوکینتیک را نام برد. زمان های نمونه برداری نیز باید به گونه ای باشند که امکان تشخیص دقیق حداکثر غلظت پلاسمایی و زمان رسیدن به این حداکثر را فراهم آورند و مقدار محاسبه شده برای $AUC_{(0-T)}$ تا ۸۰ درصد میزان محاسبه شده برای $AUC_{(0-\infty)}$ را پوشش دهد (۷).

کلوزانتل دارویی است ضد انگل و از مشتقات سالیسیلانیلیدها که دارای طیف وسیع اثر ضد انگلی بر علیه ترماتودها، برخی نماتودها و تعدادی از بند پایان است. این دارو با جلوگیری از عمل فسفریلاسیون

مقدمه

تعیین زیست فراهمی (Bioavailability) یک روش های علمی مطمئن برای ارزیابی کارایی یک دارو است که با محاسبه شاخص های فارماکوکینتیکی از جمله AUC ، T_{max} ، C_{max} و نیمه عمر دارو صورت می گیرد (۱۱). لیکن به روش علمی که در آن برای ارزیابی کیفی، زیست فراهمی یک دارو با داروی مرجع مقایسه می شود، همسنگی زیستی یا زیست هم ارزی (Bioequivalence) گفته می شود. اگر شاخص های مورد محاسبه فوق و در نتیجه فراهمی زیستی دو دارو، دارای اختلاف مختصر و قابل قبولی باشند، داروی آزمون با داروی مرجع دارای همسنگ زیستی بوده و در نتیجه کارایی درمانی یکسانی با آن خواهد داشت. براساس اعلام اداره نظارت بر مواد غذایی و داروی آمریکا (FDA) در اغلب موارد تفاوت های کمتر از ۲۰ درصد فرآورده ها در فاکتورهایی مانند C_{max} (حداکثر غلظت پلاسمایی) و AUC (سطح زیر منحنی)، تفاوت بالینی قابل ملاحظه ای در بیماران ایجاد نمی کند و هنگامی که دو دارو کاملاً زیست هم ارز باشند، منحنی پلاسمایی غلظت - زمان و یا منحنی دفع ادراری آنها نیز همسان خواهد بود (۲،۴).

در انجام مطالعات همسنگی زیست، بررسی باید در یک جمعیت



از اجرای این مطالعه بررسی همسنگ زیستی و تعیین خصوصیات فارماکوکینتیک این دو دارو شامل کلوزانتل با مواد اولیه از شرکت منادیونا-اسپانیا به عنوان داروی آزمون و کلوزانتل با مواد اولیه از شرکت یانسن-بلژیک به عنوان داروی مرجع است.

مواد و روش کار

حیوانات و شرایط نگهداری آنها

تعداد ۳۰ راس گوسفند ماده داشتی که دارای سن ۲-۴ سال، وزن ۴۰-۵۰ کیلوگرم و از نژاد شال بودند، از گله ای بزرگ انتخاب و برای مطالعه از بقیه جدا شدند. جیره غذایی گوسفندان که شامل علوفه و کنسانتره بوده است در طول طرح ثابت بود و تمامی گوسفندان از نظر شرایط نگهداری، نور، حرارت و بهداشتی در شرایط مشابه و استاندارد قرار داشتند.

گروه های آزمایشی

پس از انجام معاینات و تایید سلامتی حیوانات از نظر بالینی، گوسفندان به طور تصادفی به دو گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. در گروه اول (گروه آزمون)، به هر گوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی گرمی کلوزانتل (هیپاتک) ساخت شرکت داروسازی رازک با ماده اولیه شرکت منادیونا اسپانیا خوراندند. داروی استفاده شده در این گروه، داروی آزمون نامیده شد. در گروه دوم (گروه مرجع)، به هر گوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی گرمی کلوزانتل (هیپاتک) ساخت شرکت داروسازی رازک با ماده اولیه شرکت داروسازی یانسن بلژیک، خوراندند. چون فرآورده حاصل از ماده اولیه شرکت بلژیک قبلاً با فرآورده اصلی شرکت یانسن بلژیک مورد مطالعه بیواکووالانسی قرار گرفته بود، ترکیب ساخته شده با ماده اولیه این شرکت بر اساس موافقت سازمان دامپزشکی کشور، به عنوان داروی مرجع بکار گرفته شد.

خون گیری

از تمامی گوسفندان دو گروه در زمان ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تجویز دارو خون گیری انجام شد. خون گیری از سیاهرگ وداج و توسط سرنگ و نوجکت (ساخت شرکت پارس خاور) صورت گرفت و به لوله های آزمایش که حاوی محلول هپارین بودند، منتقل شدند. نمونه ها با دستگاه سانتریفوژ (Hettich mini centrifuge) با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی (پلازما) جدا شده و نمونه ها تا زمان استخراج نهایی در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

سنجش غلظت دارو در نمونه های پلازما

استخراج کلوزانتل از نمونه ها: ابتدا نمونه ها از فریزر ۸۰- خارج شدند و پس از هم دما شدن با محیط، مقدار اسی سی توسط سمپلر اتوماتیک (Eppendorf) در یک لوله آزمایش جدید تخلیه شد. سپس هم حجم پلازما از محلول A که از محلول آب نمک اشباع و اسید استیک ۲/۲ درصد تهیه شده بود، به لوله اضافه شد. پس از مخلوط کردن پلازما و محلول A،

اکسیداتیو در میتوکندری، مانع سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) می شود که این عمل موجب اختلال در متابولیسم و در نهایت مرگ انگل می شود. این دارو دارای اتصال پروتئینی بالایی (حدود ۹۸ درصد با آلبومین خون) است و در نتیجه به طور عمده در خون وجود دارد. از این رو، بیشتر برانگل های خون خوار موثر است. حداکثر غلظت خونی دارو بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تجویز مشاهده می شود و دارای نیمه عمری در حدود ۲ هفته است. دارو بیشتر به صورت متابولیزه نشده و از طریق صفر دفع می شود. مهم ترین مسیر متابولیزم کلوزانتل، واکنش احیاء است. کلوزانتل تقریباً به طور انحصاری در خون توزیع می شود. و میزان آن در بافت ها، ۱۵ برابر کمتر از غلظت پلاسمایی دارو است (۱،۳). در مطالعه ای که توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷ انجام شد، مشخص شده است که حدود ۹۰ درصد کلوزانتل بصورت تغییر نیافته دفع می شود و متابولیت های اصلی آن شامل دو نوع یدو کلوزانتل بوده است. لیکن، میزان متابولیت ۳- مونو یدو کلوزانتل بیشتر از ۵- مونو یدو کلوزانتل در مدفوع بوده است و تنها ۵/۰ درصد کلوزانتل تجویز شده از ادرار دفع شده بود (۵،۸).

در مطالعه ای دیگر که توسط Bogan و Mohammed-Ali در سال ۱۹۸۷ انجام شد، خصوصیات فارماکوکینتیک و کارایی سالیسیلانیلیدها (رافوکساناید، کلوزانتل و اکسی کلوزانید) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که هر سه دارو تا ۹۹ درصد به پروتئین های پلازما متصل می شوند و میانگین نیمه عمر کلوزانتل نیز ۱۴/۵ روز برآورد شد (۹). مطالعات فارماکوکینتیکی همچنین نشان داده است که توزیع و حذف کلوزانتل در بدن دارای دو فاز آلفا و بتا است. نیمه عمر فاز آلفا کمتر از ۳۰ دقیقه، نیمه عمر بتا ۴-۱۷ روز، حجم پخش کمتر از ۰/۱۵ لیتر بر کیلوگرم و پاکسازی به کمتر از ۰/۱۵ میلی لیتر در دقیقه بر کیلوگرم بوده است. در طول ۲۴ ساعت پس از تجویز دارو، میانگین غلظت کلوزانتل در بزاق ۰/۰۰۴/۰۰۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد (۱۳). حضور کلوزانتل در شیر نیز ردیابی و میزان آن با کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و ردیاب فلورسانس اندازه گیری شد (۱۰).

Maes و همکاران در سال ۱۹۸۸ تأثیر ضد انگلی کلوزانتل علیه فاسیولوپاتیکای بالغ و نابالغ را در گوسفند و موش رت مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه تأثیر غلظت حداکثر و غلظت های ثابت باقیمانده ثابت کلوزانتل در عملکرد ضد انگلی آن ارزیابی و مشخص شد که اثر ضد انگلی کلوزانتل علیه فاسیولا بیشتر به حداکثر غلظت پلاسمایی وابسته است و ارتباط کمتری به غلظت های باقیمانده دارو دارد و در ضمن با افزایش سن لاروهای کبیدی اثر دارو نیز افزایش می یابد (۶).

در خصوص همسنگ زیستی فرمولاسیون های مختلف کلوزانتل مطالعات اندکی وجود دارد. از طرفی، تازگی، دو نوع بولوس کلوزانتل با ماده اولیه از دو منشأ متفاوت توسط یک شرکت داروسازی داخلی برای مصرف ضد انگلی در گوسفند، فرموله و به بازار عرضه شده است. لذا هدف



جهت رسم منحنی استاندارد بکار رفت. با به دست آوردن مساحت زیر منحنی دارو از هر نمونه و مقایسه آن با سطح زیر منحنی غلظت‌های رفرانس استاندارد کلوژانتل (Calibration curve)، میزان کلوژانتل موجود در هر میلی‌لیتر پلاسما بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر نمونه‌های پلاسما مشخص گردید.

محاسبه پارامترهای فارماکوکینتیکی و آنالیز آماری

با مقایسه سطح زیر منحنی بدست آمده از آنالیز HPLC از نمونه‌های حاوی کلوژانتل استاندارد، میزان کلوژانتل موجود در نمونه‌های خونی بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. پس از به دست آمدن غلظت خونی کلوژانتل در نمونه‌های مربوط به هر گوسفند، نمودار غلظت-زمان برای هر گوسفند به طور جداگانه و همچنین به صورت میانگین داده‌ها برای داروی آزمون (کلوژانتل با مواد اولیه شرکت منادیونا اسپانیا) و داروی مرجع (کلوژانتل با مواد اولیه شرکت یانسن بلژیک) رسم شد. سپس سطح زیر منحنی (AUC) در فاصله زمان‌های صفر تا ۷۲ ساعت و صفر تا بی نهایت به دست تعیین شد و پس از آن، نسبت داده‌های سطح زیر منحنی گروه آزمون به مرجع (F Relative) محاسبه گردید. برای مجموعه داده‌ها، میانگین و انحراف معیار نیز محاسبه شد. در نهایت برای تعیین همسنگ زیستی دو دارو آنالیز داده‌های فارماکوکینتیک توسط روش‌های آماری انجام شد. با محاسبه میانگین و انحراف معیار فراهمی زیستی (F) و تبدیل آن به درصد، وضعیت کلی داده‌های گروه آزمون نسبت به مرجع تعیین گردید و میزان P-Value نیز برای پارامترهای فارماکوکینتیکی محاسبه گردید. با توجه به نمودارهای بدست آمده و استفاده از برنامه نرم افزار کامپیوتری kinetics Drug (۱۲)، شاخص‌های فارماکوکینتیکی شامل C_{max} ، T_{max} ، K_{el} و $(T_{1/2})$ برای هر دارو محاسبه شد. مقدار C_{max} و T_{max} کلوژانتل پلاسما هر گوسفند از منحنی غلظت پلاسمایی تعیین گردید. محاسبه $AUC_{(0-72)}$ به روش دوزنقه (rule Trapezoidal) که بر اساس آن با محاسبه مساحت‌های دوزنقه‌های حاصل از طول زمان (قاعد) و غلظت پلاسمایی دارو (ارتفاع) سطح زیر منحنی ۷۲-۰ ساعت، با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

$$AUC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1}) \quad \text{رابطه (۱)}$$

سپس مقدار سطح زیر منحنی صفر تا بی نهایت ($AUC_{(0-\infty)}$) نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید.

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-72)} + C_{72} / K_e \quad \text{رابطه (۲)}$$

مقدار K_{el} یا ثابت حذف دارو نیز با استفاده از شیب منحنی در مرحله حذف تعیین شد. در محاسبه نیمه عمر یا $(t_{1/2})$ از رابطه (۳) استفاده شد.

$$T_{1/2} = 0.693 / K_{el} \quad \text{رابطه (۳)}$$

پس از محاسبه پارامترهای مذکور، و استفاده از نرم افزار 2003 Excel و توسط آزمون t و فاصله اطمینان، تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه

مقدار ۱۰ سی‌سی استونیتریل به لوله آزمایش افزوده شد و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد. برای اطمینان کامل از مخلوط شدن، لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج فرا صوت در دستگاه حمام اولتراسونیک (sonic 505 Power) نیز قرار گرفت. مخلوط حاصل توسط سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول شفاف رویی جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل شد. به رسوب باقیمانده دوباره، ۱۰ سی‌سی استونیتریل اضافه گردید و عملیات بالا که شامل ورتکس، سانتریفیوژ و تخلیه مایع رویی بود تکرار شد. محلول‌های شفاف رویی با هم مخلوط شده و به کمک دستگاه تبخیرگر دوار (Heidolf 2) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، با دور گردش ۱۵۰ دور در دقیقه و تحت خلأ که به وسیله پمپ خلأ (مدل Waters) ایجاد شده بود، به حجم ۲ سی‌سی رسانده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و با حضور جریان گاز نیتروژن خشک شدند. به لوله‌های حاوی نمونه خشک شده، یک میلی‌لیتر استونیتریل اضافه شد و توسط دستگاه ورتکس میکسر و حمام اولتراسونیک هر کدام به مدت ۲ دقیقه مخلوط گردید. به منظور پاکسازی بیشتر نمونه، از سیستم کارتريج C18 با اندازه ۵۰۰ میلی‌گرمی (شرکت Resprep) استفاده شد. کارتريج با ۵ سی‌سی متانول و ۲ سی‌سی استونیتریل آماده شد و نمونه‌ها توسط پمپ خلأ (Fastvac) از کارتريج عبور داده شدند. برای شستشوی کامل بقایای ماده دارویی از کارتريج پس از عبور هر نمونه، کارتريج با ۵ میلی‌لیتر استونیتریل شستشوداده شد و با نمونه مخلوط شد. پس از رساندن حجم به میزان ۲ میلی‌لیتر توسط سیستم تبخیرگر دوار، نمونه مجدداً با گاز نیتروژن و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شد و تا هنگام تزریق به سیستم HPLC در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

اندازه‌گیری کلوژانتل توسط سیستم HPLC

برای اندازه‌گیری میزان کلوژانتل موجود در نمونه‌های پلاسما از سامانه HPLC و روش ارائه شده توسط Stove در سال ۱۹۹۸ استفاده گردید (۱۱). به طور خلاصه، نمونه‌ها با یک میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط گردیدند. پس از عبور هر نمونه از صافی، میزان ۵۰ میکرولیتر از آنها توسط سمپلر اتوماتیک Triatlon (شرکت Spark هلند) به دستگاه HPLC تزریق شد. سامانه مورد استفاده در این مطالعه شامل فاز متحرک استونیتریل و بافر فسفات پتاسیم ۱۰mM (pH=۲/۵) به نسبت ۲۰ درصد - ۸۰ درصد با جریان ۱.0 ml/min، ستون C18، پمپ HPLC و ردیاب فلورسانس با طول موج تحریک (Excitation) 335 nm و طول موج انتشار (Emission) 510 nm بوده است. غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رفرانس استاندارد (RS) کلوژانتل (تهیه شده از شرکت یانسن بلژیک) در نمونه پلاسمای فاقد کلوژانتل اضافه (Spiked) گردید و همزمان با نمونه‌های واقعی استخراج و به دستگاه HPLC تزریق شد. هر کدام از غلظت‌ها با سه بار تکرار مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل از کروماتوگرافی نمونه‌های رفرانس استاندارد در مقابل غلظت،



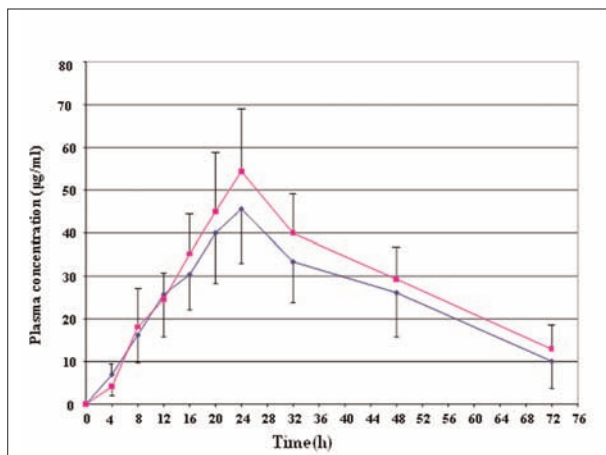
جدول ۱- مقادیر مربوط به سه پارامتر اصلی فارماکوکینتیک شامل $AUC(0-72)$ ، C_{max} و T_{max} که برای هر حیوان بطور جداگانه به همراه میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آزمون به مرجع (F) محاسبه شده است.

T_{max}			C_{max}			$AUC(0-72)$			پارامترهای فارماکوکینتیک	شماره گوسفندان
نسبت	آزمون	مرجع	نسبت	آزمون	مرجع	نسبت	آزمون	مرجع		
۱.۲۰	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۱.۱۶	۵۴.۳۳	۴۶.۷۰	۰.۸۲	۱۴۷۴.۵	۱۷۹۷.۷	۱	
۱.۲۰	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۷۷	۴۹.۳۲	۶۴.۳۹	۱.۰۲	۲۰۶۴.۵	۲۰۳۲.۳	۲	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۸	۴۷.۳۳	۴۳.۸۸	۰.۹	۱۴۳۴.۹	۱۵۹۹.۴	۳	
۰.۸۳	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۵۷	۸۰.۵۸	۵۱.۲۵	۰.۸	۱۳۵۰.۹	۱۶۸۳.۵	۴	
۰.۸۳	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۳۷	۴۸.۷۳	۳۵.۵۴	۱.۳۴	۱۶۹۷.۹	۱۳۷۴.۳	۵	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۰.۶۴	۴۵.۰۰	۷۰.۲۶	۱.۰۶	۲۱۶۸.۹	۲۰۴۴.۲	۶	
۱.۲۰	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۵۳	۴۲.۴۹	۸۱.۳۵	۰.۶۷	۱۹۳۲.۹	۲۸۶۹.۱	۷	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۱۷	۶۱.۶۰	۵۲.۵۴	۰.۹۶	۲۰۳۸.۹	۲۱۱۹.۱	۸	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۰.۷۶	۳۷.۳۹	۴۹.۰۳	۱.۳۴	۲۹۵۳.۹	۲۲۰۳.۴	۹	
۱.۳۳	۳۲.۰۰	۲۴.۰۰	۰.۸۳	۴۷.۳۳	۵۶.۷۷	۰.۷۴	۱۶۶۹.۹	۲۲۷۲.۵	۱۰	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۰.۷۳	۵۹.۳۶	۸۱.۸۶	۰.۶۱	۱۷۸۱.۹	۲۹۲۹.۱	۱۱	
۰.۸۳	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۰.۷۵	۵۴.۳۳	۷۲.۰۴	۰.۶۷	۱۴۲۱.۵	۲۱۲۸.۴	۱۲	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰	۵۰.۰۲	۵۰.۰۲	۰.۸۴	۱۶۲۵.۷	۱۹۳۲.۱	۱۳	
۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۱۹	۵۴.۳۳	۴۵.۸۱	۰.۹۹	۱۹۶۷.۸	۱۹۸۴.۵	۱۴	
۱.۲۰	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۸۷	۳۸.۴۳	۴۴.۲۸	۰.۷۷	۱۳۵۱.۴	۱۷۶۶.۲	۱۵	
۱.۰۳	۲۳.۷۳	۲۲.۹۳	۰.۹۶	۵۱.۴۴	۵۶.۳۸	۰.۹	۱۷۹۵.۱	۲۰۴۹.۱	میانگین	
۰.۱۵	۲.۸۱	۱.۸۳	۰.۲۹	۱۰.۵۵	۱۴.۲۸	۰.۲۱	۴۲۱.۲	۴۲۱.۲	انحراف معیار	

جدول ۲- مقادیر مربوط به سه پارامتر دیگر فارماکوکینتیک شامل $AUC(0-\infty)$ ، K_{el} و $t_{1/2}$ که برای هر حیوان به طور جداگانه همراه میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آزمون به مرجع (F) محاسبه شده است.

$t_{1/2}$			K_{el}			$AUC(0-\infty)$			پارامترهای فارماکوکینتیک	شماره گوسفندان
نسبت	آزمون	مرجع	نسبت	آزمون	مرجع	نسبت	آزمون	مرجع		
۰.۳۱	۹.۸۹	۳۱.۸	۳.۲۱	۰.۰۷	۰.۰۲۱۸	۰.۶۱	۱۵۰۵.۷	۲۴۷۴.۶	۱	
۱.۳۴	۳۳.۰۴	۲۴.۶۹	۰.۷۵	۰.۰۲۰۹	۰.۰۲۸	۱.۲۰	۲۸۸۸.۹	۲۴۷۱.۶	۲	
۱.۴۶	۱۵.۹۷	۱۰.۹۱	۰.۶۸	۰.۰۴۳۴	۰.۰۶۳۵	۰.۹۴	۱۵۵۰.۱	۱۶۴۲.۵	۳	
۱.۶۱	۲۰.۸۲	۱۲.۹	۰.۶۲	۰.۰۳۳۲	۰.۰۵۳۷	۰.۸۵	۱۵۱۰.۶	۱۷۷۲.۶	۴	
۱.۵۵	۱۹.۳۵	۱۲.۴۸	۰.۶۵	۰.۰۳۵۸	۰.۰۵۵۵	۱.۲۵	۱۷۹۱.۵	۱۴۴۵	۵	
۰.۸۵	۲۵.۰۸	۲۹.۳۹	۱.۱۷	۰.۰۲۷۶	۰.۰۲۳۵	۱.۰۱	۲۶۴۸.۲	۲۶۲۰.۳	۶	
۰.۶	۱۷.۳۶	۲۹.۱۵	۱.۶۹	۰.۰۳۹۹	۰.۰۲۳۷	۰.۵۵	۲۱۳۰.۲	۳۸۸۱.۹	۷	
۱.۳	۲۳.۶۱	۱۸.۱۹	۰.۷۷	۰.۰۲۹۳	۰.۰۳۸۱	۱.۰۴	۲۴۸۲.۹	۲۳۷۸.۸	۸	
۱.۵۸	۴۲.۹۳	۲۷.۲۵	۰.۶۳	۰.۰۱۶۱	۰.۰۲۵۴	۱.۶۰	۴۶۲۹.۷	۲۸۸۵.۵	۹	
۰.۶۹	۱۶.۲۳	۲۳.۵	۱.۴۵	۰.۰۴۲۷	۰.۰۲۹۴	۰.۷۰	۱۹۳۹.۴	۲۷۵۹.۲	۱۰	
۰.۸۲	۱۵.۵	۱۸.۹۸	۱.۲۲	۰.۰۴۴۷	۰.۰۳۶۵	۰.۵۷	۱۹۱۲.۲	۳۳۴۹.۲	۱۱	
۰.۹	۲۶.۸۵	۲۹.۵۲	۱.۱	۰.۰۲۵۸	۰.۰۲۳۴	۰.۶۱	۱۶۷۴.۷	۲۷۶۴.۴	۱۲	
۰.۵۶	۱۹.۰۹	۳۴.۳۴	۱.۸۱	۰.۰۳۶۳	۰.۰۲۰۱	۰.۶۶	۱۸۰۱.۱	۲۷۴۵.۲	۱۳	
۰.۶۹	۲۴.۰۵	۳۴.۹۹	۱.۴۵	۰.۰۲۸۸	۰.۰۱۹۸	۰.۹	۲۴۶۱.۴	۲۷۲۱.۸	۱۴	
۰.۷۱	۲۴.۵۴	۳۴.۶۴	۱.۴۱	۰.۰۲۸۲	۰.۰۲	۰.۶۷	۱۶۳۹.۳	۲۴۵۶.۴	۱۵	
۱	۲۲.۲۹	۲۴.۸۵	۱.۲۴	۰.۰۳۴۸	۰.۰۲۲۱	۰.۸۸	۲۱۷۱.۱	۲۵۵۷.۳	میانگین	
۰.۴۳	۸.۰۳	۸.۳۴	۰.۶۸	۰.۰۱۲۸	۰.۰۱۴۴	۰.۳	۸۰۹.۲	۶۲۱.۵	انحراف معیار	





نمودار ۲- مقایسه منحنی غلظت پلاسمایی-زمان داروی کلوژانتل یک گوسفند گروه آزمون با یک گوسفند مرجع.

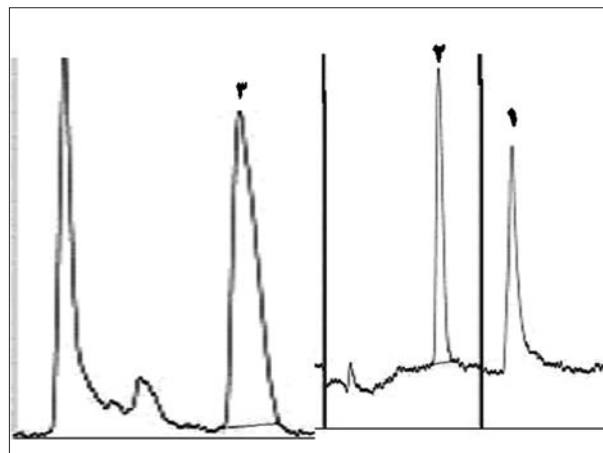
است. در جدول ۱ و ۲ داده‌های مربوط به شاخص‌های فارماکوکینتیکی محاسبه شده برای هر حیوان و همچنین میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آنها (F) ارائه شده است. نتایج نهایی آنالیز پارامترهای فارماکوکینتیکی نیز در جدول ۳ آمده است. در نمودار ۲، منحنی غلظت پلاسمایی-زمان یکی از گوسفندان گروه آزمون با یکی از گوسفندان گروه مرجع مقایسه شده است. لیکن در نمودار ۳ منحنی میانگین غلظت پلاسمایی زمان تمامی گوسفندان گروه آزمون با تمامی گوسفندان گروه مرجع در زمان‌های مختلف خونگیری، مقایسه شده است. همان طوری که در این نمودار ملاحظه می‌شود، سطح زیر منحنی در دو گروه، تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد، هم‌چنان‌که در مقایسه آماری، تفاوت معنی داری بین پارامترهای فارماکوکینتیکی کلوژانتل در دو گروه مشاهده نشد.

بحث

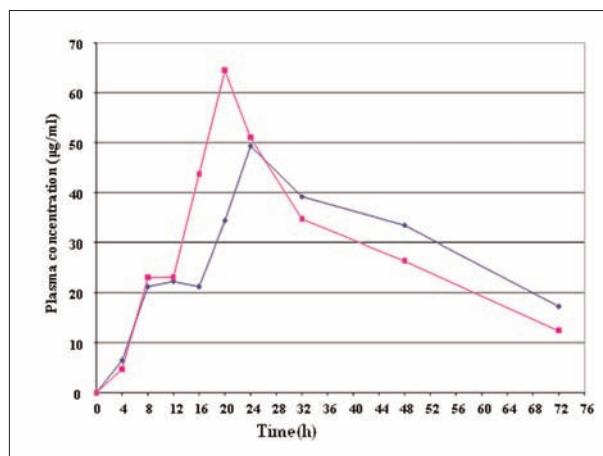
هدف اصلی این مطالعه تعیین همسنگ زیستی بولوس کلوژانتل (هیپاتک) با مواد اولیه شرکت منادیونای اسپانیا به عنوان داروی آزمون در مقایسه با بولوس کلوژانتل (هیپاتک) با ماده اولیه شرکت یانسن بلژیک به عنوان داروی مرجع بود و هر دو داروی آزمون و مرجع از محصولات شرکت دارویی رازک هستند.

برای تعیین همسنگ زیستی، سه شاخص فارماکوکینتیکی مختلف شامل سطح زیر منحنی $AUC_{(0-72)}$ ، غلظت حداکثر C_{max} و زمان رسیدن به غلظت حداکثر (T_{max}) برای هر دو داروی آزمون و مرجع اندازه‌گیری و نسبت بین آنها محاسبه شد. همچنین دو داروی تحت مطالعه توسط دو آزمون t و فاصله اطمینان مقایسه شدند.

طبق نتایج جدول ۱ میانگین C_{max} در گروه مرجع ۱۴/۲۸ و ۵۶/۳۸ در گروه آزمون ۵۱/۴۴ و ۱۰/۵۵ میکروگرم در میلی لیتر بود که نشان می‌دهد غلظت حداکثر داروی آزمون و مرجع دارای اختلاف بسیار کمی است. این



نمودار ۱- دو نمونه از کروماتوگرام‌های کلوژانتل که در آن، ۱= بلانک، ۲= استاندارد و ۳= سرم استخراج شده از خون یکی از گوسفندان تحت مطالعه را نشان می‌دهد.



نمودار ۳- منحنی غلظت پلاسمایی-زمان داروی کلوژانتل در دو گوسفند از دو گروه آزمون و مرجع.

دو دارو با یکدیگر انجام شد. P.Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد و با اطمینان ۹۰ درصد ($\alpha=0/05$) حد بالایی و پایینی بدست آمد و در دامنه ۸۰ تا ۱۲۰ درصد، فاصله اختلاف دو دارو قابل قبول شناخته شد (۱۲).

نتایج

قبل از اندازه‌گیری غلظت کلوژانتل نمونه‌های پلاسمای آزمایشات مربوط به معتبر سازی روش اندازه‌گیری انجام شد. طبق نتایج بدست آمده حد تشخیص (LOD) و حد سنجش (LOQ) به ترتیب ۳ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. همچنین پس از تزریق غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی لیتر از کلوژانتل استاندارد به سیستم HPLC و رسم منحنی کالیبراسیون، میزان خطی بودن منحنی در حد قابل قبول (۰/۹۹۶) بود. تکرار پذیری و بازیافت روش آزمایش نیز در محدوده قابل قبول (82 ± 16 درصد) قرار داشت. در نمودار ۱ کروماتوگرام مربوط به نمونه‌های شاهد، استاندارد و استخراج شده از سرم گوسفند آورده شده



پس از بررسی مقادیر T_{max} ، C_{max} و $AUC_{(0-\infty)}$ در داروی آزمون و مرجع توسط آزمون t-student تفاوت معنی داری مشاهده نشد. مقادیر P.value و حدود بالایی و پایینی با فاصله اطمینان ۹۰ درصد در جدول ۳ حاکی از مشابهت نتایج گروه آزمون و مرجع می باشد.

با توجه به جدول ۲، میانگین K_{el} در گروه مرجع ۰/۳۲۱۰/۰۱۴۴ و در گروه آزمون ۰/۳۴۸۰/۰۱۲۸ بدست آمد که پس از مقایسه آماری دارای اختلاف معنی دار بودند ($p < 0/05$). در مطالعه Ghezelloo در سال ۱۳۸۵ این مقدار در گروه مرجع ۰/۰۷۹۵/۰/۱۶۵ و در گروه آزمون، ۰/۰۳۴۱/۰/۰۶۷۶ بوده است (۱). مقدار K_{el} در این مطالعه تفاوت زیادی با مقدار K_{el} بدست آمده Ghezelloo به خصوص در گروه آزمون، دارد. این تفاوت نشان دهنده حذف سریع تر دارو از گردش خون در این مطالعه نسبت به مطالعه فوق می باشد که از سوسپانسیون کلوزانتل استفاده شده است. همچنین میانگین نیمه عمر حذفی دارو در گروه مرجع ۲۴/۸۵/۳ و در گروه آزمون ۲۲/۲۹۸/۰۳ ساعت بود که اختلاف معنی داری ندارند و با توجه به آنالیزهای آماری، داروی آزمون و مرجع از نظر نیمه عمر مشابه هستند. در مطالعه انجام شده توسط Ghezelloo در سال ۱۳۸۵ این مقدار در گروه مرجع ۵۵/۴۳۳۴/۷ و در گروه آزمون ۱۲۶/۴۳۵۴/۵ بود که تفاوت زیادی با نیمه عمر دارو در این مطالعه دارد (۱). این اختلاف می تواند حیناً به دلیل اختلاف شکل دارویی مورد استفاده در دو مطالعه باشد. در مطالعات انجام شده توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷، Bogan and Mohammed Ali در سال ۱۹۸۷ و Swan و همکاران در سال ۱۹۹۹ میزان نیمه عمر به ترتیب ۱۵ روز، ۳-۲ هفته، ۲۶/۷ روز، ۱۴/۵ روز، ۱۴ روز و ۴۱۷ روز گزارش شده است (۸، ۹، ۱۳). در نتیجه مقدار نیمه عمر بدست آمده در مطالعه حاضر تفاوت زیادی با نتایج سایر مطالعات دارد. نمی توان علت این تفاوت را به طور دقیق مشخص کرد، ولی این احتمال وجود دارد که تفاوت در فرمولاسیون دارو و یا پایین بودن اتصال پروتئینی (Binding protein) در گوسفندان مورد آزمایش و تفاوت های نژادی گوسفندان، دلیل پایین بودن نیمه عمر دارو شده باشد. بر اساس مطالعه ای که Maes و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام دادند، نشان داده شد که عملکرد درمانی کلوزانتل بیشتر تحت تأثیر غلظت حداکثر دارو است (۶). بدین معنی که نیمه عمر طولانی کلوزانتل و دوام غلظت پلاسمایی آن موجب پیشگیری از آلودگی با همونکوس کنتور توس تا ۶۰ روز پس از درمان و مقابله با کرم های کبدی تازه بالغ شده، در مجرای صفراوی می شود (۱). اما با توجه به نیمه عمر پایین بلوس کلوزانتل نسبت به شربت (بر اساس نتایج این مطالعه)، ممکن است این فرم از دارو در گوسفند کارایی لازم را جهت پیشگیری از این بیماری های انگلی نداشته باشد. با این حال به مطالعات عمیق تری در این زمینه نیاز است. همان طوری که جدول ۲ نشان می دهد، میانگین شاخص $AUC_{(0-\infty)}$ در گروه مرجع به میزان ۲۵۵۷/۶۲۱۳/۵ و در گروه آزمون ۲۱۷۱/۸۰۹۱/۲ بوده است. در مقایسه این دو، میزان F که بیانگر فراهمی زیستی نسبی به میزان ۰/۸۸ (۸۸ درصد) می باشد که در حد قابل قبول

جدول ۳- نتایج نهایی حاصل از آنالیز پارامترهای فارماکوکینتیکی و مقایسه آنها در دو گروه آزمون و مرجع.

پارامترهای فارماکوکینتیکی	P value	نسبت سطح زیر منحنی (F)	فاصله اطمینان 90%
AUC (0-72h)	۰.۱۱	۰.۹	۸۰-۱۰۰
C_{max}	۰.۲۹	۸۲-۱۱۰	۰.۹۶
T_{max}	۰.۳۶	۱.۰۳	۹۵-۱۱۱
AUC(0-∞)	۰.۱۵	۰.۸۸	۷۵-۱۰۱
K_{el}	۰.۱۵	۱.۲۴	۹۵-۱۵۳
$t_{1/2}$	۰.۴	۱	۸۲-۱۱۸

موضوع در نمودار ۲ و ۳ که مقایسه منحنی غلظت-پلازما را در یک گوسفند از هر گروه و همچنین میانگین تمامی گوسفندان دو گروه را نشان می دهد. به وضوح به نمایش گذاشته شده است. در ضمن مقادیر C_{max} بدست آمده در این مطالعه با نتایج دیگر محققان از جمله Michiels و همکاران در سال ۱۹۷۷ (۸) نیز هم خوانی دارد. در مطالعه ای که به تازگی به منظور تعیین زیست همسنگی سوسپانسیون کلوزانتل در گوسفند انجام شد، میانگین C_{max} در گروه مرجع که سوسپانسیون ساخت شرکت یانسن را دریافت کرده بودند به میزان ۷۱/۷۰/۱۳/۰۲ میکرو گرم در میلی لیتر و در گروه آزمون که سوسپانسیون ساخت شرکت رازک (با ماده اولیه از یک شرکت اسپانیایی) را دریافت نمودند، ۶۲/۲۱۷/۷۴ گزارش شده است (۱۲). هر چند بین نتایج بدست آمده در مطالعه سوسپانسیون با نتایج مطالعه حاضر اختلاف فاحشی مشاهده نمی شود، لیکن میزان ارقام بدست آمده در سوسپانسیون بیشتر از بلوس می باشد. این موضوع می تواند احتمالاً به علت اختلاف در فرمولاسیون دو دارو و جذب بالاتر سوسپانسیون نسبت به بلوس باشد. میانگین T_{max} در گروه مرجع ۲۲/۹۳۲/۸ و در گروه آزمون ۱/۸۳/۲۳/۷۳ ساعت بود. همان طور که مشاهده می شود در مورد این فاکتور هم داروی آزمون و مرجع زیست همسنگ هستند. مقادیری که برای T_{max} بدست آمد با مقادیر ذکر شده در مطالعات قبلی توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷ هم خوانی دارد (۸). در مورد سومین فاکتور اندازه گیری شده در این مطالعه یعنی $AUC_{(0-\infty)}$ ، میانگین در گروه مرجع ۲۰۴۹/۱۴۲۱/۲ و در گروه آزمون، ۱۷۹۵/۱۴۲۱/۲ بدست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند و رفتار فارماکوکینتیکی دو دارو از این نظر نیز مشابه است.



References

1. Adams, H. R. (2001) Veterinary Pharmacology and Therapeutics. (8th ed.) Iowa State University Press, Iowa, USA.
2. Aulton, M. E. (1990) Biopharmaceutics, the science of dosage form design, (2nd ed.) Churchill Livingstone, Edinburgh. Uk.
3. Benchaoui, H. A., Mc Kellar, Q. A. (1993) Determination of rafoxanide and closantel in ovine plasma by high performance liquid chromatography. J. Bio. Med. Chromat. 44: 229-32.
4. Food and drug administration. (2002) Guidance for industry, Bioequivalence guidance, FDA. Rockville, MD, USA.
5. Hennesy, D. R., Ali, D. N. (1997) The effect of feed intake level on the pharmacokinetics disposition of closantel in sheep. Int. J. Parasitol. 27:1081-6.
6. Maes, L., Lauwers, H., Deckers, W., Vanparijs, O. (1988) Flukicidal action of closantel against immature and mature *Fasciola hepatica* experimentally infected rats and sheep. J. Res. Vet. Sci. 44:229-32.
7. Martinez, M., Langston, C., Martin, T., Conner, D. (2002) Challenges associated with the evaluation of veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap. 25:201-20.
8. Michiels, M., Meulderman, W., Heykants, J. (1987) The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. J. Drug Met. Rev. 18:235-51.
9. Mohammed, A. N. A., Bogan, J. A. (1987) The pharmacodynamics of the flukicidal salicyl anilides, rafoxanide, closantel and oxyclosanide. J. Vet. Pharmacol. Therap. 10:127-133.
10. Stove, G., Dakova, T., Michailova, A. (1999) Quantitative determination of closantel residues in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A. 84:383-6.
11. Stove, G. (1998) Determination of closantel residues in plasma and tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chrom. B. 710: 234-238.
12. Martinez, M., Langston, C., Martin, T., Corner, D. (2002) Challenges associated with the evaluation of

است. اما آنالیز داده‌ها توسط آزمون فاصله اطمینان حاکی از تفاوت بین $AUC_{(0-\infty)}$ گروه آزمون و مرجع است. براساس دستورالعمل‌های اداره نظارت برمواد غذایی و داروی آمریکا (FDA) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) درخصوص زیست‌همسنگی و با توجه به تعاریفی که از سوی منابع معتبر ارائه شده است، زمانی که چهره غلظت خونی دو دارو مشابه باشد، غلظت این دو دارو در بافت هدف نیز با هم مشابه است و در واقع، دو دارو اثر درمانی مشابه یکدیگر خواهند داشت (۱۳). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که به‌طور کلی، بین فاکتورهای فارماکوکینتیک هیپاتک با مواد اولیه تهیه شده از شرکت منادیونا (اسپانیا) با هیپاتک ساخته شده با ماده اولیه شرکت یانسن (بلژیک) مشابهت کافی و قابل قبولی وجود دارد و می‌توان گفت که این دو دارو براساس استانداردهای جهانی زیست‌همسنگ هستند.

Veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap. 25:201-220.

13. Swan, G. E., Koeleman, H. A., Steyn, H. S., Meulders, M. S. (1999) Intravascular plasma disposition and salivary secretion of closantel and rafoxanide in sheep. J. South Afr. Vet. Assoc. 70: 75-90.



BIOEQUIVALENCE STUDY OF TWO CLOSAntEL FORMULATIONS IN SHEEP

Arab, H.A.^{1*}, Jahedinia, M.², Rassouli, A.¹, Shams, G.R.¹

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

²Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

(Received 2008 August 10 , Accepted 2010 February 22)

Abstract:

Bioequivalence study is a scientific and practical method used to compare the quality of a generic drug with a reference product. This study aimed to examine the bioequivalence of two closantel formulations produced with different sources of raw material by a domestic pharmaceutical Company. Due to long half- life of closantel, the study carried out by a parallel method. Thirty sheep were divided into 2 groups of 15 each. In the first group (test group) each sheep received 500 mg bolus of closantel and in the second group (reference group), each sheep received a 500 mg bolus of closantel produced with a raw material from a Belgium Company. Blood samples were collected at 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 48 and 72 hours after drug administration. An HPLC system was used to determine the amount of closantel in plasma. Pharmacokinetic parameters including area under curve (AUC), C_{max} , T_{max} , K_{el} and $t_{1/2}$ of closantel were determined in each sheep. A t-student test was used to analyze and compare the results. The mean \pm SD of C_{max} in reference and test groups were 56.38 ± 14.28 $\mu\text{g/ml}$, 51.44 ± 10.55 , respectively. T_{max} in reference and test groups were 22.93 ± 2.81 , 23.72 ± 1.83 h, respectively. AUC (0-72) in reference and test drugs were 2049.1 ± 421.2 and, 1795.1 ± 421.2 , respectively. AUC (0- ∞) in reference and test were 2557.3 ± 621.5 and 2171.1 ± 80 . K_{el} in reference group was 0.0321 ± 0.0144 while in test it was 0.0348 ± 0.0128 . $t_{1/2}$ in reference and test groups were 24.85 ± 8.34 h and, 22.29 ± 8.03 h, respectively. In conclusion, the results of this study showed that there was not significant difference between reference and test group, suggesting that two products were bioequivalent.

Key words: bioequivalence, pharmacokinetics, closantel, sheep.

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

