UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Dziedzina: Nauki Weterynaryjne

Dyscyplina: Weterynaria

mgr inż. Paulina Markowska-Buńka

Rozprawa doktorska

Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru

Pharmacokinetic characterization of selected isoxazoline derivatives in laying hens and evaluation of the role of efflux transporters P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the pharmacokinetics of fluralaner

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem naukowym
Prof. dr hab. Tomasza Maślanki
oraz promotora pomocniczego
dr n. wet. Huberta Ziółkowskiego
w Katedrze Farmakologii i Toksykologii
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Podziękowania

Panu prof. dr hab. Jerzemu J. Jaroszewskiemu

za przyjęcie mnie do zespołu oraz za wszelkie cenne uwagi w trakcie przygotowania niniejszej rozprawy

Promotorowi prof. dr hab. Tomaszowi Maślance

za wszechstronne wsparcie, cenne wskazówki oraz ogrom przekazanej wiedzy. Dziękuję za konsekwentne dążenie do najwyższych standardów pracy naukowej oraz wyjątkową dbałość o każdy szczegół, dzięki którym mogłam nieustannie doskonalić swój warsztat badawczy. Dziękuję za uwagi, zaangażowanie i zaufanie, które miały nieoceniony wpływ na ostateczny kształt niniejszej rozprawy oraz mój rozwój jako badacza

Promotorowi pomocniczemu dr n. wet. Hubertowi Ziółkowskiemu

za wprowadzenie mnie do fascynującego świata chromatografii, za bycie mentorem farmakokinetycznym, bezcenne wskazówki przy realizacji pracy doktorskiej, a także za nieocenioną pomoc w przeprowadzeniu części eksperymentalnej w ramach niniejszej rozprawy

Pani dr hab. Agnieszce Jasieckiej-Mikołajczyk, prof. UWM

za wsparcie i życzliwość podczas realizacji nie tylko rozprawy doktorskiej ale i pracy w roli nauczyciela akademickiego

Panu dr hab. Włodzimierzowi Markiewiczowi, prof. UWM

za pierwsze spotkanie z farmakologia, które z perspektywy czasu okazało się początkiem drogi prowadzącej mnie do Katedry Farmakologii i Toksykologii

Panu Bartoszowi Rasińskiemu

za nieocenioną pomoc merytoryczną i praktyczną w zakresie chromatografii oraz spektrometrii mas

*Dziękuję także wszystkim **Koleżankom i Kolegom** z Katedry Farmakologii i Toksykologii, którzy wspierali mnie w realizacji pracy doktorskiej*

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 23.06.2026

Prof. dr hab. Tomasz Maślanka

(stopień/ tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego*)~~

Zastępca Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńka pod tytułem: *Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru* została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

.....

(podpis promotora)

* niepotrzebne skreślić

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 23.06.2026

Dr n. wet. Hubert Ziółkowski

(stopień/ tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Zastępca Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny
Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńka pod tytułem: *Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru* została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

.....
(podpis promotora)

* niepotrzebne skreślić

Załącznik nr 3 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 26.06.2026

mgr inż. Paulina Markowska-Buńka

Weterynaria

Zastępca Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny

Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem *Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru* została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Paulina Markowska-Buńka

(podpis kandydata)

Wykaz dorobku naukowego mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki

1) Publikacje opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, tj. posiadające współczynnik wpływu [IF] - zestawienie chronologiczne

1.1. Publikacje oryginalne

1. **Markowska P**., Procajło Z., Wolska J., Jaroszewski J.J., Ziółkowski H., (2021) *Development, Validation, and Application of the LC-MS/MS Method for Determination of 4-Acetamidobenzoic Acid in Pharmacokinetic Pilot Studies in Pigs.* Molecules, 26, 4437; https://doi.org/10.3390/molecules26154437, IF: 4,9; MNiSW: 100,00 pkt.
2. Nosek K., Samiec M., Ziółkowski H., Czuczwar M., **Markowska-Buńka P.,** Borys M., Onichimowski *D. (2024) Linezolid Adsorption on Filters during Continuous Renal Replacement Therapy: An In Vitro Study.* Pharmaceuticals, 17, 1317; https://doi.org/10.3390/ph17101317, IF: 4,8; MNiSW: 100,00 pkt.
3. **Markowska-Buńka P.,** Jaroszewski J.J., Rasiński B., Ziółkowski H. (2025) *A novel method for the determination of isoxazoline derivatives in plasma by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: validation and applicability to screening tests.* Journal of Veterinary Research, 69, 405-415; https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0050, IF: 1,5; MNiSW: 140,00 pkt.
4. **Markowska-Buńka P**., Rasiński B., Ziółkowski H. (2026) *Pharmacology and toxicology of veterinary isoxazolines: a review. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 31, 100645; https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2026.100645, IF: 3,4; MNiSW: 100,00 pkt.
5. Kocik M., Skupień W., **Markowska-Buńka P.,** Markiewicz W., Bryła M., Trzcińska M., Yilmaz O., Burmańczuk A. (2026) *Management practices and trace element-related nutritional risk factors during the transition period in dairy cows: A large-scale screening analysis.* Journal of Elementology, 31(2), 291–310; https://doi.org/10.5601/jelem.2025.30.4.3543, IF: 0,8; MNiSW: 70,00 pkt.

2) Doniesienia na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych i naukowo-szkoleniowych - zestawienie chronologiczne

1. 27–28.04.2015 – XLIV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie. Markowska P., Marciniak M., Mazur P.: *Biosynteza nanosrebra przy użyciu materiałów roślinnych.*

2. 02–03.04.2022 – MICOS Multidisciplinary International Conference on Science. Markowska-Buńka P., Ziółkowski H., Rasiński B.: *Development and validation of the LC-MS/MS method for the determination of Fluralaner in chicken plasma.*

3. 12–15.06.2023 – Konferencja Naukowo-Szkoleniowa *Nowe koncepcje leczenia chorób ludzi i zwierząt z zastosowaniem leków konwencjonalnych, biologicznych i preparatów probiotycznych*, Olsztyn. Markowska-Buńka P.: *Opracowanie oraz walidacja metody oznaczania sarolaneru z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w osoczu kur niosek.*

4. 21.06.2023 – MKDUS – Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego. Markowska-Buńka P.: *Development and validation of the LC-MS/MS method for the determination of lotilaner in chicken plasma.*

5. 22.07.2023 – Ogólnopolski Kongres Nauk Ścisłych i Przyrodniczych. Markowska-Buńka P.: *Opracowanie oraz walidacja metody oznaczania afoksolaneru z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w osoczu kur niosek.*

6. 07–08.09.2023 – *Innovative Food of High Quality for Human Health and Sustainability – an integrated program of innovation and research development in agricultural sciences*, Olsztyn, Poland. Ziółkowski H., Markowska-Buńka P., Jaroszewski J., Maślanka M.: *Enhancement of tigecycline absorption from gastrointestinal tract in mice – preliminary study.*

7. 19–21.09.2024 – XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Olsztyn.

- Ziółkowski H., Markowska-Buńka P., Barski D., Jaroszewski J.: *„Efflux pumps" biorą udział w regulacji transportu tygecykliny przez barierę krew–mózg.*
- Rasiński B., Markowska-Buńka P., Ziółkowski H.: *Opracowanie metody analizy pochodnych izoksazolin w osoczu ludzi i zwierząt.*

8. 23–26.06.2026 – Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Innowacyjne terapie w leczeniu chorób ludzi i zwierząt", Łańsk.

- Markowska-Buńka P., Rasiński B., Ziółkowski H.: *Optymalizacja i rewalidacja wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS do jednoczesnego oznaczania pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek.*
- Markowska-Buńka P., Markiewicz W., Barski D., Burmańczuk A., Kocik M., Jaroszewski J.: *Sierść zwierząt towarzyszących jako biomarker środowiskowej ekspozycji na rtęć – analiza populacji kotów z województwa warmińsko-mazurskiego*.

9. 28.06.-01.07.2026 – 16th EAVPT Congress, Thessaloniki, Greece. Markowska-Buńka P., Jasiecka-Mikołajczyk A.: *Pharmacokinetics of sarolaner in laying hens following intravenous and oral administration.*

Spis treści

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW 21

STRESZCZENIE 24

ABSTRACT 26

1. Wstęp 28

1.1. Wprowadzenie do problematyki badań 28

1.2. Pochodne izoksazolin – charakterystyka ogólna i miejsce w weterynarii 29

1.3. Właściwości fizykochemiczne pochodnych izoksazolin 30

1.3.1. Klasyfikacja i stereochemia pochodnych izoksazolin 30

1.3.2. Właściwości fizykochemiczne istotne dla farmakokinetyki i procesów ADME 31

1.4. Mechanizm działania i aktywność przeciwpasożytnicza pochodnych izoksazolin 32

1.5. Zastosowanie pochodnych izoksazolin i uwarunkowania ich stosowania 33

1.5.1. Zastosowanie pochodnych izoksazolin 33

1.5.2. Uwarunkowania gatunkowe i produkcyjne stosowania pochodnych izoksazolin u drobiu 34

1.6. Bezpieczeństwo stosowania pochodnych izoksazolin 35

1.6.1. Profil działań niepożądanych i ich znaczenie kliniczne 35

1.6.2. Ograniczenia stosowania pochodnych izoksazolin 36

1.6.3. Interakcje z innymi lekami 37

1.7. Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin – stan wiedzy 39

1.7.1. Drogi podania i postacie farmaceutyczne pochodnych izoksazolin 40

1.7.2. Wchłanianie 41

1.7.3. Dystrybucja 43

1.7.4. Metabolizm i eliminacja 44

1.7.5. Ograniczenia aktualnego stanu wiedzy i kierunki dalszych badań nad farmakokinetyką pochodnych izoksazolin u drobiu 46

1.8. Transportery wypływowe P-gp i BCRP oraz ich potencjalna rola w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin 48

1.9. Uzasadnienie podjętych badań i cele pracy 51

1.9.1. Uzasadnienie badań dotyczących porównawczej farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur niosek 51
1.9.2. Uzasadnienie badań dotyczących udziału transporterów wypływowych w farmakokinetyce fluralaneru 52
1.9.3. Uzasadnienie optymalizacji i rewalidacji wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS do oznaczania pochodnych izoksazolin 54
1.10. Główne hipotezy badawcze 56
1.10.1. Wybrane pochodne izoksazolin - fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner - wykazują zróżnicowany profil farmakokinetyczny mimo przynależności do tej samej klasy chemicznej. 56
1.10.2. Transportery wypływowe P-gp i BCRP biorą udział w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek. 56
1.10.3. Jednoczesne oznaczanie wybranych pochodnych izoksazolin z zastosowaniem jednej zoptymalizowanej metody UPLC-MS/MS może poprawić porównywalność i zwiększyć efektywność analiz farmakokinetycznych tych związków. 57
1.11. Zadania badawcze służące realizacji celów naukowych podjętych badań 58
2. Materiały i metody 60
2.1. Zwierzęta i warunki utrzymania 60
2.2. Badane substancje i ich przygotowanie 60
2.3. Projekt doświadczenia 61
2.4. Procedura przygotowania próbek 63
2.4.1.Przygotowanie próbek osocza 64
2.5. Metody analityczne oznaczania izoksazolin 64
2.5.1.Odczynniki i wzorce chemiczne 64
2.5.2.Układ chromatograficzny i warunki jego pracy 65
2.5.3.Aparatura i wyposażenie laboratoryjne 67
2.6. Optymalizacja i rewalidacja metody analitycznej 68
2.6.1.Liniowość 69
2.6.2.Dokładność i precyzja 69
2.6.3.LOD 70
2.6.4.LLOQ 70

2.6.5.Efekt przenoszenia 70
2.6.6.Odzysk 71
2.6.7.Selektywność 71
2.6.8.Efekt matrycy 71
2.7. Analiza statystyczna 72
2.8. Analiza farmakokinetyczna 72
3. Wyniki 74
3.1. Optymalizacja i rewalidacja metody analitycznej 74
3.1.1. Liniowość 74
3.1.2. Dokładność i precyzja 81
3.1.3. LOD 90
3.1.4. LLOQ 90
3.1.5. Ocena efektu przenoszenia analitu w sekwencji analitycznej 91
3.1.6. Odzysk pochodnych izoksazolin z matrycy biologicznej 91
3.1.7. Selektywność metody analitycznej 92
3.1.8. Ocena efektu matrycy 93
3.2. Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin u kur 94
3.2.1. Profil stężenie-czas pochodnych izoksazolin po podaniu IV 94
3.2.2. Parametry farmakokinetyczne pochodnych izoksazolin po podaniu drogą IV 101
3.2.3. Profil stężenie-czas pochodnych izoksazolin po podaniu PO 107
3.2.4. Parametry farmakokinetyczne pochodnych izoksazolin po podaniu PO 114
3.2.5. Ocena wpływu elakrydaru lub oksytetracykliny na farmakokinetykę fluralaneru po podaniu PO 121
3.2.5.1. Profil stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem elakrydaru 121
3.2.5.3. Profil stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem oksytetracykliny 127
3.2.5.5. Porównanie profilu stężenie–czas oraz parametrów farmakokinetycznych fluralaneru w grupach otrzymujących elakrydar i fluralaner oraz oksytetracyklinę i fluralaner 134
4. Dyskusja 138

4.1. Ocena i porównanie farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaner i afoksolaneru u kur niosek 138
4.1.1. Ocena i porównanie profili farmakokinetycznych po podaniu pochodnych izoksazolin drogą IV 138
4.1.2. Ocena i porównanie profili farmakokinetycznych po podaniu pochodnych izoksazolin PO 142
4.2. Ocena udziału transporterów P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek 147
4.3. Ocena efektów optymalizacji i rewalidacji metody UPLC-MS/MS do jednoczesnego oznaczania pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek 150
5. Wnioski 153
6. Spis rycin 155
7. Spis tabel 157
8. Piśmiennictwo 161

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

$AUC_{0\rightarrow t}$	- pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego
$AUC_{0\rightarrow \infty}$	- pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności
AUC_{rest}	- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności
$AUC_{rest\%}$	- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$
$AUMC_{0\rightarrow t}$	- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$	- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności
BCRP	- białko oporności raka piersi
Bias	**-** błąd systematyczny (błąd obciążeniowy), odchylenie średniej wartości oznaczeń od wartości nominalnej
C_{last}	- ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu
C_{max}	- maksymalne stężenie leku w osoczu
Cl	- klirens całkowity
CV	- współczynnik zmienności
DMSO	- dimetylosulfotlenek
EMA	- Europejska Agencja Leków
F	- bezwzględna dostępność biologiczna
FDA	- Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
HQC	- wysoki poziom kontroli jakości
IS	- standard wewnętrzny
IQC	- pośredni poziom kontroli jakości
IV	- podanie droga dożylną
k_{el}	**-** stała szybkości eliminacji leku
LLOQ	- dolna granica oznaczalności
LOD	- limit detekcji

LQC	- niski poziom kontroli jakości
$MRT_{0\rightarrow t}$	- średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego
$MRT_{0\rightarrow\infty}$	- średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od momentu podania do nieskończoności
MQC	- średni poziom kontroli jakości
NCA	- analiza niekompartmentowa
p	- istotność statystyczna
P-gp	- glikoproteina P
PO	- podanie drogą doustną
RT	- czas retencji
QC	- próbka kontroli jakości
r	- współczynnik korelacji liniowej
r^2	- współczynnik determinacji
SD	- odchylenie standardowe
S/N	- stosunek sygnału do szumu w analizie HPLC
SPE	- ekstrakcja do fazy stałej
$t_{1/2kel}$	- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji
t_{last}	- czas ostatniego oznaczalnego stężenia
t_{max}	- czas osiągnięcia stężenia maksymalnego
UPLC	- ultrawydajna chromatografia cieczowa
UPLC-MS/MS	- ultrawydajna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
V_{area}	- pozorna objętość dystrybucji
V_{ss}	- objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym

STRESZCZENIE

Leki przeciwpasożytnicze odgrywają istotną rolę w ochronie zdrowia zwierząt, należąc do najczęściej stosowanych grup terapeutycznych w weterynarii. W związku z narastającym problemem oporności pasożytów na dotychczas stosowane substancje czynne poszukiwane są nowe związki o odmiennym mechanizmie działania i korzystnym profilu farmakologicznym. Pochodne izoksazolin stanowią nową i dynamicznie rozwijającą się grupę leków przeciwpasożytniczych, której zastosowanie rozszerzyło się w ostatnich latach ze zwierząt towarzyszących również na wybrane gatunki zwierząt gospodarskich, w tym kury nioski. Pomimo że europejski patent EP3878281B1 obejmuje możliwość zastosowania u drobiu fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, dostępne dane farmakokinetyczne dotyczą tylko fluralaneru. W konsekwencji farmakokinetyka pozostałych pochodnych izoksazolin u kur niosek pozostawała dotychczas nieznana. Nie wyjaśniono również, czy transportery wypływowe, w tym glikoproteina-P (P-gp/ABCB1) oraz białko oporności raka piersi (BCRP/ABCG2) uczestniczą w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin, mimo że ich udział wykazano w odniesieniu do wielu ksenobiotyków, w tym wielu leków charakteryzujących się znaczną lipofilnością. W związku z powyższym w pracy postawiono trzy cele badawcze: (1) poznanie farmakokinetyki wybranych pochodnych izoksazolin, tj. fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, u kur niosek oraz ustalenie, czy u tego gatunku występują istotne różnice w zakresie właściwości farmakokinetycznych tych leków; (2) ocena udziału P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru u kur z wykorzystaniem elakrydaru jako inhibitora oraz oksytetracykliny jako substratu tych transporterów, poprzez analizę zmian profilu stężenie–czas fluralaneru; (3) optymalizacja i rewalidacja autorskiej metody z zastosowaniem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS) umożliwiającej jednoczesne i precyzyjne oznaczanie wybranych pochodnych izoksazolin w osoczu. Badania przeprowadzono na kurach nioskach linii ISA Brown, którym podawano fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner drogą dożylną (IV) oraz doustną (PO) w ujednoliconym modelu doświadczalnym, co umożliwiło bezpośrednie porównanie ich parametrów farmakokinetycznych. Wpływ transporterów wypływowych P-gp i BCRP na farmakokinetykę fluralaneru oceniono po zastosowaniu elakrydaru, tj. inhibitora P-gp i BCRP oraz oksytetracykliny, będącej substratem tych transporterów. Oznaczenia stężeń badanych związków w osoczu wykonano metodą UPLC-MS/MS, a analizę farmakokinetyczną przeprowadzono z wykorzystaniem podejścia niekompartmentowego. Bezpośrednie porównanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru wykazało istotne różnice w ich

profilach farmakokinetycznych po podaniu IV oraz PO. Spośród badanych związków sarolaner charakteryzował się najwyższą ekspozycją ogólnoustrojową (AUC) oraz najdłuższym czasem uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia (t_{last}) po podaniu PO. Natomiast po podaniu IV lotilaner wykazywał najwyższą wartość klirensu (Cl) oraz najwyższą wartość stałej szybkości eliminacji (k_{el}). Zastosowanie elakrydaru prowadziło do zwiększenia wartości AUC oraz dostępności biologicznej (F) fluralaneru. Podanie oksytetracykliny wywoływało zmiany o analogicznym, lecz mniej nasilonym charakterze. W ramach części metodycznej zoptymalizowano i zrewalidowano wieloskładnikową metodę UPLC-MS/MS umożliwiającą jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek, spełniającą wymagania EMA i FDA dotyczące metod bioanalitycznych. Po raz pierwszy przeprowadzono bezpośrednie porównanie farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych. Wyniki tych badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków: (1) fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner, mimo bliskiego pokrewieństwa strukturalnego, nie stanowią u kur niosek jednorodnej grupy farmakokinetycznej, lecz różnią się w zakresie wchłaniania, dystrybucji i eliminacji. Sarolaner wykazuje największą ekspozycję ogólnoustrojową i najdłuższy średni czas przebywania w organizmie, natomiast lotilaner charakteryzuje się najszybszą eliminacją; (2) uzyskane wyniki wskazują, że mechanizmy transportu wypływowego mogą uczestniczyć w kształtowaniu dostępności biologicznej i profilu farmakokinetycznego fluralaneru; (3) zwalidowana wieloskładnikowa metoda UPLC-MS/MS umożliwia jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek, co pozwala na prowadzenie porównawczych badań farmakokinetycznych tych związków.

Słowa kluczowe: pochodne izoksazolin, farmakokinetyka, ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa, spektrometr mas, transportery wypływowe;

ABSTRACT

Antiparasitic drugs play a crucial role in protecting animal health and represent one of the most frequently used therapeutic groups in veterinary medicine. Due to the growing problem of parasite resistance to currently available active substances, there is an increasing need for novel compounds characterized by distinct mechanisms of action and favorable pharmacological properties. Isoxazoline derivatives constitute a new and rapidly developing class of antiparasitic drugs whose application has expanded in recent years from companion animals to selected livestock species, including laying hens. Although the European patent EP3878281B1 covers the potential use of fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner in poultry, pharmacokinetic data are currently available only for fluralaner. Consequently, the pharmacokinetics of the remaining isoxazoline derivatives in laying hens has remained unknown. Furthermore, it has not been elucidated whether efflux transporters, including P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), are involved in the pharmacokinetics of isoxazoline derivatives, despite their established role in the disposition of numerous xenobiotics, including many highly lipophilic drugs. Therefore, the present study was designed to address three research objectives: (1) to characterize the pharmacokinetics of selected isoxazoline derivatives, namely fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner, in laying hens and to determine whether significant differences in pharmacokinetic properties exist among these compounds in this species; (2) to evaluate the involvement of P-gp and BCRP in the pharmacokinetics of fluralaner in laying hens using elacridar as an inhibitor and oxytetracycline as a substrate of these transporters by analyzing changes in the fluralaner concentration–time profile; and (3) to optimize and revalidate an in-house ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method enabling the simultaneous and accurate determination of selected isoxazoline derivatives in plasma. The study was conducted in ISA Brown laying hens administered fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner intravenously (IV) and orally (PO) under a unified experimental design, enabling direct comparison of their pharmacokinetic parameters. The influence of the efflux transporters P-gp and BCRP on the pharmacokinetics of fluralaner was assessed following administration of elacridar, a dual P-gp/BCRP inhibitor, and oxytetracycline, a substrate of these transporters. Plasma concentrations of the investigated compounds were determined using a UPLC-MS/MS method, and pharmacokinetic analysis was performed using a non-compartmental approach. Direct comparison of fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner revealed significant differences in their pharmacokinetic profiles following both IV and PO

administration. Among the investigated compounds, sarolaner exhibited the highest systemic exposure (AUC) and the longest time to the last quantifiable concentration (t_{last}) after PO administration. In contrast, following IV administration, lotilaner was characterized by the highest clearance (Cl) and the highest elimination rate constant (k_{el}). Administration of elacridar resulted in increased AUC and bioavailability (F) of fluralaner, whereas oxytetracycline produced changes of a similar but less pronounced magnitude. As part of the methodological component of the study, a multianalyte UPLC-MS/MS method enabling the simultaneous determination of fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner in laying hen plasma was optimized and revalidated in accordance with EMA and FDA bioanalytical method validation guidelines. This study provides the first direct comparison of the pharmacokinetics of fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner in laying hens under unified experimental conditions. The obtained results allowed the following conclusions: (1) despite their close structural relationship, fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner do not constitute a homogeneous pharmacokinetic group in laying hens but differ with respect to absorption, distribution, and elimination. Sarolaner exhibits the greatest systemic exposure and the longest mean residence time, whereas lotilaner is characterized by the most rapid elimination; (2) the obtained findings indicate that efflux transport mechanisms may contribute to the bioavailability and pharmacokinetic profile of fluralaner; and (3) the validated multianalyte UPLC-MS/MS method enables the simultaneous determination of fluralaner, sarolaner, lotilaner, and afoxolaner in laying hen plasma, thereby facilitating comparative pharmacokinetic studies of these compounds.

Keywords: isoxazoline derivatives, pharmacokinetics, ultra-performance liquid chromatography, mass spectrometry, efflux transporters.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie do problematyki badań

Leki przeciwpasożytnicze odgrywają istotną rolę w ochronie zdrowia zwierząt, przez co należą do najczęściej stosowanych grup terapeutycznych w weterynarii (Selzer i Epe, 2021; Zhou i wsp., 2022). Narastający problem oporności pasożytów na dotychczas stosowane substancje czynne oraz ograniczenia związane z bezpieczeństwem ich stosowania i potencjalnym wpływem na środowisko uzasadniają poszukiwanie nowych związków o odmiennym mechanizmie działania i korzystnym profilu farmakologicznym (Taylor, 2001; Wardhaugh, 2005; Sparagano i wsp., 2014; McNair, 2015; Sparks i Nauen, 2015). Odpowiedzią na te wyzwania było opracowanie pochodnych izoksazolin, nowej grupy leków przeciwpasożytniczych charakteryzujących się wysoką skutecznością wobec stawonogów, szybkim wchłanianiem oraz długotrwałym działaniem (Zhou i wsp., 2021; Markowska-Buńka i wsp., 2026). Do najważniejszych przedstawicieli tej grupy należą fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner, szeroko stosowane u zwierząt towarzyszących (Hunter i wsp., 2014; Kilp i wsp., 2016; McTier i wsp., 2016; Young i wsp., 2020). W przypadku drobiu obecnie jedynie fluralaner jest zarejestrowany do stosowania u kur (Petersen i wsp., 2021; Markowska-Buńka i wsp., 2026). W związku z tym dostępne dane dotyczące zastosowania tej grupy związków u ptaków pozostają ograniczone jedynie do fluralaneru. Jednocześnie europejski patent EP3878281B1 obejmuje możliwość zastosowania u drobiu również sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, jednak przedstawione w nim dane eksperymentalne odnoszą się głównie do fluralaneru i nie obejmują charakterystyki farmakokinetycznej ani farmakodynamicznej pozostałych związków u ptaków (European Patent Office, 2023). Wskazuje to na istotną lukę w aktualnym stanie wiedzy dotyczącą farmakokinetyki pochodnych izoksazolin niezarejestrowanych obecnie do stosowania u drobiu. Z tego względu zasadne jest poznanie farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur, nie tylko w kontekście ich potencjalnego zastosowania terapeutycznego, lecz również w celu przeprowadzenia analizy porównawczej w obrębie tej samej grupy chemicznej. Takie podejście może umożliwić lepsze zrozumienie zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi badanych związków, a ich profilem farmakokinetycznym, a także identyfikację mechanizmów wpływających na ich losy w organizmie. Szczególne znaczenie mogą mieć w tym kontekście transportery błonowe uczestniczące w aktywnym transporcie wypływowym, w tym glikoproteina P (P-gp/ABCB1) oraz białko oporności raka piersi (BCRP/ABCG2), które mogą wpływać na wchłanianie,

dystrybucję i eliminację ksenobiotyków (Dawson i Locher, 2006). Ocena udziału tych transporterów w farmakokinetyce fluralaneru może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów determinujących ekspozycję ogólnoustrojową tego związku. Rzetelna ocena farmakokinetyki pochodnych izoksazolin wymaga jednocześnie zastosowania czułych, selektywnych oraz odpowiednio zwalidowanych metod analitycznych.

W związku z powyższym przedmiotem niniejszej rozprawy była charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru. Integralnym elementem pracy była również optymalizacja i rewalidacja autorskiej metody z zastosowaniem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS), umożliwiającej jednoczesne oznaczanie badanych związków w osoczu (Markowska-Buńka i wsp., 2025). Tak ujęty zakres badań łączy trzy wzajemnie powiązane elementy: porównawczą ocenę farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur, analizę potencjalnego udziału transporterów wypływowych w farmakokinetyce fluralaneru oraz opracowanie wiarygodnego narzędzia analitycznego niezbędnego do prowadzenia dalszych badań eksperymentalnych i aplikacyjnych.

1.2. Pochodne izoksazolin – charakterystyka ogólna i miejsce w weterynarii

Ektopasożyty stanowią istotny problem w weterynarii ze względu na ich negatywny wpływ na zdrowie i dobrostan zwierząt, a w przypadku drobiu również ze względu na bezpieczeństwo żywności oraz aspekty produkcyjne. Stosowanie leków przeciwpasożytniczych u zwierząt produkujących żywność wiąże się z koniecznością kontroli pozostałości substancji czynnych w tkankach i jajach, a także przestrzegania maksymalnych dopuszczalnych poziomów pozostałości (ang. Maximum Residue Limit) oraz okresów karencji (EMA, 2017a; Enomoto i in., 2024).

Tradycyjne strategie zwalczania ektopasożytów u zwierząt opierały się głównie na stosowaniu substancji oddziałujących na układ nerwowy stawonogów, między innymi poprzez wpływ na acetylocholinoesterazę, kanały sodowe oraz kanały chlorkowe zależne od kwasu γ-aminomasłowego (GABA) i glutaminianu (Taylor, 2001; Beugnet i Franc, 2012). Pochodne izoksazolin, stanowiące nową grupę leków przeciwpasożytniczych o działaniu owadobójczym i roztoczobójczym, oddziałują na kanały chlorkowe zależne od GABA i glutaminianu, jednak w sposób odmienny od starszych grup ektoparazytocydów, co wiąże się z ich wysoką selektywnością wobec stawonogów (Weber i Selzer, 2016; Rufener i wsp., 2017). Ich wysoka skuteczność oraz długotrwałe działanie sprawiły, że w ostatnich latach znalazły szerokie

zastosowanie przede wszystkim u zwierząt towarzyszących. W przypadku drobiu zastosowanie kliniczne tej grupy związków pozostaje jednak ograniczone przede wszystkim do fluralaneru. Z tego względu pogłębienie wiedzy dotyczącej właściwości farmakologicznych i farmakokinetycznych pochodnych izoksazolin u ptaków ma istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne.

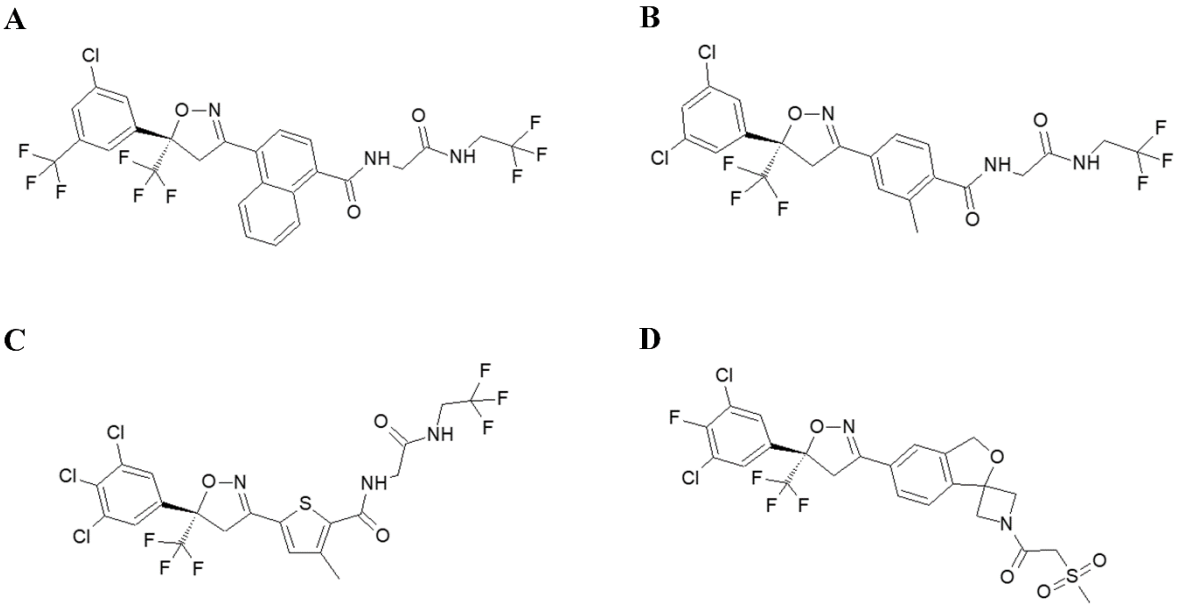
1.3. Właściwości fizykochemiczne pochodnych izoksazolin

1.3.1. Klasyfikacja i stereochemia pochodnych izoksazolin

Podstawowym elementem budowy chemicznej pochodnych izoksazolin jest pięcioczłonowy pierścień izoksazolinowy, stanowiący wspólny rdzeń strukturalny tej grupy związków (Goncalves i wsp., 2021). Poszczególne pochodne różnią się natomiast obecnością podstawników aromatycznych i heterocyklicznych, które wpływają na ich właściwości chemiczne i farmakologiczne (Goncalves i wsp., 2021). Ważną cechą ich budowy jest również obecność centrum stereogenicznego przy atomie węgla w pozycji 3 pierścienia izoksazolinowego. Odpowiada ono za występowanie dwóch enancjomerów, czyli form cząsteczki będących względem siebie nienakładalnymi odbiciami lustrzanymi (Long, 2018). Pierwsze wprowadzone do obrotu izoksazoliny, afoksolaner i fluralaner, opracowano jako mieszaniny racemiczne, natomiast sarolaner i lotilaner jako pojedyncze enancjomery (Long, 2018; Markowska-Buńka i wsp., 2026). Chociaż enancjomery danego związku wykazują zbliżone właściwości fizykochemiczne, mogą znacząco różnić się aktywnością biologiczną, farmakokinetyką oraz profilem bezpieczeństwa (FDA, 1992). Zjawisko to ma szczególne znaczenie w przypadku pochodnych izoksazolin, ponieważ ich aktywność farmakologiczna jest silnie związana z konfiguracją stereochemiczną cząsteczki. W przypadku fluralaneru wykazano, że enancjomer S charakteryzuje się wyższą aktywnością wobec wybranych pasożytów niż forma R (Zhang i wsp., 2020). Podobną zależność opisano dla sarolaneru i afoksolaneru, dla których aktywność przeciwpasożytnicza przypisywana jest przede wszystkim enancjomerowi S (McTier i wsp., 2016; Prullage i wsp., 2021; Tielemans i wsp., 2021). Również lotilaner został opracowany i wprowadzony do obrotu jako czysty enancjomer S, charakteryzujący się większą aktywnością wobec kanałów chlorkowych zależnych od GABA u bezkręgowców niż enancjomer R (Rufener, 2017).

Podsumowując, powyższe różnice strukturalne mogą wpływać na selektywność wobec receptorów stawonogów, lipofilność, ekspozycję ogólnoustrojową oraz czas utrzymywania się działania przeciwpasożytniczego omawianych związków. W konsekwencji ich profil

farmakokinetyczny, szybkość działania, czas trwania efektu oraz dostępność w różnych postaciach farmaceutycznych są różne (Weber i Selzer, 2018; Zhou i wsp., 2021; Markowska-Buńka i wsp., 2026). Struktury chemiczne omawianych pochodnych izoksazolin przedstawiono na Rycinie 1.



Ryc. 1. Budowa chemiczna fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru.

1.3.2. Właściwości fizykochemiczne istotne dla farmakokinetyki i procesów ADME

Właściwości fizykochemiczne pochodnych izoksazolin w znacznym stopniu warunkują ich profil farmakokinetyczny. Są to związki o wysokiej lipofilności, dużej masie cząsteczkowej przekraczającej 500 Da oraz bardzo ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, przy jednoczesnej dobrej rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych. Cząsteczki te charakteryzują się znaczną stabilnością chemiczną i wyraźnie hydrofobowym charakterem (Goncalves i wsp., 2021; Long, 2018). Obecność atomów fluoru w ich strukturze chemicznej dodatkowo zwiększa odporność na przemiany metaboliczne, co może sprzyjać wydłużeniu okresu półtrwania ($t_{1/2kel}$) i zwiększeniu ekspozycji ogólnoustrojowej (Mukherjee i wsp., 2025). Taki profil fizykochemiczny sprzyja bardzo wysokiemu wiązaniu z białkami osocza, które w przypadku pochodnych izoksazolin może przekraczać 99,9% (Letendre i wsp., 2014; Kilp i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017). Wysoki stopień wiązania z białkami osocza może prowadzić do zmniejszenia frakcji wolnej leku, ograniczenia klirensu (Cl) oraz wydłużenia $t_{1/2kel}$ (Dahan i Miller, 2012). Wysoka lipofilność ułatwia również przenikanie przez błony biologiczne i sprzyja dystrybucji do tkanek, natomiast mała rozpuszczalność w wodzie

może wpływać na tempo rozpuszczania i wchłaniania po podaniu doustnym (PO), a tym samym na dostępność biologiczną (F) tych związków.

Podsumowując, opisane właściwości mają istotny wpływ na przebieg procesów farmakokinetycznych tj. ADME (ang. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion), obejmujących wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i eliminację pochodnych izoksazolin. Podstawowe parametry chemiczne i fizykochemiczne omawianych związków, obejmujące wzór sumaryczny, masę molową, liczbę atomów fluoru oraz wartość XLogP3 jako obliczeniowy wskaźnik lipofilności, zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane parametry chemiczne i fizykochemiczne pochodnych izoksazolin.

Substancja czynna	Wzór sumaryczny	Masa molowa ($g \cdot mol^{-1}$)	Liczba atomów fluoru	XLogP3	Rozpuszczalność w wodzie
Afoksolaner	$C_{26}H_{17}ClF_9N_3O_3$	625,88	9	6,7	nierozpuszczalny
Fluralaner	$C_{22}H_{17}ClF_6N_3O_3$	556,29	6	5,6	bardzo słabo rozpuszczalny
Sarolaner	$C_{23}H_{18}ClF_5N_3O_3$	581,36	5	3,4	nierozpuszczalny
Lotilaner	$C_{20}H_{14}ClF_6N_3O_3$	596,76	6	6,6	nierozpuszczalny

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych zawartych w publikacji Markowska-Buńka i wsp. (2026).

1.4. Mechanizm działania i aktywność przeciwpasożytnicza pochodnych izoksazolin

Mechanizm działania pochodnych izoksazolin polega na niekompetycyjnym oddziaływaniu z kanałami chlorkowymi zależnymi od GABA oraz w mniejszym stopniu od L-glutaminianu w układzie nerwowym stawonogów (Gassel i wsp., 2014; Weber i Selzer, 2018; Rufener i wsp., 2017). Cechuje je wyraźna selektywność wobec kanałów chlorkowych u stawonogów w porównaniu z analogicznymi strukturami u kręgowców, co stanowi podstawę ich korzystnego profilu bezpieczeństwa u ssaków (Gassel i wsp., 2014). Zablokowanie tych kanałów prowadzi do zahamowania przepływu jonów chlorkowych, zaburzenia transmisji impulsów nerwowych, hiperwzbudzenia neuronów, porażenia oraz śmierci pasożyta (Ozoe i wsp., 2010; Gassel i in., 2014; Weber i Selzer, 2018). Szczególne znaczenie praktyczne ma fakt, że po podaniu ogólnoustrojowym związki te wykazują działanie układowe, a nie kontaktowe. Oznacza to, że nie działają one odstraszająco ani bójczo wyłącznie przez kontakt pasożyta z powierzchnią skóry lub upierzenia, lecz wymagają pobrania substancji czynnej podczas żerowania. Pasożyty krwiopijne muszą więc przyczepić się do gospodarza i rozpocząć

pobieranie krwi lub płynów tkankowych, aby zostać narażone na substancję czynną obecną w organizmie leczonego zwierzęcia. Mechanizm ten opisano dla pochodnych izoksazolin stosowanych u zwierząt towarzyszących, których działanie przeciwpchelne i przeciwkleszczowe następuje po pobraniu substancji czynnej przez pasożyta podczas żerowania (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016). W przypadku drobiu analogiczny mechanizm dotyczy ptaszyńca kurzego (*Dermanyssus gallinae*), który ulega ekspozycji na fluralaner po pobraniu krwi od leczonego ptaka (Brauneis i wsp., 2017).

1.5. Zastosowanie pochodnych izoksazolin i uwarunkowania ich stosowania

1.5.1. Zastosowanie pochodnych izoksazolin

Szczególne znaczenie wśród pochodnych izoksazolin z perspektywy niniejszej dysertacji ma fluralaner, ponieważ jako jedyny przedstawiciel tej grupy został zarejestrowany do stosowania u młodych kur, kur reprodukcyjnych i kur niosek w postaci preparatu Exzolt, podawanego z wodą do picia (EMA, 2017b). Rejestracja tego produktu stanowi istotne rozszerzenie zastosowań izoksazolin poza obszar medycyny zwierząt towarzyszących i wskazuje na możliwość skutecznego wykorzystania tej grupy związków w produkcji drobiarskiej. W kontekście chowu drobiu fluralaner należy uznać za jeden z najważniejszych praktycznych przykładów wykorzystania pochodnych izoksazolin, zwłaszcza w odniesieniu do zwalczania *D. gallinae*, który stanowi problem zdrowotny i produkcyjny w skali globalnej (Temple i wsp., 2020; Petersen i wsp., 2021).

Pozostałe, szeroko udokumentowane zastosowania pochodnych izoksazolin w weterynarii odnoszą się przede wszystkim do zwierząt towarzyszących. Obejmują one głównie leczenie oraz kontrolę infestacji pcheł i kleszczy. W zależności od substancji czynnej i konkretnego preparatu, wskazania dotyczą również leczenia świerzbu usznego, świerzbu skórnego, nużycy oraz alergicznego pchlego zapalenia skóry (EMA, 2014a; EMA, 2014b; EMA, 2015; EMA, 2017c). W przypadku wybranych produktów dokumentacja rejestracyjna uwzględnia również pośrednie zmniejszanie ryzyka zakażenia patogenami lub pasożytami przenoszonymi przez ektopasożyty. Przykładem jest *Babesia canis*, pierwotniak krwi przenoszony przez kleszcze i wywołujący babeszjozę psów oraz *Dipylidium caninum*, tasiemiec jelitowy psów i kotów, którego żywicielem pośrednim są pchły (EMA, 2014a, 2014b; EMA, 2019, EMA, 2025).

Dostępne dane wskazują, że zakres zastosowań fluralaneru ulega dalszemu rozszerzeniu poza obszar drobiu i zwierząt towarzyszących. Przykładem jest Exzolt 5% Pour-On dla bydła,

dopuszczony m.in. w Australii oraz wybranych krajach Ameryki Łacińskiej, a także produkt Exzolt Cattle-CA1, warunkowo dopuszczony do obrotu w Stanach Zjednoczonych (FDA, 2025; APVMA, 2024; Merck Animal Health, 2025; MSD Saude Animal, 2025). Z kolei preparat Flexolt Oral Lice Treatment for Sheep with any Length of Wool został zarejestrowany w Australii w 2023 roku jako preparat doustny dla owiec, przeznaczony do zwalczania wszy niezależnie od długości wełny (APVMA, 2023). Zakres dotychczasowych zastosowań oraz prowadzonych badań wskazuje, że pochodne izoksazolin stanowią grupę związków o dynamicznie rozwijającym się znaczeniu aplikacyjnym w weterynarii.

1.5.2. Uwarunkowania gatunkowe i produkcyjne stosowania pochodnych izoksazolin u drobiu

Drób stanowi szczególną grupę zwierząt docelowych w kontekście stosowania weterynaryjnych produktów leczniczych, w tym pochodnych izoksazolin, zarówno ze względu na odmienności biologiczne, jak i specyfikę produkcji drobiarskiej. W porównaniu ze zwierzętami towarzyszącymi ptaki charakteryzują się odmienną fizjologią przewodu pokarmowego oraz specyfiką metabolizmu oraz wydalania, co może wpływać na przebieg procesów ADME (Dorrestein i van Miert, 1988). Do najważniejszych cech anatomicznych i fizjologicznych mogących wpływać na wchłanianie leków u ptaków należą odmienna budowa przewodu pokarmowego, obecność wola oraz specyfika pasażu treści pokarmowej. Pomimo tych różnic zasadniczym miejscem wchłaniania leków po podaniu PO pozostaje dwunastnica, a sam proces może podlegać wpływowi biotransformacji w enterocytach oraz działaniu transporterów błonowych, w tym pomp wypływu (Vermeulen i wsp., 2002). Z tego względu dane farmakokinetyczne uzyskane u psów i kotów nie mogą być bezpośrednio odnoszone do drobiu bez uwzględnienia specyfiki tego gatunku.

Istotne znaczenie mają również uwarunkowania produkcyjne. W przeciwieństwie do zwierząt towarzyszących drób należy do zwierząt przeznaczonych do produkcji żywności, co wiąże się z koniecznością uwzględnienia bezpieczeństwa konsumenta, w tym ryzyka występowania pozostałości substancji czynnych w tkankach i jajach oraz wymagań dotyczących okresów karencji (Goetting i wsp., 2011; Patel i wsp., 2018). W przypadku kur niosek szczególne znaczenie ma możliwość przenikania substancji leczniczych do jaj, co stanowi istotny element oceny bezpieczeństwa ich stosowania.

W produkcji drobiarskiej leczenie obejmuje zwykle całe stada, dlatego szczególne znaczenie praktyczne ma droga podania umożliwiająca jednoczesne podawanie produktu dużej liczbie zwierząt, na przykład z wodą do picia (Vermeulen i wsp., 2002). Skuteczność takiej

terapii zależy jednak częściowo od rzeczywistego pobrania wody, na które wpływają między innymi wiek i masa ciała ptaków, warunki środowiskowe, skład diety oraz stan zdrowia stada (Sari i wsp., 2022). Z kolei czynniki te mogą wpływać na zmienność ekspozycji ogólnoustrojowej na podawany związek, co należy uwzględnić podczas interpretacji wyników farmakokinetycznych. Odrębność drobiu jako grupy zwierząt docelowych wynika również ze znaczenia ekonomicznego inwazji pasożytniczych. Pasożyty zewnętrzne, takie jak *D. gallinae*, oddziałują nie tylko na stan zdrowia ptaków, lecz także na wyniki produkcyjne, dobrostan oraz opłacalność chowu (Sigognault Flochlay i wsp., 2017; Sparagano, 2020). Z tego względu ocena farmakokinetyki i bezpieczeństwa stosowania pochodnych izoksazolin u drobiu wymaga uwzględnienia zarówno różnic biologicznych pomiędzy gatunkami, jak i specyfiki produkcji drobiarskiej.

1.6. Bezpieczeństwo stosowania pochodnych izoksazolin

1.6.1. Profil działań niepożądanych i ich znaczenie kliniczne

Pochodne izoksazolin są coraz powszechniej wykorzystywane w weterynarii ze względu na wysoką skuteczność w zwalczaniu ektopasożytów. Wraz ze wzrostem ich zastosowania rośnie jednak znaczenie monitorowania bezpieczeństwa terapii oraz analizy zgłaszanych działań niepożądanych. Ma to istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia oceny bezpieczeństwa weterynaryjnych produktów leczniczych, jak i identyfikacji potencjalnych zależności pomiędzy ekspozycją ogólnoustrojową, a występowaniem działań niepożądanych. Najczęściej zgłaszane działania niepożądane po zastosowaniu pochodnych izoksazolin dotyczą przewodu pokarmowego, natomiast w dalszej kolejności obserwuje się zaburzenia neurologiczne i behawioralne (Markowska-Buńka i wsp., 2026). Pomimo pewnych różnic ilościowych pomiędzy poszczególnymi substancjami profil jakościowy zgłaszanych działań niepożądanych pozostaje zbliżony, co może wynikać z podobieństwa mechanizmu działania oraz właściwości fizykochemicznych tej grupy związków.

W odniesieniu do drobiu dostępne dane wskazują, że stosowanie fluralaneru nie wiąże się z występowaniem istotnych działań niepożądanych. Bezpieczeństwo produktu Exzolt potwierdzono zarówno u kur niosek jak i ptaków reprodukcyjnych, nie wykazując niekorzystnego wpływu na nieśność, parametry reprodukcyjne ani użytkowość rozpłodową (Huyghe i wsp., 2017; EMA, 2017b). Korzystny profil bezpieczeństwa fluralaneru ma szczególne znaczenie w warunkach produkcyjnych, gdzie leczenie obejmuje zazwyczaj całe stada. W badaniach Prohaczik i wsp. (2017) fluralaner podawany w wodzie do picia w dawkach

piętnastokrotnie przekraczających dawkę terapeutyczną nie wywoływał negatywnego wpływu na dobrostan zwierząt, produkcyjność niosek ani jakość jaj. Z kolei Huyghe i wsp. (2017) wykazali, że stosowanie fluralaneru w dawce trzykrotnie wyższej od zalecanej nie wpływało niekorzystnie na wyniki reprodukcyjne ani przeżywalność piskląt. Bezpieczeństwo stosowania fluralaneru przy wielokrotnie zwiększonych dawkach potwierdzili również Sun i wsp. (2025), nie stwierdzając istotnych zmian w parametrach biochemicznych krwi ani wskaźnikach czynności wątroby i nerek. Badania przeprowadzone w warunkach fermowych przez Thomas i wsp. (2017) oraz Temple i wsp. (2020), przy zastosowaniu schematu dawkowania zgodnego z zaleceniami producenta preparatu Exzolt, również nie wykazały występowania działań niepożądanych. Co więcej, autorzy odnotowali poprawę dobrostanu zwierząt, wynikającą ze skutecznego ograniczania inwazji roztoczy. W badaniach Elliota i wsp. (2024) po podaniu fluralaneru dożylnie (IV) oraz naskórnie nie odnotowano objawów klinicznych tj. wymiotów, biegunek, utraty apetytu czy reakcji skórnych. W przeciwieństwie do fluralaneru, dla którego dostępne są dane dotyczące bezpieczeństwa stosowania u kur niosek, informacje dotyczące bezpieczeństwa sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u tego gatunku pozostają niedostępne w literaturze naukowej.

Natomiast u zwierząt towarzyszących w przypadku fluralaneru najwięcej zgłoszeń działań niepożądanych dotyczy zaburzeń żołądkowo-jelitowych, następnie neurologicznych i behawioralnych oraz dotyczących skóry i tkanki podskórnej. W przypadku afoksolaneru dominują zgłoszenia dotyczące przewodu pokarmowego, skóry i tkanki podskórnej, a w dalszej kolejności układu nerwowego. Z kolei w przypadku sarolaneru najczęściej zgłaszane są zaburzenia neurologiczne i behawioralne oraz objawy ze strony przewodu pokarmowego. Odmiennie lotilaner charakteryzuje się przewagą zaburzeń żołądkowo-jelitowych, a w dalszej kolejności reakcji ogólnoustrojowych, reakcji nadwrażliwości w miejscu podania oraz zgłoszeń dotyczących braku skuteczności (Markowska-Buńka i wsp., 2026).

Znaczenie kliniczne tych obserwacji polega przede wszystkim na konieczności monitorowania objawów ze strony przewodu pokarmowego, układu nerwowego i behawioru po podaniu preparatów zawierających pochodne izoksazolin, zwłaszcza u zwierząt z wywiadem neurologicznym.

1.6.2. Ograniczenia stosowania pochodnych izoksazolin

Pomimo korzystnego profilu bezpieczeństwa pochodnych izoksazolin skuteczność oraz bezpieczeństwo terapii mogą zależeć od wielu czynników związanych zarówno z właściwościami farmakologicznymi tych związków, jak i specyfiką gatunku docelowego oraz

sposobem podania produktu leczniczego. W przypadku drobiu szczególne znaczenie ma prawidłowe dawkowanie preparatów podawanych z wodą do picia. Skuteczność terapii może być ograniczana przez nieprawidłowe przygotowanie produktu leczniczego, błędy w kalibracji urządzeń dozujących, niedokładne określenie masy ciała ptaków oraz zmienność pobrania wody przez stado (EMA, 2017b; Sari i wsp., 2022). Kolejnym poważnym problemem pozostaje ryzyko rozwoju oporności pasożytów, któremu sprzyja nieuzasadnione lub nieprawidłowe stosowanie leków przeciwpasożytniczych. Z tego względu w warunkach produkcyjnych szczególnie ważna jest właściwa ocena sytuacji epidemiologicznej oraz jednoczesne leczenie wszystkich stad utrzymywanych w zakażonym obiekcie (Sigognault Flochlay i wsp., 2017; EMA, 2017b).

W odniesieniu do bezpieczeństwa żywności pochodne izoksazolin stosowane u drobiu wymagają uwzględnienia okresów karencji oraz ryzyka występowania pozostałości substancji czynnych w tkankach i jajach. W przypadku fluralaneru stosowanego u kur okres karencji dla tkanek jadalnych wynosi 14 dni, natomiast dla jaj 0 dni (EMA, 2017a; 2017b; Markowska-Buńka i wsp., 2026). Zagadnienia te mają szczególne znaczenie, ponieważ zmienność ekspozycji organizmu na substancję czynną może wpływać nie tylko na skuteczność terapii, lecz również na bezpieczeństwo produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi (EMA, 2017a).

W przypadku zwierząt towarzyszących ograniczenia stosowania pochodnych izoksazolin odnoszą się głównie do wieku, masy ciała oraz statusu rozrodczego zwierząt. Poszczególne substancje różnią się również zalecanymi odstępami pomiędzy kolejnymi podaniami, co wynika między innymi z ich długiego $t_{1/2kel}$ i utrzymującej się ekspozycji ogólnoustrojowej (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017; EMA, 2014a, 2014b; EMA, 2015; EMA, 2017c). W przypadku części preparatów nadal brakuje wystarczających danych dotyczących bezpieczeństwa stosowania u zwierząt ciężarnych i karmiących. Ograniczenia te wskazują, że sposób stosowania pochodnych izoksazolin powinien uwzględniać zarówno właściwości farmakokinetyczne poszczególnych substancji, jak i specyfikę gatunku docelowego.

1.6.3. Interakcje z innymi lekami

W odniesieniu do drobiu udokumentowane dane dotyczą fluralaneru stosowanego w postaci produktu Exzolt. Karta charakterystyki produktu leczniczego wskazuje, że interakcje fluralaneru z innymi lekami stosowanymi u kur są nieznane (EMA, 2017b). Brak adekwatnych danych literaturowych dotyczących jednoczesnego stosowania fluralaneru z innymi lekami

stosowanymi w weterynarii ogranicza możliwość oceny potencjalnych interakcji. Dotyczy to zarówno klasycznych interakcji lek–lek, jak i potencjalnego udziału transporterów wypływowych w farmakokinetyce fluralaneru u tego gatunku. W dostępnej literaturze brak jest również danych oceniających interakcję farmakokinetyczną pomiędzy fluralanerem a oksytetracykliną u kur. Oksytetracyklina jest jedną z najdłużej stosowanych tetracyklin w produkcji drobiarskiej i podawana jest najczęściej w wodzie do picia w postaci preparatów zawierających chlorowodorek oksytetracykliny (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007; Ziółkowski i wsp., 2016). Brak takich danych nie wyklucza możliwości występowania interakcji transporterowych, szczególnie w świetle doniesień wskazujących, że oksytetracyklina może być substratem P-gp i BCRP (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007), a także pojedynczych przesłanek sugerujących udział transporterów wypływowych w farmakokinetyce i dystrybucji pochodnych izoksazolin, w tym potencjalny udział P-gp i BCRP (Walther i wsp., 2014a, 2015; Drag i wsp., 2022; Stander, 2024).

Dla pozostałych pochodnych izoksazolin, tj. sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, brak jest danych dotyczących ich stosowania u kur, a tym samym również dotyczących potencjalnych interakcji tych substancji z innymi lekami. Natomiast w przypadku zwierząt towarzyszących w dokumentacji rejestracyjnej pochodnych izoksazolin stosowanych u psów interakcje z innymi lekami określano najczęściej jako nieznane (EMA, 2014a; 2014b; 2015; 2017c). Wykazano natomiast, że jednoczesne podanie fluralaneru i iwermektyny nie wpływało istotnie na farmakokinetykę żadnego z tych związków oraz nie zwiększało ryzyka neurotoksyczności związanej z iwermektyną (EMA, 2014a; Walther i wsp., 2014a, 2015). W swoich badaniach Walther i wsp., (2014b) potwierdzili również brak działań niepożądanych oraz brak klinicznie istotnych interakcji po jednoczesnym podaniu fluralaneru, milbemycyny oraz prazykwantelu. Nie stwierdzono również interakcji podczas jednoczesnego stosowania pochodnych izoksazolin z innymi lekami przeciwpasożytniczymi. Dotyczyło to zarówno sarolaneru podawanego z oksymem milbemycyny, moksydektyną lub embonianem pyrantelu (EMA, 2015; Becskei i wsp., 2020; Mathur i wsp., 2023; Lloyd i wsp., 2026), jak i afoksolaneru stosowanego równocześnie z oksymem milbemycyny (Drag i wsp., 2017; Packianathan i wsp., 2020). Ponadto, ze względu na bardzo wysoki stopień wiązania fluralaneru i sarolaneru z białkami osocza, oceniano możliwość konkurencji z innymi silnie wiążącymi się substancjami, takimi jak karprofen i warfaryna. Badania *in vitro* fluralaneru w osoczu psów nie wykazały jednak zmniejszenia stopnia wiązania z białkami żadnej z analizowanych substancji (EMA, 2014a; EMA 2015).

Podsumowując, dostępne dane wskazują, że interakcje pochodnych izoksazolin z innymi produktami leczniczymi są słabo poznane, zwłaszcza u drobiu. W przypadku kur zakres danych jest ograniczony wyłącznie do fluralaneru w produkcie Exzolt, natomiast brak danych dla pozostałych pochodnych izoksazolin oraz brak badań dotyczących interakcji fluralaneru z oksytetracykliną, jednym z najdłużej stosowanych antybiotyków w produkcji drobiarskiej, wskazują na istotną lukę poznawczą.

1.7. Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin – stan wiedzy

Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin u drobiu, a w szczególności u kur niosek, została dotychczas opisana jedynie w odniesieniu do fluralaneru, który jest obecnie jedynym przedstawicielem tej grupy dopuszczonym do stosowania u tego gatunku w preparacie Exzolt. Opublikowane badania koncentrują się głównie na ocenie jego profilu farmakokinetycznego po podaniu PO (Prohaczik i wsp., 2017; Sari i wsp., 2022; González-Morales i wsp., 2023; Enomoto i wsp., 2025), naskórnym (Elliot i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2024) oraz IV (Elliot i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2024). Należy jednak podkreślić, że dane dotyczące farmakokinetyki fluralaneru po podaniu PO oraz IV pochodzą z odrębnych badań eksperymentalnych. W literaturze opisano również przenikanie fluralaneru do jaj (Cui i wsp., 2024; Enomoto i wsp. 2024; Chen i wsp. 2026) oraz jego dystrybucję do tkanek, w tym wątroby (Enomoto i wsp., 2025).

Pomimo braku zarejestrowanych preparatów zawierających inne pochodne izoksazolin przeznaczonych do stosowania u drobiu, analiza ich farmakokinetyki u kur niosek wydaje się uzasadniona zarówno ze względu na możliwość przyszłego wykorzystania tych związków w terapii ptaków, jak i potrzebę lepszego poznania ich właściwości farmakokinetycznych u tego gatunku. Ma to szczególne znaczenie w kontekście stopniowego rozszerzania zakresu zastosowania pochodnych izoksazolin na kolejne gatunki zwierząt gospodarskich, co wiąże się z potencjalnym ryzykiem występowania pozostałości w produktach pochodzenia zwierzęcego. Ponadto, szczególne znaczenie w badaniach farmakokinetycznych ma podanie drogą IV, które umożliwia ocenę podstawowych parametrów opisujących dystrybucję i eliminację leku, niezależnie od procesu wchłaniania. Zestawienie danych uzyskanych po podaniu IV oraz PO pozwala na określenie bezwzględnej wartości F. W przypadku pochodnych izoksazolin prowadzenie takich badań może być jednak utrudnione ze względu na bardzo ograniczoną rozpuszczalność tych związków w wodzie. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym porównywanie dostępnych danych są różnice pomiędzy stosowanymi postaciami farmaceutycznymi i preparatami handlowymi, które mogą wpływać na przebieg procesów

wchłaniania oraz ekspozycję ogólnoustrojową. Na tym tle dane dostępne dla zwierząt towarzyszących są znacznie szersze, choć również dotyczą głównie pojedynczych substancji czynnych analizowanych oddzielnie, w określonych schematach podawania oraz u wybranych gatunków docelowych. W przypadku psów i kotów opisano między innymi profile farmakokinetyczne fluralaneru, afoksolaneru czy lotilaneru po podaniu PO oraz IV (Kilp i wsp., 2014, 2016; Letendre i wsp., 2014; Toutain i wsp., 2017, 2018). Analogiczne dane dla drobiu są niepełne i ograniczone tylko do fluralaneru. Wskazuje to, że wiedza dotycząca pochodnych izoksazolin u kur niosek pozostaje nadal fragmentaryczna, szczególnie w zakresie ich farmakokinetyki, interakcji z transporterami błonowymi oraz potencjalnych interakcji z innymi lekami.

1.7.1. Drogi podania i postacie farmaceutyczne pochodnych izoksazolin

W kontekście niniejszych badań szczególne znaczenie mają postacie farmaceutyczne pochodnych izoksazolin przeznaczone do podania PO oraz możliwość podania tych związków drogą IV. Podanie PO należy do najczęściej wykorzystywanych dróg aplikacji tej grupy związków w praktyce klinicznej, natomiast podanie IV ma przede wszystkim znaczenie w badaniach farmakokinetycznych, ponieważ umożliwia bezpośrednią ocenę procesów dystrybucji i eliminacji oraz stanowi punkt odniesienia do wyznaczenia wartości F po podaniu pozanaczyniowym.

Produkty lecznicze zawierające pochodne izoksazolin występują przede wszystkim w postaciach przeznaczonych do podania PO lub naskórnie (Six i wsp., 2016; Walther i wsp., 2014b; Becskei i wsp., 2016a; Cavalleri i wsp., 2017a), przy czym szczególne miejsce zajmuje fluralaner, który jest dostępny również jako roztwór do stosowania w wodzie do picia dla kur w preparacie Exzolt (EMA, 2017b; Soares i wsp., 2022). U zwierząt towarzyszących postacie PO podawane są najczęściej jednorazowo w postaci tabletek lub tabletek do rozgryzania i żucia, natomiast u drobiu fluralaner stosowany jest z wodą do picia przez określony czas (Becskei i wsp., 2016a; Six i wsp., 2016; Cavalleri i wsp., 2017b; Soares i wsp., 2022). Różnice te mogą wpływać na przebieg wchłaniania oraz ekspozycję ogólnoustrojową, co może stanowić istotne ograniczenie przy porównywaniu parametrów farmakokinetycznych uzyskiwanych u różnych gatunków zwierząt z zastosowaniem odmiennych postaci farmaceutycznych. W Unii Europejskiej zatwierdzono także iniekcyjną postać fluralaneru dla psów, jednak jest to preparat przeznaczony do podania podskórnego, a nie drogą IV (Fisara i Guerino, 2023; EMA, 2024). Poza Unią Europejską zakres dostępnych postaci fluralaneru jest szerszy i obejmuje m.in. postać do podania PO dla owiec oraz preparat pour-on dla bydła (APVMA, 2023; APVMA,

2024; FDA, 2025; Merck Animal Health, 2025; MSD Saude Animal, 2025). Wskazuje to, że zakres dostępnych postaci farmaceutycznych pochodnych izoksazolin nadal ulega rozszerzeniu, zarówno pod względem gatunków docelowych, jak i dostępnych dróg podania. Jednocześnie różnorodność stosowanych postaci farmaceutycznych może wpływać na właściwości farmakokinetyczne poszczególnych substancji czynnych oraz utrudniać bezpośrednie porównywanie wyników dostępnych badań.

1.7.2. Wchłanianie

Wchłanianie pochodnych izoksazolin po podaniu PO zostało najlepiej opisane u zwierząt towarzyszących, natomiast w odniesieniu do drobiu dostępne dane dotyczą jedynie fluralaneru. U kur fluralaner, podawany z wodą do picia w preparacie Exzolt, charakteryzuje się wysoką F, wynoszącą około 91% (EMA, 2017b). Opublikowane dane literaturowe wskazują, że substancja ta po podaniu PO ulega skutecznemu wchłanianiu, osiągając maksymalne stężenie (C_{max}) w osoczu w ciągu kilkunastu do kilkudziesięciu godzin od podania (Prohaczik i wsp., 2017; Sari i wsp., 2022; Enomoto i wsp., 2025). W porównaniu ze zwierzętami towarzyszącymi proces wchłaniania fluralaneru u kur przebiega względnie wolno, co może być związane zarówno ze specyfiką podania z wodą do picia, jak i odmiennościami fizjologicznymi przewodu pokarmowego ptaków. W badaniach prowadzonych u kur wykazano również, że zastosowana postać farmaceutyczna może wpływać na przebieg wchłaniania fluralaneru. Sari i wsp. (2022), stosując preparat Exzolt podawany z wodą do picia, uzyskali niższe wartości C_{max} w osoczu oraz dłuższy czas osiągania stężenia maksymalnego (t_{max}) niż Enomoto i wsp. (2025), którzy zastosowali odmienną postać przygotowaną z preparatu Bravecto dla psów. Obserwacje te sugerują, że przebieg wchłaniania fluralaneru u kur zależy nie tylko od właściwości samej substancji czynnej, lecz również od zastosowanej postaci farmaceutycznej oraz sposobu podania. W badaniu Sari i wsp. (2022) oceniano również wpływ pobrania paszy oraz twardości wody na farmakokinetykę fluralaneru u kur niosek. Nie wykazano istotnego wpływu tych czynników na podstawowe parametry opisujące wchłanianie i ekspozycję ogólnoustrojową fluralaneru. Wyniki te wskazują, że zmienne warunki środowiskowe i żywieniowe występujące w produkcji drobiarskiej nie wpływają istotnie na wchłanianie tej substancji. Dotychczas nie opublikowano danych dotyczących wchłaniania pozostałych pochodnych izoksazolin u drobiu. Znacznie więcej informacji dotyczących procesu wchłaniania pochodnych izoksazolin pochodzi z badań prowadzonych u psów i kotów. Dostępne dane wskazują, że fluralaner, afoksolaner, lotilaner oraz sarolaner po podaniu PO charakteryzują się dobrym wchłanianiem oraz wysoką wartością F (Kilp i wsp., 2014, 2016; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016;

Toutain i wsp., 2017, 2018). Jednocześnie pomiędzy poszczególnymi substancjami obserwuje się różnice dotyczące szybkości wchłaniania oraz wpływu pokarmu na ekspozycję ogólnoustrojową. Afoksolaner po podaniu PO u psów charakteryzuje się szybkim i skutecznym wchłanianiem oraz wysoką wartością F, wynoszącą około 74% (EMA, 2014b; Letendre i wsp., 2014). Również fluralaner po podaniu PO u psów również charakteryzuje się dobrym wchłanianiem, a obecność pokarmu zwiększa jego ekspozycję ogólnoustrojową (Kilp i wsp., 2014; EMA, 2014a; Walther i wsp., 2014c). W przypadku lotilaneru obserwuje się bardziej wyraźny wpływ pokarmu na przebieg wchłaniania. U psów podanie leku wraz z karmą zwiększa wartość F (Toutain i wsp., 2017; EMA, 2017c). Zależność ta jest jeszcze bardziej nasilona u kotów, u których wartość F dla lotilaneru po podaniu z pokarmem jest wielokrotnie wyższa niż po podaniu na czczo (Toutain i wsp., 2018). Sarolaner po podaniu PO u psów również wykazuje wysoką wartość F, przekraczającą 85%, jednak w przeciwieństwie do lotilaneru jego wchłanianie wydaje się w mniejszym stopniu zależna od obecności pokarmu (McTier i wsp., 2016; EMA, 2015; EMA, 2017c). Odmienny profil wchłaniania obserwuje się w przypadku iniekcyjnej postaci fluralaneru o przedłużonym uwalnianiu przeznaczonej do podania podskórnego. W tej postaci substancja czynna uwalniana jest stopniowo z miejsca podania, co umożliwia długotrwałe utrzymywanie stężeń terapeutycznych i przedłużone działanie przeciwpasożytnicze (Fisara i Guerino, 2023; EMA, 2024).

Istotnym ograniczeniem interpretacji dostępnych danych pozostają właściwości fizykochemiczne pochodnych izoksazolin, przede wszystkim ich bardzo mała rozpuszczalność w wodzie. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym interpretację wyników pozostają różnice pomiędzy stosowanymi postaciami farmaceutycznymi, które mogą modyfikować przebieg procesu wchłaniania oraz ekspozycję ogólnoustrojową badanych substancji.

Podsumowując, u kur niosek najlepiej scharakteryzowano wchłanianie fluralaneru po podaniu PO z wodą do picia, natomiast dane dotyczące pozostałych pochodnych izoksazolin u drobiu są niedostępne. Wyniki uzyskane u zwierząt towarzyszących wskazują jednak, że związki te mogą różnić się profilem wchłaniania, wpływem pokarmu oraz zależnością od zastosowanej postaci farmaceutycznej. Ograniczona liczba badań prowadzonych u drobiu oraz brak porównawczych analiz wykonywanych w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych utrudniają obecnie ocenę różnic farmakokinetycznych dotyczących etapu wchłaniania pomiędzy poszczególnymi pochodnymi izoksazolin.

1.7.3. Dystrybucja

Dystrybucja pochodnych izoksazolin zależy przede wszystkim od stopnia wiązania z białkami osocza, lipofilności substancji czynnej oraz jej powinowactwa do tkanek. Charakterystyczną cechą tej grupy związków jest bardzo wysoki stopień wiązania z białkami osocza, sięgający lub przekraczający 99,9% (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017). Jednocześnie pochodne izoksazolin wykazują stosunkowo wysokie wartości objętości dystrybucji (V_{ss}), co wskazuje, że mimo silnego wiązania z białkami osocza ulegają rozległemu rozmieszczeniu poza przestrzenią naczyniową.

W odniesieniu do drobiu dostępne dane dotyczą wyłącznie fluralaneru. Zgodnie z dokumentacją rejestracyjną produktu Exzolt fluralaner wiąże się w wysokim stopniu z białkami osocza oraz podlega szerokiej dystrybucji w organizmie, osiągając najwyższe stężenia w wątrobie oraz w skórze i tkance tłuszczowej (EMA, 2017b). Obecność fluralaneru zarówno w osoczu, jak i w wątrobie brojlerów reprodukcyjnych i kogutów po podaniu PO z wodą do picia potwierdzili również Enomoto i wsp. (2025). Wyniki te wskazują, że po podaniu PO fluralaner skutecznie przenika do narządów miąższowych. Na rozległą dystrybucję tkankową fluralaneru wskazują również dane uzyskane po podaniu IV. W badaniu Elliotta i wsp. (2024) V_{ss} fluralaneru u kur wynosiła około 1,4 L/kg, przekraczając całkowitą objętość wody ustrojowej u ptaków. Sugeruje to istotną penetrację substancji do tkanek i narządów. Na szeroką dystrybucję fluralaneru wskazują również dane uzyskane u psów, u których V_{ss} wynosiła około 3–3,1 L/kg (Kilp i wsp., 2014). Wysokie wartości tego parametru sugerują rozległe rozmieszczenie związku poza kompartmentem naczyniowym. Szeroka dystrybucja tkankowa w połączeniu z niskim klirensem (Cl) może stanowić jeden z czynników odpowiedzialnych za długotrwałe utrzymywanie się fluralaneru w organizmie (Kilp i wsp., 2014; EMA, 2014a).

Odmienny profil ekspozycji ogólnoustrojowej obserwuje się w przypadku podskórnej postaci fluralaneru dla psów. W tym przypadku szczególne znaczenie ma stopniowe uwalnianie substancji czynnej z miejsca podania, prowadzące do przedłużonego utrzymywania się stężeń ogólnoustrojowych przez wiele miesięcy po podaniu (Fisara i Guerino, 2023; EMA, 2024). Wydłużone utrzymywanie się fluralaneru w organizmie wynika więc nie tylko z właściwości samej substancji czynnej, lecz również z zastosowanej postaci farmaceutycznej.

Po podaniu PO podobny profil dystrybucji obserwowano również w przypadku afoksolaneru. Zarówno dane rejestracyjne (EMA, 2014b), jak i wyniki przedstawione przez Letendre i wsp. (2014) wskazują na umiarkowanie dużą V_{ss} tej substancji u psów (około 2,6–2,7 L/kg) oraz bardzo wysoki stopień wiązania z białkami osocza, przekraczający 99,9%.

Wskazuje to na utrzymywanie się afoksolaneru zarówno w krążeniu, jak i w kompartmentach pozanaczyniowych. Jeszcze większe wartości V_{ss} opisano dla lotilaneru. W badaniach Toutain i wsp. (2017, 2018) po podaniu IV przekraczały one 5 L/kg zarówno u psów, jak i u kotów, co wskazuje na bardzo szerokie rozmieszczenie tej substancji poza przestrzenią naczyniową. W porównaniu z lotilanerem, sarolaner charakteryzuje się bardziej umiarkowaną V_{ss}, wynoszącą około 2,8 L/kg, przy jednoczesnym bardzo wysokim stopniu wiązania z białkami osocza (McTier i wsp., 2016; EMA, 2015).

Wysokie wartości V_{ss} obserwowane dla pochodnych izoksazolin pozostają zgodne z ich właściwościami fizykochemicznymi, zwłaszcza znaczną lipofilnością. W klasycznej interpretacji farmakokinetycznej V_{ss} przekraczająca całkowitą objętość wody ustrojowej świadczy o intensywnej dystrybucji do tkanek oraz potencjalnej akumulacji w strukturach pozanaczyniowych, takich jak tkanka tłuszczowa lub narządy miąższowe (Grabowski, 2015; Baynes i wsp., 2018). W przypadku pochodnych izoksazolin szczególne znaczenie może mieć rozmieszczenie w tkance tłuszczowej, skórze, wątrobie oraz innych dobrze perfundowanych tkankach, co może wpływać na długotrwałe utrzymywanie się tych substancji w organizmie (Kilp i wsp., 2014; Walther i wsp., 2014; EMA, 2014a). Wysoka lipofilność pochodnych izoksazolin oraz obserwowane neurologiczne działania niepożądane mogą sugerować, że substancje te przenikają przez barierę krew–mózg, jednak mechanizmy regulujące tę penetrację, w tym potencjalny udział transporterów wypływowych, pozostają niepoznane.

Podsumowując, pochodne izoksazolin charakteryzują się bardzo wysokim stopniem wiązania z białkami osocza oraz umiarkowaną lub dużą V_{ss}, co wskazuje na ich rozległe rozmieszczenie poza przestrzenią naczyniową. U kur dostępne dane dotyczą wyłącznie fluralaneru i sugerują jego istotną penetrację do tkanek miąższowych, w tym wątroby. W odniesieniu do drobiu brakuje jednak badań dotyczących dystrybucji tkankowej innych pochodnych izoksazolin. Dostępne obserwacje wskazują również, że dystrybucja tej grupy związków może przebiegać w sposób złożony i wielofazowy, co wymaga dalszych badań farmakokinetycznych prowadzonych u ptaków.

1.7.4. Metabolizm i eliminacja

Metabolizm i eliminacja pochodnych izoksazolin charakteryzują się na ogół ograniczonym udziałem przemian metabolicznych oraz powolnym usuwaniem substancji czynnych z organizmu. W przypadku większości przedstawicieli tej grupy związek macierzysty pozostaje dominującą formą obecną w organizmie, natomiast udział metabolitów jest stosunkowo niewielki (EMA, 2014a; EMA, 2015; EMA, 2017c; Cooper, 2023; Berny i wsp.,

2024, 2026;). Pochodne izoksazolin są wydzielane głównie do żółci, a następnie usuwane z organizmu wraz z kałem, podczas gdy wydalanie nerkowe ma zwykle znaczenie drugorzędne. W połączeniu z wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, znaczną lipofilnością oraz dużą wartością V_{ss} sprzyja to długotrwałemu utrzymywaniu się stężeń ogólnoustrojowych oraz długiemu okresowi $t_{1/2kel}$ obserwowanym dla tej grupy związków. U kur dostępne dane dotyczą fluralaneru i wskazują, że substancja ta nie ulega istotnemu metabolizmowi, a jej eliminacja zachodzi głównie z udziałem wątroby (EMA, 2017b; Enomoto i wsp., 2025). Sari i wsp. (2022) wykazali, że końcowy okres $t_{1/2kel}$ fluralaneru u kur niosek po podaniu z wodą do picia wynosi około 4 dni. Z kolei Elliot i wsp. (2024), na podstawie badań po podaniu IV i naskórnym, wykazali niski Cl ogólnoustrojowy tej substancji.

Podobne obserwacje dotyczą również psów, u których fluralaner charakteryzuje się niewielkim stopniem metabolizmu, niskim Cl oraz długim okresem $t_{1/2kel}$ wynoszącym około 12 dni (Kilp i wsp., 2014; Walther i wsp., 2014; EMA, 2014a). Dane uzyskane zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i dokumentacji rejestracyjnej wskazują, że substancja ta eliminowana jest przede wszystkim po wydzieleniu do żółci, a następnie usuwana z organizmu wraz z kałem (Berny i wsp., 2024, 2026; Cooper, 2023; EMA, 2014a; EMA, 2015; EMA, 2017c). Długotrwałe utrzymywanie się fluralaneru w organizmie obserwowano również po zastosowaniu podskórnej postaci o przedłużonym uwalnianiu przeznaczonej dla psów, gdzie końcowy okres $t_{1/2kel}$ we krwi wynosił od 92 do 170 dni (EMA, 2024). W tym przypadku przedłużona ekspozycja ogólnoustrojowa wynika jednak nie tylko z właściwości samej substancji czynnej, lecz również ze stopniowego uwalniania fluralaneru z miejsca podania (Fisara i Guerino, 2023).

Podobny profil eliminacji obserwowano również dla pozostałych pochodnych izoksazolin stosowanych u zwierząt towarzyszących. Afoksolaner u psów metabolizowany jest jedynie w ograniczonym zakresie, natomiast dominującą drogą jego usuwania pozostaje wydzielanie do żółci i eliminacja z kałem (EMA, 2014b; Letendre i wsp., 2014). Letendre i wsp. (2014) wykazali ponadto niski Cl ogólnoustrojowy oraz końcowy okres $t_{1/2kel}$ wynoszący około 15 dni po podaniu PO. W dostępnych danych nie potwierdzono jednoznacznie udziału krążenia jelitowo-wątrobowego w eliminacji afoksolaneru (EMA, 2014b; Letendre i wsp., 2014).

Również lotilaner u psów i kotów metabolizowany jest w niewielkim stopniu, a dominującą drogą jego eliminacji pozostaje wydzielanie do żółci i eliminacja z kałem, podczas gdy udział wydalania nerkowego obejmuje mniej niż 10% dawki (EMA, 2017c). Toutain i wsp. (2017, 2018) wykazali, że lotilaner charakteryzuje się bardzo niskim Cl oraz jednym z

najdłuższych okresów $t_{1/2kel}$ wśród pochodnych izoksazolin, wynoszącym około 25–34 dni u psów i kotów. Dane te wskazują na bardzo powolną eliminację oraz długotrwałe utrzymywanie się ekspozycji ogólnoustrojowej u obu gatunków. Autorzy dokumentacji rejestracyjnej sugerują, że udział krążenia jelitowo-wątrobowego w eliminacji lotilaneru jest mało prawdopodobny, jednak mechanizmy odpowiedzialne za tak długie utrzymywanie się tej substancji w organizmie nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione.

W porównaniu z lotilanerem, sarolaner wykazuje bardziej umiarkowany $t_{1/2kel}$, jednak podobnie jak pozostałe pochodne izoksazolin eliminowany jest głównie w postaci substancji macierzystej po wydzieleniu do żółci, a następnie usuwany z organizmu wraz z kałem (EMA, 2015). McTier i wsp. (2016) wykazali, że końcowy $t_{1/2kel}$ sarolaneru po podaniu PO u psów wynosi około 10–12 dni. Profil ten, w połączeniu z niskim Cl oraz wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, sprzyja długotrwałemu utrzymywaniu się sarolaneru w organizmie.

Dostępne dane wskazują więc, że pochodne izoksazolin są eliminowane powoli, a ich metabolizm ma zwykle ograniczony charakter. U drobiu dane dotyczące metabolizmu i eliminacji są dostępne tylko dla fluralaneru. Wtórne wzrosty stężeń fluralaneru obserwowane w profilach osoczowych po podaniu PO mogą być rozpatrywane w kontekście redystrybucji między kompartmentami lub potencjalnego udziału krążenia jelitowo-wątrobowego, jednak mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko nie zostały dotychczas jednoznacznie scharakteryzowane. Dominujący udział wydzielania do żółci może ponadto sugerować udział transporterów błonowych uczestniczących w transporcie ksenobiotyków z hepatocytów do dróg żółciowych. Rola tych mechanizmów, w tym potencjalny udział transporterów wypływowych, pozostają niewyjaśnione.

1.7.5. Ograniczenia aktualnego stanu wiedzy i kierunki dalszych badań nad farmakokinetyką pochodnych izoksazolin u drobiu

Dotychczasowy stan wiedzy wskazuje, że farmakokinetyka pochodnych izoksazolin u drobiu pozostaje poznana jedynie fragmentarycznie. U kur niosek dostępne dane dotyczą wyłącznie fluralaneru. Nie wykonano również bezpośrednich badań porównawczych najważniejszych pochodnych izoksazolin prowadzonych w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych, zarówno u drobiu, jak i innych gatunków zwierząt. Utrudnia to ocenę wpływu właściwości fizykochemicznych poszczególnych substancji na ich profil farmakokinetyczny oraz porównanie ich potencjalnej przydatności terapeutycznej i bezpieczeństwa stosowania u drobiu. Istotną lukę stanowi również niewielka liczba badań obejmujących jednoczesną ocenę parametrów farmakokinetycznych po podaniu IV i PO.

Podanie IV umożliwia bowiem precyzyjne określenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych, takich jak Cl i V_{ss}, natomiast zestawienie danych uzyskanych po podaniu IV oraz PO pozwala na wyznaczenie wartości F po podaniu pozanaczyniowym. W przypadku kur niosek dostępne są jedynie pojedyncze doniesienia dotyczące podania drogą IV fluralaneru opisane przez Elliotta i wsp. (2024) oraz Enomoto i wsp. (2024). Interpretację dostępnych danych utrudniają ponadto różnice w stosowanych preparatach i formulacjach fluralaneru. W dostępnych badaniach farmakokinetycznych u kur substancję tę podawano zarówno w postaci weterynaryjnego produktu leczniczego Exzolt, przeznaczonego do stosowania z wodą do picia, jak i w postaci roztworów sporządzonych ze standardu chemicznego substancji czynnej lub z preparatu Bravecto przeznaczonego dla psów (Sari i wsp., 2022; Pereira i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2025; Chen i wsp., 2026). Różnice w składzie formulacji oraz sposobie przygotowania roztworów mogą wpływać na przebieg procesów wchłaniania i ekspozycję ogólnoustrojową, co należy uwzględniać podczas interpretacji i porównywania wyników uzyskanych w poszczególnych badaniach.

Pomimo istotnego znaczenia produkcji drobiarskiej w globalnym systemie żywnościowym, zakres dostępnych i dobrze scharakteryzowanych metod farmakologicznej kontroli ektopasożytów u drobiu jest nadal wyraźnie ograniczony (Tomley i Sparagano, 2018). Dotyczy to zwłaszcza nowoczesnych substancji przeciwpasożytniczych, które w ostatnich latach znalazły szerokie zastosowanie w weterynarii zwierząt towarzyszących (Zhou i wsp., 2021). Jednocześnie dane dotyczące ich stosowania u kur pozostają ograniczone. Dostępna literatura wskazuje, że skuteczność i bezpieczeństwo wielu leków przeciwpasożytniczych oceniano głównie u ssaków (Walther i wsp., 2014a, 2014b; Becskei i wsp., 2016b, 2020; Drag i wsp., 2014; Cavalleri i wsp., 2017b; Kuntz i wsp., 2017), podczas gdy badania prowadzone u drobiu są zdecydowanie mniej liczne i dotyczą tylko fluralaneru (Huyghe i wsp., 2017; Prohaczik i wsp., 2017; Thomas i wsp., 2017; Hinkle i wsp., 2018; Cui i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2024; Sun i wsp., 2025). Ze względu na istotne różnice fizjologiczne pomiędzy ptakami a ssakami, a także specyfikę produkcji jaj konsumpcyjnych, bezpośrednia ekstrapolacja wyników uzyskanych u psów i kotów na drób jest metodologicznie nieuzasadniona. Różnice w budowie i funkcji przewodu pokarmowego, tempie pasażu treści pokarmowej, metabolizmie wątrobowym, składzie osocza, dystrybucji tkankowej oraz mechanizmach eliminacji mogą istotnie modyfikować profil farmakokinetyczny substancji czynnych u ptaków. Z tego względu dane uzyskane u zwierząt towarzyszących mogą stanowić jedynie punkt odniesienia, ale nie powinny zastępować badań przeprowadzonych bezpośrednio u drobiu.

Ograniczona liczba dopuszczonych substancji czynnych, narastający problem oporności ektopasożytów oraz rosnące wymagania dotyczące bezpieczeństwa żywności podkreślają potrzebę dalszych badań nad pochodnymi izoksazolin przeznaczonymi do stosowania u drobiu. Właściwości farmakokinetyczne obserwowane dla tej grupy związków u zwierząt towarzyszących wskazują, że również pozostałe pochodne izoksazolin mogą być rozważane jako potencjalni kandydaci do zwalczania ektopasożytów u kur niosek, co uzasadnia prowadzenie dalszych badań nad ich farmakokinetyką u tego gatunku.

Uzasadnienie takiego kierunku badań wspiera również europejski patent EP3878281B1, który obejmuje możliwość zastosowania u drobiu nie tylko fluralaneru, lecz także sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru (European Patent Office, 2023). Należy jednak podkreślić, że dokument patentowy nie jest równoznaczny z rejestracją produktu leczniczego ani pełną oceną jego farmakokinetyki, skuteczności i bezpieczeństwa u gatunku docelowego. Poszerzenie wiedzy dotyczącej farmakokinetyki tych substancji u drobiu, zwłaszcza w ramach badań porównawczych prowadzonych w możliwie ujednoliconych warunkach eksperymentalnych, pozostaje więc istotne zarówno z punktu widzenia oceny ich potencjalnej przydatności terapeutycznej, jak i bezpieczeństwa produktów pochodzenia drobiowego przeznaczonych do spożycia przez ludzi.

1.8. Transportery wypływowe P-gp i BCRP oraz ich potencjalna rola w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin

W ostatnich dekadach wykazano, że transportery błonowe odgrywają istotną rolę w procesach farmakokinetycznych, wpływając na wchłanianie, dystrybucję oraz eliminację wielu substancji czynnych (Varma i wsp., 2003). Szczególne znaczenie mają transportery błonowe należące do rodziny ABC (ATP-binding cassette), funkcjonujące jako zależne od ATP pompy usuwające określone związki z komórek wbrew gradientowi stężeń (Juliano i Ling, 1976; Borst i Oude Elferink, 2002).

Transportery te uczestniczą w transporcie licznych ksenobiotyków i pełnią funkcję biologicznej bariery ochronnej, ograniczającej wewnątrzkomórkową akumulację substancji potencjalnie toksycznych (Ambudkar i wsp., 1999; Borst i Oude Elferink, 2002). Do najlepiej poznanych transporterów wypływowych należą P-gp i BCRP. Transportery te zlokalizowane są między innymi w jelicie, wątrobie, nerkach oraz w obrębie istotnych barier biologicznych, takich jak bariera krew–mózg. W jelicie obecne są głównie w apikalnej części błony enterocytów, gdzie ograniczają wchłanianie części substancji poprzez ich aktywny transport zwrotny do światła przewodu pokarmowego. W hepatocytach uczestniczą natomiast w

wydzielaniu ksenobiotyków do żółci, wpływając tym samym na procesy eliminacji. W obrębie bariery krew–mózg ograniczają z kolei przenikanie wielu substancji do ośrodkowego układu nerwowego poprzez ich transport z komórek śródbłonka z powrotem do krążenia (Borst i Oude Elferink, 2002; Haritova, 2008; Peña-Solórzano i wsp., 2017). Znaczenie transporterów wypływowych może być szczególnie istotne w przypadku substancji lipofilnych, które ze względu na zdolność do łatwego przenikania przez błony biologiczne mogą wykazywać rozległą dystrybucję tkankową (Liu i wsp., 2011; Fong, 2015). Transportery wypływowe ograniczają ten proces poprzez aktywne usuwanie cząsteczek z komórek (Borst i Oude Elferink, 2002).

Aktywność P-gp i BCRP może w takich przypadkach wpływać zarówno na wartość F po podaniu PO, jak i na dystrybucję tkankową oraz eliminację substancji czynnych. Dominujący udział wydzielania do żółci w eliminacji pochodnych izoksazolin może sugerować udział transporterów wypływowych uczestniczących w transporcie tych związków z hepatocytów do dróg żółciowych. Jednocześnie wysoka lipofilność pochodnych izoksazolin oraz obserwowane działania niepożądane ze strony ośrodkowego układu nerwowego uzasadniają rozważenie, czy transportery obecne w obrębie bariery krew–mózg mogą uczestniczyć w ograniczaniu ekspozycji tkanki nerwowej na te substancje. Dotychczas brak jest jednak jednoznacznych danych określających udział P-gp i BCRP w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin. Znaczenie transporterów wypływowych w farmakokinetyce leków weterynaryjnych stosowanych u ptaków pozostaje niewystarczająco poznane. Barnes (2001) wykazał, że ekspresja P-gp i BCRP u kur może podlegać regulacji między innymi przez czynniki żywieniowe, co sugeruje, że transportery te stanowią istotny element mechanizmów ochronnych organizmu przed działaniem ksenobiotyków. Obecność P-gp i BCRP wykazano u kur oraz indyków między innymi w jelicie, wątrobie, nerkach oraz mózgu, a rozmieszczenie tych transporterów w przewodzie pokarmowym i wątrobie wykazuje istotne podobieństwo do obserwowanego u człowieka (Edelmann i wsp., 1999; Haritova i wsp., 2006). Jednocześnie obserwowano różnice międzygatunkowe dotyczące poziomu ekspresji transporterów wypływowych w poszczególnych tkankach. U ludzi ekspresja P-gp i BCRP w nerkach przewyższa ekspresję jelitową, podczas gdy u ptaków obserwowano odwrotną zależność, z wyższą ekspresją w obrębie jelit niż nerek. Różnice te mogą wpływać na przebieg procesów ADME a tym samym na ekspozycję ogólnoustrojową i bezpieczeństwo farmakoterapii u drobiu (Schrickx i Fink-Gremmels, 2008).

Większość substratów P-gp i BCRP stanowią związki lipofilne o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej, a lipofilność uznawana jest za jeden z czynników wpływających na

powinowactwo substancji do transporterów wypływowych (Lin i Yamazaki, 2003). Pochodne izoksazolin charakteryzują się znaczną lipofilnością, wysokim stopniem wiązania z białkami osocza oraz dużą wartością V_{ss}, dlatego można przypuszczać, że mogą one w pewnym stopniu podlegać transportowi zależnemu od P-gp i BCRP. Transport zależny od P-gp i BCRP może potencjalnie wpływać na ich wartość F, dystrybucję tkankową oraz ekspozycję ogólnoustrojową. Aktywność transporterów wypływowych może podlegać modulacji pod wpływem substancji będących inhibitorami lub konkurencyjnymi substratami tych układów transportowych. Zjawisko to może prowadzić do zmian w zakresie wchłaniania, dystrybucji oraz eliminacji równocześnie podawanych substancji czynnych, wpływając tym samym na ich ekspozycję ogólnoustrojową oraz penetrację do poszczególnych tkanek. Jednym z najlepiej poznanych inhibitorów P-gp i BCRP jest elakrydar, szeroko wykorzystywany w badaniach eksperymentalnych jako narzędzie umożliwiające ocenę udziału transporterów wypływowych w procesach transportu błonowego (Dash i wsp., 2017; Wang i wsp., 2022). Wykazano, że hamowanie aktywności P-gp i BCRP przy użyciu elakrydaru może prowadzić do zwiększenia dostępności biologicznej oraz ekspozycji tkankowej wybranych substancji czynnych, a także nasilenia ich penetracji przez barierę krew–mózg (Karbownik i wsp., 2020). Z tego względu elakrydar znajduje szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za ograniczanie ekspozycji leków oraz potencjalnych interakcji farmakokinetycznych zależnych od transporterów wypływowych. Znaczenie tego typu mechanizmów ilustrują badania Stewart i wsp. (2011), w których opisano doustną interakcję farmakokinetyczną po jednoczesnym podaniu psom dwóch substratów P-gp. Autorzy wykazali, że spinosad istotnie zwiększał ekspozycję ogólnoustrojową na iwermektynę, prawdopodobnie poprzez hamowanie funkcji P-gp w jelicie i/lub wątrobie, podczas gdy iwermektyna nie wpływała na stężenia spinosadu w osoczu. Wykazano również, że oksytetracyklina oddziałuje z układem P-gp i BCRP i może wpływać na transport innych substratów tych transporterów (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007). W związku z tym oksytetracyklina może być rozważana jako substancja pozwalająca ocenić możliwość występowania interakcji farmakokinetycznych związanych z transportem zależnym od P-gp i BCRP. Wiadomym jest, że udział aktywnego transportu w całkowitej przepuszczalności oksytetracykliny uznawany jest za ograniczony, możliwość występowania interakcji farmakokinetycznych związanych z konkurencją o transport błonowy pozostaje biologicznie uzasadniona. Zjawisko to może mieć szczególne znaczenie u drobiu, gdzie oksytetracyklina może być stosowana w terapii stad produkcyjnych. W przeciwieństwie do elakrydaru, wykorzystywanego głównie jako narzędzie

eksperymentalne, oksytetracyklina może więc stanowić również model potencjalnych interakcji farmakokinetycznych o znaczeniu praktycznym.

Pomimo rosnącego znaczenia transporterów wypływowych w farmakokinetyce leków weterynaryjnych udział P-gp i BCRP w kształtowaniu farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u drobiu nie został dotychczas poznany. Ocena potencjalnego wpływu transporterów wypływowych na wchłanianie, dystrybucję oraz eliminację pochodnych izoksazolin może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za losy tych substancji w organizmie, a także potencjalnych interakcji farmakokinetycznych zarówno u drobiu, jak i innych gatunków zwierząt.

1.9. Uzasadnienie podjętych badań i cele pracy

1.9.1. Uzasadnienie badań dotyczących porównawczej farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur niosek

Pomimo rosnącego znaczenia pochodnych izoksazolin w weterynarii, dostępne dane dotyczące ich farmakokinetyki pozostają nadal ograniczone i fragmentaryczne. Dotychczas opublikowane badania koncentrowały się głównie na pojedynczych substancjach czynnych ocenianych oddzielnie, najczęściej u zwierząt towarzyszących, przy zastosowaniu różnych schematów dawkowania, odmiennych postaci farmaceutycznych oraz niejednolitych metod analitycznych (Kilp i wsp., 2014, 2016; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017, 2018). W konsekwencji bezpośrednie porównanie właściwości farmakokinetycznych poszczególnych pochodnych izoksazolin pozostaje utrudnione, a ocena rzeczywistego wpływu różnic strukturalnych i fizykochemicznych na przebieg procesów ADME jest ograniczona.

Szczególnie istotna luka dotyczy drobiu, ponieważ u kur niosek dane farmakokinetyczne odnoszą się wyłącznie do fluralaneru, będącego obecnie jedyną pochodną izoksazolin dopuszczoną do stosowania u tego gatunku w postaci preparatu Exzolt. Tym samym brak jest badań umożliwiających bezpośrednie porównanie farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek. Dane literaturowe dotyczące innych gatunków zwierząt, zwłaszcza psów i kotów, obejmują zwykle pojedyncze pochodne izoksazolin oceniane oddzielnie, przy zastosowaniu różnych preparatów handlowych, odmiennych postaci farmaceutycznych, różnych dróg podania oraz niejednakowych dawek, co utrudnia bezpośrednie porównywanie uzyskiwanych wyników (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017).

Ograniczenia te mają szczególne znaczenie w przypadku pochodnych izoksazolin ze względu na ich znaczną lipofilność, wysokie wiązanie z białkami osocza oraz bardzo małą rozpuszczalność w wodzie. W części badań farmakokinetycznych poszczególne pochodne izoksazolin podawano w różnych dawkach zależnie od drogi podania (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016), co ogranicza możliwość bezpośredniego porównywania uzyskanych parametrów farmakokinetycznych i dostępności biologicznej. Dodatkowym ograniczeniem jest stosowanie gotowych preparatów handlowych występujących w odmiennych postaciach farmaceutycznych, co może wpływać na przebieg wchłaniania oraz ekspozycję ogólnoustrojową substancji czynnej.

Potrzeba pogłębienia wiedzy dotyczącej farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur niosek ma znaczenie nie tylko poznawcze, lecz również praktyczne. Drób stanowi szczególną grupę zwierząt docelowych ze względu na znaczenie w produkcji żywności oraz ryzyko występowania pozostałości substancji czynnych w tkankach i jajach. Z tego względu ocena farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur niosek może mieć istotne znaczenie zarówno dla bezpieczeństwa produktów pochodzenia drobiowego i zdrowia publicznego, jak i dla przyszłego rozszerzania możliwości terapeutycznego wykorzystania tej grupy substancji u drobiu. Szczególnie istotne wydaje się określenie, czy pozostałe pochodne izoksazolin, obecnie stosowane głównie u zwierząt towarzyszących, mogą wykazywać właściwości farmakokinetyczne potencjalnie sprzyjające ich przyszłemu zastosowaniu również u kur niosek.

W związku z przedstawionymi ograniczeniami pierwszym celem badań było przeprowadzenie porównawczej oceny farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru u kur niosek w możliwie ujednoliconych warunkach eksperymentalnych.

1.9.2. Uzasadnienie badań dotyczących udziału transporterów wypływowych w farmakokinetyce fluralaneru

Pochodne izoksazolin charakteryzują się znaczną lipofilnością, wysokim stopniem wiązania z białkami osocza oraz dużą wartością V_{ss}, a dostępne dane wskazują, że ich eliminacja zachodzi głównie poprzez wydzielanie do żółci, a następnie wydalanie z kałem (Berny i wsp., 2026; Markowska-Buńka i wsp., 2026). Właściwości te sugerują, że transportery wypływowe, w tym zwłaszcza P-gp i BCRP, mogą uczestniczyć zarówno we wchłanianiu jelitowym, jak i w eliminacji tych substancji. Dotychczas brak jest jednak jednoznacznych danych określających udział transporterów wypływowych w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin, szczególnie u drobiu.

Pomimo wykazanej obecności P-gp i BCRP w jelicie, wątrobie oraz innych tkankach kur i indyków (Edelmann i wsp., 1999; Barnes, 2001), znaczenie tych transporterów w procesach wchłaniania, dystrybucji oraz eliminacji pochodnych izoksazolin u ptaków pozostaje niewyjaśnione. Brakuje również danych dotyczących potencjalnych interakcji farmakokinetycznych związanych z modulacją aktywności transporterów wypływowych u drobiu. Ograniczenia te nie dotyczą tylko drobiu, bowiem udział P-gp i BCRP w transporcie pochodnych izoksazolin nie został jednoznacznie scharakteryzowany również u innych gatunków zwierząt.

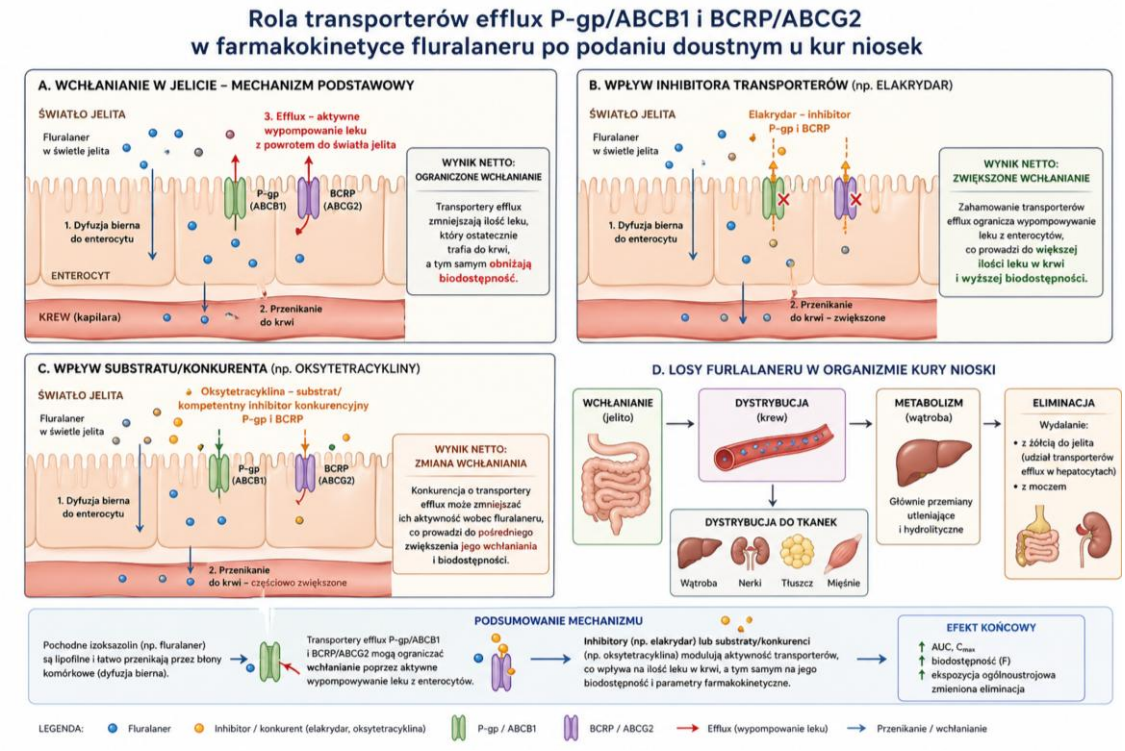
Istotnym narzędziem wykorzystywanym w badaniach nad transporterami wypływowymi jest elakrydar, uznawany za silny inhibitor P-gp i BCRP (Karbownik i wsp., 2020). Substancja ta znajduje szerokie zastosowanie w modelach eksperymentalnych służących do oceny udziału transporterów wypływowych w procesach transportu błonowego oraz w ocenie interakcji farmakokinetycznych (Bihorel i wsp., 2007; Dash i wsp., 2017; Karbownik i wsp., 2020; Wang i wsp., 2022; Yao, 2024). Wykazano, że hamowanie aktywności P-gp i BCRP może prowadzić do zwiększenia dostępności biologicznej oraz ekspozycji ogólnoustrojowej wybranych substancji czynnych, szczególnie po podaniu PO (Dash i wsp., 2017; Karbownik i wsp., 2020; Wang i wsp., 2022).

Potencjalne znaczenie praktyczne mogą mieć również interakcje wynikające z konkurencji między substratami transporterów wypływowych. Oksytetracyklina, należąca do substancji stosowanych w terapii drobiu, może oddziaływać z transporterami P-gp i BCRP oraz wpływać na transport innych substratów tych transporterów (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007).

W przeciwieństwie do elakrydaru, wykorzystywanego głównie jako narzędzie eksperymentalne, oksytetracyklina może więc stanowić substancję modelową do oceny potencjalnych interakcji farmakokinetycznych o znaczeniu praktycznym w warunkach produkcji drobiarskiej.

Ocena wpływu modulacji aktywności transporterów wypływowych na ekspozycję ogólnoustrojową fluralaneru może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za jego wchłanianie i eliminację, a także potencjalnych interakcji farmakokinetycznych związanych z transportem błonowym zarówno u drobiu, jak i u innych gatunków zwierząt.

W związku z przedstawionymi ograniczeniami drugim celem badań było określenie potencjalnego udziału transporterów wypływowych P-gp i BCRP w kształtowaniu farmakokinetyki fluralaneru u kur niosek z wykorzystaniem modulacji aktywności transporterów (Rycina 2).



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie potencjalnego wpływu modulacji aktywności transporterów wypływowych P-gp i BCRP na farmakokinetykę fluralaneru po podaniu PO u kur niosek; (A) Fluralaner podany samodzielnie może podlegać aktywnemu transportowi zwrotnemu zależnemu od P-gp i BCRP, co może ograniczać jego wartość F. (B) W obecności elakrydaru, inhibitora P-gp i BCRP, dochodzi do zahamowania aktywności tych transporterów, co może skutkować zmniejszeniem wypływu fluralaneru i zwiększeniem jego przenikania do krążenia ogólnoustrojowego. (C) Jednoczesne podanie fluralaneru i oksytetracykliny, będącej potencjalnym substratem P-gp i BCRP, może prowadzić do konkurencji o transport zależny od tych transporterów, a tym samym ekspozycję ogólnoustrojową fluralaneru. (D) Schematycznie przedstawiono potencjalne procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji (ADME) fluralaneru u kur niosek. Ze względu na ograniczoną wiedzę dotyczącą szczegółowych szlaków metabolicznych i eliminacyjnych u tego gatunku schemat ma charakter poglądowy.

1.9.3. Uzasadnienie optymalizacji i rewalidacji wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS do oznaczania pochodnych izoksazolin

Prawidłowa ocena farmakokinetyki pochodnych izoksazolin wymaga zastosowania czułych, selektywnych oraz odpowiednio zwalidowanych metod analitycznych umożliwiających oznaczanie niskich stężeń substancji czynnych w materiale biologicznym. Dotychczas opublikowane metody analityczne dotyczące pochodnych izoksazolin koncentrowały się jednak najczęściej na oznaczaniu pojedynczych substancji czynnych (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; Cui i wsp., 2024; Liu i wsp., 2026). Chociaż opracowano

również metodę umożliwiającą jednoczesne oznaczanie kilku pochodnych izoksazolin w próbkach pochodzenia zwierzęcego, była ona przeznaczona do analizy tkanek, a nie osocza, i nie została zwalidowana pod kątem zastosowań farmakokinetycznych (Wu i wsp., 2023). W konsekwencji w badaniach farmakokinetycznych pochodnych izoksazolin nadal wykorzystuje się głównie odrębne procedury przygotowania próbek oraz niezależne analizy chromatograficzne dla poszczególnych substancji. Ograniczenia te mają szczególne znaczenie w przypadku badań porównawczych prowadzonych w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych. Zastosowanie odrębnych metod analitycznych dla poszczególnych substancji zwiększa bowiem liczbę etapów przygotowania próbek, wydłuża czas analizy oraz może stanowić dodatkowe źródło zmienności analitycznej. Jednocześnie różnice w parametrach poszczególnych metod utrudniają bezpośrednie porównywanie uzyskiwanych wyników farmakokinetycznych. Wcześniej opracowane i opublikowane procedury oznaczania pochodnych izoksazolin umożliwiały analizę wybranych substancji oddzielnie, jednak nie pozwalały na jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru w osoczu w ramach jednej procedury analitycznej. Wstępne badania pilotażowe prowadzone z wykorzystaniem pojedynczych metod oznaczania potwierdziły przydatność techniki UPLC-MS/MS w analizie pochodnych izoksazolin, wskazując jednocześnie na potrzebę dalszej optymalizacji i ujednolicenia procedury analitycznej dla badań porównawczych obejmujących kilka substancji czynnych (Markowska-Buńka i wsp., 2025). Potrzeba opracowania wspólnej metody oznaczania tych substancji wynikała więc nie tylko z konieczności ujednolicenia warunków analitycznych, lecz również z dążenia do uproszczenia przygotowania próbek oraz ograniczenia liczby niezależnych analiz wykonywanych dla poszczególnych związków. Zastosowanie UPLC-MS/MS stwarza możliwość jednoczesnego oznaczania wielu substancji czynnych przy zachowaniu wysokiej czułości i selektywności analitycznej. Szczególne znaczenie w przypadku pochodnych izoksazolin mają ich właściwości fizykochemiczne, przede wszystkim znaczna lipofilność oraz ograniczona polarność, które mogą wpływać na efektywność jonizacji i parametry detekcji. Z tego względu istotnym elementem procesu optymalizacji pozostawał dobór odpowiednich warunków jonizacji oraz parametrów przygotowania próbek umożliwiających uzyskanie stabilnych i powtarzalnych wyników analitycznych dla wszystkich analizowanych substancji.

Opracowanie wieloskładnikowej metody umożliwiającej jednoczesne oznaczanie czterech najważniejszych pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek może ponadto stanowić podstawę do przyszłych badań przesiewowych, porównawczych oraz badań interakcji farmakokinetycznych prowadzonych z udziałem tej grupy leków.

W związku z przedstawionymi ograniczeniami trzecim celem badań była optymalizacja oraz rewalidacja wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS umożliwiającej jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek.

1.10.Główne hipotezy badawcze

1.10.1. Wybrane pochodne izoksazolin - fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner - wykazują zróżnicowany profil farmakokinetyczny mimo przynależności do tej samej klasy chemicznej.

Pomimo wspólnej struktury chemicznej pochodne izoksazolin nie wykazują jednorodnego profilu farmakokinetycznego. Dostępne dane wskazują, że poszczególne związki różnią się wchłanianiem, dystrybucją i eliminacją, co znajduje odzwierciedlenie w odmiennych wartościach parametrów farmakokinetycznych, takich jak F, t_{max}, $t_{1/2kel}$ czy całkowita ekspozycja ogólnoustrojowa. Różnice te mogą wynikać między innymi z różnic w lipofilności, rozpuszczalności oraz stopniu wiązania z białkami osocza, a także różnic w zakresie metabolizmu i transportu przez bariery biologiczne (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017; Toutain i wsp., 2018). Należy jednak zaznaczyć, że większość dostępnych danych dotyczących farmakokinetyki pochodnych izoksazolin pochodzi z badań prowadzonych u psów i kotów, podczas gdy dane dotyczące drobiu pozostają ograniczone. Ze względu na różnice fizjologiczne między ptakami a ssakami nie można zakładać, że substancje należące do tej samej klasy chemicznej będą wykazywały podobny profil farmakokinetyczny u kur niosek. Potwierdzenie niniejszej hipotezy wskazywałoby, że przynależność do jednej klasy chemicznej nie determinuje jednorodności parametrów farmakokinetycznych pochodnych izoksazolin, a każda z badanych substancji może charakteryzować się odmiennymi właściwościami wpływającymi na jej ekspozycję ogólnoustrojową oraz potencjalną przydatność terapeutyczną u drobiu.

1.10.2. Transportery wypływowe P-gp i BCRP biorą udział w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek.

Dostępne dane wskazują, że P-gp i BCRP uczestniczą w regulacji wchłaniania jelitowego oraz eliminacji wielu substancji czynnych, szczególnie związków lipofilnych wykazujących rozległą dystrybucję tkankową.

Transportery te, obecne między innymi w enterocytach oraz hepatocytach, mogą ograniczać wartość F leków poprzez aktywny transport do światła przewodu pokarmowego, a także uczestniczyć w ich wydzielaniu do dróg żółciowych, wpływając tym samym na

ekspozycję ogólnoustrojową substancji czynnych (Borst i Oude Elferink, 2002; Schinkel i Jonker, 2003).

Pochodne izoksazolin, w tym fluralaner, charakteryzują się znaczną lipofilnością, wysokim stopniem wiązania z białkami osocza oraz długim $t_{1/2kel}$. Ponadto, dominujący udział wydzielania do żółci i eliminacji z kałem w usuwaniu pochodnych izoksazolin z organizmu może pośrednio sugerować udział transporterów wypływowych w tych procesach. Dotychczasowe dane dotyczące udziału P-gp i BCRP w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin pozostają jednak bardzo ograniczone, a w odniesieniu do ptaków praktycznie nie są dostępne.

W badaniach dotyczących mechanizmów transportu błonowego szerokie zastosowanie znajduje elakrydar, będący silnym inhibitorem P-gp i BCRP, wykorzystywanym do oceny wpływu transporterów wypływowych na wartość F i ekspozycję ogólnoustrojową leków. Potencjalne znaczenie mogą mieć również interakcje wynikające z konkurencji między substratami transporterów. Wykazano, że oksytetracyklina może oddziaływać z transporterami P-gp i BCRP oraz może wpływać na transport innych substratów tych transporterów (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007). Ponieważ oksytetracyklina należy do substancji stosowanych w terapii drobiu, potencjalne interakcje związane z modulacją aktywności transporterów mogą mieć znaczenie nie tylko eksperymentalne, lecz również praktyczne.

Potwierdzenie niniejszej hipotezy wskazywałoby, że aktywność transporterów wypływowych stanowi jeden z czynników wpływających na profil farmakokinetyczny fluralaneru oraz potencjalne interakcje farmakokinetyczne pochodnych izoksazolin.

1.10.3. Jednoczesne oznaczanie wybranych pochodnych izoksazolin z zastosowaniem jednej zoptymalizowanej metody UPLC-MS/MS może poprawić porównywalność i zwiększyć efektywność analiz farmakokinetycznych tych związków.

Dotychczas stosowane metody analityczne dotyczące pochodnych izoksazolin obejmowały najczęściej oznaczanie pojedynczych substancji czynnych analizowanych oddzielnie. Takie podejście utrudnia prowadzenie badań porównawczych wykonywanych w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych, zwiększa liczbę etapów przygotowania próbek oraz może stanowić dodatkowe źródło zmienności analitycznej. Ponadto właściwości fizykochemiczne pochodnych izoksazolin, przede wszystkim ich znaczna lipofilność i ograniczona polarność, mogą wpływać na efektywność ekstrakcji, jonizacji, rozdziału chromatograficznego oraz detekcji chromatograficznej.

Wstępne badania pilotażowe wykazały przydatność techniki UPLC-MS/MS w analizie pochodnych izoksazolin, wskazując jednocześnie na możliwość dalszej optymalizacji i ujednolicenia procedury analitycznej do jednoczesnego oznaczania kilku substancji czynnych (Markowska-Buńka i wsp., 2025). Założono, że odpowiedni dobór warunków przygotowania próbek, parametrów chromatograficznych oraz warunków jonizacji umożliwi opracowanie wspólnej, czułej i selektywnej metody oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek.

Potwierdzenie niniejszej hipotezy wskazywałoby, że możliwe jest opracowanie ujednoliconej procedury analitycznej umożliwiającej jednoczesne oznaczanie badanych pochodnych izoksazolin, co mogłoby znaleźć zastosowanie zarówno w badaniach farmakokinetycznych, jak i przyszłych badaniach porównawczych oraz przesiewowych dotyczących tej grupy substancji.

1.11. Zadania badawcze służące realizacji celów naukowych podjętych badań

Cel nr 1: Poznanie farmakokinetyki wybranych pochodnych izoksazolin, tj. fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, u kur niosek oraz ustalenie, czy u tego gatunku występują istotne różnice w zakresie właściwości farmakokinetycznych tych leków:

Zadanie badawcze nr 1: Określenie parametrów farmakokinetycznych, w tym profili stężenie-czas fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek po podaniu PO oraz IV.

Zadanie badawcze nr 2: Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek po podaniu PO oraz po podaniu IV w celu określenia podobieństw i różnic w obrębie tej grupy związków.

Cel nr 2: Ocena udziału P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek z wykorzystaniem elakrydaru jako inhibitora oraz oksytetracykliny jako substratu/konkurenta tych transporterów, poprzez analizę zmian profilu stężenie–czas fluralaneru.

Zadanie badawcze nr 3: Określenie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, w tym określenie profili stężenie – czas w następujących układach doświadczalnych: fluralaner + inhibitor P-gp i BCRP, fluralaner + konkurent/substrat P-gp i BCRP.

Zadanie badawcze nr 4: Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru oraz ocena wpływu inhibitora lub substratu/konkurenta P-gp i BCRP na proces wchłaniania i/lub eliminacji fluralaneru u kur niosek.

Cel nr 3: Optymalizacja i rewalidacja autorskiej metody UPLC-MS/MS umożliwiającej jednoczesne i precyzyjne oznaczanie wybranych pochodnych izoksazolin, tj. fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek.

Zadanie badawcze nr 5: Optymalizacja warunków chromatograficznych oraz parametrów detekcji metody LC-MS/MS z jonizacją APCI do jednoczesnego oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek, w tym: dobór warunków chromatograficznych oraz optymalizacja parametrów detektora LC-MS/MS.

Zadanie badawcze nr 6: Optymalizacja procedury przygotowania próbek osocza kur niosek do analizy UPLC-MS/MS.

Zadanie badawcze nr 7: Przeprowadzenie rewalidacji zmodyfikowanej metody zgodnie z wymaganiami Europejskiej Agencji Leków (EMA) i Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) w zakresie: liniowości, precyzji, dokładności, selektywności, dolnej granicy oznaczalności (LLOQ), efektu matrycowego oraz stabilności analitów w próbkach biologicznych.

Zadanie badawcze nr 8: Ocena przydatności zoptymalizowanej i zrewalidowanej metody do jednoczesnego oznaczania wybranych pochodnych izoksazolin w badaniach farmakokinetycznych.

2. Materiały i metody

2.1. Zwierzęta i warunki utrzymania

Badania przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (Uchwała nr 26/P1/2023). W doświadczeniu wykorzystano 80 klinicznie zdrowych kur niosek linii ISA Brown, pochodzących z fermy komercyjnej w Dywitach, Polska. Po przetransportowaniu do zwierzętarni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie ptaki poddano 7-dniowej aklimatyzacji. W okresie aklimatyzacji nie otrzymywały one żadnych leków ani innych substancji farmakologicznie czynnych. Ptaki utrzymywano w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze 21-23°C, wilgotności względnej 50-65% oraz cyklu świetlnym, obejmującym 16 godzin światła i 8 godzin ciemności. Ptaki miały stały dostęp do komercyjnej pełnoporcjowej mieszanki paszowej dla kur niosek (Zielona Zagroda Nioska, De Heus, Polska) i wody. W okresie aklimatyzacji oraz w trakcie doświadczenia ptaki poddawano codziennej obserwacji klinicznej. W jej trakcie nie stwierdzono żadnych objawów chorobowych. W dniu rozpoczęcia badań kury osiągnęły wiek 20 tygodni, a ich średnia masa ciała wynosiła 2,00±0,32 kg. Po zakończeniu części doświadczalnej ptaki poddano eutanazji poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodowego w dawce 200 mg/kg masy ciała (Euthasol vet. 400 mg/ml, Le Vet B.V., The Netherlands).

2.2. Badane substancje i ich przygotowanie

W doświadczeniu wykorzystano czyste standardy chemiczne pochodnych izoksazolin tj. fluralaner (CAS 864731-61-3), sarolaner (CAS 1398609-39-6), lotilaner (CAS 1369852-71-0) oraz afoksolaner (CAS 1093861-60-9) (HPC Standards, Cunnersdorf, Niemcy), a także elakrydar (Cayman Chemicals, USA) i chlorowodorek oksytetracykliny (Sigma-Aldrich, USA). Roztwory przeznaczone do podania IV lub PO przygotowano bezpośrednio z wymienionych czystych standardów chemicznych/odczynników chemicznych, a nie z gotowych produktów leczniczych. W przypadku podania IV pochodne izoksazolin rozpuszczano w 75 µL dimetylosulfotlenku (DMSO), następnie łączono z 20 mg Tween 80, a całość rozcieńczano 1,4 mL 5% roztworu etanolu w 0,9% roztworze chlorku sodu (NaCl), uzyskując końcowe stężenie około 0,68 mg/mL. W przypadku podania PO wszystkie badane związki rozpuszczano w 100 µL DMSO, a następnie rozcieńczano w 1 mL wody dejonizowanej. Roztwory pochodnych izoksazolin przeznaczone do podania PO przygotowano tak, aby ich końcowe stężenie było takie samo jak w roztworach przeznaczonych do podania

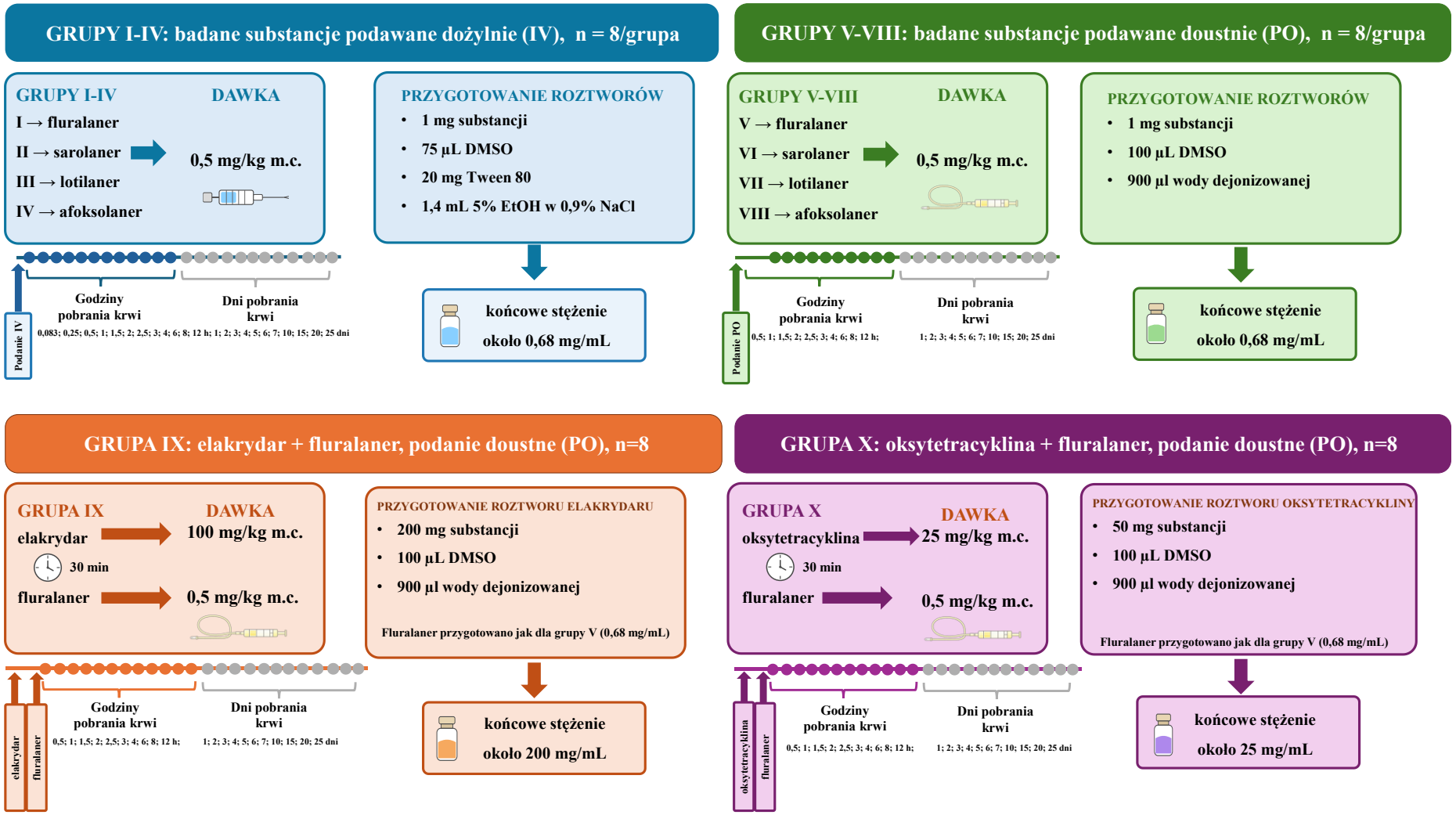
IV, tj. około 0,68 mg/mL. Końcowe stężenia elakrydaru i oksytetracykliny w roztworach przeznaczonych do podania PO wynosiły odpowiednio 200 mg/mL i 25 mg/mL.

2.3. Projekt doświadczenia

Kury losowo przydzielono do dziesięciu grup doświadczalnych, po osiem ptaków w każdej grupie. W czterech grupach substancje podawano drogą IV, natomiast w sześciu grupach drogą PO. W grupach I–VIII ptakom podawano pojedynczą dawkę jednej z badanych pochodnych izoksazolin: fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru albo afoksolaneru, w dawce 0,5 mg/kg m.c. W grupach I–IV substancje te podawano drogą IV, natomiast w grupach V–VIII podawano je drogą PO. W grupie IX ptakom podawano drogą PO elakrydar w dawce 100 mg/kg m.c., a po 30 minutach fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c. W grupie X ptakom podawano drogą PO oksytetracyklinę w dawce 25 mg/kg m.c., a po 30 minutach fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c. (Ryc. 3).

Przed podaniem badanych substancji ptakom wstrzymywano dostęp do paszy na 6 godz. oraz do wody na 1 godz. Wodę ponownie udostępniano po upływie 1 godz. od podania badanych substancji, natomiast paszę po 3 godz. od ich podania. W grupach otrzymujących badane substancje drogą IV (grupy I–IV) roztwory podawano do lewej żyły skrzydłowej przy użyciu kaniuli 26 G (0,3 × 20 mm), natomiast w grupach otrzymujących je drogą PO (grupy V–X) substancje podawano do wola za pomocą plastikowej sondy. Ptaki z grup otrzymujących substancje PO obserwowano przez 0,5 godz. po podaniu badanych substancji w celu stwierdzenia, czy nie doszło do regurgitacji mogącej prowadzić do utraty części podanej dawki.

Próbki krwi o objętości 0,5 mL pobierano z prawej żyły skrzydłowej przy użyciu kaniuli 26 G do probówek zawierających heparynę. Pobrania wykonywano przed podaniem badanych substancji (0 godz.), następnie po 0,083 i 0,25 godz. wyłącznie w grupach, w których badane substancje podawano IV, oraz po 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72; 96 i 120 godz., a także w dziesiątym, piętnastym, dwudziestym i dwudziestym piątym dniu po podaniu badanych substancji we wszystkich grupach, niezależnie od drogi podania. Osocze oddzielano przez wirowanie (4500 obr./min, 10 min, 4°C), a następnie przechowywano w temperaturze −70°C do czasu analizy.



Ryc. 3. Schemat doświadczeń: układ grup, dawkowanie badanych substancji oraz harmonogram pobierania próbek.

2.4. Procedura przygotowania próbek

Przygotowanie roztworów podstawowych

Roztwory podstawowe fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru przygotowano poprzez odważenie 1,0 mg odpowiedniego standardu analitycznego do kolby miarowej o pojemności 5 mL, rozpuszczenie w metanolu, a następnie uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL. Uzyskano roztwory o stężeniu 200 µg/mL. Roztwór podstawowy wzorca wewnętrznego tj. lotilaneru-D4 (IS, ang. internal standard) przygotowano analogicznie, również uzyskując stężenie 200 µg/mL.

Przygotowanie roztworów roboczych

Roztwory robocze poszczególnych badanych pochodnych izoksazolin sporządzono oddzielnie z odpowiednich roztworów podstawowych, stosując metanol jako rozpuszczalnik. Wszystkie roztwory robocze przygotowywano w kolbach miarowych o pojemności 5 mL i przechowywano w temperaturze 4°C. Roztwory robocze badanych pochodnych izoksazolin przygotowano według następującego schematu rozcieńczeń:

- roztwór roboczy o stężeniu 25 µg/mL - przez przeniesienie 625 µL roztworu podstawowego do kolby miarowej o pojemności 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 15 µg/mL - przez przeniesienie 375 µL roztworu podstawowego do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 10 µg/mL - przez przeniesienie 250 µL roztworu podstawowego do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 5 µg/mL - przez przeniesienie 125 µL roztworu podstawowego do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 2,5 µg/mL - przez przeniesienie 2500 µL roztworu roboczego 5 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 1 µg/mL - przez przeniesienie 1000 µL roztworu roboczego 5 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 0,5 µg/mL - przez przeniesienie 2500 µL roztworu roboczego 1 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 0,25 µg/mL - przez przeniesienie 1250 µL roztworu roboczego 1 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,

- roztwór roboczy 0,1 µg/mL - przez przeniesienie 500 µL roztworu roboczego 1 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL,
- roztwór roboczy 0,01 µg/mL - przez przeniesienie 50 µL roztworu roboczego 1 µg/mL do kolby 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL.

Roztwór roboczy IS o stężeniu 0,5 µg/mL przygotowano oddzielnie przez przeniesienie 12,5 µL roztworu podstawowego IS o stężeniu 200 µg/mL do kolby miarowej o pojemności 5 mL i uzupełnienie metanolem do objętości 5 mL.

2.4.1. Przygotowanie próbek osocza

Próbki osocza rozmrażano w temperaturze pokojowej, a następnie mieszano przy użyciu mieszadła typu vortex (1000 obr./min, 5 s) i przenoszono w objętości 100 µL do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 mL. Do próbek przeznaczonych do sporządzenia krzywych kalibracyjnych dodawano 10 µL odpowiedniego roztworu roboczego badanej izoksazoliny oraz 10 µL roztworu roboczego IS. Do próbek badanych dodawano 10 µL roztworu roboczego IS oraz 10 µL metanolu, stosowanego jako rozpuszczalnik do przygotowania roztworów standardowych, aby zachować identyczny stosunek objętościowy. Po krótkim wymieszaniu (1000 obr./min, 5 s) do próbek dodawano 450 µL mieszaniny acetonitrylu i roztworu amoniaku (96:4, v/v) w celu strącenia białek. Następnie próbki wytrząsano (3000 obr./min, 30 s) i wirowano (20 000 × g, 10 min, 4 °C). Po wirowaniu 150 µL supernatantu przesączano przez nylonowy filtr nastrzykawkowy (0,22 µm, Ø 13 mm; Waters, Milford, MA, USA) do naczynek chromatograficznych typu Total Recovery, a następnie poddawano analizie z wykorzystaniem UPLC-MS/MS.

2.5. Metody analityczne oznaczania izoksazolin

Oznaczenia stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek wykonano w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Analizy przeprowadzono metodą UPLC-MS/MS, zgodnie z zoptymalizowaną i zrewalidowaną autorską metodą analityczną (Markowska i wsp. 2021; Markowska-Buńka i wsp. 2025).

2.5.1. Odczynniki i wzorce chemiczne

Do przeprowadzenia analiz chromatograficznych wykorzystano czyste standardy chemiczne pochodnych izoksazolin: fluralaner (CAS 864731-61-3), sarolaner (CAS 1398609-

39-6), lotilaner (CAS 1369852-71-0) oraz afoksolaner (CAS 1093861-60-9), a także deuterowany lotilaner (lotilaner-D4) jako IS (wszystkie substancje o czystości ≥98%, HPC Standards, Cunnersdorf, Niemcy). Do przygotowania próbek oraz analiz chromatograficznych stosowano rozpuszczalniki i odczynniki klasy LC/MS grade, przeznaczone do chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (ang. liquid chromatography/mass spectrometry), lub cz.d.a. — czyste do analizy, w tym acetonitryl, metanol, wodę oraz roztwór amoniaku (Merck, Darmstadt, Niemcy). W analizie spektrometrii mas (LC-MS/MS) wykorzystywano azot o czystości ≥99,5% (NitroGen N110R; Peak Scientific, USA) oraz sprężony argon o czystości 99,995% (Eurogaz-Bombi, Polska) jako gazy robocze aparatu.

2.5.2. Układ chromatograficzny i warunki jego pracy

System analityczny stanowił chromatograf cieczowy ACQUITY UPLC I-Class sprzężony z tandemowym spektrometrem mas XEVO TQ-XS (Waters, Milford, USA). Układ chromatografii cieczowej (UPLC) wyposażony był w moduł pompy binarnej (Binary Solvent Manager), automatyczny podajnik próbek z termostatem (autosampler), termostat kolumny oraz system przemywania igły i tłoków. Detekcję prowadzono z wykorzystaniem potrójnego kwadrupolowego spektrometru mas pracującego w trybie chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym w dodatnim trybie jonów (APCI+, ang. atmospheric pressure chemical ionization, positive ion mode). Jako gaz osłonowy i pomocniczy stosowano azot generowany przez wytwornicę gazu, natomiast jako gaz kolizyjny stosowano argon.

Analizę próbek osocza prowadzono w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych/wybranych przejść jonowych (MRM, ang. multiple reaction monitoring), a wartości jonów prekursorowych i produktowych podano jako stosunek masy do ładunku (m/z, ang. mass-to-charge ratio): dla fluralaneru m/z 556,06 → 400,01 (jon główny) oraz m/z 556,06 → 457,01 (jon potwierdzający); dla sarolaneru m/z 581,03 → 444,02 oraz m/z 581,03 → 432,01; dla lotilaneru m/z 595,98 → 439,93 oraz m/z 595,98 → 166,01; dla afoksolaneru m/z 626,09 → 470,03 oraz m/z 626,09 → 196,01. Jako IS zastosowano deuterowany lotilaner (lotilaner-D4; m/z 603,98 → 445,93) (Tabela 2).

Analizę chromatograficzną prowadzono z zastosowaniem elucji gradientowej dwóch faz ruchomych przy natężeniu przepływu 0,4 mL/min. Fazę A stanowiła woda, natomiast fazę B mieszanina acetonitrylu i metanolu w stosunku objętościowym 1:1 (v/v). Separację chromatograficzną prowadzono w temperaturze 40 °C na kolumnie Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl (Waters, Milford, USA) o wymiarach 100 × 2,1 mm i wielkości cząstek 1,7 µm.

Całkowity czas pojedynczej analizy wynosił 6,0 min. Objętość nastrzyku wynosiła 1 µL, a temperatura autosamplera była utrzymywana na poziomie 4 °C (Tabela 3).

Tabela 2. Parametry pracy tandemowego spektrometru mas zastosowane do oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru, afoksolaneru oraz lotilaneru-D4 jako IS.

Parametry MS/MS		Analizowane związki			
		Fluralaner	Sarolaner	Lotilaner	Afoksolaner
Masa jonu macierzystego (m/z)		556,06	581,03	595,98	626,09
Masa jonów potomnych (m/z)	Jony główne	400,01	444,02	439,93	470,03
	Jony potwierdzające	457,01	432,01	166,01	196,01
Energia kolizji (eV)	Jony główne	18	25	30	26
	Jony potwierdzające	12	20	35	48
Czas retencji (min)		2,09	2,23	2,36	2,51
Prąd wyładowania koronowego (µA)		5,0			
Napięcie stożka (V)		10			
Gaz desolwatacyjny		Azot			
Przepływ gazu desolwatacyjnego (L/h)		1200			
Przepływ gazu kolizyjnego (mL/min)		0,20			
Gaz kolizyjny		Argon			
Temperatura źródła (°C)		500			
Tryb jonizacji		APCI +			

Tabela 3. Parametry pracy chromatografu cieczowego zastosowane do oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru oraz lotilaneru-D4 jako IS.

Czas (min)	Przepływ (mL/min)	Faza ruchoma		Krzywa gradientu
		A	B	
0,00	0,4	47,0	53,0	początkowa
2,80		20,0	80,0	6
3,00		20,0	80,0	6
3,20		0,0	100,0	6
4,00		47,0	53,0	11
		woda	acetonitryl:metanol 1:1	-
Kolumna	Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl (Waters, Milford, USA) o wymiarach 100 × 2,1 mm i wielkości cząstek 1,7 µm, nr seryjny 01203425318543			

2.5.3. Aparatura i wyposażenie laboratoryjne

Do przygotowania próbek oraz przeprowadzenia analiz wykorzystano aparaturę i wyposażenie laboratoryjne wyszczególnione poniżej:

- ultrawysokosprawny chromatograf cieczowy Acquity UPLC sprzężony z tandemowym spektrometrem mas XEVO TQ-XS (Waters, Milford, USA),
- kolumna chromatograficzna Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl column (100 × 2.1 mm, 1,7 µm), (Waters, Milford, USA),
- mieszadło typu vortex (Velp Scientifica, Włochy),
- wirówka laboratoryjna Allegra 64R (Beckmann Coulter, USA),
- waga analityczna XA 52,3Y (Radwag, Polska),
- łaźnia ultradźwiękowa (Polsonic, Polska),
- wytwornica azotu NitroGen N110R (Peak Scientific Billerica, Stany Zjednoczone),
- probówki typu eppendorf safe seal 1,5 ml (Eppendorf SE, Hamburg, Niemcy),
- korki polipropylenowe średnicy 12 mm (F.L. Medical S.r.l., Torreglia, Włochy)
- probówki typu eppendorf 1,5 ml (Eppendorf SE, Hamburg, Niemcy),
- strzykawki jednorazowe 2,0 ml (Polfa Lublin, Polska),
- filtry nastrzykawkowe politetrafluoroetylenowe (PTFE) 0,22 µm (Fioroni, Ahlstrom Specialties, Francja),
- kolby miarowe borokrzemianowe 5,0 ml (Duran, Niemcy),

- pipety automatyczne 10-100 µl, 20-200 µl i 100-1000 µl (Eppendorf SE, Hamburg, Niemcy),
- naczynka chromatograficzne borokrzemianowe typu total recovery vials (Waters, Milford, USA),
- zamrażarka niskotemperaturowa -80°C (Infrico Medcare, Lucena, Hiszpania),
- chłodziarka 2-8°C (Liebherr, Ochsenhausen, Niemcy),
- zamrażarka -20°C (Liebherr, Ochsenhausen, Niemcy).

2.6. Optymalizacja i rewalidacja metody analitycznej

Metoda oznaczania pochodnych izoksazolin w osoczu została uprzednio opracowana i poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi EMA i FDA, co szczegółowo opisano w publikacji Markowska-Buńka i in. (2025). W pierwotnej wersji umożliwiała ona oznaczanie poszczególnych związków oddzielnie z wykorzystaniem jonizacji przez elektrorozpylanie w trybie dodatnim (ESI+), przy zastosowaniu analizy jednoskładnikowej oraz indywidualnych ustawień aparaturowych. Na potrzeby niniejszej rozprawy metodę tę zmodyfikowano tak, aby umożliwić jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w pojedynczej próbce (podejście wieloskładnikowe), z zastosowaniem deuterowanego lotilaneru-D4 jako IS, co pozwoliło na ujednolicenie warunków analitycznych oraz ograniczenie ryzyka interferencji związanego z wykorzystaniem analitów jako standardów wewnętrznych. Modyfikacja obejmowała również zmianę źródła jonizacji z ESI+ na APCI+, co miało na celu poprawę selektywności i czułości metody.

Ze względu na zakres wprowadzonych zmian metodę poddano rewalidacji zgodnie z przyjętym protokołem walidacyjnym (Markowska i in., 2021). Rewalidację przeprowadzono w zakresie liniowości, precyzji i dokładności, selektywności, odzysku, efektu matrycy, testu przenoszenia, wyznaczenia limitu detekcji (LOD) oraz LLOQ. Oceny stabilności nie powtarzano, ponieważ warunki przygotowania próbek, skład rozpuszczalników oraz sposób przechowywania materiału biologicznego pozostawały niezmienione względem uprzednio zwalidowanej metody (Markowska-Buńka i in., 2025).

Do walidacji wykorzystano osocze pochodzące od kur niosek, które nie otrzymywały badanych substancji. Ustalono następujące poziomy/próbki kontroli jakości (Quality Control, QC):

- LLOQ - 1 ng/mL,
- LQC (próbki kontroli jakości o niskim stężeniu) - 25 ng/mL,

- MQC (próbki kontroli jakości o średnim stężeniu) - 500 ng/mL,
- IQC (próbki kontroli jakości o średnio wysokim stężeniu) - 1500 ng/mL,
- HQC (próbki kontroli jakości o wysokim stężeniu) - 2500 ng/mL.

W analizie poszczególnych parametrów uwzględniono odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (CV), obliczany według równania:

CV = (SD / średnia arytmetyczna) × 100%

oraz błąd systematyczny/obciążeniowy, oznaczający odchylenie średniej wartości oznaczeń od wartości nominalnej (Bias), wyznaczany zgodnie z równaniem:

Bias = (średnie stężenie – stężenie nominalne) / stężenie nominalne × 100%

2.6.1. Liniowość

Liniowość metody oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru w osoczu kur niosek oceniano na podstawie czterech niezależnych krzywych kalibracyjnych, sporządzanych oddzielnie dla przeprowadzenia analiz próbek zarówno po podaniu IV oraz PO. Krzywe kalibracyjne przygotowywano przez cztery kolejne dni z wykorzystaniem tej samej matrycy co w analizowanych próbkach biologicznych. Każda krzywa obejmowała dziesięć punktów stężeniowych w zakresie 1-2500 ng/mL (1; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 1500; 2500 ng/mL), w LLOQ. Liniowość metody oceniano na podstawie następujących kryteriów:

- odchylenia względnego pomiędzy stężeniami nominalnymi a stężeniami wyliczonymi wstecznie (ang. back-calculated concentrations); za akceptowalne uznawano wartości nieprzekraczające ±15% dla wszystkich punktów kalibracyjnych oraz ±20% dla LLOQ,
- parametrów równania regresji liniowej ($y = ax + b$), w tym współczynnika nachylenia (a) oraz wyrazu wolnego (b),
- współczynnika determinacji (r^2), przy czym wartości $\geq 0,99$ uznawano za spełniające kryterium liniowości,
- liczby punktów kalibracyjnych spełniających kryteria akceptacji; wymagano, aby co najmniej 75% punktów krzywej kalibracyjnej (nie mniej niż osiem) mieściło się w granicach akceptacji.

2.6.2. Dokładność i precyzja

Dokładność i precyzję metody oceniano na podstawie analizy próbek QC przygotowywanych na czterech poziomach stężeń. W każdym dniu przez trzy kolejne dni

przygotowywano po sześć powtórzeń dla każdego stężenia, z dodatkiem IS, a następnie analizowano je zgodnie z ustaloną procedurą. Roztwory podstawowe i robocze przygotowywano każdorazowo bezpośrednio przed analizą.

Precyzję wyrażano jako wartość CV i oceniano dla precyzji wewnątrzdniowej oraz międzydniowej. Dokładność wyrażano jako wartość Bias, obliczane względem stężenia nominalnego. Za spełniające kryteria akceptacji uznawano wartości CV i Bias mieszczące się w granicach ±15%. Wymagano, aby kryteria te spełniało co najmniej 75% poziomów próbek QC.

2.6.3. LOD

LOD dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru określano jako najniższe stężenie analitu możliwe do wykrycia przy jednoznacznym odróżnieniu sygnału analitycznego od szumu tła. Jako kryterium przyjęto minimalny stosunek sygnału do szumu (S/N) wynoszący co najmniej 3:1. Wartości LOD wyznaczano na podstawie analizy stosunku wysokości piku analitu do poziomu szumu tła z wykorzystaniem oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters).

2.6.4. LLOQ

LLOQ dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru definiowano jako najniższe stężenie analitu w osoczu, które może zostać oznaczone z zachowaniem akceptowalnej precyzji i dokładności. Za dodatkowe kryterium kwalifikujące przyjęto minimalny S/N wynoszący co najmniej 10:1. Poziom LLOQ stanowił najniższy punkt krzywej kalibracyjnej. Ocenę przeprowadzano na podstawie sześciokrotnego oznaczenia próbek na tym poziomie w ciągu trzech kolejnych dni analitycznych. Wyniki uznawano za spełniające kryteria akceptacji, jeżeli wartości Bias mieściła się w zakresie ±20%, a CV nie przekraczał 20%, zgodnie z przyjętymi kryteriami walidacyjnymi.

2.6.5. Efekt przenoszenia

Efekt przenoszenia oceniano w celu określenia obecności pozostałości analitów w kolejnych nastrzykach po analizie próbek o wysokim stężeniu. Ocenę przeprowadzano w sześciu powtórzeniach poprzez wykonanie nastrzyku próbki ślepej bezpośrednio po analizie próbki HQC. Kryterium akceptacji stanowił sygnał analitu w próbce ślepej nie przekraczający 20% odpowiedzi uzyskanej dla poziomu LLOQ.

2.6.6. Odzysk

Odzysk ekstrakcyjny oceniano w sześciu powtórzeniach dla każdego poziomu próbek QC. W tym celu porównywano stosunki pól powierzchni pików analitów do wzorca wewnętrznego uzyskane dla próbek wzbogacanych przed ekstrakcją ze stosunkami pól powierzchni pików uzyskanymi dla próbek wzbogacanych po ekstrakcji. Za wartość odpowiadającą 100% odzysku przyjmowano odpowiedzi uzyskane dla próbek wzbogaconych po ekstrakcji. Odzysk wyrażano jako procentowy stosunek odpowiedzi uzyskanych dla próbek wzbogaconych przed ekstrakcją do odpowiedzi uzyskanych dla próbek wzbogaconych po ekstrakcji.

2.6.7. Selektywność

Selektywność metody oceniano poprzez analizę sześciu próbek osocza kur niosek niezawierających badanych analitów oraz porównanie uzyskanych chromatogramów z chromatogramami próbek wzbogaconych odpowiednimi standardami analitycznymi. Metodę uznawano za selektywną, jeżeli w czasach retencji fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru, afoksolaneru oraz wzorca wewnętrznego nie obserwowano sygnałów interferujących. Dopuszczano obecność sygnałów resztkowych, pod warunkiem, że ich pola powierzchni nie przekraczały 20% pola powierzchni piku odpowiadającego poziomowi LLOQ dla analitów oraz 5% pola powierzchni piku IS.

2.6.8. Efekt matrycy

Efekt matrycy oceniano poprzez porównanie stosunków pól powierzchni pików analitów do wzorca wewnętrznego uzyskanych dla próbek przygotowanych w dwóch wariantach: w osoczu kur niosek oraz w matrycy odniesienia. W obu przypadkach stosowano równoważne ilości analitów oraz IS. W wariancie z matrycą biologiczną anality oraz IS dodawano po etapie ekstrakcji do uprzednio przygotowanych próbek osocza, natomiast w przypadku matrycy odniesienia do roztworu przygotowanego w układzie rozpuszczalników odpowiadającym końcowemu składowi próbki. Oznaczenia wykonywano w sześciu powtórzeniach dla każdego poziomu próbek QC. Efekt matrycy wyrażano jako stosunek odpowiedzi uzyskanej w obecności matrycy biologicznej do odpowiedzi uzyskanej dla próbek odniesienia. Jako kryterium akceptacji przyjęto CV nieprzekraczający 15%.

2.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzano z wykorzystaniem oprogramowania SigmaPlot for Windows, wersja 12.0 (Systat Software Inc., USA). Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD dla poszczególnych grup, obliczone na podstawie wartości uzyskanych dla indywidualnych ptaków w danej grupie. Wyniki te odnoszą się do stężeń badanych substancji w poszczególnych punktach czasowych oraz do wyznaczonych parametrów farmakokinetycznych. Tak obliczone wartości średnie porównywano następnie między określonymi grupami. Przed zastosowaniem testów parametrycznych normalność rozkładu danych weryfikowano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. Porównania między analizowanymi grupami przeprowadzono z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA). W przypadku uzyskania istotnego wyniku analizy wariancji wykonywano test post hoc Tukeya, umożliwiający porównania wielokrotne między grupami. Za statystycznie istotne uznawano różnice przy poziomie istotności $p<0,05$.

2.8. Analiza farmakokinetyczna

Uzyskane wartości stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru w osoczu kur, oznaczone w poszczególnych punktach czasowych, poddano analizie farmakokinetycznej z wykorzystaniem oprogramowania ThothPro™ (Gdańsk, Polska). Analizę przeprowadzono z zastosowaniem podejścia niekompartmentowego (NCA, ang. non-compartmental analysis). Na podstawie uzyskanych profili stężenie–czas wyznaczano następujące parametry farmakokinetyczne: pole powierzchni pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do ostatniego oznaczanego punktu czasowego ($AUC_{0\rightarrow t}$) oraz do nieskończoności ($AUC_{0\rightarrow\infty}$), stałą szybkości eliminacji (k_{el}) oraz okres półtrwania w fazie eliminacji ($t_{½kel}$). W dalszych analizach oraz przy obliczaniu dostępności biologicznej wykorzystywano wartości $AUC_{0\rightarrow t}$.

Ponadto wyznaczano pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do czasu t ($AUMC_{0\rightarrow t}$) oraz do nieskończoności ($AUMC_{0\rightarrow\infty}$), średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie ($MRT_{0\rightarrow t}$ oraz $MRT_{0\rightarrow\infty}$), a także C_{max} oraz czas jego osiągnięcia (t_{max}), ostatnie oznaczalne stężenie (C_{last}) oraz czas jego wystąpienia (t_{last}). W grupach otrzymujących badane substancje drogą IV wyznaczano wartość Cl oraz V_{ss}. W grupach, w których badane substancje podawano PO, określano natomiast średni czas wchłaniania (MAT), obliczany jako różnica między średnimi wartościami MRT uzyskanymi po podaniu PO i IV. Ze względu na brak sparowanych danych indywidualnych parametr ten wyznaczano na poziomie wartości

średnich i nie obliczano dla niego ± SD. Wartość F obliczano na podstawie stosunku wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ uzyskanych po podaniu PO i IV, z uwzględnieniem zastosowanych dawek.

3. Wyniki

3.1. Optymalizacja i rewalidacja metody analitycznej

Optymalizacja metody umożliwiła opracowanie wieloskładnikowej procedury jednoczesnego oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu ptaków. Rewalidację przeprowadzono w szerokim zakresie stężeń obejmującym wartości obserwowane w grupach, w których substancje podawano IV lub PO. Oceniono liniowość, dokładność i precyzję, LOD, LLOQ, efekt przenoszenia, odzysk, selektywność oraz efekt matrycy. Wszystkie analizowane parametry spełniły przyjęte kryteria akceptacji.

3.1.1. Liniowość

Wszystkie krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL spełniły przyjęte kryteria akceptacji. Wartości R^2 we wszystkich przypadkach przekraczały wartość 0,99. Wartości CV dla wstecznie wyliczonych stężeń wynosiły 1,89-13,79% dla fluralaneru, 0,52-13,58% dla sarolaneru, 0,75-13,82% dla lotilaneru oraz 1,48-11,23% dla afoksolaneru. Wartości Bias mieściły się w zakresie od −7,10 do 11,25% dla fluralaneru, od −0,34 do 13,75% dla sarolaneru, od −9,75 do 12,50% dla lotilaneru oraz od −1,28 do 15,0% dla afoksolaneru (Tabele 4–7). Reprezentatywne krzywe kalibracyjne dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru przedstawiono na rycinach 4–7, natomiast reprezentatywne chromatogramy UPLC-MS/MS badanych pochodnych izoksazolin przedstawiono na rycinie 8.

Tabela 4. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania fluralaneru w osoczu ptaków.

Stężenie nominalne (ng/mL)	Wstecznie wyliczone stężenia fluralaneru (ng/mL)				Średnia	SD	CV (%)	Bias (%)
	Krzywa kalibracyjna I	Krzywa kalibracyjna II	Krzywa kalibracyjna III	Krzywa kalibracyjna IV				
1,0	1,15	1,10	1,15	1,05	**1,11**	**0,048**	**4,30**	**11,25**
10,0	10,60	9,50	8,45	10,10	**9,66**	**0,925**	**9,57**	**-3,38**
25,0	22,60	24,15	23,20	22,95	**23,23**	**0,664**	**2,86**	**-7,10**
50,0	44,95	54,60	45,80	51,30	**49,16**	**4,589**	**9,34**	**-1,68**
100,0	112,75	98,65	104,90	103,90	**105,05**	**5,819**	**5,54**	**5,05**
250,0	228,90	249,3	310,0	244,70	**258,23**	**35,605**	**13,79**	**3,29**
500,0	497,05	489,60	440,30	514,0	**485,24**	**31,650**	**6,52**	**-2,95**
1000,0	900,65	992,65	902,80	994,30	**947,60**	**52,983**	**5,59**	**-5,24**
1500,0	1549,90	1507,75	1593,95	1564,95	**1554,14**	**35,924**	**2,31**	**3,61**
2500,0	2567,35	2582,15	2505,40	2482,80	**2534,43**	**47,852**	**1,89**	**1,38**
Współczynnik kierunkowy	**1,022**	**1,023**	**1,007**	**1,004**				
Wyraz wolny	**-13,023**	**-7,796**	**-4,020**	**3,2649**				
r	**0,999**	**0,999**	**0,998**	**0,999**				
r^2	**0,998**	**0,999**	**0,996**	**0,999**				

Bias – błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **r**– współczynnik korelacji liniowej; **r^2**– współczynnik determinacji; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 5. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania sarolaneru w osoczu ptaków.

Stężenie nominalne (ng/mL)	Wstecznie wyliczone stężenia sarolaneru (ng/mL)				Średnia	SD	CV (%)	Bias (%)
	Krzywa kalibracyjna I	Krzywa kalibracyjna II	Krzywa kalibracyjna III	Krzywa kalibracyjna IV				
1,0	1,10	1,20	1,01	1,25	**1,14**	**0,111**	**9,75**	**13,75**
10,0	12,45	10,45	9,75	9,20	**10,46**	**1,420**	**13,58**	**4,63**
25,0	27,0	27,0	25,40	26,60	**26,50**	**0,757**	**2,86**	**6,0**
50,0	56,85	52,70	52,45	51,45	**53,36**	**2,387**	**4,47**	**6,73**
100,0	94,10	106,8	102,35	99,60	**100,71**	**5,314**	**5,28**	**0,71**
250,0	241,65	257,75	272,95	243,90	**254,06**	**14,465**	**5,69**	**1,63**
500,0	619,60	510,60	503,10	509,20	**535,63**	**56,078**	**10,47**	**7,13**
1000,0	930,40	1009,85	997,60	1060,45	**999,58**	**53,543**	**5,36**	**-0,04**
1500,0	1701,65	1507,65	1513,95	1531,70	**1563,74**	**92,504**	**5,92**	**4,25**
2500,0	2481,80	2505,30	2479,55	2499,75	**2491,60**	**12,850**	**0,52**	**-0,34**
Współczynnik kierunkowy	**1,017**	**1,002**	**0,994**	**1,008**				
Wyraz wolny	**12,885**	**4,329**	**5,796**	**4,730**				
r	**0,996**	**1,000**	**0,999**	**0,999**				
r^2	**0,992**	**1,000**	**0,999**	**0,999**				

Bias – błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **r**– współczynnik korelacji liniowej; **r^2**– współczynnik determinacji; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 6. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania lotilaneru w osoczu ptaków.

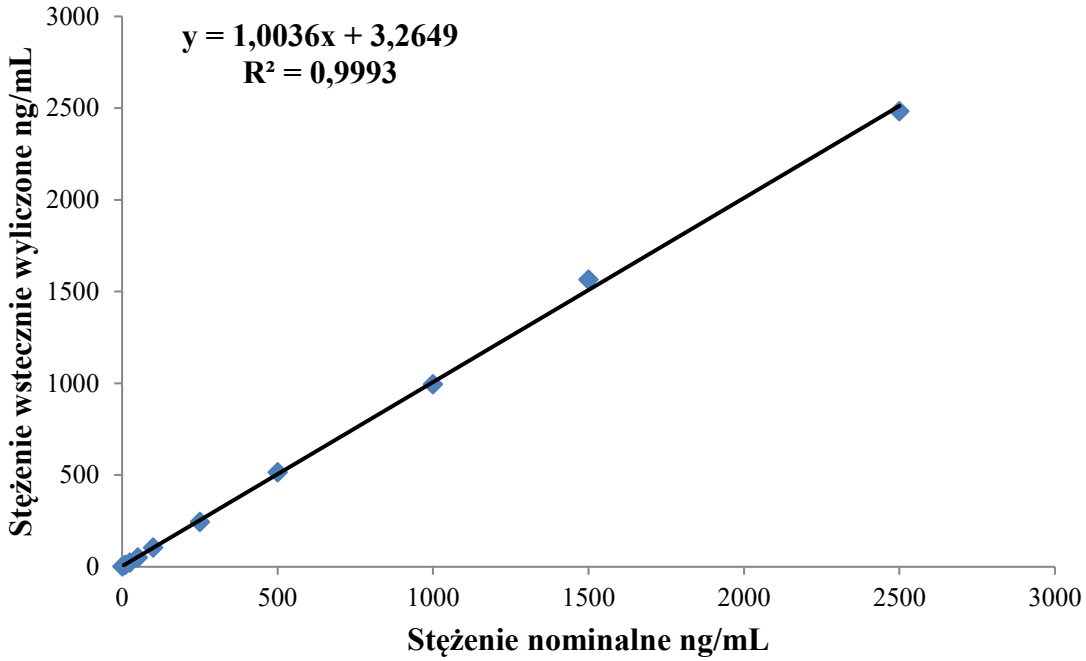
Stężenie nominalne (ng/mL)	Wstecznie wyliczone stężenie lotilaneru (ng/mL)				Średnia	SD	CV (%)	Bias (%)
	Krzywa kalibracyjna I	Krzywa kalibracyjna II	Krzywa kalibracyjna III	Krzywa kalibracyjna IV				
1,0	0,9	1,15	1,25	1,20	**1,13**	**0,155**	**13,82**	**12,50**
10,0	10,05	8,50	9,40	8,15	**9,03**	**0,863**	**9,56**	**-9,75**
25,0	26,10	23,70	24,35	19,95	**23,53**	**2,590**	**11,01**	**-5,90**
50,0	49,90	49,15	44,85	45,15	**47,26**	**2,633**	**5,57**	**-5,48**
100,0	97,00	119,45	103,55	97,35	**104,34**	**10,515**	**10,08**	**4,34**
250,0	243,05	246,75	228,50	249,65	**241,99**	**9,389**	**3,88**	**-3,21**
500,0	522,30	478,60	585,80	495,85	**520,64**	**47,012**	**9,03**	**4,13**
1000,0	1024,20	950,65	952,50	1009,45	**984,20**	**38,158**	**3,88**	**-1,58**
1500,0	1496,0	1494,60	1513,50	1515,80	**1504,98**	**11,226**	**0,75**	**0,33**
2500,0	2501,35	2563,50	2504,50	2576,35	**2536,43**	**39,058**	**1,54**	**1,46**
Współczynnik kierunkowy	**1,002**	**1,002**	**1,000**	**1,027**				
Wyraz wolny	**2,541**	**4,329**	**2,986**	**-7,911**				
r	**0,999**	**1,0**	**0,999**	**0,999**				
r^2	**0,999**	**1,0**	**0,998**	**0,999**				

Bias – błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **r**– współczynnik korelacji liniowej; **r^2**– współczynnik determinacji; **SD** – odchylenie standardowe;

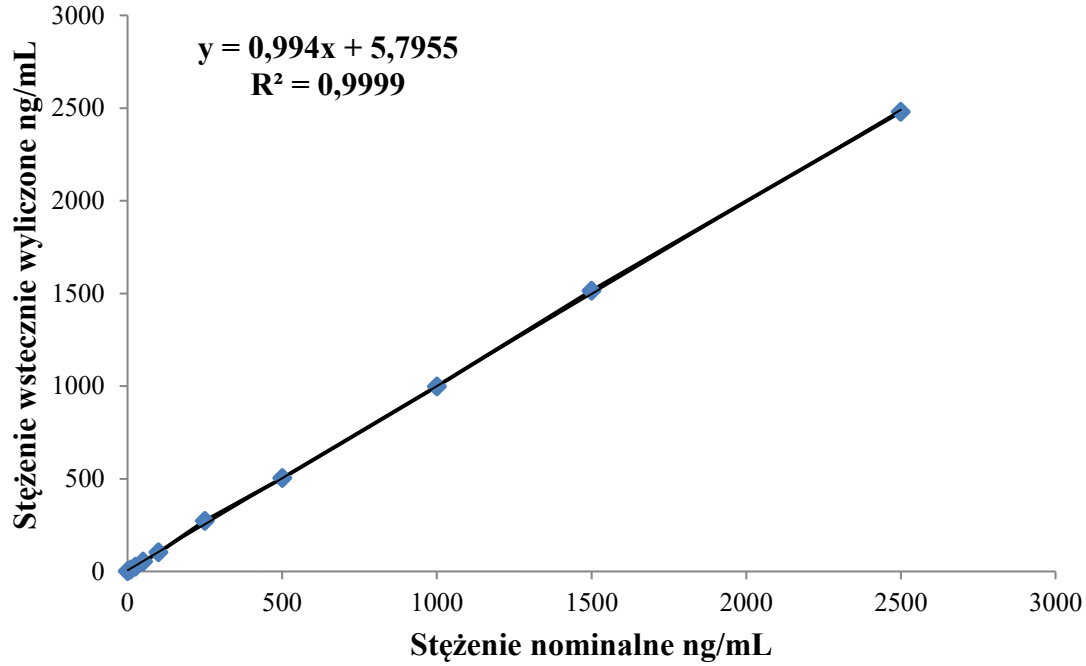
Tabela 7. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania afoksolaneru w osoczu ptaków.

Stężenie nominalne (ng/mL)	Wstecznie wyliczone stężenie afoksolaneru (ng/mL)				Średnia	SD	CV (%)	Bias (%)
	Krzywa kalibracyjna I	Krzywa kalibracyjna II	Krzywa kalibracyjna III	Krzywa kalibracyjna IV				
1,0	1,25	1,80	1,21	1,26	**1,15**	**0,129**	**11,23**	**15,00**
10,0	10,85	9,75	9,09	10,29	**9,99**	**0,754**	**7,55**	**-0,06**
25,0	26,60	25,05	27,55	23,22	**25,60**	**1,893**	**7,39**	**2,42**
50,0	55,15	53,20	51,14	48,72	**52,05**	**2,762**	**5,31**	**4,10**
100,0	97,85	100,80	98,67	97,58	**98,72**	**1,460**	**1,48**	**-1,28**
250,0	244,65	246,15	250,30	265,46	**251,64**	**9,518**	**3,78**	**0,66**
500,0	460,0	490,40	518,74	529,26	**499,60**	**31,085**	**6,22**	**-0,08**
1000,0	1011,65	976,15	1004,37	993,24	**996,35**	**15,450**	**1,55**	**-0,37**
1500,0	1753,65	1552,85	1567,25	1445,12	**1579,72**	**128,123**	**8,11**	**5,31**
2500,0	2594,50	2568,70	2579,41	2504,03	**2561,66**	**39,853**	**1,56**	**2,47**
Współczynnik kierunkowy	**1,066**	**1,027**	**1,0335**	**0,992**				
Wyraz wolny	**-7,271**	**-7,025**	**-2,729**	**2,952**				
r	**0,998**	**0,999**	**0,999**	**0,999**				
r^2	**0,995**	**0,999**	**0,999**	**0,999**				

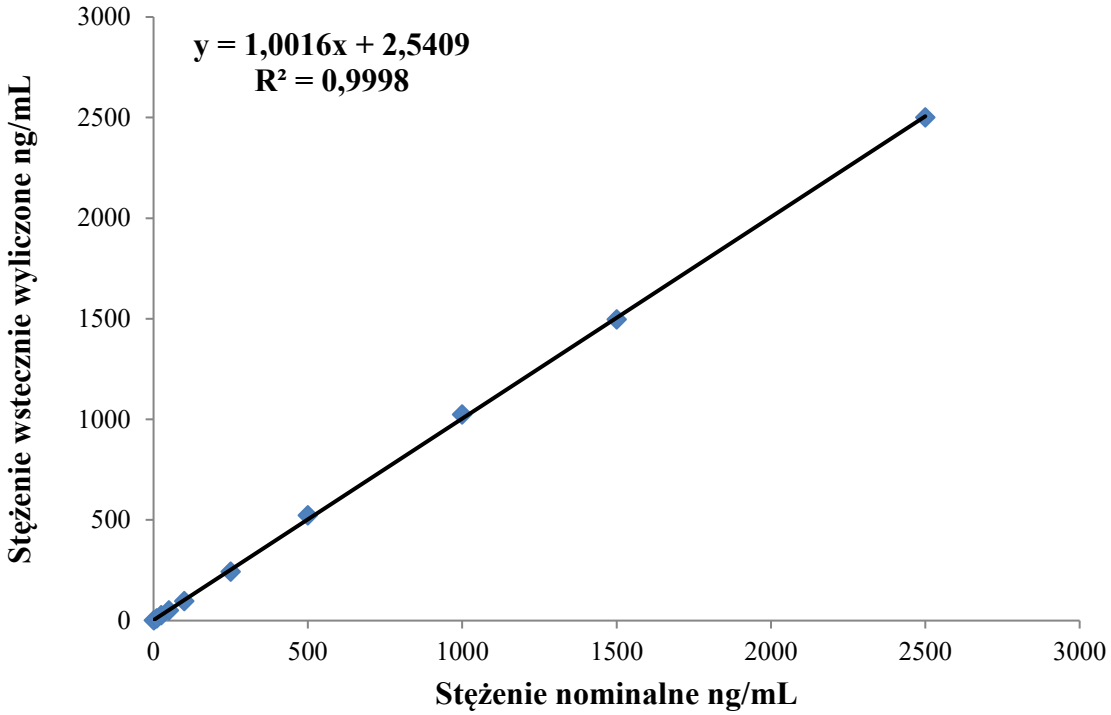
Bias – błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **r**– współczynnik korelacji liniowej; **r^2**– współczynnik determinacji; **SD** – odchylenie standardowe;



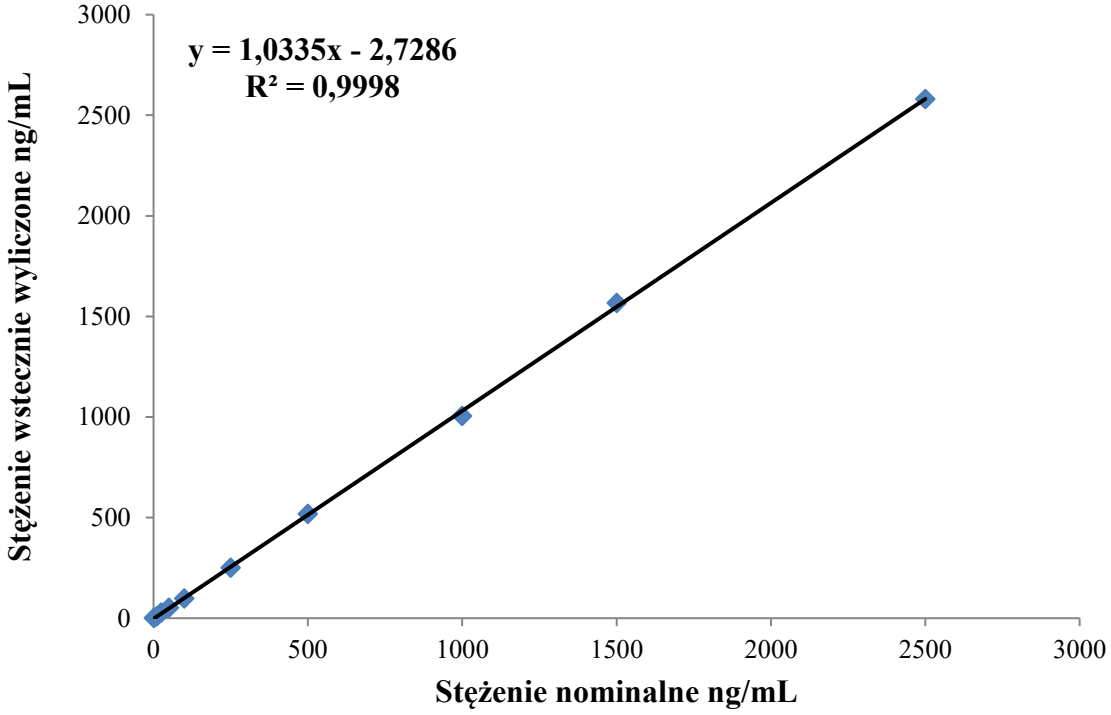
Ryc. 4. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna fluralaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL.



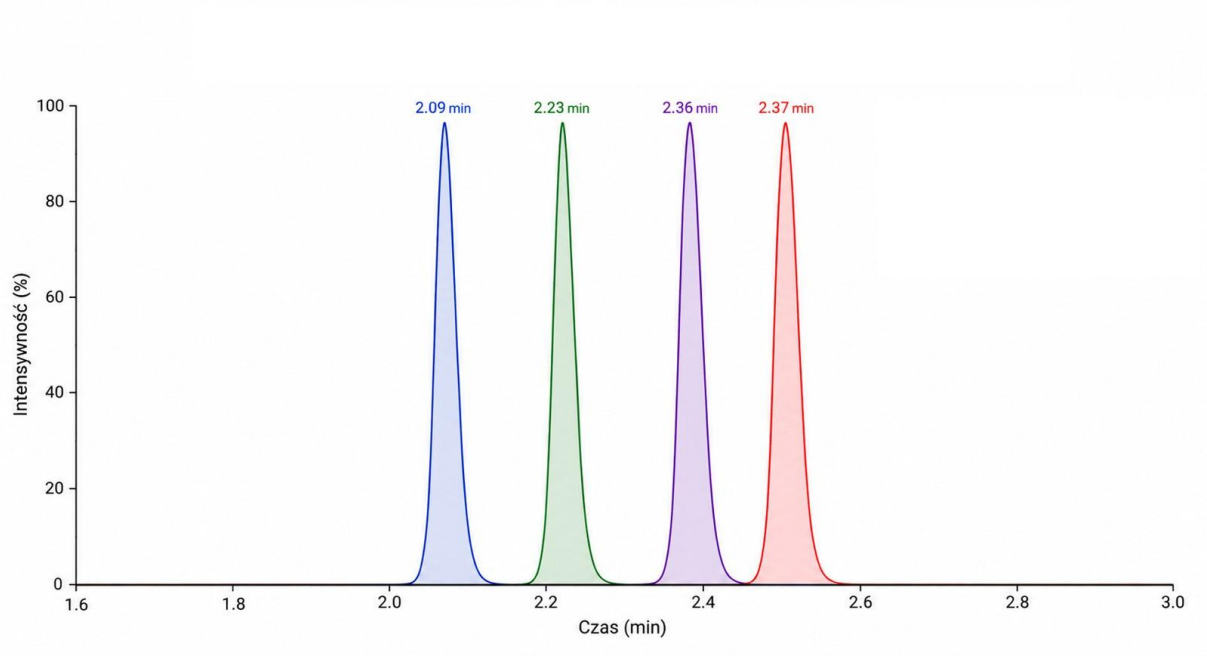
Ryc. 5. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna sarolaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL.



Ryc. 6. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna lotilaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL.



Ryc. 7. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna afoksolaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL.



Ryc. 8. Chromatogramy MRM (UPLC-MS/MS) pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek, fluralaner (RT tj. czas retencji 2,09 min), sarolaner (RT 2,23 min), lotilaner (RT 2,36 min), afoksolaner (RT 2,51 min) w jednym przebiegu analitycznym.

3.1.2. Dokładność i precyzja

Dokładność i precyzję metody oceniono na pięciu poziomach QC: LLOQ, LQC, MQC, IQC oraz HQC. Dla każdego poziomu wykonano po sześć powtórzeń, a uzyskane wyniki wykorzystano do oceny zmienności wewnątrzdniowej i międzydniowej. Dokładność wyrażano jako wartości Bias, natomiast precyzję jako wartości CV. Uzyskane wartości spełniały przyjęte kryteria akceptacji, tj. mieściły się w granicach ±15% dla poziomów LQC–HQC oraz ±20% dla LLOQ, co potwierdza odpowiednią dokładność i precyzję opracowanej metody (Tabele 8-27).

Tabela 8. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1,0	**1**	0,80	0,90	0,90
	2	1,20	1,0	0,90
	3	0,90	0,90	0,90
	4	1,0	1,10	0,90
	5	1,0	1,0	1,20
	6	1,20	1,10	1,10
Średnie stężenie		**1,02**	**1,00**	**0,98**
SD		**0,016**	**0,089**	**0,132**
CV (%)		**15,76**	**8,94**	**13,52**
Bias (%)		**1,67**	**0,00**	**-1,67**

Średnie stężenie całkowite	**1,00**
SD całkowite	**0,123**
CV całkowite (%)	**12,37**
Bias całkowite (%)	**0,00**

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 9. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1,0	**1**	1,0	0,90	1,0
	2	0,90	1,0	1,0
	3	1,0	0,80	0,80
	4	1,0	0,80	1,0
	5	1,20	1,0	1,20
	6	1,0	1,20	0,90
Średnie stężenie		**1,02**	**0,95**	**0,98**
SD		**0,098**	**0,152**	**0,133**
CV (%)		**9,67**	**15,96**	**13,52**
Bias (%)		**1,67**	**-5,00**	**-1,67**
Średnie stężenie całkowite			**0,98**	
SD całkowite			**0,125**	
CV całkowite (%)			**12,69**	
Bias całkowite (%)			**-1,67**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 10. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1,0	**1**	1,20	1,20	1,20
	2	1,10	1,10	0,80
	3	1,0	0,90	1,10
	4	1,0	1,0	1,10
	5	1,0	1,20	0,90
	6	0,80	0,80	1,0
Średnie stężenie		**1,02**	**1,03**	**1,02**
SD		**0,133**	**0,163**	**0,147**
CV (%)		**13,07**	**15,80**	**14,48**
Bias (%)		**1,67**	**3,33**	**1,67**
Średnie stężenie całkowite			**1,05**	
SD całkowite			**0,125**	
CV całkowite (%)			**11,83**	
Bias całkowite (%)			**5,33**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 11. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1,0	1	0,90	0,80	0,80
	2	1,20	1,20	0,90
	3	1,0	1,0	1,30
	4	1,10	1,20	0,90
	5	1,10	0,90	1,0
	6	1,10	1,10	1,0
Średnie stężenie		**1,07**	**1,03**	**0,98**
SD		**0,103**	**0,163**	**0,172**
CV (%)		**9,68**	**15,80**	**17,52**
Bias (%)		**6,67**	**3,33**	**-1,67**
Średnie stężenie całkowite			**1,03**	
SD całkowite			**0,145**	
CV całkowite (%)			**14,08**	
Bias całkowite (%)			**2,78**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 12. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie LQC (25 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
25,0	1	21,20	23,00	21,30
	2	27,40	26,40	25,90
	3	19,90	22,60	24,10
	4	26,60	26,0	30,30
	5	27,80	25,90	24,70
	6	27,10	26,20	23,70
Średnie stężenie		**25,0**	**25,02**	**25,0**
SD		**3,493**	**1,730**	**3,006**
CV (%)		**13,97**	**6,92**	**12,02**
Bias (%)		**0,00**	**0,07**	**0,00**
Średnie stężenie całkowite			**25,01**	
SD całkowite			**2,670**	
CV całkowite (%)			**10,68**	
Bias całkowite (%)			**0,02**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 13. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie LQC (25 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
25,0	1	22,70	24,40	23,40
	2	22,30	28,70	28,20
	3	27,0	22,70	22,60
	4	24,0	24,60	25,50
	5	21,80	26,60	24,20

6	29,80	22,90	26,10
Średnie stężenie	**24,60**	**24,98**	**25,00**
SD	**3,159**	**2,301**	**2,032**
CV (%)	**12,84**	**9,21**	**8,13**
Bias (%)	**-1,60**	**-0,07**	**0,000**
Średnie stężenie całkowite		**24,86**	
SD całkowite		**2,397**	
CV całkowite (%)		**9,64**	
Bias całkowite (%)		**-0,56**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 14. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie LQC (25 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
25,0	**1**	25,30	28,60	26,50
	2	25,0	28,90	26,70
	3	25,20	21,60	26,30
	4	25,30	25,80	24,80
	5	24,30	23,40	22,60
	6	25,20	25,30	24,60
Średnie stężenie		**25,05**	**25,60**	**25,25**
SD		**0,383**	**2,859**	**1,576**
CV (%)		**1,53**	**11,17**	**6,24**
Bias (%)		**0,20**	**2,40**	**1,00**
Średnie stężenie całkowite			**25,30**	
SD całkowite			**1,798**	
CV całkowite (%)			**7,11**	
Bias całkowite (%)			**1,20**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 15. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie LQC (25 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
25,0	**1**	26,60	22,30	26,80
	2	21,40	26,20	20,50
	3	24,20	21,10	21,90
	4	22,10	28,30	25,20
	5	24,40	24,40	24,00
	6	25,40	27,10	27,10
Średnie stężenie		**24,02**	**24,90**	**24,25**
SD		**1,964**	**2,812**	**2,652**
CV (%)		**8,18**	**11,29**	**10,94**
Bias (%)		**-3,93**	**-0,40**	**-3,0**
Średnie stężenie całkowite			**24,39**	
SD całkowite			**2,383**	
CV całkowite (%)			**9,77**	

Bias całkowite (%)	**-2,44**

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 16. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie IQC (500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
500,0	**1**	400,40	480,00	443,50
	2	546,40	499,10	538,60
	3	417,70	482,40	501,40
	4	563,30	521,30	487,20
	5	538,30	489,30	511,50
	6	533,90	527,80	517,80
Średnie stężenie		**500,00**	**499,98**	**500,00**
SD		**71,371**	**20,256**	**32,549**
CV (%)		**14,27**	**4,05**	**6,51**
Bias (%)		**0**	**0**	**0**
Średnie stężenie całkowite			**499,99**	
SD całkowite			**43,94**	
CV całkowite (%)			**8,28**	
Bias całkowite (%)			**0,00**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 17. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie IQC (500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Powtórzenie	Dzień I	Dzień II	Dzień III
500,0	**1**	392,30	453,1	543,9
	2	487,60	472,2	456,3
	3	485,40	532,8	430,6
	4	549,40	456,4	436,1
	5	481,20	553,7	555,9
	6	484,00	531,8	577,2
Średnie stężenie		**479,98**	**500,0**	**500,0**
SD		**50,223**	**44,372**	**66,062**
CV (%)		**10,46**	**8,87**	**13,21**
Bias (%)		**-4,00**	**0,00**	**0,00**
Średnie stężenie całkowite			**493,33**	
SD całkowite			**53,55**	
CV całkowite (%)			**10,85**	
Bias całkowite (%)			**-1,33**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 18. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie IQC (500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
500,0	**1**	564,00	508,10	623,10

	2	481,50	507,60	495,90
	3	573,0	602,20	467,0
	4	519,80	467,10	487,60
	5	455,40	443,80	454,30
	6	470,20	471,10	472,00
Średnie stężenie		**510,65**	**499,98**	**499,98**
SD		**49,711**	**55,936**	**62,106**
CV (%)		**9,73**	**11,19**	**12,42**
Bias (%)		**2,13**	**0,00**	**0,00**
Średnie stężenie całkowite			**503,54**	
SD całkowite			**55,918**	
CV całkowite (%)			**11,11**	
Bias całkowite (%)			**0,71**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 19. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie IQC (500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
500,0	**1**	486,50	576,50	550,80
	2	520,90	475,50	583,70
	3	428,90	411,60	435,40
	4	572,80	505,70	487,10
	5	509,30	520,10	466,60
	6	481,70	422,10	411,70
Średnie stężenie		**500,02**	**485,25**	**489,22**
SD		**47,740**	**62,40**	**66,544**
CV (%)		**9,55**	**12,86**	**13,69**
Bias (%)		**0,00**	**-2,95**	**-2,16**
Średnie stężenie całkowite			**491,50**	
SD całkowite			**58,89**	
CV całkowite (%)			**12,03**	
Bias całkowite (%)			**-1,70**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 20. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1500,0	**1**	1218,90	1201,20	1535,40
	2	1363,10	1480,10	1403,50
	3	1179,80	1135,20	1366,50
	4	1395,30	1411,0	1605,40
	5	1419,20	1260,0	1440,40
	6	1623,70	1512,60	1648,70
Średnie stężenie		**1366,67**	**1333,35**	**1499,98**
SD		**159,001**	**156,079**	**114,158**
CV (%)		**11,64**	**11,71**	**7,61**
Bias (%)		**-8,89**	**-11,11**	**0**

Średnie stężenie całkowite	**1400,00**
SD całkowite	**143,079**
CV całkowite (%)	**10,32**
Bias całkowite (%)	**-6,67**

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 21. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1500,0	**1**	1396,10	1451,60	1634,80
	2	1744,60	1469,10	1462,70
	3	1379,10	1107,30	1654,80
	4	1863,60	1500,30	1962,80
	5	1336,30	1666,80	1466,20
	6	1776,30	1412,20	1436,30
Średnie stężenie		**1582,67**	**1434,55**	**1602,93**
SD		**236,467**	**182,942**	**199,669**
CV (%)		**14,94**	**12,75**	**12,46**
Bias (%)		**5,51**	**-4,36**	**6,86**
Średnie stężenie całkowite			**1540,05**	
SD całkowite			**206,359**	
CV całkowite (%)			**13,38**	
Bias całkowite (%)			**2,67**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 22. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1500,0	**1**	1613,30	1391,70	1309,9
	2	1694,0	1726,0	1569,4
	3	1637,60	1609,20	1605,5
	4	1337,50	1230,0	1405,2
	5	1311,10	1459,30	1494,6
	6	1406,40	1583,80	1615,6
Średnie stężenie		**1499,98**	**1500,0**	**1500,0**
SD		**167,486**	**176,810**	**122,036**
CV (%)		**11,17**	**11,79**	**8,14**
Bias (%)		**0**	**0**	**0**
Średnie stężenie całkowite			**1499,99**	
SD całkowite			**155,444**	
CV całkowite (%)			**10,36**	
Bias całkowite (%)			**0**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 23. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
1500,0	1	1705,30	1665,7	1805
	2	1411,80	1749,4	1353,7
	3	1576,0	1629,9	1286,8
	4	1395,0	1248,8	1504,4
	5	1465,60	1409	1383,7
	6	1446,30	1297,1	1666,4
Średnie stężenie		**1500,0**	**1499,98**	**1500,0**
SD		**118,992**	**209,324**	**200,558**
CV (%)		**7,93**	**13,96**	**13,37**
Bias (%)		**0**	**-0,001**	**0**
Średnie stężenie całkowite			**1499,99**	
SD całkowite			**176,291**	
CV całkowite (%)			**11,75**	
Bias całkowite (%)			**0**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 24. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL).

Nominalne stężenie (µg/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
2500,0	1	2462,11	2531,01	2618,03
	2	2587,03	2476,0	2441,71
	3	2358,71	2594,40	2512,55
	4	2721,69	2489,17	2694,62
	5	2553,50	2612,51	2384,12
	6	2498,34	2421,83	2569,0
Średnie stężenie		**2530,23**	**2520,82**	**2536,67**
SD		**122,883**	**73,122**	**114,441**
CV (%)		**4,86**	**2,90**	**4,51**
Bias (%)		**1,21**	**0,83**	**1,47**
Średnie stężenie całkowite			**2529,24**	
SD całkowite			**103,48**	
CV całkowite (%)			**4,09**	
Bias całkowite (%)			**1,17**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 25. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
2500,0	1	2229,01	2581,76	2476,77
	2	2531,14	2718,22	2395,33
	3	2297,42	2570,14	2620,01
	4	2545,6	2444,67	2443,6
	5	2477,45	2385,11	2457,25

6	2518,17	2339,9	2632,01
Średnie stężenie	**2433,13**	**2506,63**	**2504,16**
SD	**135,302**	**142,024**	**98,213**
CV (%)	**5,56**	**5,67**	**3,92**
Bias (%)	**-2,67**	**0,26**	**0,17**
Średnie stężenie całkowite		**2481,31**	
SD całkowite		**125,180**	
CV całkowite (%)		**5,05**	
Bias całkowite (%)		**-0,75**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 26. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
2500,0	**1**	2493,32	2467,11	2504,9
	2	2591,17	2627,03	2556,4
	3	2588,08	2606,44	2524,51
	4	2473,33	2323,11	2553
	5	2445,0	2291,06	2522,8
	6	2503,1	2684,71	2482,26
Średnie stężenie		**2515,67**	**2499,91**	**2523,98**
SD		**60,643**	**165,898**	**28,282**
CV (%)		**2,411**	**6,630**	**1,125**
Bias (%)		**0,620**	**0**	**0,96**
Średnie stężenie całkowite			**2513,19**	
SD całkowite			**84,941**	
CV całkowite (%)			**3,39**	
Bias całkowite (%)			**0,53**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

Tabela 27. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL).

Nominalne stężenie (ng/mL)	Nr powtórzenia	Dzień I	Dzień II	Dzień III
2500,0	**1**	2174,22	2506,11	2505,01
	2	2427,09	2565,67	2350,43
	3	2477,33	2603,0	2593,22
	4	2562,0	2503,91	2451,0
	5	2548,17	2519,43	2726,12
	6	2357,02	2493,88	2588,07
Średnie stężenie		**2424,31**	**2532,0**	**2535,64**
SD		**144,355**	**43,0**	**130,194**
CV (%)		**5,95**	**1,70**	**5,13**
Bias (%)		**-3,03**	**1,28**	**1,43**
Średnie stężenie całkowite			**2497,32**	
SD całkowite			**105,850**	
CV całkowite (%)			**4,26**	

Bias całkowite (%)	-0,11

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **SD** – odchylenie standardowe;

3.1.3. LOD

LOD dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru oszacowano na poziomie od 0,4 do 0,6 ng/mL. Wartości LOD określono na podstawie wartości S/N, wyznaczanego automatycznie przez oprogramowanie systemu UPLC-MS/MS, przy przyjętym kryterium S/N ≥ 3:1. Obliczenia wykonano na podstawie analizy sześciu powtórzeń dla każdego analitu (Tabela 28).

Tabela 28. LOD dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru dla S/N ≥ 3:1.

Nr powtórzenia	Stężenie fluralaneru (ng/mL)	Stężenie sarolaneru (ng/mL)	Stężenie lotilaneru (ng/mL)	Stężenie afoksolaneru (ng/mL)
1	0,43	0,60	0,42	0,46
2	0,51	0,45	0,53	0,50
3	1,20	0,63	0,71	0,55
4	0,10	0,31	0,60	0,51
5	0,50	0,35	0,57	0,50
6	0,33	0,68	0,80	0,49
Średnie stężenie całkowite	**0,52**	**0,50**	**0,61**	**0,50**
SD	**0,370**	**0,155**	**0,134**	**0,029**

SD – odchylenie standardowe;

3.1.4. LLOQ

LLOQ dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru określono na podstawie analizy próbek o stężeniu 1 ng/mL, oznaczanych w sześciu powtórzeniach przez trzy kolejne dni analityczne. Za spełniające kryteria akceptacji dla poziomu LLOQ uznano wyniki charakteryzujące się wartościami Bias mieszczącymi się w granicach ±20% oraz CV ≤ 20% oraz S/N ≥ 10:1. Stężenie 1 ng/mL stanowiło jednocześnie najniższy punkt krzywych kalibracyjnych wykorzystywanych podczas walidacji metody oraz analizy próbek uzyskanych od ptaków objętych doświadczeniem (Tabela 29).

Tabela 29. LLOQ dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru.

Analit	LLOQ (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)
Fluralaner	1,0	**13,72**	**0**

Sarolaner	**12,56**	**-2,67**
Lotilaner	**11,83**	**5,33**
Afoksolaner	**14,08**	**2,78**
Lotilaner-D4	**≤5% odpowiedzi IS**	

Bias-błąd systematyczny/obciążeniowy; **CV** – współczynnik zmienności; **LLOQ** – granica oznaczalności;

3.1.5. Ocena efektu przenoszenia analitu w sekwencji analitycznej

Efekt przenoszenia analitu oceniano na podstawie odpowiedzi detektora rejestrowanej w próbkach ślepych analizowanych bezpośrednio po próbkach na poziomie HQC. Wartości przenoszenia wyrażono jako procent odpowiedzi odpowiadającej poziomowi LLOQ. Dla wszystkich badanych pochodnych izoksazolin wartości przenoszenia były niższe niż 20% odpowiedzi dla poziomu LLOQ i wynosiły 3,08% dla fluralaneru, 4,43% dla sarolaneru, 7,18% dla lotilaneru oraz 2,89% dla afoksolaneru. Uzyskane wyniki spełniły przyjęte kryteria akceptacji, wskazując na brak istotnego efektu przenoszenia analitów w sekwencji analitycznej (Tabela 30).

Tabela 30. Wyniki oceny efektu przenoszenia dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru.

Analit	Średnie pole powierzchni HQC	Średnie pole powierzchni próbki BLANK	Średnie pole powierzchni LLOQ	Przenoszenie (% LLOQ)	CV (%)
Fluralaner	3 850 464,50	47,28	1548,32	3,08	19,44
Sarolaner	228 217,94	6,09	141,86	4,43	14,07
Lotilaner	415 510,29	15,39	216,19	7,18	20,58
Afoksolaner	726 487,53	17,78	615,19	2,89	1,47

CV – współczynnik zmienności; **HQC** – wysoki punkt kontrolny; **LLOQ** – granica oznaczalności;

3.1.6. Odzysk pochodnych izoksazolin z matrycy biologicznej

Odzysk badanych pochodnych izoksazolin oceniono na pięciu poziomach QC: LLOQ, LQC, MQC, IQC i HQC. Średnie wartości odzysku dla fluralaneru mieściły się w zakresie 88,24-108,28%, dla sarolaneru 55,67–106,06%, dla lotilaneru 87,56–106,70%, natomiast dla afoksolaneru 99,78–125,62%. Wartości CV dla wszystkich analizowanych poziomów nie przekraczały 15,49% (Tabela 31).

Tabela 31. Wyniki oceny odzysku fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru z matrycy biologicznej.

Analit	Poziom QC	Stężenie nominalne (ng/mL)	Odzysk średni (%)	SD	CV (%)
Fluralaner	LLOQ	1,0	**88,24**	**13,20**	**14,96**
	LQC	25,0	**102,80**	**7,75**	**7,54**
	IQC	500,0	**97,40**	**9,71**	**10,09**
	MQC	1500,0	**108,28**	**10,65**	**9,84**
	HQC	2500,0	**90,26**	**7,23**	**8,01**
Sarolaner	LLOQ	1,0	**55,67**	**10,65**	**19,13**
	LQC	25,0	**77,95**	**7,40**	**9,50**
	IQC	500,0	**83,45**	**8,81**	**11,43**
	MQC	1500,0	**106,06**	**9,77**	**9,21**
	HQC	2500,0	**94,10**	**7,40**	**7,86**
Lotilaner	LLOQ	1,0	**87,56**	**13,56**	**15,49**
	LQC	25,0	**96,22**	**13,10**	**13,62**
	IQC	500,0	**97,94**	**13,52**	**13,87**
	MQC	1500,0	**106,70**	**13,55**	**12,70**
	HQC	2500,0	**101,29**	**13,87**	**13,69**
Afoksolaner	LLOQ	1,0	**102,59**	**14,87**	**14,49**
	LQC	25,0	**125,62**	**14,11**	**11,23**
	IQC	500,0	**108,21**	**14,14**	**13,19**
	MQC	1500,0	**104,85**	**13,20**	**12,59**
	HQC	2500,0	**99,78**	**14,41**	**14,44**

CV – współczynnik zmienności; **HQC** – wysoki poziom kontroli jakości**; IQC** – pośredni poziom kontroli jakości; **LLOQ** – granica oznaczalności; **LQC –** niski poziom kontroli jakości; **MQC** – średni poziom kontroli jakości; **SD** – odchylenie standardowe; **QC** – punkt kontroli;

3.1.7. Selektywność metody analitycznej

Selektywność metody oceniono poprzez porównanie chromatogramów sześciu próbek ślepego osocza ptaków z chromatogramami próbek osocza wzbogaconych odpowiednimi standardami analitycznymi. Kryterium braku interferencji uznawano za spełnione, gdy sygnał zarejestrowany w próbkach ślepych nie przekraczał 20% odpowiedzi odpowiadającej poziomowi LLOQ dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru oraz 5% odpowiedzi dla IS. W analizowanych próbkach ślepych nie stwierdzono sygnałów interferujących w czasach retencji badanych analitów ani IS, co potwierdziło selektywność metody (Tabela 32).

Tabela 32. Wyniki oceny selektywności metody oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu ptaków.

Analit	Czas retencji (min)	Liczba próbek ślepych	Interferencje w czasie retencji analitu	Kryterium akceptacji
fluralaner	2,17	6	-	≤20% LLOQ
sarolaner	2,30	6	-	≤20% LLOQ
lotilaner	2,41	6	-	≤20% LLOQ
afoksolaner	2,58	6	-	≤20% LLOQ
lotilaner-D4	2,89	6	-	≤5% IS

IS – standard wewnętrzny**; LLOQ** – granica oznaczalności;

3.1.8. Ocena efektu matrycy

Efekt matrycy oceniono na poziomach LLOQ oraz HQC dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru. Efekt matrycy wyrażano jako procentowe odchylenie odpowiedzi analitu uzyskanej w obecności matrycy biologicznej względem odpowiedzi uzyskanej bez udziału matrycy. Dodatnie wartości wskazywały na wzmocnienie sygnału analitycznego (enhancement), natomiast wartości ujemne na jego tłumienie (suppression). Uzyskane wartości efektu matrycy mieściły się w zakresie od −11,21% do +17,40%. Wartości CV dla większości analizowanych poziomów nie przekraczały 15%, natomiast najwyższą wartość odnotowano dla lotilaneru na poziomie LLOQ (18,43%) (Tabela 33).

Tabela 33. Wyniki efektu matrycy dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaner i afoksolaneru na dwóch poziomach QC: LLOQ i HQC.

Analit	Poziom QC	Efekt matrycy (%)	CV (%)
Fluralaner	LLOQ	**+12,59**	**12,27**
	HQC	**-11,21**	**12,85**
Sarolaner	LLOQ	**+16,52**	**14,14**
	HQC	**−7,51**	**13,69**
Lotilaner	LLOQ	**+10,11**	**18,43**
	HQC	**+3,05**	**14,75**
Afoksolaner	LLOQ	**+17,40**	**4,66**
	HQC	**-7,83**	**7,47**

CV – współczynnik zmienności; **HQC** – wysoki poziom kontroli jakości**; LLOQ** – granica oznaczalności; **QC** – punkt kontroli;

3.2. Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin u kur

3.2.1. Profil stężenie-czas pochodnych izoksazolin po podaniu IV

Stężenia pochodnych izoksazolin w osoczu kur oznaczono indywidualnie dla każdego ptaka po podaniu badanych substancji drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. W Tabelach 34–37 przedstawiono stężenia oznaczone u poszczególnych ptaków w kolejnych punktach czasowych oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD dla każdego z badanych związków. Wyniki porównawczej analizy statystycznej średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w poszczególnych punktach czasowych zestawiono w Tabeli 38. Profil stężenie–czas po podaniu IV przedstawiono na Rycinie 8.

Analiza statystyczna wykazała wyższe stężenia fluralaneru w większości punktów czasowych doświadczenia w porównaniu do pozostałych pochodnych izoksazolin. W porównaniu z sarolanerem wyższe stężenia fluralaneru obserwowano już w pierwszych punktach czasowych, tj. po 0,083 i 0,25 godz., a następnie w przedziałach 2–3 godz. oraz 12–24 godz. W kolejnych punktach czasowych, tj. od 36 do 120 godz., analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między stężeniami fluralaneru i sarolaneru. Natomiast w późniejszym etapie doświadczenia, tj. w 240., 360. i 480. godz. próbkowania, istotnie wyższe stężenia osiągał sarolaner. W ostatnim punkcie czasowym, tj. w 600. godz., różnica między tymi związkami nie była istotna statystycznie. Z kolei istotnie wyższe stężenie fluralaneru w porównaniu z lotilanerem odnotowano już w pierwszym punkcie pobrania próbki, tj. po 0,083 godz., a następnie we wszystkich punktach czasowych od 2 do 120 godz. doświadczenia. Należy podkreślić, że 120 godz. była ostatnim punktem czasowym, w którym dla lotilaneru uzyskano oznaczalne stężenia umożliwiające wyznaczenie średniego stężenia oraz przeprowadzenie porównania statystycznego z pozostałymi związkami. Jeśli chodzi o porównanie fluralaneru z afoksolanerem, istotnie wyższe stężenia fluralaneru odnotowano we wszystkich punktach czasowych od 1 do 120 godz. próbkowania.

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między średnimi stężeniami sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w początkowym etapie próbkowania po podaniu badanych substancji, tj. od 0,083 do 4 godz. Różnice pomiędzy tymi związkami zaczęto obserwować od 6 godz. Między 6 a 120 godz. doświadczenia stężenie sarolaneru było znacząco wyższe niż lotilaneru. Z kolei w 8 godz. od podania, a następnie w przedziale 36-480 godz. sarolaner uzyskał istotnie wyższe stężenia od afoksolaneru, przy czym 480 godz. stanowiła ostatni punkt czasowy oznaczania stężeń afoksolaneru. Ponadto analiza statystyczna wykazała wyższe

stężenia afoksolaneru względem lotilaneru w końcowej części doświadczenia, tj. w przedziale 72-120 godz.

Tabela 34. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy I po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0,08	754,0	1264,50	869,20	882,10	901,0	1259,20	876,60	880,50	**960,89**	**191,14**
0,25	589,20	712,50	424,40	454,30	741,70	923,90	622,10	810,90	**659,88**	**171,60**
0,5	426,30	616,90	450,20	230,80	422,80	621,80	395,40	693,30	**482,19**	**151,47**
1	304,30	528,70	294,50	261,30	335,20	489,0	273,70	650,40	**392,14**	**144,60**
1,5	311,80	386,80	255,30	195,70	340,60	511,80	182,70	503,40	**336,01**	**126,39**
2	407,50	467,70	168,80	439,90	273,90	99,10	303,90	468,0	**328,60**	**141,02**
2,5	269,20	358,30	218,10	372,0	442,10	278,60	279,20	458,70	**334,53**	**86,99**
3	320,30	337,70	183,70	348,40	390,90	334,30	295,10	402,90	**326,66**	**67,68**
4	216,40	226,60	202,20	221,40	404,60	349,70	303,60	438,30	**295,35**	**92,97**
6	214,70	255,80	149,80	183,50	227,30	165,40	193,50	578,10	**246,01**	**138,42**
8	159,90	365,40	134,40	259,20	308,30	183,80	305,90	421,20	**267,26**	**101,92**
12	259,90	313,20	140,60	235,20	171,40	229,30	159,30	339,0	**230,99**	**71,86**
24	165,60	409,70	116,40	285,40	260,30	204,40	156,20	287,10	**235,64**	**94,45**
36	130,0	287,10	84,80	240,40	287,20	145,70	207,10	258,30	**205,08**	**76,72**
48	122,50	171,30	89,90	194,30	210,0	111,40	131,40	203,40	**154,28**	**46,18**
72	126,40	149,40	64,0	111,30	142,30	139,30	116,70	183,60	**129,13**	**34,59**
96	94,90	58,40	69,90	90,30	130,50	133,0	138,10	161,70	**109,60**	**36,44**
120	77,80	81,60	55,0	75,80	139,40	66,40	76,70	164,10	**92,10**	**38,31**
240	37,90	29,0	27,10	29,50	37,50	29,0	37,10	88,20	**39,41**	**20,21**
360	8,50	14,20	2,30	7,50	9,10	14,50	11,80	21,90	**11,23**	**5,85**
480	5,10	10,80	1,40	2,60	5,0	11,40	6,40	8,40	**6,39**	**3,61**
600	4,0	2,80	1,0	1,10	4,0	2,40	1,10	3,30	**2,46**	**1,28**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 35. Stężenia sarolaneru w osoczu kur z grupy II po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	9	10	11	12	13	14	15	16		
0,08	618,80	702,40	439,60	392,10	599,10	468,70	305,90	503,70	**503,79**	**130,24**
0,25	523,20	550,70	431,50	282,60	393,10	415,20	253,20	492,70	**417,78**	**107,28**
0,5	501,30	509,60	276,80	233,70	277,40	315,20	170,80	454,50	**342,41**	**128,90**
1	330,10	222,60	329,70	199,20	176,40	256,10	156,50	355,40	**253,25**	**76,83**
1,5	305,20	241,80	154,0	191,20	168,40	300,10	141,10	313,30	**226,89**	**72,26**
2	303,0	251,90	171,40	202,40	121,40	228,30	138,90	192,40	**201,21**	**59,62**
2,5	398,10	286,30	141,80	174,50	242,10	142,60	117,60	173,80	**209,60**	**94,52**
3	322,0	221,20	115,70	171,70	144,50	174,20	121,0	140,50	**176,35**	**67,92**
4	456,20	343,80	142,70	167,0	211,90	109,30	103,10	161,40	**211,93**	**124,67**
6	482,90	346,80	219,30	275,40	157,70	96,80	107,10	242,50	**241,06**	**129,30**
8	446,20	249,50	228,0	193,20	140,40	122,30	99,20	269,90	**218,59**	**110,69**
12	141,80	186,10	109,10	269,70	149,0	111,90	122,30	113,40	**150,41**	**54,68**
24	255,40	256,80	89,60	125,80	118,10	72,50	100,50	105,90	**140,58**	**73,15**
36	409,90	295,30	105,60	195,10	136,30	162,40	118,60	111,70	**191,86**	**107,86**
48	261,50	219,20	83,70	117,60	264,40	187,60	102,60	130,50	**170,89**	**72,02**
72	101,60	243,30	115,70	146,50	137,20	118,10	91,40	181,40	**141,90**	**49,73**
96	120,80	146,30	76,0	136,20	215,30	88,80	68,80	189,80	**130,25**	**52,91**
120	92,90	122,30	86,20	85,50	100,0	110,70	103,80	149,0	**106,30**	**21,25**
240	66,70	115,20	63,20	63,30	62,50	103,50	46,60	42,90	**70,49**	**25,65**
360	25,30	86,30	28,20	40,90	42,70	87,20	24,50	25,0	**45,01**	**26,72**
480	8,10	56,80	15,10	22,90	23,90	50,70	16,20	16,60	**26,29**	**17,71**
600	4,70	33,40	6,10	14,50	13,90	23,0	9,10	9,10	**14,23**	**9,67**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 36. Stężenia lotilaneru w osoczu kur z grupy III po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	17	18	19	20	21	22	23	24		
0,08	961,80	1021,40	376,90	395,80	349,20	724,60	391,60	360,40	**572,71**	**286,17**
0,25	678,90	824,20	272,20	314,70	274,70	595,60	229,20	278,10	**433,45**	**230,03**
0,5	504,70	640,0	185,90	246,40	229,30	235,90	169,20	207,30	**302,34**	**172,44**
1	351,50	477,30	132,30	175,10	162,40	534,00	152,30	208,0	**274,11**	**158,75**
1,5	318,80	413,20	117,50	147,50	132,70	256,50	212,80	133,70	**216,59**	**106,38**
2	270,10	311,0	97,10	137,20	114,80	94,40	111,90	87,40	**152,99**	**86,96**
2,5	223,30	289,0	92,10	125,70	103,50	212,60	101,40	104,0	**156,45**	**74,51**
3	233,60	180,10	81,80	139,80	81,70	185,90	106,30	110,50	**139,96**	**55,12**
4	178,30	214,90	76,90	92,40	69,30	137,50	88,50	61,60	**114,93**	**56,19**
6	167,10	175,20	68,60	46,50	64,80	114,50	78,30	56,90	**96,49**	**50,26**
8	176,60	146,90	67,20	59,60	42,10	110,70	65,50	49,90	**89,81**	**49,44**
12	140,00	131,10	55,80	60,00	30,40	79,60	48,90	40,80	**73,33**	**41,07**
24	105,00	98,70	36,50	45,20	25,40	60,20	58,80	30,10	**57,49**	**30,09**
36	74,20	67,0	32,60	49,50	29,60	59,50	57,70	36,90	**50,88**	**16,51**
48	38,90	38,70	46,0	40,10	31,00	31,50	33,40	30,0	**36,20**	**5,61**
72	7,20	21,40	12,0	18,70	18,20	25,70	16,40	17,50	**17,14**	**5,62**
96	5,80	17,80	8,70	20,20	10,80	18,80	29,90	16,10	**16,01**	**7,62**
120	1,20	1,70	2,90	9,00	5,20	8,70	9,60	4,50	**5,35**	**3,38**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 37. Stężenia afoksolaneru w osoczu kur z grupy IV po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

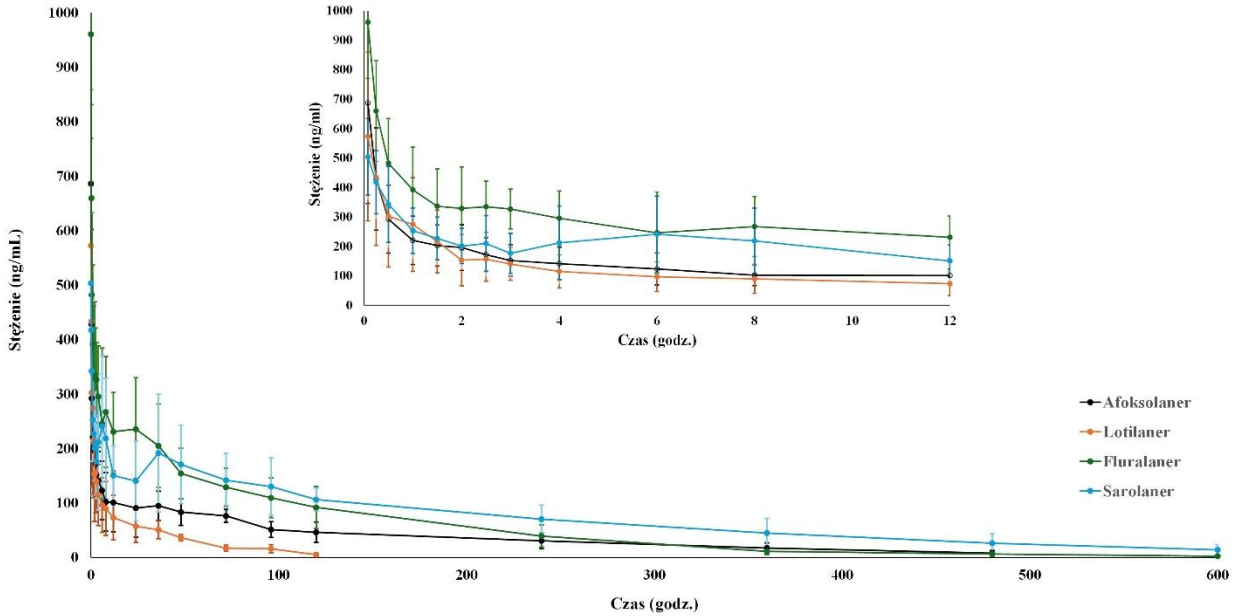
Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	25	26	27	28	29	30	31	32		
0,08	422,50	857,90	1170,60	449,70	1203,70	410,30	511,10	465,80	**686,45**	**340,75**
0,25	264,20	531,0	667,40	371,40	609,90	227,90	510,60	245,30	**428,46**	**173,73**
0,5	260,10	331,20	485,80	251,70	427,30	146,60	198,50	237,30	**292,31**	**115,21**
1	206,20	371,0	183,80	224,40	309,40	120,20	190,10	157,70	**220,35**	**81,98**
1,5	134,10	280,30	262,30	218,20	289,40	116,00	184,70	137,10	**202,76**	**69,88**
2	124,80	284,80	241,30	206,20	314,20	112,20	141,50	141,80	**195,85**	**77,47**
2,5	140,50	199,0	231,80	171,60	257,0	83,70	163,70	127,00	**171,79**	**56,58**
3	135,30	218,50	219,10	143,70	199,10	96,80	120,50	83,40	**152,05**	**53,77**
4	125,60	227,50	170,40	135,70	205,40	73,20	96,10	95,90	**141,23**	**55,30**
6	107,50	229,50	157,40	149,60	108,30	65,10	101,90	63,50	**120,23**	**54,37**
8	100,10	171,0	108,60	111,80	118,0	65,50	83,40	59,20	**102,20**	**35,19**
12	82,40	142,00	108,30	116,40	102,40	94,90	90,80	70,80	**101,00**	**21,95**
24	55,10	103,20	89,90	104,40	100,10	88,50	111,80	74,20	**90,90**	**18,60**
36	68,10	121,20	131,10	119,90	88,60	55,80	91,80	83,80	**95,04**	**26,85**
48	114,50	56,10	84,80	111,70	67,80	48,10	97,50	86,90	**83,43**	**24,54**
72	97,80	68,70	63,90	63,40	76,60	77,10	87,60	76,10	**76,40**	**11,76**
96	39,40	75,80	55,60	63,20	45,10	34,70	41,0	59,30	**55,26**	**14,56**
120	36,10	69,30	71,70	52,40	33,80	20,90	30,50	56,50	**46,40**	**18,79**
240	31,90	53,50	24,10	32,80	26,70	12,30	15,20	49,60	**30,76**	**14,74**
360	20,40	33,80	13,30	14,10	18,20	4,80	8,70	26,60	**17,49**	**9,45**
480	10,60	17,30	4,60	7,80	7,80	1,40	3,20	10,90	**7,95**	**5,07**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 38. Porównanie średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy I–IV).

Punkt czasowy (godz.)	Poziomy istotności statystycznej różnic między średnimi stężeniami pochodnych izoksazolin po podaniu każdego z tych związków drogą IV					
	Fluralaner vs Sarolaner	Fluralaner vs Lotilaner	Fluralaner vs Afoksolaner	Sarolaner vs Lotilaner	Sarolaner vs Afoksolaner	Lotilaner vs Afoksolaner
0,083	0,006	0,022	-	-	-	-
0,25	0,048	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-
1	-	-	0,04	-	-	-
1,5	-	-	0,047	-	-	-
2	0,05	0,006	0,047	-	-	-
2,5	0,019	<0,001	0,002	-	-	-
3	<0,001	<0,001	<0,001	-	-	-
4	-	0,002	0,007	-	-	-
6	-	0,031	0,05	0,039	-	-
8	-	<0,001	0,002	0,018	0,037	-
12	0,018	<0,001	<0,001	0,025	-	-
24	0,024	<0,001	<0,001	0,05	-	-
36	-	<0,001	0,016	0,002	0,039	-
48	-	<0,001	0,018	<0,001	0,003	-
72	-	<0,001	0,01	<0,001	0,001	0,004
96	-	<0,001	0,008	<0,001	<0,001	0,050
120	-	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	0,022
240	0,009	n.d.	-	n.d.	<0,001	n.d.
360	<0,001	n.d.	-	n.d.	0,003	n.d.
480	0,024	n.d.	-	n.d.	0,041	n.d.
600	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Objaśnienia: „–” oznacza brak istotnej różnicy statystycznej między porównywanymi związkami; n.d. – nie dotyczy, ponieważ w danym punkcie czasowym nie uzyskano oznaczalnych stężeń co najmniej jednego z porównywanych związków, co uniemożliwiło wyznaczenie średniego stężenia i wykonanie porównania statystycznego; **IV** – podanie drogą dożylną;



Ryc. 9. Profil stężenie–czas fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony profil stężenie–czas w przedziale 0,083-12 godz. po podaniu.

3.2.2. Parametry farmakokinetyczne pochodnych izoksazolin po podaniu drogą IV

Parametry farmakokinetyczne obliczono na podstawie danych indywidualnych uzyskanych dla poszczególnych ptaków. W Tabelach 39–42 przedstawiono wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych wyznaczone dla indywidualnych ptaków oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD dla każdego z badanych związków. Wyniki porównawczej analizy statystycznej parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru zestawiono w Tabeli 43.

Po podaniu badanych substancji drogą IV najwyższe wartości C_{max} obserwowano dla fluralaneru i były one istotnie wyższe od wartości uzyskanych dla sarolaneru i lotilaneru. W pozostałych porównaniach nie stwierdzono różnic w zakresie tego parametru. Sarolaner charakteryzował się najwyższą wartością $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$, przy czym wartość $AUC_{0\rightarrow t}$ była istotnie wyższa niż wartości uzyskane dla lotilaneru i afoksolaneru, a wartość $AUC_{0\rightarrow\infty}$ była istotnie wyższa od wartości uzyskanych dla wszystkich pozostałych badanych substancji. Ponadto wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$ były istotnie wyższe dla fluralaneru niż dla lotilaneru, natomiast w porównaniu z afoksolanerem fluralaner osiągał wyższe wartości tylko w przypadku $AUC_{0\rightarrow t}$. Wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$ afoksolaneru były również istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla lotilaneru. Najwyższe wartości V_{ss} obserwowano dla

lotilaneru i były one istotnie wyższe od wartości uzyskanych dla fluralaneru oraz sarolaneru. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wartością V_{ss} lotilaneru i afoksolaneru jak również pomiędzy fluralanerem, a sarolanerem. Jednocześnie wartości V_{ss} afoksolaneru były istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla fluralaneru i sarolaneru. Ponadto sarolaner charakteryzował się najwyższymi wartościami $MRT_{0\rightarrow t}$ oraz $MRT_{0\rightarrow\infty}$ i były one istotnie wyższe od wartości uzyskanych dla wszystkich pozostałych badanych substancji. Fluralaner oraz afoksolaner również osiągnęły wartości $MRT_{0\rightarrow t}$ i $MRT_{0\rightarrow\infty}$ istotnie wyższe od lotilaneru. W porównaniu fluralaneru z afoksolanerem afoksolaner osiągnął znacząco wyższe wartości $MRT_{0\rightarrow\infty}$, natomiast w przypadku $MRT_{0\rightarrow t}$ nie wykazano istotnych różnic statystycznych. Również w przypadku parametru $t_{1/2kel}$ sarolaner charakteryzował się najwyższą wartością spośród wszystkich badanych substancji. Fluralaner oraz afoksolaner również osiągnęły wartości istotnie wyższe od lotilaneru w zakresie tego parametru, natomiast pomiędzy fluralanerem i afoksolanerem nie stwierdzono istotnej różnicy**.** Z kolei w przypadku Cl oraz k_{el} najwyższe wartości obserwowano dla lotilaneru i były one istotnie wyższe od wartości uzyskanych dla wszystkich pozostałych badanych substancji, natomiast pomiędzy fluralanerem, sarolanerem i afoksolanerem nie stwierdzono różnic w zakresie tych parametrów. Najwyższe wartości t_{last} stwierdzono dla fluralaneru i sarolaneru i były one istotnie wyższe od wartości uzyskanych dla pozostałych badanych substancji; równocześnie wyższe wartości tego parametru wykazano dla afoksolaneru względem lotilaneru.

Tabela 39. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy I po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	27661,49	35070,68	18065,19	29466,58	38138,49	29018,73	29227,53	52397,20	**32380,74**	**9985,64**
$AUC_{0\rightarrow}$ (µg×godz./L)	28162,81	35653,83	18139,38	29599,62	38636,48	29371,66	29377,51	52814,01	**32719,41**	**10091,47**
$AUMC_{0\rightarrow t}$(µg×godz.^{2}/L)	3250066,0	3704947,0	1912195,0	2806546,0	4067844,0	3576050,0	3445475,0	6621581,0	**3673088,0**	**1359741,0**
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	3633762,0	4150869,0	1965278,0	2903002,0	4448350,0	3838199,0	3551576,0	6924526,0	**3926945,0**	**1436207,0**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	117,49	105,64	105,85	95,25	106,66	123,23	117,88	126,37	**112,30**	**10,58**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	129,03	116,42	108,34	98,08	115,13	130,68	120,89	131,11	**118,71**	**11,71**
k_{el} (1/godz.)	0,006	0,0061	0,0087	0,008	0,0061	0,007	0,0093	0,0079	**0,01**	**0**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	114,62	114,15	80,02	86,66	113,74	98,97	74,49	87,90	**96,32**	**16,34**
C_{max} (ng/mL)	754,0	1264,50	869,20	882,10	901,0	1259,20	876,60	880,50	**960,89**	**191,14**
t_{max} (godz.)	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	**0,08**	**0**
C_{last} (ng/mL)	4,0	2,80	1,0	1,10	4,0	2,40	1,10	3,30	**2,46**	**1,28**
t_{last} (godz.)	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	**600,0**	**0**
$AUC_{rest\%}$ (%)	1,78	1,64	0,41	0,45	1,29	1,20	0,51	0,79	**1,01**	**0,55**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	501,33	583,15	74,20	133,04	497,98	352,93	149,97	416,81	**338,68**	**194,85**
Cl (L/godz)	0,036	0,029	0,055	0,034	0,026	0,034	0,034	0,019	**0,03**	**0,01**
V_{area} (L)	5,98	4,70	6,39	4,24	4,30	4,92	3,68	2,42	**4,58**	**1,26**
V_{ss} (L)	4,25	3,01	5,86	3,23	2,80	4,25	4,03	2,41	**3,73**	**1,10**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow\infty}$ do $AUC_{0\rightarrow\infty}$; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**-procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow\infty}$; **AUC_{rest}**-pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **Cl**-klirens całkowity; **V_{area}**-pozorna objętość dystrybucji; **V_{ss}**-objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

Tabela 40. Parametry farmakokinetyczne sarolaneru u kur z grupy II po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	9	10	11	12	13	14	15	16		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	42418,22	66234,32	30745,59	39276,90	42767,85	51956,81	28984,13	38685,95	**42633,72**	**11943,11**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	43025,13	74838,77	31747,79	42564,69	45721,36	58455,54	31250,06	40917,19	**46065,07**	**14412,45**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	5417692,36	13756696,07	5411704,08	6994704,07	7462028,57	12131135,43	5060128,02	5851400,98	**7760686,20**	**3331121,81**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	5868369,57	21094780,19	6170122,15	9728312,53	9865728,27	17652658,01	6968780,54	7720020,41	**10633596,46**	**5665213,93**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	127,72	207,70	176,02	178,09	174,48	233,49	174,58	151,25	**177,92**	**32,14**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	136,39	281,87	194,35	228,55	215,78	301,98	223,0	188,67	**221,32**	**52,46**
k_{el} (1/godz.)	0,01	0	0,01	0	0	0	0	0	**0**	**0**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	98,83	175,24	108,66	160,42	148,23	173,03	167,97	164,61	**149,62**	**29,62**
C_{max} (ng/mL)	618,80	702,40	439,60	392,10	599,10	468,70	305,90	503,70	**503,79**	**130,24**
t_{max} (godz.)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	**0,08**	**0**
C_{last} (ng/mL)	4,70	33,40	6,10	14,50	13,90	23,00	9,10	9,10	**14,23**	**9,67**
t_{last} (godz.)	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,00	600,0	**600,0**	**0**
$AUC_{rest\%}$ (%)	1,41	11,50	3,16	7,72	6,46	11,12	7,25	5,45	**6,76**	**3,51**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	606,91	8604,44	1002,20	3287,80	2953,51	6498,74	2265,93	2231,23	**3431,35**	**2754,10**
Cl (L/godz)	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	**0,03**	**0,01**
V_{area} (L)	3,36	3,82	5,10	5,89	5,00	4,80	8,36	6,14	**5,31**	**1,55**
V_{ss} (L)	3,01	3,14	5,72	4,53	4,08	4,49	6,02	3,91	**4,36**	**1,09**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow \infty}$ do $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$k_{el}$**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**-procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **Cl**-klirens całkowity; **V_{area}**-pozorna objętość dystrybucji; **V_{ss}**-objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

Tabela 41. Parametry farmakokinetyczne lotilaneru u kur z grupy III po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	17	18	19	20	21	22	23	24		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	6636,54	7228,3	3543,78	4395,29	3498,34	5571,35	5381,76	3416,90	**4959,03**	**1480,82**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	6666,83	7303,59	3655,35	4935,92	3620,87	6158,10	5623,04	3589,31	**5194,13**	**1474,40**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	145819,9	192547,4	118153,70	170039,0	178419,10	184328,40	301149,50	131238,20	**177711,89**	**56422,10**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	150137,2	203472,5	135312,40	264368,4	216793,0	288488,40	378976,90	158403,80	**224494,07**	**82722,96**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	21,97	26,64	33,34	38,69	51,0	33,09	55,96	38,41	**37,39**	**11,47**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	22,52	27,86	37,02	53,56	59,87	46,85	67,4	44,13	**44,90**	**15,41**
k_{el} (1/godz.)	0,044	0,040	0,030	0,018	0,014	0,017	0,012	0,027	**0,03**	**0,01**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	15,62	17,40	23,43	37,76	50,71	39,87	57,23	26,03	**33,51**	**15,37**
C_{max} (ng/mL)	961,8	1021,40	376,90	395,80	349,20	724,6	391,60	360,4	**572,71**	**286,17**
t_{max} (godz.)	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	**0,08**	**0,00**
C_{last} (ng/mL)	1,2	1,70	2,90	9	1,70	8,7	2,90	4,5	**4,08**	**3,12**
t_{last} (godz.)	120,0	120,0	120,0	120,0	240,0	120,0	240,0	120	**150,00**	**55,55**
$AUC_{rest\%}$ (%)	0,454	1,03	3,05	10,95	3,38	9,53	4,29	4,8	**4,69**	**3,75**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	30,29	75,29	111,57	540,63	122,54	586,76	241,28	172,42	**235,10**	**212,60**
Cl (L/godz)	0,15	0,14	0,28	0,23	0,29	0,18	0,19	0,29	**0,22**	**0,06**
V_{area} (L)	3,39	3,47	9,54	12,40	20,91	10,32	15,34	10,99	**10,80**	**5,80**
V_{ss} (L)	3,31	3,69	9,41	8,80	14,58	5,94	10,4	11,24	**8,42**	**3,88**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow \infty}$ do $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$k_{el}$**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**-procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **Cl**-klirens całkowity; **V_{area}**-pozorna objętość dystrybucji; **V_{ss}**-objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

Tabela 42. Parametry farmakokinetyczne afoksolaneru u kur z grupy IV po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	25	26	27	28	29	30	31	32		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	18316,01	27197,03	19826,98	20124,76	17565,29	10565,53	14444,31	22133,36	**18771,66**	**4970,80**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	20706,36	31006,03	20547,57	21374,46	19208,9	10785,44	15026,82	23939,02	**20324,33**	**5961,32**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	2834407,85	4545233,78	2432288,27	2682234,89	2450604,37	1099389,75	1575434,56	3790747,79	**2676292,66**	**1106408,06**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	4502473,80	7183284,82	2882596,16	3490907,16	3560103,12	1234102,02	1950513,23	4943465,66	**3718430,75**	**1859090,54**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	154,75	167,12	122,68	133,28	139,51	104,05	109,07	171,27	**137,72**	**25,31**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	217,44	231,67	140,29	163,32	185,34	114,42	129,80	206,50	**173,60**	**43,34**
k_{el} (1/godz.)	0,005	0,005	0,007	0,006	0,005	0,008	0,006	0,006	**0,01**	**0,00**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	150,99	147,35	100,45	115,82	135,19	91,90	113,60	109,79	**120,64**	**21,61**
C_{max} (ng/ml)	422,50	857,90	1170,60	449,70	1203,70	410,30	511,10	465,80	**686,45**	**340,75**
t_{max} (godz.)	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	**0,08**	**0,00**
C_{last} (ng/ml)	10,60	17,30	4,60	7,80	7,80	1,40	3,20	10,90	**7,95**	**5,07**
t_{last} (godz.)	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	**480,0**	**0**
$AUC_{rest\%}$ (%)	11,54	12,28	3,51	5,85	8,56	2,04	3,88	7,54	**6,90**	**3,76**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	2390,34	3809,01	720,59	1249,7	1643,61	219,91	582,51	1805,66	**1552,67**	**1156,76**
Cl (L/godz)	0,06	0,04	0,05	0,05	0,06	0,10	0,07	0,05	**0,06**	**0,02**
V_{area} (L)	11,89	7,82	7,31	8,30	11,10	12,55	11,35	7,16	**9,69**	**2,24**
V_{ss} (L)	8,45	6,14	6,19	6,62	7,94	9,85	7,55	7,74	**7,56**	**1,25**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow \infty}$ do $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$k_{el}$**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**-procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **Cl**-klirens całkowity; **V_{area}**-pozorna objętość dystrybucji; **V_{ss}**-objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

Tabela 43. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy I-IV).

Parametr farmakokinetyczny	Poziomy istotności statystycznej różnic między wartościami parametrów PK pochodnych izoksazolin po podaniu każdego z tych związków drogą IV					
	Fluralaner vs Sarolaner	Fluralaner vs Lotilaner	Fluralaner vs Afoksolaner	Sarolaner vs Lotilaner	Sarolaner vs Afoksolaner	Lotilaner vs Afoksolaner
C_{max} (ng/mL)	**0,005**	**0,005**	**-**	**-**	**-**	**-**
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	**-**	**<0,001**	**0,012**	**<0,001**	**<0,001**	**0,011**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	**0,037**	**<0,001**	**-**	**<0,001**	**<0,001**	**0,015**
V_{area} (L)	**-**	**0,004**	**0,020**	**0,012**	**-**	**-**
V_{ss} (L)	**-**	**0,001**	**0,008**	**0,005**	**0,032**	**-**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	**<0,001**	**<0,001**	**-**	**<0,001**	**0,005**	**<0,001**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	**<0,001**	**0,002**	**0,021**	**<0,001**	**0,020**	**<0,001**
$t_{1/2kel}$ (godz.) (1/godz.)	**<0,001**	**<0,001**	**-**	**<0,001**	**0,050**	**<0,001**
k_{el} (1/godz.)	**-**	**<0,001**	**-**	**<0,001**	**-**	**<0,001**
Cl (L/godz.)	**-**	**<0,001**	**-**	**<0,001**	**-**	**<0,001**
t_{last} (godz.)	**-**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow\infty}$ do $AUC_{0\rightarrow\infty}$; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **Cl**-klirens całkowity; **V_{area}**-pozorna objętość dystrybucji; **V_{ss}**-objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

3.2.3. Profil stężenie-czas pochodnych izoksazolin po podaniu PO

Stężenia pochodnych izoksazolin w osoczu kur oznaczono indywidualnie dla każdego ptaka po podaniu badanych substancji drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. W Tabelach 44–47 przedstawiono stężenia oznaczone u poszczególnych ptaków w kolejnych punktach czasowych oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD dla każdego z badanych związków. Wyniki porównawczej analizy statystycznej średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w poszczególnych punktach czasowych zestawiono w Tabeli 48. Profil stężenie–czas po podaniu PO przedstawiono na Rycinie 9.

Należy podkreślić, że poszczególne związki różniły się zakresem punktów czasowych, w których uzyskano oznaczalne stężenia umożliwiające wyznaczenie średnich stężeń i przeprowadzenie porównań statystycznych. Dla fluralaneru i afoksolaneru ostatnim takim punktem czasowym była 480 godz., dla lotilaneru 120 godz., natomiast dla sarolaneru oznaczalne stężenia uzyskano do ostatniego punktu próbkowania, tj. do 600 godz.

W początkowym okresie doświadczenia, tj. do 6 godz. po podaniu PO, przebieg średnich stężeń poszczególnych związków był zróżnicowany, jednak tylko nieliczne różnice zostały potwierdzone statystycznie. W pierwszym punkcie czasowym, tj. po 0,5 godz., najwyższe średnie stężenie odnotowano dla lotilaneru i było ono istotnie wyższe niż stężenia fluralaneru i sarolaneru. W kolejnych punktach czasowych do 6 godz. najwyższe średnie stężenia obserwowano dla afoksolaneru, jednak istotnie wyższe stężenia tego związku względem fluralaneru wykazano jedynie po 1 i 6 godz. W pozostałych porównaniach w tym przedziale czasowym nie stwierdzono istotnych różnic między średnimi stężeniami badanych związków.

Od 12 do 120 godz. próbkowania sarolaner osiągał istotnie wyższe stężenia niż lotilaner. Należy podkreślić, że 120 godz. była ostatnim punktem czasowym, w którym dla lotilaneru uzyskano oznaczalne stężenia umożliwiające wyznaczenie średniego stężenia oraz przeprowadzenie porównania statystycznego z pozostałymi związkami. Podobnie, od 24 do 480 godz. próbkowania stężenia sarolaneru były istotnie wyższe niż stężenia afoksolaneru, przy czym 480 godz. była ostatnim punktem czasowym, w którym dla afoksolaneru uzyskano oznaczalne stężenia umożliwiające przeprowadzenie porównania statystycznego. W porównaniu z fluralanerem istotnie wyższe stężenia sarolaneru odnotowano w 96 godz., a następnie w przedziale 240-480 godz.; w przypadku fluralaneru 480 godz. była ostatnim punktem czasowym, w którym uzyskano oznaczalne stężenia umożliwiające porównanie statystyczne.

Fluralaner osiągał istotnie wyższe stężenia niż lotilaner w szerokim przedziale czasowym, od 12 do 120 godz. doświadczenia. W porównaniu z afoksolanerem różnice istotne statystycznie występowały jedynie w pojedynczych punktach czasowych: po 1 i 6 godz. wyższe stężenia osiągał afoksolaner, natomiast po 36, 72 i 96 godz. fluralaner. W przypadku porównania afoksolaneru z lotilanerem istotnie wyższe stężenia afoksolaneru odnotowano od 48 do 120 godz. doświadczenia.

Tabela 44. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy V po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer zwierzęcia								Średnia	SD
	33	34	35	36	37	38	39	40		
0,5	2,0	3,90	2,30	4,40	13,90	1,80	11,40	4,10	**5,48**	**4,59**
1	2,10	17,70	4,70	9,60	18,70	8,10	6,60	12,80	**10,04**	**5,96**
1,5	8,60	33,70	6,70	13,90	27,30	18,10	15,0	15,30	**17,33**	**9,09**
2	15,10	86,10	13,20	28,70	27,80	19,50	28,20	20,50	**29,88**	**23,49**
2,5	17,10	87,70	16,90	42,90	35,50	26,30	25,50	15,40	**33,41**	**23,96**
3	47,80	68,40	27,10	51,0	33,0	55,40	28,50	29,10	**42,54**	**15,31**
4	84,60	64,60	41,90	47,20	39,60	55,80	98,30	26,30	**57,29**	**24,19**
6	74,60	96,10	59,40	81,50	55,40	103,80	73,0	39,30	**72,88**	**21,34**
8	107,70	110,30	79,90	40,70	53,0	167,50	57,0	43,60	**82,46**	**43,79**
12	100,70	70,40	65,90	121,90	63,20	157,70	201,70	181,90	**120,43**	**54,66**
24	109,20	69,40	95,60	122,10	61,20	136,70	187,40	107,30	**111,11**	**39,79**
36	63,40	69,90	96,10	154,80	107,90	217,0	165,20	123,50	**124,73**	**52,0**
48	101,30	77,70	76,30	107,30	88,40	210,30	114,0	125,60	**112,61**	**43,08**
72	82,90	86,0	58,90	145,80	85,90	149,90	139,70	83,50	**104,08**	**35,21**
96	60,10	66,90	36,30	99,90	46,70	106,50	122,70	133,0	**84,01**	**36,23**
120	98,10	63,30	35,20	152,20	41,40	34,80	34,50	87,80	**68,41**	**42,12**
240	34,10	39,20	6,20	20,70	24,50	4,70	12,10	15,60	**19,64**	**12,50**
360	11,90	4,80	-	5,50	2,20	1,70	3,20	5,20	**4,93**	**3,41**
480	0,90	1,90	-	1,80	1,20	-	-	1,20	**1,40**	**0,43**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 45. Stężenia sarolaneru w osoczu kur z grupy VI po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer zwierzęcia								Średnia	SD
	41	42	43	44	45	46	47	48		
0,5	6,30	5,60	4,80	0,80	1,0	16,4	3,20	2,10	**5,03**	**5,03**
1	23,90	13,90	13,10	17,0	8,30	35,0	52,60	12,70	**22,06**	**14,90**
1,5	50,70	13,80	22,30	7,90	13,90	56,10	105,10	38,90	**38,59**	**32,31**
2	48,80	22,70	41,50	22,0	21,70	86,60	119,90	16,40	**47,45**	**37,24**
2,5	73,60	22,10	125,70	9,20	32,10	92,80	106,0	46,60	**63,51**	**42,38**
3	91,40	27,20	112,50	28,60	23,0	95,60	150,20	37,90	**70,80**	**48,00**
4	113,40	58,60	181,90	47,60	33,80	95,70	121,30	76,20	**91,06**	**48,00**
6	149,90	57,60	135,90	65,20	58,70	91,50	146,50	104,90	**101,28**	**39,17**
8	157,40	71,30	169,80	74,50	88,70	121,90	162,70	104,50	**118,85**	**40,28**
12	166,60	167,30	191,60	103,20	76,20	108,50	184,90	116,40	**139,34**	**43,26**
24	181,60	159,30	162,10	94,20	126,40	114,70	200,50	139,70	**147,31**	**35,35**
36	199,20	177,70	183,40	98,20	103,30	131,20	162,0	155,70	**151,34**	**37,19**
48	188,30	123,40	93,90	134,80	146,0	113,50	163,0	136,10	**137,38**	**29,25**
72	121,20	111,80	133,60	104,40	119,10	121,10	181,30	142,0	**129,31**	**24,04**
96	125,0	123,30	120,40	86,0	110,70	120,0	118,30	175,80	**122,44**	**24,92**
120	70,80	89,90	82,10	148,30	124,80	68,10	82,30	107,10	**96,68**	**28,07**
240	66,70	63,20	73,40	103,50	62,50	63,30	46,60	42,90	**65,26**	**18,50**
360	25,30	28,20	56,80	87,20	52,70	50,90	24,50	25,0	**43,83**	**22,34**
480	8,10	7,10	24,90	53,0	23,90	22,90	16,20	16,60	**21,59**	**14,40**
600	4,70	6,10	4,90	10,30	3,90	4,50	9,10	9,10	**6,58**	**2,53**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 46. Stężenia lotilaneru w osoczu kur z grupy VII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Numer zwierzęcia								Średnia	SD
	49	50	51	52	53	54	55	56		
0,5	9,30	39,20	6,70	28,40	5,10	12,60	29,70	9,60	**17,58**	**12,888**
1	57,40	59,70	14,90	47,60	12,60	12,90	46,90	18,70	**33,84**	**20,912**
1,5	58,20	49,50	14,70	110,80	14,70	21,40	46,20	25,50	**42,63**	**32,191**
2	58,70	52,70	14,50	130,60	23,80	48,40	42,60	30,80	**50,26**	**35,760**
2,5	69,90	62,0	24,20	152,60	32,20	45,90	49,10	52,40	**61,04**	**39,817**
3	73,40	86,80	43,20	109,40	41,50	56,50	53,10	61,80	**65,71**	**23,191**
4	70,50	103,60	65,20	103,10	76,20	73,20	64,30	82,50	**79,83**	**15,644**
6	91,90	104,50	54,90	105,0	64,80	55,70	76,40	88,50	**80,21**	**20,365**
8	79,60	88,20	52,30	78,50	66,90	67,60	81,30	68,10	**72,81**	**11,291**
12	73,50	46,30	36,0	82,0	40,30	55,50	66,70	64,70	**58,13**	**16,376**
24	48,80	51,60	34,90	25,70	25,80	44,90	79,20	30,70	**42,70**	**17,860**
36	19,20	23,60	27,0	26,90	31,60	36,40	59,70	27,50	**31,49**	**12,481**
48	24,30	25,20	16,30	19,80	12,30	13,30	39,0	23,50	**21,71**	**8,563**
72	11,0	13,20	11,80	13,70	9,30	20,30	25,70	14,40	**14,93**	**5,432**
96	7,40	21,10	8,0	15,10	6,20	12,40	13,50	7,60	**11,41**	**5,102**
120	3,50	9,70	4,80	6,50	3,80	9,90	5,80	4,70	**6,09**	**2,489**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 47. Stężenia afoksolaneru w osoczu kur z grupy VIII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

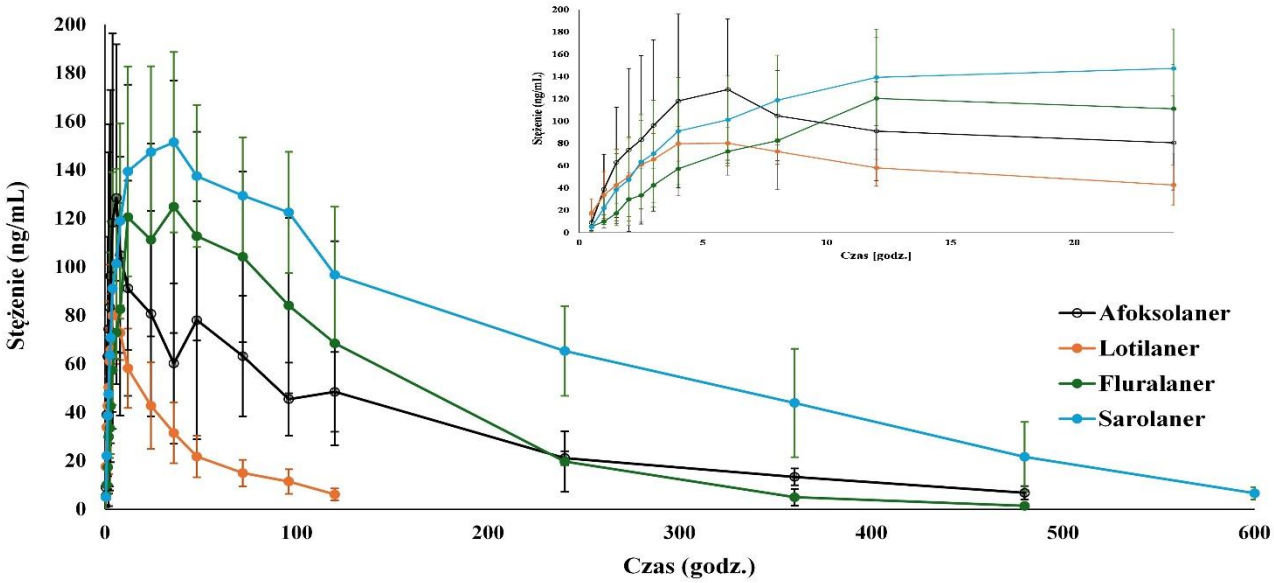
Czas pobrania (godz.)	Numer zwierzęcia								Średnia	SD
	57	58	59	60	61	62	63	64		
0,5	7,70	23,20	6,10	3,30	10,60	2,40	15,80	3,20	**9,04**	**7,272**
1	67,10	65,40	15,80	21,90	25,60	4,40	92,10	19,60	**38,99**	**31,373**
1,5	143,60	118,10	36,40	32,80	33,50	8,50	97,50	33,40	**62,98**	**49,366**
2	203,0	173,60	56,20	26,80	40,30	10,30	63,90	20,0	**74,26**	**73,013**
2,5	235,50	159,20	55,30	46,60	55,90	10,80	72,0	30,90	**83,28**	**75,533**
3	242,70	156,30	68,30	52,30	54,60	15,80	140,50	38,70	**96,15**	**76,759**
4	262,90	173,20	57,0	142,60	97,80	26,40	138,50	47,10	**118,18**	**78,024**
6	234,20	148,60	96,20	118,70	193,20	40,80	126,40	69,10	**128,40**	**63,388**
8	170,20	114,40	71,10	122,90	145,10	51,30	88,70	75,10	**104,85**	**40,462**
12	157,20	105,80	66,50	100,40	149,0	57,50	47,90	44,60	**91,11**	**44,380**
24	160,70	107,60	65,50	62,80	109,90	62,50	43,50	32,70	**80,65**	**42,337**
36	124,80	77,90	49,60	32,0	31,90	65,20	74,40	24,90	**60,09**	**33,096**
48	33,60	105,20	47,50	167,30	122,40	53,50	67,30	27,30	**78,01**	**49,095**
72	74,50	106,90	59,70	68,70	73,80	45,90	54,60	21,0	**63,14**	**24,918**
96	67,80	48,80	52,80	52,60	54,50	30,90	33,60	22,30	**45,41**	**15,051**
120	53,70	66,10	42,90	60,10	63,20	52,0	27,30	21,90	**48,40**	**16,423**
240	19,0	18,60	27,10	20,10	21,0	21,60	22,80	18,70	**21,11**	**2,843**
360	8,70	12,0	16,80	16,80	8,70	14,90	16,70	12,10	**13,34**	**3,465**
480	4,80	4,90	10,80	10,10	4,10	4,60	9,40	5,50	**6,78**	**2,805**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 48. Porównanie średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy V–VIII).

Czas pobrania (godz.)	Poziomy istotności statystycznej różnic między średnimi stężeniami pochodnych izoksazolin po podaniu każdego z tych związków drogą PO					
	Fluralaner vs Sarolaner	Fluralaner vs Lotilaner	Fluralaner vs Afoksolaner	Sarolaner vs Lotilaner	Sarolaner vs Afoksolaner	Lotilaner vs Afoksolaner
0,5	-	0,029	-	0,022	-	-
1	-	-	0,041	-	-	-
1,5	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
6	-	-	0,046	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
12	-	0,03	-	0,003	-	-
24	-	0,003	-	<0,001	0,004	-
36	-	<0,001	0,007	<0,001	<0,001	-
48	-	<0,001	-	<0,001	0,014	0,02
72	-	<0,001	0,013	<0,001	<0,001	0,003
96	0,014	<0,001	0,013	<0,001	<0,001	0,034
120	-	<0,001	-	<0,001	0,006	0,018
240	<0,001	n.d.	-	n.d.	<0,001	n.d.
360	<0,001	n.d.	-	n.d.	<0,001	n.d.
480	<0,001	n.d.	-	n.d.	0,006	n.d.
600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Objaśnienia: „–” oznacza brak istotnej różnicy statystycznej między porównywanymi związkami; **n.d.** – nie dotyczy, ponieważ w danym punkcie czasowym nie uzyskano oznaczalnych stężeń co najmniej jednego z porównywanych związków, co uniemożliwiło wyznaczenie średniego stężenia i wykonanie porównania statystycznego; **PO** – podanie drogą doustną;



Ryc. 10. Profil stężenie–czas fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony profil stężenie–czas w przedziale 0,5-24 godz. po podaniu.

3.2.4. Parametry farmakokinetyczne pochodnych izoksazolin po podaniu PO

Parametry farmakokinetyczne obliczono na podstawie danych indywidualnych uzyskanych dla poszczególnych ptaków. W Tabelach 49–52 przedstawiono wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych wyznaczone dla indywidualnych ptaków oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD dla każdego z badanych związków. Wyniki porównawczej analizy statystycznej parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru zestawiono w Tabeli 53.

Po podaniu badanych substancji drogą PO najwyższe wartości C_{max} obserwowano dla sarolaneru i były one istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla lotilaneru. Pomiędzy pozostałymi badanymi substancjami nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie tego parametru. Sarolaner charakteryzował się najwyższą wartością t_{max}, istotnie wyższą niż wartości uzyskane dla lotilaneru i afoksolaneru. Pomiędzy pozostałymi badanymi substancjami nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie tego parametru. Sarolaner charakteryzował się również najwyższymi wartościami $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$, które były istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla wszystkich pozostałych badanych substancji. Ponadto wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$ uzyskane dla fluralaneru i afoksolaneru były istotnie wyższe niż wartości uzyskane niż dla lotilaneru. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wartościami tych parametrów dla fluralaneru i afoksolaneru. Sarolaner charakteryzował się najwyższymi

wartościami $MRT_{0\rightarrow t}$ oraz $MRT_{0\rightarrow\infty}$, które były istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla fluralaneru i lotilaneru, w przypadku $MRT_{0\rightarrow t}$ były istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla afoksolaneru. Nie wykazano natomiast istotnych różnic w zakresie $MRT_{0\rightarrow\infty}$ pomiędzy sarolanerem a afoksolanerem. Afoksolaner charakteryzował się jednocześnie wyższymi wartościami $MRT_{0\rightarrow t}$ oraz $MRT_{0\rightarrow\infty}$ w porównaniu z fluralanerem i lotilanerem. Fluralaner osiągał wyższe wartości tych parametrów niż lotilaner. Najwyższe wartości $t_{1/2kel}$ obserwowano dla afoksolaneru i były one istotnie wyższe niż wartości uzyskane dla fluralaneru i lotilaneru. Podobnie sarolaner osiągał istotnie wyższe wartości $t_{1/2kel}$ niż fluralaner i lotilaner. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy afoksolanerem a sarolanerem ani pomiędzy fluralanerem a lotilanerem. Sarolaner charakteryzował się również najwyższą wartością F, istotnie wyższą niż wartości uzyskane dla fluralaneru i lotilaneru. Afoksolaner także osiągał istotnie wyższą wartość F niż fluralaner. W pozostałych porównaniach nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych. Najdłuższy t_{last} obserwowano dla sarolaneru i był on istotnie dłuższy niż t_{last} pozostałych badanych substancji. Ponadto fluralaner i afoksolaner osiągały wyższe wartości tego parametru niż lotilaner, natomiast nie wykazano różnicy pomiędzy fluralanerem a afoksolanerem.

.

Tabela 49. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy V po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	33	34	35	36	37	38	39	40		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	22280,10	18040,45	9855,78	26780,50	13980,75	19488,85	18851,57	20273,15	**18693,89**	**5101,23**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	22392,97	18216,18	10336,73	26951,34	14074,52	19603,53	19190,12	20334,60	**18887,50**	**5024,84**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	2852508,0	2369346,0	723105,10	2891619,0	1597965,0	1312903,0	1485955,0	1985547,0	**1902368,0**	**766304,90**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	2915637,0	2470411,0	875129,0	2990411,0	1651606,0	1363305,0	1642002,0	2019714,0	**1991027,0**	**752195,90**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	128,03	131,34	73,37	107,97	114,3	67,37	78,82	97,94	**99,89**	**24,68**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	130,20	135,62	84,66	110,96	117,35	69,54	85,56	99,32	**104,15**	**23,41**
k_{el} (1/godz.)	0,013	0,011	0,013	0,010	0,011	0,013	0,010	0,013	**0,01**	**0**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	54,99	65,92	52,74	68,11	63,82	55,10	69,96	53,86	**60,56**	**7,09**
C_{max} (ng/mL)	148,70	110,30	96,10	154,80	107,90	217,0	201,70	180,64	**152,14**	**45,27**
t_{max} (godz.)	48,0	8,0	36,0	36,0	36,0	36,0	12,0	12,0	**28,00**	**14,97**
C_{last} (ng/mL)	0,90	1,90	6,20	1,80	1,20	1,70	3,20	0	**2,11**	**1,89**
t_{last} (godz.)	480,0	480,0	240,0	480,0	480,0	360,0	360,0	478,32	**419,79**	**90,55**
$AUC_{rest\%}$ (%)	0,51	0,97	4,65	0,63	0,67	0,59	1,76	0,30	**1,26**	**1,44**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	112,87	175,73	480,96	170,84	93,77	114,68	338,55	61,45	**193,61**	**143,73**
$AUC_{0\rightarrow tmax}$ (µg×godz./L)	4429,73	546,81	2712,98	3852,71	2327,89	5090,52	960,63	713,01	**2579,29**	**1759,35**
$AUC_{tmax\rightarrow tlast}$ (µg×godz./L)	17849,87	17492,67	7142,22	22926,69	12705,39	14397,88	17888,10	20161,89	**16320,59**	**4863,49**
F (%)	68,81	55,71	30,44	82,71	43,18	60,19	58,22	62,61	**57,73**	**15,75**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna

Tabela 50. Parametry farmakokinetyczne sarolaneru u kur z grupy VI po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	41	42	43	44	45	46	47	48		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	32381,25	39524,33	51145,20	37910,75	34180,80	34170,30	33674,58	33704,50	**37086,46**	**6169,46**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	33160,56	40466,90	53648,57	38700,73	35071,50	36231,71	35900,94	34311,41	**38436,54**	**6579,89**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	5169177,03	7628636,83	12030194,08	7350462,0	6780355,98	5251518,88	5415723,98	5082520,40	**6838573,65**	**2337776,53**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	5758928,64	8327166,80	13937066,75	7928469,20	7437210,02	6953897,66	7279404,92	5533197,61	**7894417,70**	**2627045,33**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	159,63	193,01	235,22	193,89	198,37	153,69	160,83	150,80	**180,68**	**29,45**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	173,67	205,78	259,78	204,87	212,06	191,93	202,76	161,26	**201,51**	**29,34**
k_{el} (1/godz.)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0	0,01	**0,01**	**0,00**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	108,66	97,79	112,10	91,27	95,28	156,54	164,34	98,83	**115,60**	**28,57**
C_{max} (ng/mL)	177,70	191,60	148,30	146,0	131,20	200,50	175,80	199,20	**171,29**	**26,41**
t_{max} (godz.)	36,0	12,00	120,0	48,0	36,0	24,0	96,0	36,0	**51,00**	**37,26**
C_{last} (ng/mL)	6,10	4,90	10,30	3,90	4,50	9,10	9,10	4,70	**6,58**	**2,53**
t_{last} (godz.)	600,0	600,00	600,0	600,0	600,0	600,00	600,0	600,0	**600,0**	**0**
$AUC_{rest\%}$ (%)	2,35	2,33	4,67	2,04	2,54	5,69	6,20	1,77	**3,45**	**1,78**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	779,31	942,58	2503,37	789,98	890,70	2061,41	2226,37	606,91	**1350,08**	**772,09**
$AUC_{0\rightarrow tmax}$ (µg×godz./L)	5817,93	809,65	15691,13	4418,20	3235,90	2459,50	15802,30	4265,65	**6562,53**	**5856,98**
$AUC_{tmax\rightarrow tlast}$ (µg×godz./L)	27885,0	31570,20	23832,0	46726,80	34674,60	31717,20	18367,20	29408,40	**30522,68**	**8307,11**
F (%)	75,95	92,71	99,96	88,92	80,18	80,16	78,98	79,05	**84,49**	**8,42**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

Tabela 51. Parametry farmakokinetyczne lotilaneru u kur z grupy VII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	49	50	51	52	53	54	55	56		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	3035,15	3491,65	2291,4	3330	2170,13	3099,58	4553,03	2843,3	**3101,78**	**747,01**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	3174,05	4227,72	2589,89	3750,18	2414,23	3732,45	4796,25	3046	**3466,35**	**813,89**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	95319,7	141060,3	87456,1	116269,7	74421,23	126367,8	176107,6	99856,03	**114607,30**	**32873,86**
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	117356,6	289316,6	140936,5	193835,7	118623,4	244617	214471,3	133077,4	**181529,31**	**64260,00**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	31,41	40,4	38,17	34,92	34,29	40,77	38,68	35,12	**36,72**	**3,29**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	36,97	68,43	54,42	51,69	49,14	65,54	44,72	43,69	**51,83**	**10,79**
k_{el} (1/godz.)	0,026	0,012	0,017	0,016	0,016	0,015	0,027	0,023	**0,02**	**0,01**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	26,79	56,43	41,01	44,78	42,34	46,33	26,15	30,43	**39,28**	**10,64**
C_{max} (ng/mL)	91,9	104,5	65,2	152,6	76,2	73,2	81,3	88,5	**91,68**	**27,45**
t_{max} (godz.)	6	6	4	2,5	4	4	8	6	**5,06**	**1,74**
C_{last} (ng/mL)	3,5	9,7	4,8	6,5	3,8	9,9	5,8	4,7	**6,09**	**2,49**
t_{last} (godz.)	120	120	120	120	120	120	120	120	**120,00**	**0,00**
$AUC_{rest\%}$ (%)	4,38	17,41	11,53	11,2	10,11	16,96	5,07	6,65	**10,41**	**4,97**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	138,9	736,07	298,49	420,18	244,1	632,88	243,22	202,7	**364,57**	**215,08**
$AUC_{0\rightarrow tmax}$ (µg×godz./L)	398,05	474,05	221,35	336,25	200,05	236,70	471,10	389,05	**340,83**	**110,37**
$AUC_{tmax\rightarrow tlast}$ (µg×godz./L)	1714,55	1727,55	1136,15	1285,35	1066,35	1220,10	1763,45	1257,65	**1396,39**	**289,07**
F (%)	61,22	70,41	46,21	67,16	43,77	62,51	91,82	57,33	**62,55**	**15,06**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow\infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow\infty}$; **AUC_{rest}**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

Tabela 52. Parametry farmakokinetyczne afoksolaneru u kur z grupy VIII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	57	58	59	60	61	62	63	64		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	18065,82	18715,18	15100,33	18149,53	17628,70	13503,75	13398,47	8698,13	**15407,49**	**3448,20**
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	18877,53	19666,62	17900,75	20164,03	18218,28	14333,88	16058,85	9842,14	**16882,76**	**3423,90**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	1964171,0	2235573,0	2503983,0	2546253,0	2070013,0	2097887,0	2168919,0	1547702,0	**2141812,61**	**315294,20**
$AUMC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	2495383,0	2863452,0	4578742,0	3950377,0	2439630,0	2626618,0	4166498,0	2321190,0	**3180236,16**	**901108,40**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	108,72	119,45	165,82	140,29	117,42	155,36	161,88	177,94	**143,36**	**25,75**
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	132,19	145,60	255,78	195,91	133,91	183,25	259,45	235,84	**192,74**	**53,09**
k_{el} (1/godz.)	0,006	0,006	0,004	0,005	0,007	0,006	0,004	0,005	**0,005**	**0,001**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	120,91	124,71	180,82	150,42	101,84	108,77	187,75	135,94	**138,90**	**31,83**
C_{max} (ng/mL)	262,90	173,60	96,20	167,30	193,20	65,20	140,50	75,10	**146,75**	**66,73**
t_{max} (godz.)	4,0	2,0	6,0	48,0	6,0	36,0	3,0	8,0	**14,13**	**17,60**
C_{last} (ng/mL)	4,80	4,90	10,80	10,10	4,10	4,60	9,40	5,50	**6,78**	**2,81**
t_{last} (godz.)	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	480,0	**480,0**	**0**
$AUC_{rest\%}$ (%)	4,30	4,84	15,64	9,99	3,24	5,79	16,57	11,62	**9,0**	**5,24**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	811,70	951,45	2800,42	2014,50	589,58	830,13	2660,37	1144,02	**1475,27**	**884,50**
$AUC_{0\rightarrow tmax}$ (µg×godz./L)	604,65	272,20	323,75	2926,20	707,10	918,30	251,45	356,90	**795,7**	**893,15**
$AUC_{tmax\rightarrow tlast}$ (µg×godz./L)	2462,55	2563,35	1891,85	2216,40	1838,25	1695,20	1926,85	1840,60	**2054,38**	**319,82**
F (%)	95,91	99,35	80,16	96,35	93,59	71,69	71,14	46,17	**81,80**	**18,31**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow \infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$AUC_{rest}$**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

Tabela 53. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy V–VIII).

Parametr farmakokinetyczny	Poziomy istotności statystycznej różnic między wartościami parametrów PK pochodnych izoksazolin po podaniu każdego z tych związków drogą PO					
	Fluralaner vs Sarolaner	Fluralaner vs Lotilaner	Fluralaner vs Afoksolaner	Sarolaner vs Lotilaner	Sarolaner vs Afoksolaner	Lotilaner vs Afoksolaner
C_{max} (ng/mL)	-	-	-	0,006	-	-
t_{max} (godz.)	-	-	-	0,001	0,01	-
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001
$AUC_{0\rightarrow \infty}$ (µg×godz./L)	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	0,016	<0,001
$MRT_{0\rightarrow \infty}$ (godz.)	<0,001	0,018	<0,001	<0,001	-	<0,001
k_{el} (1/godz.)	-	0,003	0,008	<0,001	-	<0,001
$t_{1/2kel}$ (godz.)	<0,001	-	<0,001	<0,001	-	<0,001
F (%)	0,006	-	0,015	0,030	-	-
t_{last} (godz.)	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow \infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow \infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku $AUMC_{0\rightarrow \infty}$ do $AUC_{0\rightarrow \infty}$; **$k_{el}$**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości k_{el}; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**-czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **t_{max}** – czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **F –** dostępność biologiczna; **PO**- podanie drogą doustną;

3.2.5. Ocena wpływu elakrydaru lub oksytetracykliny na farmakokinetykę fluralaneru po podaniu PO

3.2.5.1. Profil stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem elakrydaru

Stężenia fluralaneru w osoczu kur oznaczono indywidualnie dla każdego ptaka po podaniu elakrydaru w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru w dawce 0,5 mg/kg m.c. Wartości stężeń oznaczone u poszczególnych ptaków w tej grupie oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD przedstawiono w Tabeli 54. Dane dla grupy otrzymującej wyłącznie fluralaner przedstawiono wcześniej w Tabeli 44. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner oraz w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner, wraz z poziomami istotności statystycznej różnic, zestawiono w Tabeli 55. Profil stężenie–czas fluralaneru w obu grupach przedstawiono na Rycinie 10.

Podanie elakrydaru przed podaniem fluralaneru wiązało się z wyższymi średnimi stężeniami fluralaneru w osoczu we wszystkich analizowanych punktach czasowych w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie fluralaner. W części punktów czasowych wzrost ten był wyraźny liczbowo; co najmniej dwukrotnie wyższe średnie stężenia fluralaneru w grupie z elakrydarem odnotowano po 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 6; 24; 36 oraz 480 godz. po podaniu fluralaneru. Istotnie wyższe stężenia fluralaneru w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner, w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie fluralaner, wykazano w 10 z 20 analizowanych punktów czasowych. Dotyczyło to punktów po 1 i 1,5 godz., po 6 godz., wszystkich punktów czasowych od 24 do 120 godz. oraz punktu po 360 godz. W pozostałych punktach czasowych średnie stężenia fluralaneru w grupie z elakrydarem były liczbowo wyższe, jednak nie wykazano ich istotnej statystycznie przewagi nad stężeniami obserwowanymi po podaniu wyłącznie fluralaneru.

Tabela 54. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy IX po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL.

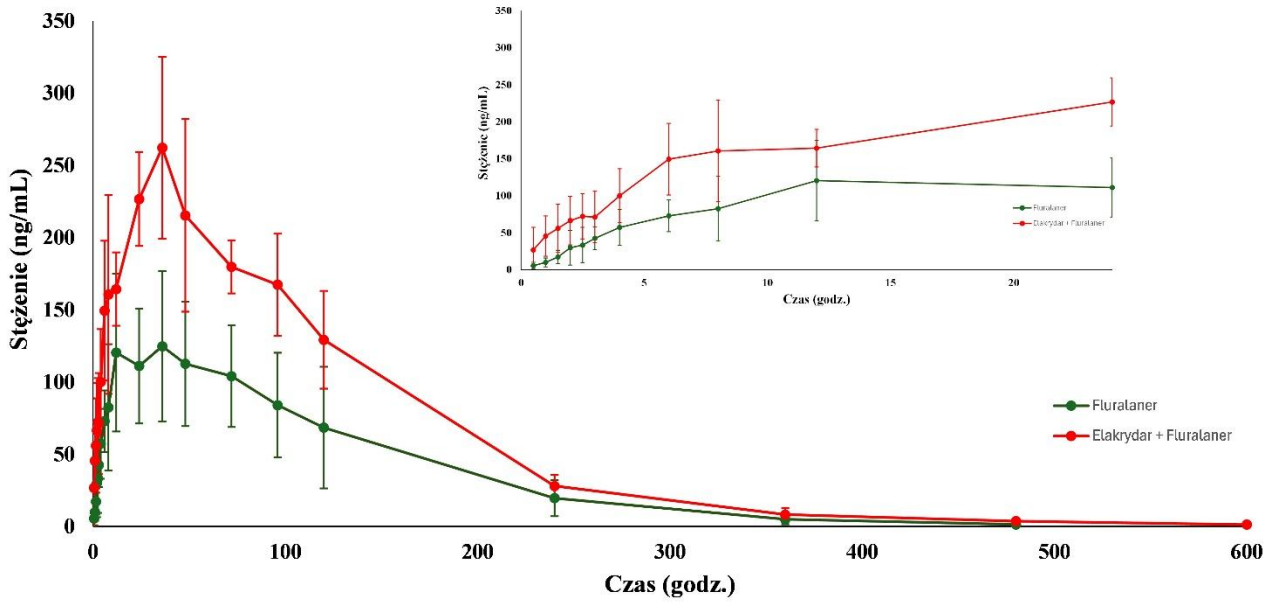
Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	65	66	67	68	69	70	71	72		
0,5	75,70	9,30	20,20	5,30	6,0	12,40	75,40	10,30	**26,83**	**30,42**
1	81,50	28,70	33,40	28,70	28,80	26,40	88,80	31,50	**45,59**	**27,20**
1,5	108,50	31,10	39,10	37,50	40,20	36,10	108,50	47,20	**56,03**	**32,70**
2	115,90	62,40	31,80	38,70	33,80	68,90	111,50	68,90	**66,49**	**32,82**
2,5	119,0	87,50	44,40	45,80	56,10	55,70	114,40	54,70	**72,20**	**30,50**
3	118,80	100,80	36,80	49,90	49,30	48,80	118,30	47,30	**71,25**	**34,95**
4	143,30	148,0	49,60	79,30	76,90	86,80	134,60	81,40	**99,99**	**36,64**
6	176,50	151,50	76,70	127,80	239,80	116,90	170,80	135,80	**149,48**	**48,35**
8	168,10	95,10	83,90	196,50	303,50	135,80	163,70	137,80	**160,55**	**68,75**
12	165,50	138,20	179,40	154,0	218,10	144,70	165,10	150,0	**164,38**	**25,36**
24	274,30	170,70	212,30	229,60	236,70	218,80	262,70	208,40	**226,69**	**32,54**
36	350,80	264,50	262,40	249,70	168,40	222,10	352,30	227,60	**262,23**	**62,94**
48	332,90	156,30	165,70	175,80	214,0	188,90	305,80	183,70	**215,39**	**66,78**
72	211,50	179,0	166,20	170,30	180,10	162,20	203,40	165,20	**179,74**	**18,36**
96	183,90	162,60	181,60	122,40	108,10	202,70	172,20	205,50	**167,38**	**35,37**
120	153,70	153,50	176,10	78,40	85,80	120,60	139,10	126,60	**129,23**	**33,88**
240	36,80	21,70	32,70	16,60	19,0	32,20	32,60	32,50	**28,01**	**7,65**
360	3,40	12,50	14,20	3,70	7,30	14,10	5,10	5,30	**8,20**	**4,65**
480	2,0	3,80	6,60	2,10	2,90	6,30	2,90	2,80	**3,68**	**1,80**
600	1,60	-	1,50	1,50	0,80	1,40	0,90	-	**1,28**	**0,34**

SD – odchylenie stadardowe;

Tabela 55. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c.; wartości stężeń wyrażono w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Średnie stężenie fluralaneru	Średnie stężenie fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem elakrydaru	Poziom istotności statystycznej
0,5	5,48	26,83	-
1	10,04	45,59	**0,033**
1,5	17,33	56,03	**0,03**
2	29,88	66,49	-
2,5	33,41	72,29	-
3	42,54	71,25	-
4	57,29	99,99	-
6	72,88	149,48	**0,03**
8	82,46	160,55	-
12	120,43	164,38	-
24	111,11	226,69	**<0,001**
36	124,73	262,23	**<0,001**
48	112,61	215,39	**0,002**
72	104,08	179,74	**<0,001**
96	84,01	167,38	**<0,001**
120	68,41	129,23	**0,005**
240	19,64	28,01	-
360	4,93	8,20	**0,012**
480	1,40	3,68	-
600	-	1,28	**n.d.**

Objaśnienia: „–" oznacza brak istotnej różnicy statystycznej między porównywanymi związkami; **n.d.** – nie dotyczy, ponieważ w danym punkcie czasowym nie uzyskano oznaczalnych stężeń fluralaneru, co uniemożliwiło wyznaczenie średniego stężenia i wykonanie porównania statystycznego;



Ryc. 11. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru.

3.2.5.2. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem elakrydaru

Parametry farmakokinetyczne fluralaneru w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner obliczono na podstawie danych indywidualnych uzyskanych dla poszczególnych ptaków. W Tabeli 56 przedstawiono wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych wyznaczone dla indywidualnych ptaków z tej grupy oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD. Dane dotyczące parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u ptaków otrzymujących wyłącznie fluralaner drogą PO przedstawiono wcześniej w Tabeli 49. Porównanie średnich wartości parametrów farmakokinetycznych fluralaneru pomiędzy grupą otrzymującą wyłącznie fluralaner a grupą otrzymującą elakrydar i fluralaner, wraz z poziomami istotności statystycznej różnic, zestawiono w Tabeli 57.

Analiza statystyczna wykazała, że w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner wartości C_{max} fluralaneru były istotnie wyższe niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner. W grupie

tej odnotowano również istotnie wyższe wartości $AUC_{0\rightarrow t}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}$ oraz F fluralaneru. Istotnemu wydłużeniu uległ również $t_{1/2}$kel, natomiast wartość k_{el} była istotnie niższa niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy obiema grupami w zakresie t_{max} oraz $MRT_{0\rightarrow t}$ i $MRT_{0\rightarrow\infty}$.

Tabela 56. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy IX po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. oraz fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c., (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	65	66	67	68	69	70	71	72		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	41945,05	33719,20	38242,15	26644,58	28729,27	34593,15	39533,43	33403,48	**34601,29**	**5230,62**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	42067,34	34301,48	38461,97	26823,74	28831,32	34795,19	39621,70	33628,81	**34816,44**	**5214,50**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	4038408,0	3601745,0	4554803,0	2414125,0	2717623,0	4080583,0	3824051,0	3435543,0	**3583360,0**	**716612,30**
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	4125074,0	3961448,0	4713042,0	2549265,0	2790592,0	4225550,0	3886366,0	3565765,0	**3727138,0**	**731883,40**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	96,28	106,82	119,10	90,60	94,59	117,96	96,73	102,85	**103,12**	**10,73**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	98,06	115,49	122,54	95,04	96,79	121,44	98,09	106,03	**106,69**	**11,52**
k_{el} (1/godz.)	0,009	0,007	0,008	0,006	0,008	0,008	0,009	0,010	**0,01**	**0,001**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	75,35	95,48	83,08	106,94	79,78	81,45	73,39	67,86	**82,92**	**12,66**
C_{max} (ng/mL)	350,80	264,50	262,4	249,70	303,5	222,1	352,3	227,60	**268,87**	**45,61**
t_{max} (godz.)	36,0	36,0	36,0	36,0	8,0	36,0	36,0	36,0	**32,50**	**9,90**
C_{last} (ng/mL)	1,6	3,80	1,50	1,50	0,80	1,40	0,90	2,80	**1,79**	**1,01**
t_{last} (godz.)	600,0	480,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	480,0	**570,0**	**55,55**
$AUC_{rest\%}$ (%)	0,29	1,70	0,57	0,67	0,35	0,58	0,22	0,67	**0,63**	**0,47**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	122,29	582,28	219,82	179,16	102,04	202,04	88,28	225,34	**215,16**	**157,61**
$AUC_{0\rightarrow tmax}$ (µg×godz./L)	8068,21	5669,44	6110,10	6501,05	1086,47	5991,98	7895,67	5961,26	**5910,52**	**2148,88**
$AUC_{tmax\rightarrow tlast}$ (µg×godz./L)	33857,92	26986,43	32127,0	20142,20	27641,30	28598,07	31618,90	27439,64	**28551,43**	**4235,63**
F (%)	129,50	104,10	118,10	82,30	88,70	106,80	122,10	103,20	**106,85**	**16,15**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow\infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; tmax-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości AUC0→∞; **AUC_{rest}**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

Tabela 57. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic.

Parametr farmakokinetyczny	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem elakrydaru	Poziom istotności statystycznej
C_{max} (ng/mL)	152,14	268,87	**<0,001**
t_{max} (godz.)	28,0	32,50	**-**
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	18693,89	34601,29	**<0,001**
$AUC_{0-\infty}$ (µg×godz./L)	18887,50	34816,44	**<0,001**
MRT_{0-t} (godz.)	99,89	103,12	**-**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	104,15	106,69	**-**
k_{el} (1/godz.)	0,01	0,008	**0,005**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	60,56	82,92	**0,001**
F (%)	57,73	106,85	**<0,001**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow\infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**- średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; tmax-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**- procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości AUC0→∞; **AUC_{rest}**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego ozaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

3.2.5.3. Profil stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem oksytetracykliny

Stężenia fluralaneru w osoczu kur oznaczono indywidualnie dla każdego ptaka po podaniu oksytetracykliny w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru w dawce 0,5 mg/kg m.c. Wartości stężeń oznaczone u poszczególnych ptaków w tej grupie oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD przedstawiono w Tabeli 58. Dane dla grupy otrzymującej

wyłącznie fluralaner przedstawiono wcześniej w Tabeli 44. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner oraz w grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner, wraz z poziomami istotności statystycznej różnic, zestawiono w Tabeli 59. Profil stężenie–czas fluralaneru w obu grupach przedstawiono na Rycinie 11.

W grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner średnie stężenia fluralaneru w osoczu były wyższe niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner we wszystkich punktach czasowych, w których możliwe było porównanie obu grup (tj. z wyjątkiem ostatniego), jednak istotnie wyższe stężenia wykazano tylko w 9 punktach czasowych, czyli w około połowie analizowanych punktów. Dotyczyło to pierwszych czterech punktów czasowych, tj. od 0,5 do 2 godz., następnie wszystkich punktów czasowych od 24 do 72 godz. oraz punktu po 480 godz. W części punktów czasowych skala przewagi liczbowej była znaczna; co najmniej dwukrotnie wyższe średnie stężenia fluralaneru w grupie z oksytetracykliną odnotowano po 0,5; 1; 1,5; 2; 3 oraz 480 godz. po podaniu fluralaneru. W pozostałych punktach czasowych średnie stężenia fluralaneru w grupie z oksytetracykliną pozostawały wyższe niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner, ale nie wykazano ich istotnej statystycznie przewagi.

Tabela 58. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy X po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., oraz fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) wyrażone w ng/mL.

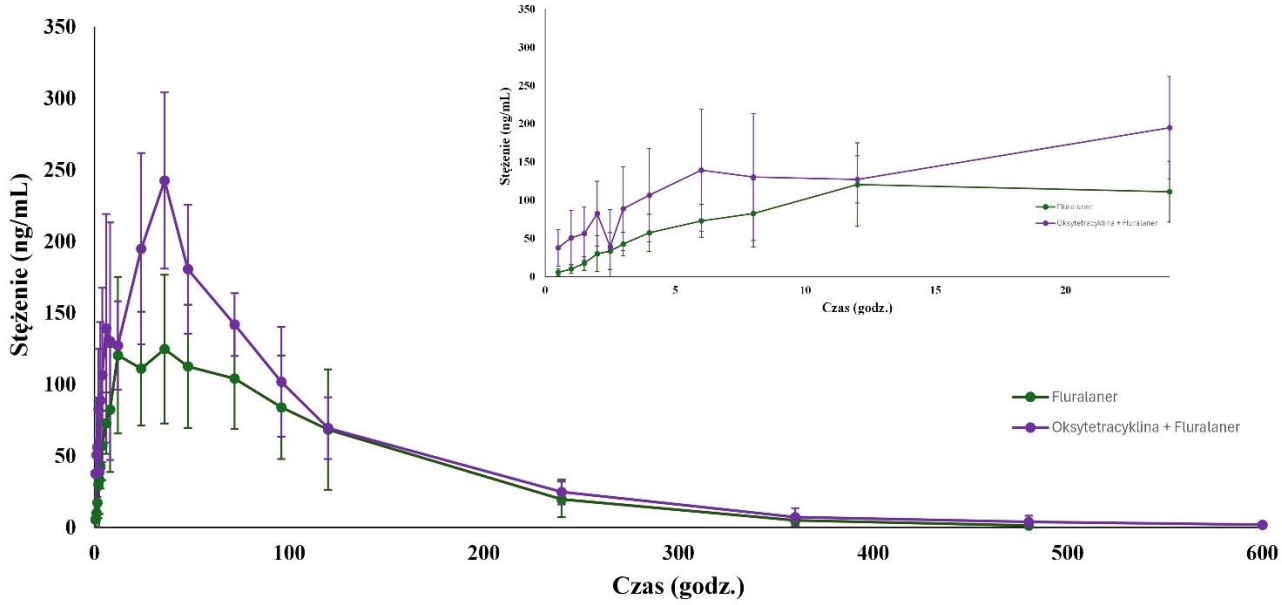
Czas pobrania (godz.)	Numer ptaka								Średnia	SD
	73	74	75	76	77	78	79	80		
0,5	40,70	1,9	79,40	18,70	49,40	48,70	19,20	43,60	**37,70**	**23,98**
1	73,70	10,0	124,30	40,0	47,50	46,90	17,30	46,70	**50,80**	**35,60**
1,5	96,10	11,0	116,20	50,10	54,60	50,60	23,10	47,50	**56,15**	**34,80**
2	111,20	13,60	124,10	72,90	110,50	101,80	22,70	102,60	**82,43**	**42,31**
2,5	111,80	14,40	122,10	12,70	13,20	15,60	5,50	15,70	**38,88**	**48,37**
3	93,10	15,40	128,50	17,10	145,70	135,90	46,40	128,70	**88,85**	**54,73**
4	106,90	32,50	140,60	22,20	165,90	165,20	58,30	160,90	**106,56**	**60,95**
6	140,0	52,80	128,10	34,0	236,60	214,70	81,80	225,80	**139,23**	**79,85**
8	24,10	85,40	130,90	40,70	226,30	218,0	93,30	223,40	**130,26**	**83,04**
12	140,90	119,70	142,60	53,20	142,40	142,80	132,40	143,0	**127,13**	**30,96**
24	137,80	143,30	245,90	73,80	240,60	237,90	229,60	249,70	**194,83**	**66,91**
36	152,90	189,90	215,10	199,70	300,50	316,10	259,50	306,30	**242,50**	**61,55**
48	270,30	148,0	186,50	111,60	180,10	173,50	194,30	180,20	**180,56**	**44,95**
72	152,10	180,90	159,50	125,10	138,50	137,40	110,80	130,50	**141,85**	**21,86**
96	150,20	156,80	99,90	101,10	88,80	92,0	34,20	91,50	**101,81**	**38,38**
120	90,10	74,40	67,10	98,60	67,30	66,30	25,20	67,0	**69,50**	**21,66**
240	36,10	24,40	24,70	37,10	15,30	14,20	18,30	28,50	**24,83**	**8,76**
360	4,0	1,60	3,20	11,90	3,70	1,80	13,90	17,80	**7,24**	**6,31**
480	2,10	0,80	1,20	13,10	2,30	0,80	7,20	3,70	**3,90**	**4,27**
600	1,30	-	0,90	3,40	1,40	-	3,0	1,50	**1,92**	**1,02**

SD – odchylenie standardowe;

Tabela 59. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic; wartości stężeń wyrażono w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Średnie stężenie fluralaneru	Średnie stężenie fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem oksytetracykliny	Poziom istotności statystycznej
0,5	5,48	37,70	**0,024**
1	10,04	50,80	**0,019**
1,5	17,33	56,15	**0,033**
2	29,88	82,43	**0,014**
2,5	33,41	38,88	-
3	42,54	88,85	-
4	57,29	106,56	-
6	72,88	139,23	-
8	82,46	130,26	-
12	120,43	127,13	-
24	111,11	194,83	**0,008**
36	124,73	242,50	**0,002**
48	112,61	180,56	**0,012**
72	104,08	141,85	**0,019**
96	84,01	101,81	-
120	68,41	69,50	-
240	19,64	24,83	-
360	4,93	7,24	-
480	1,40	3,90	**0,040**
600	-	1,917	**n.d.**

Objaśnienia: „–” oznacza brak istotnej różnicy statystycznej między porównywanymi związkami; **n.d.** – nie dotyczy, ponieważ w danym punkcie czasowym nie uzyskano oznaczalnych stężeń fluralaneru, co uniemożliwiło wyznaczenie średniego stężenia i wykonanie porównania statystycznego.



Ryc. 12. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru

3.2.5.4. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru po jego podaniu PO poprzedzonym podaniem oksytetracykliny

Parametry farmakokinetyczne fluralaneru w grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner obliczono na podstawie danych indywidualnych uzyskanych dla poszczególnych ptaków. W Tabeli 60 przedstawiono wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych wyznaczone dla indywidualnych ptaków z tej grupy oraz obliczone na ich podstawie wartości średnie i SD. Dane dotyczące parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u ptaków otrzymujących wyłącznie fluralaner drogą PO przedstawiono wcześniej w Tabeli 49. Porównanie średnich wartości parametrów farmakokinetycznych fluralaneru pomiędzy grupą otrzymującą wyłącznie fluralaner a grupą otrzymującą oksytetracyklinę i fluralaner, wraz z poziomami istotności statystycznej różnic, zestawiono w Tabeli 61.

Analiza statystyczna wykazała, że w grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner wartości C_{max} fluralaneru były istotnie wyższe niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner. W grupie tej odnotowano również istotnie wyższe wartości $AUC_{0\rightarrow t}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}$, $t_{1/2kel}$ oraz F fluralaneru. Wartość k_{el} była natomiast istotnie niższa niż w grupie otrzymującej wyłącznie fluralaner. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy obiema grupami w zakresie t_{max} oraz $MRT_{0\rightarrow t}$ i $MRT_{0\rightarrow\infty}$.

Tabela 60. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy X po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8).

Parametr farmakokinetyczny	Numer ptaka								Średnia	SD
	73	74	75	76	77	78	79	80		
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	29164,63	24517,15	25871,83	26004,87	25462,83	24725,52	21237,85	28889,32	**25734,25**	**2524,29**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	29267,09	24585,05	25936,79	26594,50	25645,81	24779,68	21724,78	29065,76	**25949,93**	**2458,35**
$AUMC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz.^{2}/L)	3123878,0	2368547,0	2381475,0	3962597,0	2186938,0	1909970,65	2500776,95	3255254,0	**2711180**	**678182,30**
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz.^{2}/L)	3196937,0	2406430,0	2427595,0	4407370,0	2325432,0	1940484,34	2869153,15	3381467,0	**2869359**	**784052**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	107,11	96,61	92,05	152,38	85,89	77,25	117,75	112,68	**105,22**	**23,43**
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	109,23	97,88	93,60	165,72	90,67	78,31	132,07	116,34	**110,48**	**27,84**
k_{el} (1/godz.)	0,009	0,013	0,009	0,006	0,006	0,012	0,006	0,008	**0,009**	**0,002**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	78,35	54,04	76,19	106,97	108,74	57,83	108,50	79,95	**83,82**	**22,14**
C_{max} (ng/mL)	270,30	189,90	245,90	199,70	300,50	316,10	259,50	306,30	**261,03**	**47,48**
t_{max} (godz.)	48,0	36,0	24,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	**36**	**6,41**
C_{last} (ng/mL)	1,30	0,80	0,90	3,40	1,40	0,8	3,0	1,50	**1,64**	**1,01**
t_{last} (godz.)	600,0	480,0	600,0	600,0	600,0	480,0	600,0	600,0	**570**	**55,55**
$AUC_{rest\%}$ (%)	0,35	0,28	0,25	2,22	0,71	0,219	2,24	0,61	**0,86**	**0,86**
AUC_{rest} (µg×godz./L)	102,46	67,90	64,97	589,63	182,98	54,16	486,93	176,44	**215,68**	**206,84**
$AUC_{(0\rightarrow tmax)}$ (µg×godz./L)	7086,10	4313,63	3862,74	2767,91	7426,39	7529,54	5943,0	7515,80	**5805,64**	**1905,28**
$AUC_{(tmax\rightarrow tlast)}$ (µg×godz./L)	22068,35	20203,05	21989,23	23236,51	18024,08	17183,81	15290,05	21362,63	**19919,71**	**2792,22**
F (%)	89,90	75,90	79,60	80,50	79,20	89,30	65,90	88,60	**81,11**	**8,15**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$AUMC_{0\rightarrow t}$**-pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do t; **$AUMC_{0\rightarrow\infty}$**- pole pod krzywą zależności iloczynu czasu i stężenia leku od czasu 0 do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **C_{last}**-ostatnie oznaczalne stężenie leku w osoczu; **t_{last}**- czas uzyskania ostatniego oznaczalnego stężenia; **$AUC_{rest\%}$**-procentowy udział pola pod krzywą stężenie-czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności w całkowitej wartości AUC0→∞; **AUC_{rest}**- pole pod krzywą stężenie–czas od ostatniego oznaczalnego stężenia do nieskończoności; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna

Tabela 61. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic.

Parametr farmakokinetyczny	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem oksytetracykliny	Poziom istotności statystycznej
C_{max} (ng/mL)	152,14	261,03	**<0,001**
t_{max} (godz.)	28,0	36,0	**-**
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	18693,89	25734,25	**<0,001**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	18887,50	25949,93	**<0,001**
$MRT_{(0-t)}$ (godz.)	99,89	105,23	**-**
$MRT_{(0-\infty)}$ (godz.)	104,15	110,48	**-**
k_{el} (1/godz.)	0,01	0,009	**0,015**
$t_{1/2kel}$ (godz.)	60,56	83,82	**0,018**
F (%)	57,73	81,11	**<0,001**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

3.2.5.5. Porównanie profilu stężenie–czas oraz parametrów farmakokinetycznych fluralaneru w grupach otrzymujących elakrydar i fluralaner oraz oksytetracyklinę i fluralaner

W niniejszym podrozdziale porównano średnie stężenia fluralaneru oraz parametry farmakokinetyczne uzyskane w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner oraz w grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner. Średnie wartości stężeń fluralaneru w kolejnych punktach czasowych oraz poziomy istotności statystycznej różnic między tymi grupami zestawiono w Tabeli 62. Profil stężenie–czas fluralaneru w obu grupach przedstawiono na

Rycinie 12, natomiast porównanie średnich wartości parametrów farmakokinetycznych zestawiono w Tabeli 63.

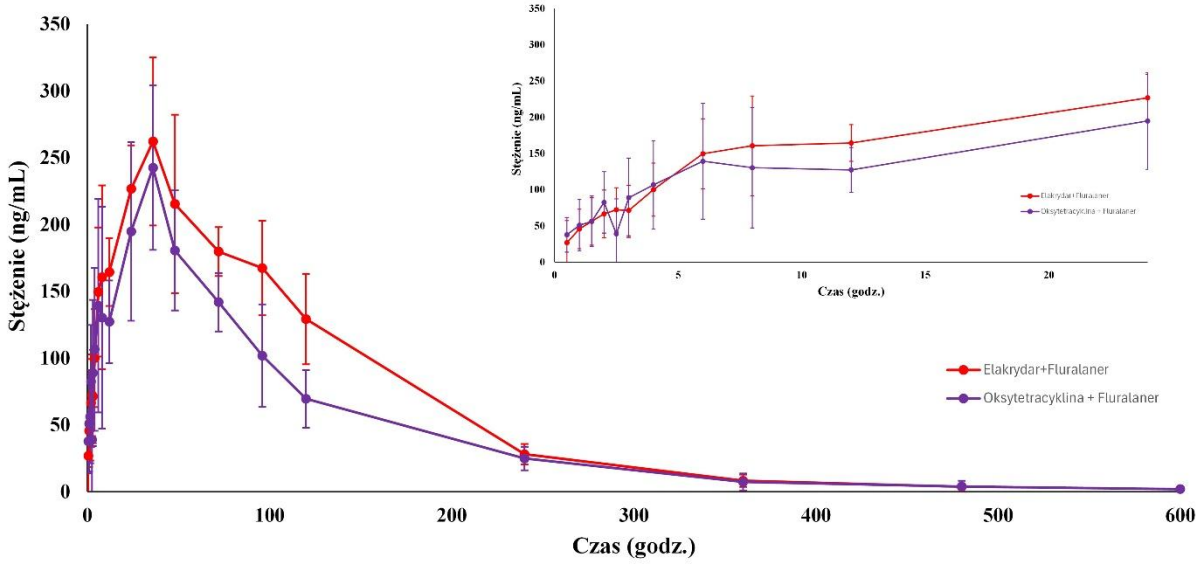
Analiza statystyczna wykazała, że w większości punktów czasowych doświadczenia średnie stężenia fluralaneru w grupie otrzymującej elakrydar i fluralaner oraz w grupie otrzymującej oksytetracyklinę i fluralaner nie różniły się istotnie statystycznie. Istotne różnice pomiędzy analizowanymi grupami wykazano jedynie w późniejszym okresie doświadczenia, tj. w trzech punktach czasowych: po 72, 96 i 120 godz. od podania fluralaneru. W tych punktach średnie stężenia fluralaneru były istotnie wyższe w grupie, w której jego podanie poprzedzono podaniem elakrydaru, niż w grupie, w której poprzedzono je podaniem oksytetracykliny. W pozostałych punktach czasowych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy analizowanymi grupami.

Analiza parametrów farmakokinetycznych wykazała, że wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz $AUC_{0\rightarrow\infty}$ były istotnie wyższe w grupie z elakrydarem niż w grupie z oksytetracykliną. Odnotowano w tej grupie również istotnie wyższą wartość F. Nie wykazano natomiast różnic istotnych statystycznie pomiędzy analizowanymi grupami w zakresie C_{max}, t_{max}, $MRT_{0\rightarrow t}$, $MRT_{0\rightarrow\infty}$, k_{el} oraz $t_{1/2kel}$.

Tabela 62. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic; wartości stężeń wyrażono w ng/mL.

Czas pobrania (godz.)	Średnie stężenie fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem elakrydaru	Średnie stężenie fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem oksytetracykliny	Poziom istotności statystycznej
0,5	26,83	37,70	-
1	45,59	50,80	-
1,5	56,03	56,15	-
2	66,49	82,43	-
2,5	72,29	38,88	-
3	71,25	88,85	-
4	99,99	106,56	-
6	149,48	139,23	-
8	160,55	130,26	-

12	164,38	127,13	**-**
24	226,69	194,83	**-**
36	262,23	242,50	**-**
48	215,39	180,56	**-**
72	179,74	141,85	**0,031**
96	167,38	101,81	**0,028**
120	129,23	69,50	**0,04**
240	28,01	24,83	**-**
360	8,20	7,24	**-**
480	3,68	3,90	**-**
600	1,28	1,917	**-**



Ryc. 13. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogąPOw dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru.

Tabela 63. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic.

Parametr farmakokinetyczny	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem elakrydaru	Średnie wartości parametrów PK fluralaneru po jego podaniu poprzedzonym podaniem oksytetracykliny	Poziom istotności statystycznej
C_{max} (ng/mL)	268,87	261,03	-
t_{max} (godz.)	32,50	36,0	-
$AUC_{0\rightarrow t}$ (µg×godz./L)	34601,29	25734,25	**0,002**
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg×godz./L)	34816,44	25949,93	**0,002**
$MRT_{0\rightarrow t}$ (godz.)	103,12	105,23	-
$MRT_{0\rightarrow\infty}$ (godz.)	106,69	110,48	-
k_{el} (1/godz.)	0,008	0,009	-
$t_{1/2kel}$ (godz.)	82,92	83,82	-
F (%)	106,85	81,11	**0,002**

$AUC_{0\rightarrow t}$-pole pod krzywą stężenie-czas od momentu podania do ostatniego oznaczalnego punktu czasowego; **$AUC_{0\rightarrow\infty}$**-pole pod krzywą stężenie–czas od momentu podania do nieskończoności; **$MRT_{0\rightarrow t}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie od czasu 0 do czasu t; **$MRT_{0\rightarrow\infty}$**-średni czas przebywania cząsteczek leku w organizmie, obliczony na podstawie stosunku AUMC0→∞ do AUC0→∞; **k_{el}**-stała szybkości eliminacji; **$t_{1/2kel}$**- biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji, określony na podstawie wartości kel; **C_{max}**-maksymalne stężenie leku w osoczu; **t_{max}**-czas osiągnięcia stężenia maksymalnego; **F**-bezwzględna dostępność biologiczna;

4. Dyskusja

4.1. Ocena i porównanie farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaner i afoksolaneru u kur niosek

4.1.1. Ocena i porównanie profili farmakokinetycznych po podaniu pochodnych izoksazolin drogą IV

Jednym z głównych celów niniejszych badań było poznanie farmakokinetyki fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek, w tym po podaniu drogą IV, oraz ustalenie, czy mimo przynależności do tej samej klasy chemicznej związki te różnią się właściwościami farmakokinetycznymi. Podanie substancji drogą IV umożliwiło bezpośrednią ocenę procesów dystrybucji i eliminacji, z pominięciem etapu wchłaniania. Uzyskane wyniki dostarczyły danych dotyczących parametrów farmakokinetycznych analizowanych związków, co umożliwiło weryfikację hipotezy, zgodnie z którą mimo zbliżonej struktury chemicznej analizowane pochodne izoksazolin wykazują odmienne profile farmakokinetyczne.

Dzięki zastosowaniu jednolitego modelu badawczego możliwe było bezpośrednie porównanie czterech pochodnych izoksazolin oraz określenie ich dostępności biologicznej przy zachowaniu identycznych warunków eksperymentalnych. Zastosowanie tego samego gatunku zwierząt, jednolitego schematu dawkowania, identycznych warunków utrzymania oraz tej samej metody analitycznej pozwoliło ograniczyć wpływ czynników metodologicznych na uzyskane wyniki. Dzięki temu obserwowane różnice można interpretować przede wszystkim jako konsekwencję właściwości badanych związków, a nie efekt odmiennych warunków prowadzenia badań. Takie podejście umożliwia bardziej wiarygodną ocenę podobieństw i różnic farmakokinetycznych pomiędzy przedstawicielami tej samej klasy chemicznej.

Przeprowadzone badania wykazały wyraźne różnice w parametrach opisujących dystrybucję analizowanych związków. Dotyczyły one przede wszystkim wartości C_{max}, V_{ss} oraz pozornej objętości dystrybucji (V_{area}). Najwyższą wartość C_{max} odnotowano dla fluralaneru, który jednocześnie charakteryzował się najniższymi wartościami V_{ss} oraz V_{area}. Może to wskazywać, że po podaniu IV fluralaner w większym stopniu pozostawał w krążeniu ogólnoustrojowym, co mogło przyczyniać się do uzyskania wyższych stężeń w osoczu. Wartości V_{ss} oraz V_{area} uzyskane dla fluralaneru w niniejszym badaniu były zbliżone do danych opisanych przez Elliota i wsp. (2024) po podaniu fluralaneru kurom drogą IV, co potwierdza umiarkowaną dystrybucje tego związku u tego gatunku. Z kolei większe wartości V_{ss} oraz V_{area} dla pozostałych izoksazolin sugerują ich większą zdolność do przenikania poza przestrzeń

naczyniową oraz intensywniejszą dystrybucję tkankową. Podobną zależność między V_{ss} a profilem stężeń obserwowano w badaniach prowadzonych u psów. Po podaniu IV, lotilaner osiągał u psów wyraźnie większe wartości V_{ss} niż fluralaner, afoksolaner i sarolaner. Analogicznie u psów lotilaner charakteryzował się większą wartością V_{ss} niż fluralaner i afoksolaner (Kilp i wsp., 2016; Letendre i wsp., 2018; Toutain i wsp., 2017). Tendencja ta pozostaje zgodna z obserwacjami uzyskanymi u kur w niniejszym badaniu, co może wskazywać na względnie większą zdolność lotilaneru do dystrybucji tkankowej u różnych gatunków.

Wartości $AUC_{0\rightarrow\infty}$ uzyskane dla fluralaneru były zbliżone do wyników opisanych przez Elliot i wsp. (2024) po podaniu fluralaneru kurom nioskom drogą IV, co może wskazywać na zbliżony przebieg procesów farmakokinetycznych obserwowanych w obu badaniach. W przypadku pozostałych pochodnych izoksazolin najwyższe wartości $AUC_{0\rightarrow\infty}$ odnotowano dla sarolaneru, natomiast najniższe dla lotilaneru. Odmienny profil obserwowano u psów, u których najwyższe wartości tego parametru uzyskiwano po podaniu IV fluralaneru, a najniższe po podaniu afoksolaneru (Letendre i wsp., 2014; Kilp i wsp., 2014). Wskazuje to, że względne różnice w ekspozycji ogólnoustrojowej poszczególnych izoksazolin mogą być zależne od gatunku.

Uzyskane wyniki dotyczące eliminacji również wskazują na wyraźne różnice między badanymi substancjami. Wartości Cl, $t_{1/2kel}$ oraz MRT fluralaneru były zgodne z wynikami uzyskanymi przez Elliot i wsp. (2024), a jednocześnie przyjmowały wartości pośrednie w porównaniu z pozostałymi izoksazolinami podawanymi kurom w niniejszym badaniu. Interesujących informacji dostarcza również porównanie uzyskanych wyników z danymi pochodzącymi od innych gatunków. Warto odnieść te wyniki do danych uzyskanych u bydła, u którego po podaniu IV fluralaneru wartość $t_{1/2kel}$ oraz MRT była wyższa niż u kur niosek, lecz jednocześnie niższa niż wartości opisywane u psów czy kotów. Natomiast V_{ss} u bydła pozostawała zbliżona do wartości opisywanych u kotów (Kilp i wsp., 2016; Berkovic i wsp., 2026). Z kolei wartości Cl obserwowane u bydła były zbliżone do wartości uzyskanych w niniejszych badanich (Berkovic i wsp., 2026). Obserwacje te wskazują, że profil farmakokinetyczny fluralaneru po podaniu IV nie układa się liniowo według prostego podziału na ptaki i ssaki, lecz może zależeć od gatunkowo swoistych mechanizmów dystrybucji i eliminacji. Spośród wszystkich analizowanych pochodnych, lotilaner charakteryzował się najwyższą wartością Cl, a jednocześnie najniższą wartością $t_{1/2kel}$ oraz MRT. Najwyższa wartość Cl uzyskana dla lotilaneru jest zgodna z krótszym czasem oznaczalności tego związku w osoczu kur niosek. Lotilaner był wykrywalny jedynie do 120. godziny po podaniu, mimo że

całkowity czas pobierania próbek wynosił 600 godzin. Po 120 godzinach jego stężenia w osoczu znajdowały się poniżej LLOQ zastosowanej metody analitycznej. Oznacza to, że eliminacja lotilaneru u kur niosek zachodziła szybciej niż eliminacja pozostałych analizowanych izoksazolin. Odwrotny profil obserwowano dla sarolaneru. Związek ten charakteryzował się najwyższą wartością $t_{1/2kel}$ oraz MRT. Sarolaner pozostawał oznaczalny aż do ostatniego punktu pobierania próbek tj. do 600. godziny po podaniu, podczas gdy pozostałe izoksazoliny nie były już w tym czasie wykrywalne. Oznacza to, że spośród wszystkich analizowanych związków sarolaner utrzymywał oznaczalne stężenia w osoczu kur niosek przez najdłuższy czas, podczas gdy lotilaner był eliminowany najszybciej. Podobnie jak w niniejszym badaniu, najwyższą wartość Cl lotilaneru obserwowano również u psów (Toutain i wsp., 2017). Natomiast w przypadku wartości MRT u psów, wyższe wartości tego parametru opisywano dla lotilaneru niż dla fluralaneru (Kilp i wsp., 2014; Toutain i wsp., 2017). Może to wskazywać, że mechanizmy odpowiedzialne za eliminację poszczególnych izoksazolin różnią się między ptakami a ssakami, a zależności obserwowane u zwierząt towarzyszących nie mogą być bezpośrednio ekstrapolowane na drób. Zróżnicowanie parametrów związanych z eliminacją poszczególnych izoksazolin u kur niosek może wynikać z odmiennych właściwości fizykochemicznych badanych cząsteczek, w tym ich lipofilności, oraz z różnic w ich podatności na procesy dystrybucji, metabolizmu i eliminacji u tego gatunku. Różnice gatunkowe mogą natomiast tłumaczyć odmienność profili farmakokinetycznych obserwowanych u kur niosek w porównaniu z danymo opisanymi u psów, kotów czy bydła.

Zaobserwowane różnice w czasie utrzymywania się oznaczalnych stężeń poszczególnych związków mogą mieć znaczenie dla przyszłych badań farmakokinetyczno-farmakodynamicznych prowadzonych u drobiu. Po określeniu zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych dla poszczególnych pochodnych izoksazolin możliwa będzie ocena, w jakim stopniu odmienne profile farmakokinetyczne mogą wpływać na długość działania oraz potencjalne schematy dawkowania. Uzyskane wyniki stanowią zatem istotną podstawę do dalszych badań nad przydatnością poszczególnych przedstawicieli tej grupy związków u ptaków.

Przeprowadzone badania wykazały, że mimo przynależności do tej samej klasy chemicznej pochodne izoksazolin wykazują istotne różnice zarówno w zakresie dystrybucji, jak i eliminacji u kur niosek. Szczególnie wyraźne rozbieżności dotyczyły czasu utrzymywania się związków w organizmie, który był najdłuższy dla sarolaneru, a najkrótszy dla lotilaneru. Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność postawionej hipotezy badawczej i wskazują, że

farmakokinetyka poszczególnych przedstawicieli tej grupy nie może być traktowana jako jednorodna, pomimo ich bliskiego pokrewieństwa strukturalnego.

Jak wskazano we wstępie, według aktualnego stanu wiedzy nie opublikowano dotąd badań, w których porównano farmakokinetykę czterech pochodnych izoksazolin po podaniu IV u jednego gatunku zwierząt, w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych. Ponadto niniejsze badanie jest pierwszym na świecie, w którym opracowano formulację przeznaczoną do podania IV czterech pochodnych izoksazolin: fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru, kurom nioskom. Opracowana formulacja stanowiła istotne narzędzie eksperymentalne, które umożliwiło przeprowadzenie badań porównawczych oraz późniejszą ocenę dostępności biologicznej po podaniu doustnym. Procedura jej przygotowania została opracowana na podstawie wytycznych dotyczących stosowania DMSO jako nośnika u zwierząt laboratoryjnych, zawartych w dokumencie Standard Operating Procedure opracowanym przez Institutional Animal Care and Use Committee (Washington State University IACUC, 2022), z uwzględnieniem wcześniejszych doniesień o wykorzystaniu DMSO jako rozpuszczalnika/nośnika w podaniu substancji drogą IV u ptaków z gatunku kury domowej *Gallus gallus domesticus* (Paudel i in., 2015; Hu i in., 2023). Zastosowanie DMSO umożliwiło skuteczne rozpuszczenie silnie lipofilnych pochodnych izoksazolin, natomiast Tween 80 pełnił funkcję środka powierzchniowo czynnego stabilizującego roztwór i ograniczającego ryzyko wytrącania substancji po podaniu IV. Dotychczas opisywane w literaturze sposoby przygotowania formulacji dożylnych nie pozwalały na uzyskanie stabilnych i jednorodnych roztworów wszystkich czterech analizowanych związków. W badaniach Elliot i wsp. (2024) oraz Enomoto i wsp. (2024), obejmujących podanie IV fluralaneru kurom nioskom, fluralaner w postaci czystego standardu analitycznego rozpuszczano w formalu glicerolu (glycerol formal, GF). Są to obecnie jedyne dostępne doniesienia dotyczące podania IV pochodnej izoksazoliny u kur niosek. Znacznie więcej danych dotyczących podania pochodnych izoksazolin drogą IV jest dostępnych dla zwierząt towarzyszących; u psów i kotów stosowano w tym celu formulacje oparte na PEG 200, PEG 400 lub tetraglikolu (Letendre i wsp., 2014; Kilp i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017). Wymienione formulacje wykorzystują rozpuszczalniki o wysokiej zdolności rozpuszczania substancji czynnych, takie jak DMSO, GF, PEG 200 czy tetraglikol, co wynika z silnej lipofilności pochodnych izoksazolin. Wspólną cechą tych rozwiązań było wykorzystanie rozpuszczalników o wysokiej zdolności solubilizacji substancji silnie lipofilnych, do których należą pochodne izoksazolin. Zastosowany w niniejszym badaniu układ DMSO-Tween 80 stanowi formulację mieszaną, łączącą właściwości rozpuszczające i stabilizujące, przy jednoczesnym ograniczeniu stężenia pojedynczego rozpuszczalnika

organicznego. Może to mieć znaczenie dla tolerancji miejscowej oraz bezpieczeństwa podania u ptaków.

Podsumowując, uzyskane wyniki dla fluralaneru pozostają zgodne z jedynymi dostępnymi doniesieniami dotyczącymi podania IV tego związku kurom nioskom (Elliot i wsp. 2024). W przypadku sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru brak jest natomiast jakichkolwiek doniesień naukowych dotyczących ich farmakokinetyki po podaniu IV u kur niosek, dlatego jedyną możliwą formą odniesienia wyników pozostaje ostrożne porównanie z danymi uzyskanymi u ssaków. Porównanie wyników uzyskanych w niniejszym badaniu z danymi literaturowymi dla psów i kotów sugeruje, że względne zależności pomiędzy poszczególnymi pochodnymi izoksazolin mogą różnić się u różnych gatunków. Oznacza to, że bezpośrednia ekstrapolacja danych farmakokinetycznych pomiędzy gatunkami może prowadzić do błędnych wniosków. Należy jednak zaznaczyć, że pochodne izoksazolin stanowią stosunkowo nową, lecz intensywnie rozwijającą się grupę leków, a brak danych dotyczących ich farmakokinetyki u drobiu stanowi istotną lukę w obecnym stanie wiedzy.

Przeprowadzone badania wypełniły istotną lukę w aktualnym stanie wiedzy, dostarczając pierwszych danych dotyczących farmakokinetyki sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru po podaniu dożylnym kurom nioskom. Jednocześnie zastosowanie jednolitego modelu eksperymentalnego umożliwiło bezpośrednie porównanie właściwości farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru po podaniu IV.

4.1.2. Ocena i porównanie profili farmakokinetycznych po podaniu pochodnych izoksazolin PO

Kolejnym celem niniejszych badań było określenie parametrów farmakokinetycznych, w tym profili stężenie–czas, fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek po podaniu PO. W przypadku sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru badania te dostarczyły pierwszych danych dotyczących ich farmakokinetyki u drobiu po podaniu PO. Zestawienie wyników uzyskanych po podaniu PO z wynikami uzyskanymi po podaniu IV umożliwiło wyznaczenie wartości F dla badanych związków. Pozwoliło to również ustalić, czy poszczególne pochodne izoksazolin różnią się nie tylko właściwościami związanymi z dystrybucją i eliminacją, lecz także stopniem wchłaniania z przewodu pokarmowego.

Porównanie wyników uzyskanych w niniejszym badaniu z danymi literaturowymi dotyczącymi fluralaneru wymaga ostrożności ze względu na istotne różnice zarówno w składzie zastosowanych formulacji, jak i sposobie podania leku. W niniejszym badaniu fluralaner podawano jednorazowo bezpośrednio do wola w postaci czystego standardu analitycznego

rozpuszczonego w DMSO i rozcieńczonego wodą dejonizowaną. Natomiast w badaniach Sari i wsp. (2022) stosowano jednorazowo w wodzie do picia preparat Exzolt, zarejestrowany dla kur zawierający m.in. glikol dietylenowo monoetylowy oraz polisorbat 80 (EMA, 2022b), zaś w badaniach Gonzales-Morales i wsp. (2023) dwukrotnie do wola podano roztwór sporządzony z produktu Bravecto, zarejestrowanego dla psów, zawierający m.in. skrobię kukurydzianą, embonian disodu, glicerol, olej sojowy oraz makrogol 3350 (EMA, 2014b). Substancje pomocnicze wchodzące w skład tych produktów pełnią funkcje technologiczne związane z poprawą rozpuszczalności, uwalniania oraz wchłaniania substancji czynnej, dlatego mogą wpływać na profil farmakokinetyczny fluralaneru, w tym na wartości jego parametrów farmakokinetycznych.

Wartości $AUC_{0\rightarrow t}$ uzyskane dla fluralaneru w niniejszym badaniu były nieznacznie niższe od wartości opisanych po podaniu tej samej dawki preparatu Bravecto (Gonzales-Morales i wsp., 2023) oraz blisko dwukrotnie niższe od uzyskanych po podaniu preparatu Exzolt (Sari i wsp., 2022). Wartości C_{max} uzyskane w niniejszym badaniu były zbliżone do obserwowanych przez Gonzales-Morales i wsp. (2023), natomiast były około dwukrotnie niższe niż wartości opisane przez Sari i wsp. (2022). Z kolei wartości t_{max} były podobne do uzyskanych przez Sari i wsp. (2022), pomimo wyraźnych różnic w osiąganych wartościach C_{max}. Odmienną sytuację obserwowano w badaniach Gonzalez-Morales i wsp. (2023), w których po podaniu preparatu Bravecto uzyskiwano znacznie niższe wartości t_{max} niż w niniejszym badaniu.

Porównując analizowane pochodne izoksazolin, najwyższe wartości AUC uzyskano dla sarolaneru, natomiast najniższe dla lotilaneru. Oznacza to, że spośród badanych związków sarolaner zapewniał największą ekspozycję ogólnoustrojową po podaniu drogą PO, podczas gdy lotilaner charakteryzował się najmniejszą ekspozycją ogólnoustrojową. Ocena analogicznych zależności u zwierząt towarzyszących jest utrudniona, ponieważ dla sarolaneru i afoksolaneru nie opublikowano pełnych danych dotyczących AUC, natomiast w przypadku fluralaneru i lotilaneru wartości tego parametru zależą od warunków podania, zwłaszcza obecności pokarmu. Niezależnie od tych różnic, wartości AUC opisywane dla zwierząt towarzyszących (Letendre i wsp., 2014; Walther i wsp., 2014; Toutain i wsp. 2017, 2018) są wyższe niż uzyskane w niniejszym badaniu. Wskazuje to, że ekspozycja ogólnoustrojowa pochodnych izoksazolin jest parametrem silnie zależnym od gatunku, formulacji oraz warunków podania.

Interpretując różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu a danymi literaturowymi dla zwierząt towarzyszących, należy również uwzględnić fakt, że w poszczególnych badaniach stosowano odmienne dawki substancji czynnych wyrażone w mg/kg

masy ciała. W większości dostępnych badań poszczególne pochodne izoksazolin podawano w dawkach wyższych od zastosowanej w niniejszej pracy (0,5 mg/kg). Chociaż wpływ wielkości dawki na wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych zależy od właściwości fizykochemicznych danego związku, czynnik ten może dodatkowo utrudniać bezpośrednie porównywanie wyników pomiędzy badaniami.

Szczególnie istotnym parametrem umożliwiającym ocenę stopnia wchłaniania substancji po podaniu pozanaczyniowym jest wartość F. Wartość ta nie mogła zostać wyznaczona przez Sari i wsp. (2022), Gonzalez-Morales i wsp. (2023) ani Elliott i wsp. (2024), ponieważ jej obliczenie wymaga porównania ekspozycji ogólnoustrojowej uzyskanej po podaniu PO oraz IV tej samej substancji. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki stanowią zatem pierwsze dane umożliwiające określenie wartości F czterech pochodnych izoksazolin u kur niosek. Dodatkową wartość przeprowadzonych badań stanowi zastosowanie identycznych dawek po podaniu drogą IV oraz PO. Umożliwiło to bezpośrednie porównanie parametrów uzyskanych po obu drogach podania. Najwyższą wartość F uzyskano dla sarolaneru, natomiast najniższą dla fluralaneru. Najwyższa wartość F uzyskana dla sarolaneru jest zgodna z tym, że związek ten osiągał również najwyższą wartość AUC po podaniu PO. Wyniki te wskazują, że badane związki różnią się efektywnością wchłaniania z przewodu pokarmowego, pomimo przynależności do tej samej klasy chemicznej. Wartości F uzyskane dla sarolaneru i afoksolaneru były zbliżone do danych opisywanych u zwierząt towarzyszących (Letendre i wsp., 2014; McTier i wsp., 2016; Toutain i wsp., 2017). W przypadku fluralaneru wartość F była wyższa niż wartości opisywane u psów przez Kilp i wsp. (2014). Z kolei dla lotilaneru wykazano bardzo silny wpływ pokarmu na wartość parametru F. Po podaniu z posiłkiem osiągała ona wartości zbliżone do 100%, natomiast na czczo wynosiła jedynie 8,4% (Toutain i wsp., 2018), co podkreśla znaczenie warunków podania dla farmakokinetyki tej cząsteczki. Wyniki te podkreślają, że warunki podania mogą w istotnym stopniu wpływać na farmakokinetykę pochodnych izoksazolin i powinny być uwzględniane podczas interpretacji danych pochodzących z różnych badań.

Analizując wszystkie badane pochodne izoksazolin, najwyższą wartość C_{max} odnotowano dla sarolaneru, który jednocześnie charakteryzował się najdłuższym t_{max}. Wskazuje to, że proces wchłaniania sarolaneru u kur niosek przebiega wolniej niż w przypadku pozostałych analizowanych związków. Pomimo osiągania najwyższych stężeń w osoczu, C_{max} sarolaneru występowało później niż w przypadku pozostałych analizowanych związków. Wyniki te sugerują, że proces absorpcji poszczególnych pochodnych izoksazolin może przebiegać odmiennie pomimo ich przynależności do tej samej grupy chemicznej. Odmienny

obraz obserwowany jest u zwierząt towarzyszących. U psów po podaniu PO najwyższe wartości C_{max} opisywano dla lotilaneru (Toutain i wsp., 2017), natomiast najniższe dla sarolaneru (McTier i wsp., 2016). Ponadto wartości t_{max} opisywane dla pochodnych izoksazolin u zwierząt towarzyszących (Letendre i wsp., 2014; Toutain i wsp., 2017; Walther i wsp., 2014a) są wyraźnie niższe niż uzyskane w niniejszym badaniu. Wydłużony t_{max} obserwowany u kur może być związany ze specyficzną budową oraz fizjologią przewodu pokarmowego ptaków, obejmującą obecność wola, żołądka mięśniowego oraz odmienną motorykę przewodu pokarmowego w porównaniu ze ssakami. Czynniki te mogą wpływać na szybkość przemieszczania treści pokarmowej oraz tempo uwalniania i absorpcji substancji czynnych. Podsumowując, dane te sugerują, że pochodne izoksazolin mogą wchłaniać się u kur niosek wolniej niż u zwierząt towarzyszących, a przebieg wchłaniania może zależeć zarówno od właściwości fizykochemicznych poszczególnych związków, jak i od odmienności budowy oraz fizjologii przewodu pokarmowego ptaków w porównaniu z ssakami.

Uzyskane w niniejszym badaniu wartości $t_{1/2kel}$ dla fluralaneru były niższe niż po podaniu preparatu Exzolt kurom nioskom w tej samej dawce (Sari i wsp., 2022), natomiast w porównaniu z preparatem Bravecto były niemal trzykrotnie niższe (Gonzalez-Morales i wsp., 2023). Spośród analizowanych pochodnych izoksazolin najwyższą wartość $t_{1/2kel}$ odnotowano dla afoksolaneru, natomiast najniższą dla lotilaneru. Jednocześnie wartości te były wielokrotnie niższe od opisywanych u psów i kotów. Niższa wartość $t_{1/2kel}$ obserwowana u drobiu może wynikać z różnic gatunkowych w zakresie metabolizmu wątrobowego oraz intensywności procesów eliminacyjnych.

Podobne zależności obserwowano dla wartości MRT. Parametr ten dla fluralaneru był niższy niż po podaniu preparatu Exzolt w tej samej dawce (Sari i wsp., 2022) oraz ponad dwukrotnie niższy niż po podaniu preparatu Bravecto (Gonzalez-Morales i wsp., 2023). Różnice te należy interpretować z uwzględnieniem opisanych wcześniej ograniczeń związanych z odmiennym składem formulacji oraz sposobem podania. Spośród analizowanych związków najwyższą wartość MRT uzyskano dla sarolaneru, natomiast najniższą dla lotilaneru. Wyniki te wskazują, że w warunkach niniejszego doświadczenia sarolaner charakteryzował się najdłuższym średnim czasem przebywania cząsteczki leku w organizmie, natomiast lotilaner najkrótszym. Na podstawie MRT po podaniu PO nie można jednak jednoznacznie określić czy obserwowano różnice wynikały z odmiennych procesów wchłaniania, dystrybucji czy eliminacji.

Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi dla psów wskazuje na odmienne zależności pomiędzy poszczególnymi pochodnymi izoksazolin. Spośród związków,

dla których dostępne są date dotyczące MRT po podaniu PO, u psów wyższe wartości tego parametru opisywano dla lotilaneru niż dla fluralaneru (Kilp i wsp., 2014; Toutain i wsp., 2017), W niniejszym badaniu obserwowano natomiast zależność odwrotną, ponieważ lotilaner charakteryzował się najniższą wartością MRT spośród wszystkich analizowanych pochodnych izoksazolin. Wyniki te wskazują, że wzajemne zależności farmakokinetycze pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej grupy mogą różnić się pomiędzy gatunkami.

Uzyskane wyniki dotyczące eliminacji również wskazują na wyraźne różnice pomiędzy analizowanymi związkami, szczególnie w odniesieniu do parametru t_{last}. Najniższą wartość tego parametru odnotowano dla lotilaneru, natomiast najwyższą dla sarolaneru. Znajduje to odzwierciedlenie w pozostałych parametrach farmakokinetycznych. Najniższe wartości $t_{1/2kel}$ oraz MRT uzyskano dla lotilaneru. Natomiast najwyższą wartość MRT obserwowano dla sarolaneru, a najwyższą wartość $t_{1/2kel}$ dla afoksolaneru. Różnice te najprawdopodobniej wynikają zarówno z odmiennej efektywności wchłaniania, jak i z różnic w szybkości eliminacji poszczególnych związków. Łącznie wyniki te wskazują, że pomimo przynależności do tej samej klasy chemicznej badane pochodne izoksazolin nie tworzą jednorodnej grupy pod względem czasu utrzymywania się w organizmie kur niosek. Obserwacje te mogą mieć znaczenie dla przyszłych badań farmakokinetyczno-farmakodynamicznych, których celem będzie określenie zależności pomiędzy stężeniem substancji a skutecznością przeciwpasożytniczą u drobiu.

Szczególną wartość przeprowadzonych badań stanowi możliwość bezpośredniego porównania czterech pochodnych izoksazolin w identycznych warunkach eksperymentalnych oraz określenie ich dostępności biologicznej na podstawie wyników uzyskanych po podaniu drogą IV oraz PO. Dzięki zastosowaniu jednolitego modelu badawczego możliwe było ograniczenie wpływu czynników metodologicznych, takich jak różnice w dawkowaniu, sposobie podania czy rodzaju zastosowanej postaci farmaceutycznej. Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność postawionej hipotezy badawczej i wskazują, że farmakokinetyka poszczególnych pochodnych izoksazolin po podaniu PO nie może być traktowana jako jednorodna, mimo ich bliskiego pokrewieństwa strukturalnego. Uzyskane dane podkreślają potrzebę odrębnej oceny właściwości farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u drobiu, ponieważ wyniki uzyskane dla tych związków u innych gatunków mogą stanowić jedynie punkt odniesienia i nie powinny być automatycznie przenoszone na kury nioski.

4.2. Ocena udziału transporterów P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek

Kluczową rolę w kształtowaniu farmakokinetyki badanych związków odgrywają ich właściwości fizykochemiczne, nie można jednak wykluczyć udziału dodatkowych mechanizmów odpowiedzialnych za transport substancji przez bariery biologiczne. Jednym z nich mogą być transportery wypływowe P-gp i BCRP, obecne między innymi w enterocytach oraz hepatocytach, gdzie uczestniczą w ograniczaniu wchłaniania substancji z przewodu pokarmowego oraz ich wydzielaniu do żółci (Borst i Elferink, 2002; Schinkel i Jonker, 2003). W niniejszych badaniach oceniano potencjalny udział P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru po podaniu PO kurom nioskom. W tym celu zastosowano elakrydar, będący silnym inhibitorem P-gp i BCRP oraz oksytetracyklinę, stanowiącą substrat tych transporterów. Takie podejście umożliwiło ocenę, czy modyfikacja aktywności transporterów wypływowych wpływa na profil farmakokinetyczny fluralaneru. Założono, że zahamowanie aktywności transporterów lub konkurencja o miejsca transportowe będą prowadzić do zmian profilu stężenie–czas, a tym samym wpłynie na parametry farmakokinetyczne fluralaneru.

Według aktualnego stanu wiedzy nie opublikowano dotychczas badań oceniających udział transporterów wypływowych w farmakokinetyce fluralaneru u drobiu. Co więcej, dostępne dane dotyczące potencjalnych interakcji pomiędzy pochodnymi izoksazolin a transporterami błonowymi są bardzo ograniczone również u innych gatunków zwierząt. Ponadto, niniejsze badanie jest pierwszym, w którym jednocześnie oceniono wpływ elakrydaru oraz oksytetracykliny na farmakokinetykę fluralaneru u kur niosek.

Pomimo braku bezpośrednich danych wskazujących na udział P-gp i BCRP w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin, podjęcie takich badań było uzasadnione kilkoma przesłankami. Izoksazoliny należą do związków silnie lipofilnych, a wiele substancji o podobnych właściwościach fizykochemicznych podlega transportowi zależnemu od transporterów wypływowych (Liu i wsp., 2011; Fong, 2015). Dodatkowo w literaturze sugerowano możliwość udziału krążenia wątrobowo-jelitowego w farmakokinetyce fluralaneru (Kilp i wsp., 2014), co pośrednio wskazuje na potencjalne znaczenie mechanizmów odpowiedzialnych za wydzielanie substancji do żółci. Chociaż przesłanki te nie stanowiły dowodu na udział transporterów wypływowych, uzasadniały ocenę ich potencjalnego znaczenia w farmakokinetyce fluralaneru u kur niosek.

Przeprowadzone badania wykazały różnice w parametrach farmakokinetycznych pomiędzy grupą otrzymującą wyłącznie fluralaner a grupami otrzymującymi odpowiednio

elakrydar i fluralaner lub oksytetracyklinę i fluralaner. Ponieważ wszystkie doświadczenia prowadzono w identycznych warunkach eksperymentalnych, obserwowane zmiany można wiązać przede wszystkim z zastosowanymi modulatorami aktywności transporterów. Zgodnie z postawioną hipotezą po zastosowaniu elakrydaru obserwowano wzrost wartości C_{max}, $AUC_{0\rightarrow t}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}$ oraz wartości F dla fluralaneru. Analogiczny kierunek zmian odnotowano również po podaniu oksytetracykliny, jednak ich zakres był mniejszy. W przypadku parametrów t_{max}, MRT średnie wartości były również wyższe po zastosowaniu obu związków, jednak różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej. Istotny wzrost stwierdzono natomiast dla $t_{1/2kel}$.

Szczególnie istotna jest obserwacja, że największe zmiany parametrów farmakokinetycznych uzyskano po zastosowaniu elakrydaru, czyli związku będącego silnym inhibitorem P-gp i BCRP. Wynik ten jest zgodny z założeniem, że aktywność transporterów wypływowych może ograniczać dostępność fluralaneru w organizmie. Gdyby transportery te nie uczestniczyły w farmakokinetyce fluralaneru, zastosowanie ich inhibitora nie powinno prowadzić do tak wyraźnych zmian wartości AUC, C_{max} czy F. Obserwacja ta sugeruje, że farmakokinetyka fluralaneru może być kształtowana nie tylko przez jego właściwości fizykochemiczne, ale również przez aktywność mechanizmów transportowych obecnych w jelicie i wątrobie.

Dane literaturowe wskazują, że oksytetracyklina jest substratem P-gp o stosunkowo niewielkim powinowactwie. W modelu Caco-2 wykazano, że hamowanie aktywności tych transporterów ogranicza transport wypływowy oksytetracykliny do światła jelita (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007). Ponadto wykazano możliwość wpływu oksytetracykliny na transport innych substratów P-gp i BCRP, takich jak rodamina-123 czy iwermektyna (Schrickx i Fink-Gremmels, 2007). W związku z tym obserwowany wzrost C_{max} i AUC fluralaneru po zastosowaniu oksytetracykliny może wynikać z konkurencji o mechanizmy transportowe obecne w nabłonku jelitowym. Ograniczenie transportu wypływowego fluralaneru mogło prowadzić do zwiększenia ilości substancji dostępnej do wchłaniania, a w konsekwencji do wzrostu jej stężeń w krążeniu.

W badaniach przeprowadzonych na szczurach jednoczesne podanie elakrydaru i feksofenadyny powodowało aż 8,6-krotny wzrost wartości AUC oraz około 5 krotny wzrost wartości C_{max} feksofenadyny (Suzuki i wsp., 2020). Podobny kierunek zmian obserwowano również w niniejszym badaniu, gdzie zastosowanie elakrydaru prowadziło do większego wzrostu ekspozycji ogólnoustrojowej fluralaneru niż podanie oksytetracykliny. Stanowi to

dodatkową przesłankę wskazującą na udział transporterów wypływowych w kształtowaniu farmakokinetyki fluralaneru.

Interpretując uzyskane wyniki należy jednak uwzględnić, że obserwowane zmiany parametrów farmakokinetycznych nie muszą wynikać wyłącznie z wpływu na proces absorpcji jelitowej. Zarówno P-gp, jak i BCRP są obecne również w hepatocytach, gdzie uczestniczą w wydzielaniu substancji do żółci (Borst i Oude Elferink, 2002). Nie można zatem wykluczyć, że część obserwowanych zmian była związana również z wpływem na procesy eliminacyjne, a pośrednio także na mechanizmy związane z krążeniem wątrobowo-jelitowym. Na podstawie przeprowadzonych badań nie jest jednak możliwe określenie udziału procesów zachodzących w jelicie i wątrobie.

Uzyskane wyniki mają znaczenie nie tylko dla lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za farmakokinetykę fluralaneru, ale również dla przewidywania potencjalnych interakcji lekowych. Szczególnie interesujące są obserwacje dotyczące oksytetracykliny, ponieważ w przeciwieństwie do elakrydaru jest ona substancją wykorzystywaną w praktyce weterynaryjnej, w tym w hodowli kur niosek. Otrzymane wyniki sugerują, że jednoczesne stosowanie substancji oddziałujących z transporterami wypływowymi może prowadzić do zmian stężeń fluralaneru w organizmie. Chociaż zakres tych zmian był umiarkowany, obserwacje te wskazują na możliwość występowania interakcji farmakokinetycznych, które mogą mieć znaczenie praktyczne i wymagają dalszej oceny.

Należy jednocześnie podkreślić, że aktywność transporterów błonowych może wykazywać istotne różnice gatunkowe, a obserwacja zmian parametrów farmakokinetycznych w modelu *in vivo* pozwala jedynie na pośrednie wnioskowanie o ich udziale. Ostateczne potwierdzenie znaczenia P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru wymagałoby zastosowania bardziej swoistych modeli eksperymentalnych, w tym badań komórkowych lub badań wykorzystujących selektywne inhibitory transporterów.

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że P-gp i BCRP mogą uczestniczyć w kształtowaniu farmakokinetyki fluralaneru u kur niosek. Obserwowany po zastosowaniu elakrydaru, a w mniejszym stopniu także oksytetracykliny, wzrost wartości AUC, C_{max} oraz F sugeruje udział transporterów wypływowych w kształtowaniu ekspozycji ogólnoustrojowej fluralaneru. Wyniki te stanowią pierwsze przesłanki wskazujące na znaczenie mechanizmów transportowych w farmakokinetyce pochodnych izoksazolin u drobiu. Jednocześnie otwierają nowy kierunek badań nad potencjalnym udziałem transporterów wypływowych w farmakokinetyce innych przedstawicieli tej grupy oraz nad możliwością występowania interakcji lekowych o znaczeniu praktycznym w medycynie weterynaryjnej.

4.3. Ocena efektów optymalizacji i rewalidacji metody UPLC-MS/MS do jednoczesnego oznaczania pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek

Kolejnym celem przeprowadzonych badań była optymalizacja i rewalidacja metody oznaczania pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek, stanowiącej narzędzie niezbędne do realizacji badań farmakokinetycznych opisanych w niniejszej dysertacji. Na potrzeby projektu zoptymalizowano i zrewalidowano metodę opisaną wcześniej w badaniach własnych (Markowska-Buńka i wsp., 2025). Należy podkreślić, że celem tej części pracy nie było opracowanie metody analitycznej od podstaw, lecz rozwinięcie wcześniej opracowanej procedury oraz dostosowanie jej do jednoczesnego oznaczania czterech pochodnych izoksazolin: fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru.

Według aktualnego stanu wiedzy nie opublikowano dotychczas doniesień dotyczących wieloskładnikowej metody umożliwiającej jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu, w tym u kur niosek, z wykorzystaniem techniki UPLC-MS/MS. Dotychczasowe metody obejmowały przede wszystkim oznaczanie pojedynczych związków w różnych matrycach biologicznych (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; Toutain i wsp., 2017), natomiast w pracy Markowska-Buńka i wsp., (2025) fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner oznaczano oddzielnie w analizach jednoskładnikowych. Cui i wsp. (2024) w swoich badaniach opisali metodę oznaczania fluralaneru w jajach. Z kolei Wu i wsp. (2023) przedstawili metodę wieloskładnikową umożliwiającą jednoczesne oznaczanie pochodnych izoksazolin w tkankach zwierzęcych, jednak nie została ona opracowana ani zwalidowana do zastosowań farmakokinetycznych wymagających oznaczania tych związków w osoczu zwierząt.

W związku z tym należy podkreślić, że opracowana i zwalidowana procedura stanowi pierwszą metodę umożliwiającą jednoczesną analizę fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek. Kluczowym elementem optymalizacji było dostosowanie warunków detekcji do jednoczesnej analizy wszystkich badanych związków. W przeciwieństwie do wcześniejszej metody wykorzystującej źródło jonizacji ESI (Markowska-Buńka i wsp., 2025), w niniejszym badaniu zastosowano jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Zmiana ta wymagała ponownego określenia parametrów spektrometru mas dla wszystkich analizowanych substancji oraz przeprowadzenia szczegółowej optymalizacji przejść MRM dla poszczególnych analitów i standardu wewnętrznego. Pomimo, że większość opublikowanych metod oznaczania pochodnych izoksazolin wykorzystuje źródło ESI, zastosowanie APCI umożliwiło uzyskanie odpowiednich

parametrów selektywności, czułości i efektu matrycy w opracowanej metodzie wieloskładnikowej. Miało to szczególne znaczenie w przypadku opracowanej metody, wykorzystującej uproszczone przygotowanie próbek biologicznych. Przyjęte warunki detekcji umożliwiły opracowanie wieloskładnikowej metody analitycznej przy zachowaniu odpowiednich parametrów walidacyjnych.

Istotnym elementem optymalizacji było zastosowanie znakowanego izotopowo IS czyli lotilaneru-D4. W większości opublikowanych metod wykorzystywano nieznakowane analogi strukturalne (Letendre i wsp., 2014, 2016; Toutain i wsp., 2017; Padivitage i wsp., 2021; Sari i wsp., 2022; Morgan i wsp., 2025) lub nie raportowano zastosowania IS (Kilp i wsp., 2016; Bernigaud i wsp., 2018; Enomoto i wsp., 2025). Zastosowanie lotilaneru-D4 było korzystne, ponieważ jako znakowany izotopowo standard wewnętrzny nie występuje endogennie w badanej matrycy biologicznej i może ograniczać część zmienności związanej z przygotowaniem próbki oraz oznaczeniem. Wykorzystanie lotilaneru-D4 umożliwiło uzyskanie odpowiednich parametrów dokładności i precyzji w opracowanej metodzie wieloskładnikowej. Chociaż zastosowanie indywidualnych standardów izotopowych dla każdego analitu stanowiłoby rozwiązanie optymalne, użycie jednego znakowanego izotopowo standardu wewnętrznego pozwoliło zachować prostotę procedury analitycznej.

Metoda przygotowania próbek osocza została zaadaptowana na podstawie procedury opisanej wcześniej przez Markowska-Buńka i wsp. (2025) i opierała się na prostym etapie wytrącania białek mieszaniną zawierającą 96% acetonitrylu i 4% wodorotlenku amonu. W dostępnej literaturze do przygotowania próbek biologicznych najczęściej wykorzystywano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) (Kilp i wsp., 2014; Letendre i wsp., 2014; Walther i wsp., 2014c; Elliott i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2025) lub klasyczną precypitację białek z użyciem acetonitrylu (Wu i wsp., 2023; Toutain i wsp., 2018; Crean i wsp., 2024; Morgan i wsp., 2025). Zastosowana procedura pozwoliła na uproszczenie etapu przygotowania próbek przy jednoczesnym zachowaniu odpowiednich parametrów analitycznych. Ograniczenie liczby etapów przygotowania próbki mogło dodatkowo zmniejszyć ryzyko błędów analitycznych oraz skrócić czas niezbędny do wykonania oznaczeń. Pomimo uproszczonego przygotowania próbek uzyskano odpowiednie parametry selektywności, czułości i efektu matrycy w opracowanej metodzie.

W związku z wprowadzonymi modyfikacjami przeprowadzono rewalidację metody w zakresie liniowości, dokładności i precyzji, LOD, LLOQ, efektu przenoszenia, odzysku analitów, selektywności oraz efektu matrycy. Rozdział chromatograficzny prowadzono z wykorzystaniem kolumny Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl (100 × 2,1 mm; 1,7 µm), co

umożliwiło uzyskanie odpowiedniej symetrii pików chromatograficznych oraz wysokiej intensywności sygnału dla wszystkich analizowanych związków. Chociaż w dostępnej literaturze opisywano zastosowanie kolumn chromatograficznych opartych na chemii C18 lub fenylowej (Crean i wsp., 2024; Enomoto i wsp., 2025; Morgan i wsp., 2025), wykorzystanie fazy Fluoro-Phenyl zapewniło wysoką selektywność wobec badanych pochodnych izoksazolin oraz pozwoliło na jednoczesne oznaczanie wszystkich czterech związków w jednym ciągu analitycznym.

Na tle dostępnych doniesień opracowana metoda łączy kilka istotnych cech: umożliwia jednoczesne oznaczanie czterech pochodnych izoksazolin, wykorzystuje znakowany izotopowo IS, opiera się na uproszczonym przygotowaniu próbek oraz zapewnia odpowiednie parametry walidacyjne. Celem opracowanej procedury nie było uzyskanie możliwie najniższych granic oznaczalności dla pojedynczego analitu, lecz stworzenie uniwersalnego narzędzia umożliwiającego jednoczesne oznaczanie czterech pochodnych izoksazolin w osoczu na potrzeby badań farmakokinetycznych. Dzięki temu została wykorzystana do realizacji wszystkich badań przedstawionych w niniejszej dysertacji. Jednoczesna analiza fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w jednej procedurze analitycznej umożliwiła uzyskanie wyników porównywalnych metodologicznie, stanowiących podstawę do oceny różnic farmakokinetycznych pomiędzy badanymi związkami oraz wpływu transporterów wypływowych na farmakokinetykę fluralaneru u kur niosek.

5. Wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiły ocenę farmakokinetyki wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek, ocenę wpływu modulacji transporterów wypływowych na farmakokinetykę fluralaneru oraz optymalizację i rewalidację metody analitycznej wykorzystywanej do oznaczania tych związków w osoczu. Wyniki tych badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Fluralaner, sarolaner, lotilaner i afoksolaner, mimo bliskiego pokrewieństwa strukturalnego, nie stanowią u kur niosek jednorodnej grupy farmakokinetycznej, lecz różnią się w zakresie wchłaniania, dystrybucji i eliminacji. Sarolaner wykazuje największą ekspozycję ogólnoustrojową i najdłuższy średni czas przebywania w organizmie, natomiast lotilaner charakteryzuje się najszybszą eliminacją.
2. Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizmy transportu wypływowego mogą uczestniczyć w kształtowaniu dostępności biologicznej i profilu farmakokinetycznego fluralaneru.
3. Zwalidowana wieloskładnikowa metoda UPLC-MS/MS umożliwia jednoczesne oznaczanie fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur niosek, co pozwala na prowadzenie porównawczych badań farmakokinetycznych tych związków.

Implikacje kliniczne: Uzyskane wyniki wskazują, że pochodne izoksazolin charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami farmakokinetycznymi u kur niosek, co sugeruje konieczność indywidualnej oceny każdej substancji przed rozważaniem jej potencjalnego zastosowania u tego gatunku. Dane dotyczące ekspozycji ogólnoustrojowej po podaniu PO oraz czasu utrzymywania się oznaczalnych stężeń w osoczu stanowią przesłankę do dalszej oceny przydatności poszczególnych pochodnych izoksazolin w zwalczaniu pasożytów zewnętrznych drobiu, w szczególności *D. gallinae*. Uzyskane wyniki dostarczają również podstaw do projektowania przyszłych badań dotyczących skuteczności, bezpieczeństwa stosowania oraz wyznaczania okresów karencji dla tej grupy związków u drobiu. Obserwowany wpływ substancji modulujących aktywność transporterów wypływowych na farmakokinetykę fluralaneru uzasadnia dalszą ocenę możliwości występowania interakcji farmakokinetycznych pomiędzy pochodnymi izoksazolin a innymi substancjami stosowanymi w praktyce weterynaryjnej. Obserwowany wpływ substancji modulujących aktywność transporterów wypływowych na farmakokinetykę fluralaneru uzasadnia dalszą ocenę możliwości

występowania interakcji farmakokinetycznych pomiędzy pochodnymi izoksazolin a innymi substancjami stosowanymi w praktyce weterynaryjnej. Wyniki te rozszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów odpowiedzialnych za farmakokinetykę pochodnych izoksazolin oraz mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad znaczeniem transporterów wypływowych u drobiu i innych gatunków zwierząt.

Kierunki dalszych badań: W przyszłości zasadne wydaje się przeprowadzenie badań obejmujących: ocenę skuteczności klinicznej poszczególnych pochodnych izoksazolin w zwalczaniu *D.gallinae* w warunkach eksperymentalnych i fermowych; określenie poziomów pozostałości fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w tkankach oraz produktach pochodzenia zwierzęcego, w szczególności w jajach; dalsze badania nad udziałem transporterów P-gp i BCRP w farmakokinetyce fluralaneru, z wykorzystaniem bardziej swoistych modeli eksperymentalnych; ocenę potencjalnych interakcji farmakokinetycznych pomiędzy pochodnymi izoksazolin a innymi substancjami powszechnie stosowanymi w produkcji drobiarskiej; określenie mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane różnice farmakokinetyczne pomiędzy poszczególnymi pochodnymi izoksazolin oraz pomiędzy gatunkami zwierząt.

6. Spis rycin

Ryc. 1. Budowa chemiczna fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru oraz afoksolaneru (Markowska-Buńka i wsp., 2026)..... 31

Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie potencjalnego wpływu modulacji aktywności transporterów wypływowych P-gp i BCRP na farmakokinetykę fluralaneru po podaniu PO u kur niosek; (A) Fluralaner podany samodzielnie może podlegać aktywnemu transportowi zwrotnemu zależnemu od P-gp i BCRP, co może ograniczać jego wartość F. (B) W obecności elakrydaru, inhibitora P-gp i BCRP, dochodzi do zahamowania aktywności tych transporterów, co może skutkować zmniejszeniem wypływu fluralaneru i zwiększeniem jego przenikania do krążenia ogólnoustrojowego. (C) Jednoczesne podanie fluralaneru i oksytetracykliny, będącej potencjalnym substratem P-gp i BCRP, może prowadzić do konkurencji o transport zależny od tych transporterów, a tym samym ekspozycję ogólnoustrojową fluralaneru. (D) Schematycznie przedstawiono potencjalne procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji (ADME) fluralaneru u kur niosek. Ze względu na ograniczoną wiedzę dotyczącą szczegółowych szlaków metabolicznych i eliminacyjnych u tego gatunku schemat ma charakter poglądowy.. 54

Ryc. 3. Schemat doświadczeń: układ grup, dawkowanie badanych substancji oraz harmonogram pobierania próbek. 62

Ryc. 4. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna fluralaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL .79

Ryc. 5. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna sarolaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL. 79

Ryc. 6. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna lotilaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL... 80

Ryc. 7. Reprezentatywna krzywa kalibracyjna afoksolaneru w zakresie stężeń 1-2500 ng/mL. 80

Ryc. 8. Reprezentatywne chromatogramy MRM (UPLC-MS/MS) pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek, nałożone chromatogramy fluralaneru (RT tj. czas retencji 2,09 min), sarolaneru (RT 2,23 min), lotilaneru (RT 2,36 min), afoksolaneru (RT 2,51 min) w jednym przebiegu analitycznym..... 81

Ryc. 9. Profil stężenie–czas fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony profil stężenie–czas w przedziale 0,083-12 godz. po podaniu. 101

Ryc. 10. Profil stężenie–czas fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8).

Wstawka przedstawia powiększony profil stężenie–czas w przedziale 0,5-24 godz. po podaniu. 114
Ryc. 11. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru. 124
Ryc. 12. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru 131
Ryc. 13. Porównanie profili stężenie–czas fluralaneru w osoczu kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (średnia ± SD; n = 8). Wstawka przedstawia powiększony fragment profili stężenie–czas w przedziale 0,5–24 godz. po podaniu fluralaneru.. 136

7. Spis tabel

Tabela 1. Wybrane parametry chemiczne i fizykochemiczne pochodnych izoksazolin. 32
Tabela 2. Parametry pracy tandemowego spektrometru mas zastosowane do oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru, afoksolaneru oraz lotilaneru-D4 jako IS. 66
Tabela 3. Parametry pracy chromatografu cieczowego zastosowane do oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru oraz lotilaneru-D4 jako IS. 67
Tabela 4. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania fluralaneru w osoczu ptaków. 75
Tabela 5. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania sarolaneru w osoczu ptaków. 76
Tabela 6. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania lotilaneru w osoczu ptaków. 77
Tabela 7. Wyniki oceny liniowości metody oznaczania afoksolaneru w osoczu ptaków. 78
Tabela 8. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL). 81
Tabela 9. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL). 82
Tabela 10. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL). 82
Tabela 11. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie LLOQ (1 ng/mL). 83
Tabela 12. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie LQC (25 ng/mL). 83
Tabela 13. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie LQC (25 ng/mL). 83
Tabela 14. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie LQC (25 ng/mL). 84
Tabela 15. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie LQC (25 ng/mL). 84
Tabela 16. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie IQC (500 ng/mL). 85
Tabela 17. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie IQC (500 ng/mL). 85
Tabela 18. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie IQC (500 ng/mL). 85
Tabela 19. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie IQC (500 ng/mL). 86
Tabela 20. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL). 86
Tabela 21. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL). 87
Tabela 22. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL). 87
Tabela 23. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie MQC (1500 ng/mL). 88
Tabela 24. Wyniki oznaczeń fluralaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL). 88
Tabela 25. Wyniki oznaczeń sarolaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL). 88
Tabela 26. Wyniki oznaczeń lotilaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL). 89
Tabela 27. Wyniki oznaczeń afoksolaneru na poziomie HQC (2500 ng/mL). 89
Tabela 28. LOD dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru dla S/N ≥ 3:1. 90
Tabela 29. LLOQ dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru. 90

Tabela 30. Wyniki oceny efektu przenoszenia dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru. 91
Tabela 31. Wyniki oceny odzysku fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru z matrycy biologicznej. 92
Tabela 32. Wyniki oceny selektywności metody oznaczania fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu ptaków. 93
Tabela 33. Wyniki efektu matrycy dla fluralaneru, sarolaneru, lotilaner i afoksolaneru na dwóch poziomach kontroli jakości: LLOQ i HQC. 93
Tabela 34. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy I po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 96
Tabela 35. Stężenia sarolaneru w osoczu kur z grupy II po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 97
Tabela 36. Stężenia lotilaneru w osoczu kur z grupy III po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 98
Tabela 37. Stężenia afoksolaneru w osoczu kur z grupy IV po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 99
Tabela 38. Porównanie średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy I–IV). 100
Tabela 39. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy I po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8). 103
Tabela 40. Parametry farmakokinetyczne sarolaneru u kur z grupy II po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8). 104
Tabela 41. Parametry farmakokinetyczne lotilaneru u kur z grupy III po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8). 105
Tabela 42. Parametry farmakokinetyczne afoksolaneru u kur z grupy IV po jego podaniu drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8) 106
Tabela 43. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą IV w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy I-IV). 107
Tabela 44. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy V po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 109
Tabela 45. Stężenia sarolaneru w osoczu kur z grupy VI po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 110

Tabela 46. Stężenia lotilaneru w osoczu kur z grupy VII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 111
Tabela 47. Stężenia afoksolaneru w osoczu kur z grupy VIII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL..... 112
Tabela 48. Porównanie średnich stężeń fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru w osoczu kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy V–VIII). 113
Tabela 49. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy V po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8). 116
Tabela 50. Parametry farmakokinetyczne sarolaneru u kur z grupy VI po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8)..... 117
Tabela 51. Parametry farmakokinetyczne lotilaneru u kur z grupy VII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8)..... 118
Tabela 52. Parametry farmakokinetyczne afoksolaneru u kur z grupy VIII po jego podaniu drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8)..... 119
Tabela 53. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur po podaniu każdego z tych związków drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (grupy V–VIII). 120
Tabela 54. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy IX po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 122
Tabela 55. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c.; wartości stężeń wyrażono w ng/mL..... 123
Tabela 56. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy IX po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c. oraz fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c., (n = 8). 126
Tabela 57. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu elakrydaru drogą POw dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic. 127
Tabela 58. Stężenia fluralaneru w osoczu kur z grupy X po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., oraz fluralaner w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8), wyrażone w ng/mL. 129

Tabela 59. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic; wartości stężeń wyrażono w ng/mL. 130
Tabela 60. Parametry farmakokinetyczne fluralaneru u kur z grupy X po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c. a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. (n = 8). 133
Tabela 61. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu wyłącznie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic. 134
Tabela 62. Porównanie średnich stężeń fluralaneru w osoczu kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic; wartości stężeń wyrażono w ng/mL..... 135
Tabela 63. Porównanie parametrów farmakokinetycznych fluralaneru u kur po podaniu elakrydaru drogą PO w dawce 100 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c. oraz po podaniu oksytetracykliny drogą PO w dawce 25 mg/kg m.c., a następnie fluralaneru drogą PO w dawce 0,5 mg/kg m.c., wraz z poziomami istotności statystycznej różnic. 137

8. Piśmiennictwo

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 39, 361–398. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. (2023). Flexolt Oral Lice Treatment for Sheep with any Length of Wool (APVMA No. 91565): Registration of 10 g/L fluralaner lousicide oral solution for sheep. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. https://www.apvma.gov.au/news-and-publications/newsletters/veterinary-medicines-regulatory-newsletter-july-2023

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. (2024). Trade advice notice on fluralaner in the product Exzolt Pour-On for Cattle for use on cattle. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. https://www.apvma.gov.au/sites/default/files/2024-06/Trade%20Advice%20Notice%20on%20fluralaner%20in%20the%20product%20Exzolt%20Pour-on%20for%20Cattle%20for%20use%20on%20cattle.pdf

Barnes, D. M. (2001). Expression of P-glycoprotein in the chicken. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 130(2), 301–310. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00389-0

Baynes, R. E., Dix, K. J., & Riviere, J. E. (2018). Distribution and pharmacokinetic models. In J. E. Riviere & M. G. Papich (Eds.), Veterinary pharmacology and therapeutics (10th ed., pp. 117–145). Elsevier.

Becskei, C., Geurden, T., Liebenberg, J., Cuppens, O., Mahabir, S.P., Six, R.H. (2016a). Comparative speed of kill of oral treatments with Simparica (sarolaner) and Bravecto (fluralaner) against induced infestations of *Rhipicephalus sanguineus* on dogs. Parasites Vectors 9, 103 https://doi.org/10.1186/s13071-016-1376-x

Becskei, C., De Bock, F., Illambas, J., Cherni, J. A., Fourie, J. J., Lane, M., Mahabir, S. P., & Six, R. H. (2016b). Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (Simparica™), for the treatment of sarcoptic mange in dogs. Veterinary Parasitology, 222, 56–61. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.017

Becskei, C., Kryda, K., Fias, D. et al. Field efficacy and safety of a novel oral chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against naturally acquired gastrointestinal nematode infections in dogs presented as veterinary patients in

Europe and the USA. Parasites Vectors 13, 70 (2020). https://doi.org/10.1186/s13071-020-3947-0

Berkovic, A., Canton, L., Gramuglia, V., Lanusse, C., Alvarez, L., & Moreno, L. (2026). Fluralaner, an innovative ectoparasiticide for use in cattle: UFLC–MS/MS method development and validation for its pharmacokinetic characterization. Veterinary Research Communications, 50, 263. https://doi.org/10.1007/s11259-026-11193-5

Bernigaud, C., Fang, F., Fischer, K., Lespine, A., Aho, L. S., Mullins, A. J., Tecle, B., & Guillot, J. (2018). Efficacy and pharmacokinetics evaluation of a single oral dose of afoxolaner against *Sarcoptes scabiei* in the porcine scabies model for human infestation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(9), e02334-17. https://doi.org/10.1128/AAC.02334-17

Berny, P. J., Belhadj, D., España, B., & Lécu, A. (2024). Fecal elimination of fluralaner in different carnivore species after oral administration. Frontiers in Veterinary Science, 11, 1279844. https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1279844

Berny, P. J., España, B., Auré, J., & Cado, J. (2026). Prolonged fecal elimination of isoxazoline antiparasitic drugs in dogs and cats: Is there a risk for nontarget species? Environmental Toxicology and Chemistry, 45(2), 490–499. https://doi.org/10.1093/etojnl/vgaf285

Beugnet, F., & Franc, M. (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. Trends in Parasitology, 28(7), 267–279. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.04.004

Bihorel, S., Camenisch, G., Lemaire, M., & Scherrmann, J. M. (2007). Modulation of the brain distribution of imatinib and its metabolites in mice by valspodar, zosuquidar and elacridar. Pharmaceutical Research, 24(9), 1720–1728. https://doi.org/10.1007/s11095-007-9278-4

Borst, P., & Oude Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. Annual Review of Biochemistry, 71, 537–592. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055

Brauneis, M. D., Zoller, H., Williams, H., Zschiesche, E., & Heckeroth, A. R. (2017). The acaricidal speed of kill of orally administered fluralaner against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) on laying hens and its impact on mite reproduction. Parasites & Vectors, 10, 594. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2534-5

Cavalleri, D., Murphy, M., Gorbea, R.L., Seewald, W., Drake, J., Nanchen, S. (2017a). Laboratory evaluations of the immediate and sustained effectiveness of lotilaner

(Credelio™) against three common species of ticks affecting dogs in Europe. Parasites Vectors 10, 527 https://doi.org/10.1186/s13071-017-2477-x

Cavalleri, D., Murphy, M., Seewald, W., Drake, J., Nanchen, S. (2017b). Two randomized, controlled studies to assess the efficacy and safety of lotilaner (Credelio™) in preventing *Dermacentor reticulatus* transmission of *Babesia canis* to dogs. Parasites Vectors 10, 520 https://doi.org/10.1186/s13071-017-2473-1

Chen, C. H. (2012). Lipophilic foreign compounds. In Activation and detoxification enzymes (pp. 17–37). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1049-2_2

Chen, T., Wang, L., Zhang, Y., Zhang, M., Chen, Z., Zhang, S., Lang, F., & Hao, Z. (2026). Residue depletion and withdrawal period determination of fluralaner in edible tissues and eggs following oral administration in laying hens. Poultry Science, 105(8), 106899. https://doi.org/10.1016/j.psj.2026.106899

Cooper, H. M. (2023). Environmental toxicity of isoxazoline drugs on non-target species (Master's thesis, University of North Dakota). ProQuest Dissertations & Theses Global. (30573109). https://www.proquest.com/openview/f4d0332338ed474b5d119a68fd169c04/1?cbl=18750&diss=y&pq-origsite=gscholar

Crean, C. S., Yeu, E., Maiti, S., & Neervannan, S. (2024). Ocular and systemic pharmacokinetics of lotilaner ophthalmic solution, 0.25%, following a single dose or repeated doses in Dutch-belted rabbits. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. Advance online publication. https://doi.org/10.1089/jop.2024.0074

Cui, C., Jiao, X., Xu, X., Gong, J., Zhou, J., Tian, G., Lu, L., Li, L., & Huang, X. (2024). Determination of fluralaner residues in eggs by LC-MS/MS and laying hen withdrawal trial. Journal of Food Composition and Analysis, 128, 106071. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106071

Curtis, M. P., Vaillancourt, V., Goodwin, R. M., Chubb, N. A. L., Howson, W., McTier, T. L., Pullins, A., Zinser, E. W., Meeus, P. F. M., Woods, D. J., Hedges, L., Stuk, T., Price, J. E., Koch, J. D., & Menon, S. R. (2016). Design and synthesis of sarolaner, a novel, once-a-month, oral isoxazoline for the control of fleas and ticks on dogs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26(7), 1831–1835. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.027

Dahan, A., & Miller, J. M. (2012). The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. AAPS Journal, 14(2), 244–251. https://doi.org/10.1208/s12248-012-9337-6

Dash, R. P., Jayachandra Babu, R., & Srinivas, N. R. (2017). Therapeutic potential and utility of elacridar with respect to P-glycoprotein inhibition: An insight from the published in vitro, preclinical and clinical studies. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 42(6), 915–933. https://doi.org/10.1007/s13318-017-0411-4

Dawson, R. J. P., & Locher, K. P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. Nature, 443(7108), 180–185. https://doi.org/10.1038/nature05155

Dorrestein, G. M., & van Miert, A. S. J. P. A. M. (1988). Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 11(1), 33–44. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1988.tb00118.x

Drag, M., Saik, J., Harriman, J., & Larsen, D. (2014). Safety evaluation of orally administered afoxolaner in 8-week-old dogs. Veterinary Parasitology, 201(3–4), 198–203. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.022

Drag, M., Saik, J., Harriman, J., Letendre, L., Yoon, S., & Larsen, D. (2017). Safety evaluation of orally administered afoxolaner and milbemycin oxime in eight-week-old dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 40(5), 447–453. https://doi.org/10.1111/jvp.12375

Drag, M., Saik, J., Harriman, J., Larsen, D., Hedges, L., & Trepanier, L. A. (2022). Safety of oral afoxolaner formulated with or without milbemycin oxime in homozygous MDR1-deficient collie dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 45(1), 90–97. https://doi.org/10.1111/jvp.13064

Edelmann, H. M. L., Duchek, P., Rosenthal, F. E., Föger, N., Glackin, C., Kane, S. E., & Kuchler, K. (1999). Cmdr1, a chicken P-glycoprotein, confers multidrug resistance and interacts with estradiol. Biological Chemistry, 380(2), 231–241. https://doi.org/10.1515/BC.1999.031

Elliot, B. A., Enomoto, H., Petritz, O., Crespo, R., Yeatts, J., Fricke, I., Singleton, A., Thomson, A., & Baynes, R. E. (2024). Pharmacokinetics of intravenously and trans-dermally administered fluralaner in healthy laying shaver hens: Fluralaner in chickens. Poultry Science, 103(3), 103362. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103362

Enomoto, H., Elliot, B. A., Petritz, O. A., Crespo, R., Yeatts, J., Sheela, F. F., Fricke, I., Singleton, A., Thomson, A., & Baynes, R. E. (2024). Residue, distribution and depletion of fluralaner in egg following a single intravenous and transdermal administration in healthy shaver hens: Fluralaner residue in egg. Poultry Science, 103(7), 103843. https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103843

Enomoto, H., Crespo, R., Neumann, L. M., Shamoun, K., Yeatts, J., & Baynes, R. E. (2025). Distribution of fluralaner in plasma and liver in broiler breeder hens and roosters following the administration of fluralaner (Bravecto®) via medicated drinking water. Poultry Science, 104(12), 105902. https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105902

European Medicines Agency. (2014a). Bravecto (fluralaner): Summary of Product Characteristics. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/bravecto

European Medicines Agency. (2014b). NexGard (afoxolaner): Summary of Product Characteristics. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/nexgard

European Medicines Agency. (2015). Simparica (sarolaner): Summary of Product Characteristics. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/simparica

European Medicines Agency. (2017a). European public MRL assessment report (EPMAR): Fluralaner (poultry) (EMA/CVMP). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/fluralaner-poultry-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar-cvmp_en.pdf

European Medicines Agency. (2017b). Exzolt (fluralaner): European public assessment report (EPAR) – Product information. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/exzolt

European Medicines Agency. (2017c). Credelio (lotilaner): Summary of Product Characteristics. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/credelio

European Medicines Agency. (2019). Frontpro (afoxolaner): EPAR – Product information. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/frontpro

European Medicines Agency. (2024). Bravecto 150 mg/ml powder and solvent for suspension for injection for dogs (fluralaner). European Medicines Agency. https://medicines.health.europa.eu/veterinary/en/600000992699

European Medicines Agency. (2025). Credelio, Lotimax and Credelio Plus: Summary of positive opinion following a variation. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/cvmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-credelio-lotimax-credelio-plus_en.pdf

European Patent Office. (2023). Use of isoxazoline compounds in poultry (European Patent No. EP3878281B1). European Patent Office. https://patents.google.com/patent/EP3878281B1

Fisara, P., & Guerino, F. (2023). Year-round efficacy of a single treatment of fluralaner injectable suspension (Bravecto Quantum™) against repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* in dogs. Parasites & Vectors, 16(1), 378. https://doi.org/10.1186/s13071-023-05960-5

Fong, C. W. (2015). Blood-brain barrier permeability: Molecular mechanism of transport of drugs and physiologically important compounds. Journal of Membrane Biology, 248(4), 651–669. https://doi.org/10.1007/s00232-015-9778-9

Gassel, M., Wolf, C., Noack, S., Williams, H., & Ilg, T. (2014). The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 45, 111–124. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009

Goetting, V., Lee, K. A., & Tell, L. A. (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: A review of the literature. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 34(6), 521–556. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01287.x

Goncalves, I. L., das Neves, G. M., Kagami, L. P., Eifler-Lima, V. L., & Merlo, A. A. (2021). Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 30, 115934. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115934

González-Morales, M.A., Thomson, A.E., Yeatts, J. et al. Pharmacokinetics of fluralaner as a systemic drug to control infestations of the common bed bug, *Cimex lectularius*, in poultry facilities. Parasites Vectors 16, 333 (2023). https://doi.org/10.1186/s13071-023-05962-3

Grabowski, T. (2015). Farmakokinetyka i biofarmacja. Biokinetica.

Haritova, A. M., Schrickx, J., Lashev, L., & Fink-Gremmels, J. (2006). ABC efflux transporters: P-gp, MRP2 and BCRP – The 3rd dimension in kinetics not only of fluoroquinolones. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 9(4), 223–242.

Haritova, A. (2008). A role of P-glycoprotein in modulation of antibiotic pharmacokinetics. Trakia Journal of Sciences, 6(Suppl. 1), 1–6.

Hinkle, N. C., Jirjis, F., Szewczyk, E., Sun, F., & Flochlay-Sigognault, A. F. (2018). Efficacy and safety assessment of a water-soluble formulation of fluralaner for treatment of natural

Ornithonyssus sylviarum infestations in laying hens. Parasites & Vectors, 11, 99. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2678-y

Hu, N.-X., Chen, M., Liu, Y.-S., Shi, Q., Yang, B., Zhang, H.-C., Cheng, P., Tang, Q., Liu, Z.-Y., & Zeng, J.-G. (2023). Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.

Hunter, J. S., III, Dumont, P., Chester, T. S., Young, D. R., Fourie, J. J., & Larsen, D. L. (2014). Evaluation of the curative and preventive efficacy of a single oral administration of afoxolaner against cat flea *Ctenocephalides felis* infestations on dogs. Veterinary Parasitology, 201(3–4), 207–211. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.024

Huyghe, B., Le Traon, G., & Sigognault Flochlay, A. (2017). Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic poultry red mite treatment, for chicken breeders' reproductive performances. Parasites & Vectors, 10, 499. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2480-2

Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochimica et Biophysica Acta, 455(1), 152–162.

Karbownik, A., Sobańska, K., Płotek, W., Grabowski, T., Klupczynska, A., Plewa, S., Grześkowiak, E., & Szałek, E. (2020). The influence of the coadministration of the P-glycoprotein modulator elacridar on the pharmacokinetics of lapatinib and its distribution in the brain and cerebrospinal fluid. Investigational New Drugs, 38(3), 574–583. https://doi.org/10.1007/s10637-019-00806-3

Kilp, S., Ramirez, D., Allan, M. J., Roepke, R. K. A., & Nuernberger, M. C. (2014). Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. Parasites & Vectors, 7, 85. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-85

Kilp, S., Ramirez, D., Allan, M.J., & Roepke R.KA. (2016). Comparative pharmacokinetics of fluralaner in dogs and cats following single topical or intravenous administration. Parasites & Vectors 9, 296 https://doi.org/10.1186/s13071-016-1564-8

Kuntz, E. A., Kammanadiminti, S., Artmeier, K., & McCall, J. W. (2017). Safety evaluation of lotilaner in dogs after oral administration as flavoured chewable tablets (Credelio™). Parasites & Vectors, 10, 538. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2468-y

Letendre, L., Huang, R., Kvaternick, V., Harriman, J., & Drag, M. (2014). The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs. Veterinary Parasitology, 201(1–2), 190–197. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.001

Letendre, L., Harriman, J., Drag, M., Mullins, A., Malinski, T., & Rehbein, S. (2016). The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner and milbemycin oxime when used as a combination chewable parasiticide for dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 39(6), 536–544. https://doi.org/10.1111/jvp.12332

Lin, J. H., & Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. Clinical Pharmacokinetics, 42(1), 59–98. https://doi.org/10.2165/00003088-200342010-00003

Liu, X., Testa, B., & Fahr, A. (2011). Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. Pharmaceutical Research, 28(5), 962–977. https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7

Liu, X., Huang, T., Tang, X., Ye, Q., Yuan, M., Cui, Z., Ma, Y., He, J., & Xiang, R. (2026). Development and validation of LC-MS/MS methods for quantification of fluralaner and moxidectin in cat plasma and its application in a pharmacokinetic study. Animals, 16(9), 1420. https://doi.org/10.3390/ani16091420

Lloyd, A., Van Mechelen, L., Willesen, J. L., Van Overloop, C., Solari Basano, F., Doherty, P., & Geurden, T. (2026). Safety and efficacy assessment of a chewable tablet containing sarolaner, moxidectin, and pyrantel in the treatment of *Angiostrongylus vasorum* in dogs. *Veterinary Parasitology, 341*, 110652. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2025.110652

Long, A. (2018). Isoxazolines: Preeminent ectoparasiticides of the early twenty-first century. In C. Q. Meng & A. E. Sluder (Eds.), Ectoparasites: Drug discovery against moving targets. Wiley. https://doi.org/10.1002/9783527802883.ch16

Markowska, P., Procajło, Z., Wolska, J., Jaroszewski, J. J., & Ziółkowski, H. (2021). Development, validation, and application of the LC-MS/MS method for determination of 4-acetamidobenzoic acid in pharmacokinetic pilot studies in pigs. Molecules, 26(15), 4437. https://doi.org/10.3390/molecules26154437

Markowska-Buńka, P., Jaroszewski, J. J., Rasiński, B., & Ziółkowski, H. (2025). A novel method for the determination of isoxazoline derivatives in plasma by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Validation and applicability to screening tests. Journal of Veterinary Research, 69(4), 405–415. https://doi.org/10.2478/jvetres-2025-0050

Markowska-Buńka, P., Rasiński, B., & Ziółkowski, H. (2026). Pharmacology and toxicology of veterinary isoxazolines: A review. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 31, 100645. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2026.100645

Mathur, S., Malpas, P.B., Mahabir, S. et al. Safety of Simparica Trio® (sarolaner, pyrantel, moxidectin) in heartworm-infected dogs. Parasites Vectors 16, 119 (2023). https://doi.org/10.1186/s13071-023-05700-9

McNair, C. M. (2015). Ectoparasites of medical and veterinary importance: Drug resistance and the need for alternative control methods. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 67(3), 351–363. https://doi.org/10.1111/jphp.12368

McTier, T. L., Chubb, N., Curtis, M. P., Hedges, L., Inskeep, G. A., Knauer, C. S., Menon, S., Mills, B., Pullins, A., Zinser, E., Woods, D. J., & Meeus, P. (2016). Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. Veterinary Parasitology, 222, 3–11. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.019

Merck Animal Health. (2025). Exzolt™ Cattle-CA1 campaign. Merck Animal Health. https://www.merck-animal-health-usa.com

Morgan, J. M., Gentille, S. R., Goyette, F. D., Lehman, M. L., Boss, A. L., Cassano, J. M., Knych, H. K., & White, S. D. (2025). Pharmacokinetics and preliminary safety of single-dose oral fluralaner at 10 and 25 mg/kg in healthy horses revealed no adverse reactions. American Journal of Veterinary Research, 86(12). https://doi.org/10.2460/ajvr.25.06.0200

MSD Saúde Animal. (2025). Exzolt Pour-On para bovinos. MSD Saúde Animal. https://www.msd-saude-animal.com.br/produto/exzolt-2/

Mukherjee, S., Rani, U., Chandra, G., & Pal, S. (2025). Recent advances in the synthesis of fluorinated heterocycles and a review of recent FDA-approved fluorinated drugs. Organic & Biomolecular Chemistry, 23, 7821–7851. https://doi.org/10.1039/D5OB00997A

Ozoe, Y., Asahi, M., Ozoe, F., Nakahira, K., & Mita, T. (2010). The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. Biochemical and Biophysical Research Communications, 391(1), 744–749. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.131

Packianathan, R., Hodge, A., Bruellke, N., Jackson, C., & Maeder, S. (2020). Efficacy of combination products containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) or afoxolaner and milbemycin (NexGard Spectra®) against induced infestations of *Ixodes holocyclus* in dogs. Parasites & Vectors, 13, 448. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04328-z

Padivitage, N., Adhikari, S., & Rustum, A. M. (2021). Assay of afoxolaner and determination of its related substances in commercial bulk batches of afoxolaner by reversed-phase

HPLC method based on a short octadecyl column. Journal of Chromatography B, 1184, 122984. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122984

Patel T., Marmulak T., Gehring R., Clapham M.O., & Tell L.A., 2018. Drug residues in poultry meat: A literature review of commonly used veterinary antibacterials and anthelmintics used in poultry. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 41 (6), 761-789. https://doi.org/10.1111/jvp.12700

Paudel, S., Hess, C., Wernsdorf, P., Käser, T., Meitz, S., Jensen-Jarolim, E., Hess, M., & Liebhart, D. (2015). The systemic multiplication of *Gallibacterium anatis* in experimentally infected chickens is promoted by immunosuppressive drugs which have a less specific effect on the depletion of leukocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology, 166(1–2), 22–32. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.05.011

Peña-Solórzano, D., Stark, S. A., König, B., Sierra, C. A., & Ochoa-Puentes, C. (2017). ABCG2/BCRP: Specific and nonspecific modulators. Medicinal Research Reviews, 37(5), 987–1050. https://doi.org/10.1002/med.21428

Pereira, L. C., Pereira, N. D., Barbosa da Silva, A. N., Barbosa da Silva, M. V., de Almeida, M. A. O., de Oliveira, C. I., & da Silva, M. L. (2024). Insecticidal activity of fluralaner (Exzolt®) administered to *Gallus gallus domesticus* against triatomines (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*). Parasites & Vectors, 17, 208. https://doi.org/10.1186/s13071-024-06276-8

Petersen, I., Johannhörster, K., Pagot, E., Escribano, D., Zschiesche, E., Temple, D., & Thomas, E. (2021). Assessment of fluralaner as a treatment in controlling *Dermanyssus gallinae* infestation on commercial layer farms and the potential for resulting benefits of improved bird welfare and productivity. Parasites & Vectors 14, 181. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04685-7

Prohaczik, A., Menge, M., Huyghe, B., Sigognault Flochlay, A., & Le Traon, G. (2017). Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic antiparasitic treatment for chickens, in laying hens after oral administration via drinking water. Parasites & Vectors, 10, 363. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2297-z

Prullage, J., Pfefferkorn, A., Knaus, M., Frost, J., Mitchell, E., & Tielemans, E. (2021). Efficacy of a novel topical combination of esafoxolaner, eprinomectin and praziquantel against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* in cats. Parasite, 28, 23. https://doi.org/10.1051/parasite/2021019

Rufener, L., Danelli, V., Bertrand, D., & Sager, H. (2017). The novel isoxazoline ectoparasiticide lotilaner (Credelio™): A non-competitive antagonist specific to

invertebrates γ-aminobutyric acid-gated chloride channels (GABACls). Parasites & Vectors, 10, 530. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2470-4

Sari, A. B., Gunes, Y., Anlas, C., Ustun Alkan, F., Guncum, E., Ustuner, O., & Bakirel, T. (2022). Effects of feed intake and water hardness on fluralaner pharmacokinetics in layer chickens. Journal of Veterinary Science, 23(5), e64. https://doi.org/10.4142/jvs.22048

Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. Advanced Drug Delivery Reviews, 55(1), 3–29. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00169-2

Schrickx, J., & Fink-Gremmels, J. (2007). P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 30(1), 25–31. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00808.x

Schrickx, J. A., & Fink-Gremmels, J. (2008). Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. European Journal of Pharmacology, 585(2–3), 510–519. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.025

Selzer, P. M., & Epe, C. (2021). Antiparasitics in animal health: Quo vadis? Trends in Parasitology, 37(1), 77–89. https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.004

Sigognault Flochlay, A., Thomas, E., & Sparagano, O. (2017). Poultry red mite *(Dermanyssus gallinae*) infestation: A broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. Parasites & Vectors, 10, 357. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2292-4

Six, R. H., Young, D. R., Holzmer, S. J., & Mahabir, S. P. (2016). Comparative speed of kill of sarolaner (Simparica™) and afoxolaner (NexGard®) against induced infestations of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. on dogs. Parasites & Vectors, 9, 91. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1375-y

Soares, N. M., Tucci, E. C., Perdoncini, G., & Della Matta Junior, R. (2022). Efficacy of fluralaner (Exzolt) in the treatment of natural *Allopsoroptoides galli* infestations in laying hens. Poultry Science, 101(10), 102099. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102099

Sparagano, O. A. E., George, D. R., Harrington, D. W. J., & Giangaspero, A. (2014). Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Annual Review of Entomology, 59, 447–466. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162101

Sparagano, O. (2020). A nonexhaustive overview on potential impacts of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) on poultry production systems. Journal of Animal Science, 98(Suppl. 1), S58–S62. https://doi.org/10.1093/jas/skaa136

Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pesticide Biochemistry and Physiology, 121, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014

Stander, A. (2024). Toxicological effects and treatment of accidental ingestion of Simparica Trio® in *Felis catus*: An investigative review (Undergraduate honors thesis, University of Nebraska–Lincoln). University of Nebraska–Lincoln. https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1691&context=honorstheses

Stewart, T. D., Hedges, L., Sampson, K. E., Lai, Y., Mahabir, S., Balogh, L., & Locuson, C. W. (2011). Pharmacokinetic interaction of the antiparasitic agents ivermectin and spinosad in dogs. Drug Metabolism and Disposition, 39(5), 789–795. https://doi.org/10.1124/dmd.110.034827

Sun, T., Wu, H., Liu, J., Jiang, L., Wang, X., Xu, F., & Li, X. (2025). Safety study of fluralaner solution on poultry red mite: A clinical study screening of the optimal dose and focusing on hepatic and renal parameters. Poultry Science, 104(2), 104685. https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104685

Suzuki, K., Taniyama, K., Aoyama, T., & Watanabe, Y. (2020). Evaluation of the role of P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux in the intestinal absorption of common substrates with elacridar, a P-gp inhibitor, in rats. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 45(3), 385–392. https://doi.org/10.1007/s13318-019-00602-7

Taylor, M. A. (2001). Recent developments in ectoparasiticides. The Veterinary Journal, 161(3), 253–268. https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0549

Temple, D., Manteca, X., Escribano, D., Salas, M., Mainau, E., Zschiesche, E., Petersen, I., Dolz, R., & Thomas, E. (2020). Assessment of laying-bird welfare following acaricidal treatment of a commercial flock naturally infested with the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). PLOS ONE, 15(11), e0241608. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241608

Thomas, E., Chiquet, M., Sander, B., Zschiesche, E., & Sigognault Flochlay, A. (2017). Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe. Parasites & Vectors, 10, 457. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2411-9

Tielemans, E., Otsuki, T., Cheesman, T., Selmes, F., Pfefferkorn, A., & Prullage, J. (2021). Efficacy of a novel topical combination of esafoxolaner, eprinomectin and praziquantel

against fleas in cats, under field conditions. Parasite, 28, 22. https://doi.org/10.1051/parasite/2021018

Tomley, F. M., & Sparagano, O. (2018). Spotlight on avian pathology: Red mite, a serious emergent problem in layer hens. Avian Pathology, 47(6), 533–535. https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1490493

Toutain, C. E., Seewald, W., & Jung, M. (2017). The intravenous and oral pharmacokinetics of lotilaner in dogs. Parasites & Vectors, 10, 522. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2475-z

Toutain, C. E., Seewald, W., & Jung, M. (2018). Pharmacokinetics of lotilaner following a single oral or intravenous administration in cats. Parasites & Vectors, 11, 412. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2966-6

U.S. Food and Drug Administration. (1992, May 1). Development of new stereoisomeric drugs: Guidance for industry. Center for Drug Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs

U.S. Food and Drug Administration. (2025, December 4). FDA conditionally approves topical drug for cattle for New World screwworm and cattle fever tick. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-conditionally-approves-topical-drug-cattle-new-world-screwworm-and-cattle-fever-tick

Varma, M. V. S., Ashokraj, Y., Dey, C. S., & Panchagnula, R. (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: A perspective from bioavailability enhancement. Pharmacological Research, 48(4), 347–359. https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00158-0

Vermeulen, B., De Backer, P., & Remon, J. P. (2002). Drug administration to poultry. Advanced Drug Delivery Reviews, 54(6), 795–803. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00069-8

Walther, F. M., Paul, A. J., Allan, M. J., Roepke, R. K. A., & Nuernberger, M. C. (2014a). Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(-/-) *Collies* after oral administration. Parasites & Vectors, 7, 86. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-86

Walther, F. M., Fisara, P., Allan, M. J., Roepke, R. K. A., & Nuernberger, M. C. (2014b). Safety of concurrent treatment of dogs with fluralaner (Bravecto™) and milbemycin oxime–praziquantel. Parasites & Vectors, 7, 481. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0481-8

Walther, F.M., Allan, M.J., Roepke, R.K., Nuernberger M.C. (2014c). The effect of food on the pharmacokinetics of oral fluralaner in dogs. Parasites Vectors 7, 84 https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-84

Walther, F.M., Allan, M.J. & Roepke, R.K. Plasma pharmacokinetic profile of fluralaner (Bravecto™) and ivermectin following concurrent administration to dogs. Parasites Vectors 8, 508 (2015). https://doi.org/10.1186/s13071-015-1123-8

Wardhaugh, K. G. (2005). Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: An Australian perspective. Environmental Toxicology and Chemistry, 24(4), 789–796. https://doi.org/10.1897/03-588.1

Wang, J., Susam, M. M., Gan, C., Sparidans, R. W., Lebre, M. C., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2022). P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) restricts brain accumulation of the novel EGFR inhibitor EAI045 and oral elacridar coadministration enhances its brain accumulation and oral exposure. Pharmaceuticals, 15(9), 1124. https://doi.org/10.3390/ph15091124

Washington State University Institutional Animal Care and Use Committee. (2022). Standard operating procedure: Dimethyl sulfoxide (DMSO) administration in laboratory animals [Standard operating procedure]. Washington State University.

Weber, T., & Selzer, P. M. (2018). Isoxazolines: A novel chemotype highly effective on ectoparasites. In C. Q. Meng & A. E. Sluder (Eds.), Ectoparasites: Drug discovery against moving targets. Wiley. https://doi.org/10.1002/9783527802883.ch12

Wick, A., Fink, G., & Ternes, T. A. (2010). Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1217(14), 2088–2103. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.079

Wu, S., Wang, Y., Li, X., Zhou, T., Niu, Y., Zhou, H., Zheng, W., Huang, X., Hu, J., Wang, J., & Yin, W. (2023). Development and validation of a multianalyte method for quantification of isoxazolines in animal-derived matrix samples using SPE-HPLC–MS/MS. Journal of Food Composition and Analysis, 123, 105620. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105620

Yao, X. (2024). Improving brain penetration using elacridar—A P-glycoprotein and BCRP inhibitor. Theoretical and Natural Science, 29, 50–62. https://doi.org/10.54254/2753-8818/29/20240729

Young, L., Karadzovska, D., Wiseman, S., Helbig, R. (2020). Efficacy of lotilaner (Credelio™) against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis* and flea eggs following oral

administration to dogs. Parasites Vectors 13, 25. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3873-1

Zhang, Z., Zhou, L., Gao, Y., Zhang, J., Gao, B., Shi, H., & Wang, M. (2020). Enantioselective detection, bioactivity, and metabolism of the novel chiral insecticide fluralaner. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(25), 6846–6854. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07907

Zhou, X., Hohman, A. E., & Hsu, W. H. (2021). Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 44(3), 329-348. https://doi.org/10.1111/jvp.12959

Ziółkowski, H., Grabowski, T., Jasiecka, A., Zuśka-Prot, M., Barski, D., & Jaroszewski, J. J. (2016). Pharmacokinetics of oxytetracycline in broiler chickens following different routes of administration. The Veterinary Journal, 208, 96–98. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.022