
(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

Analiza bioechivalenței și toleranței unui nou antihelmintic generic canin cu Milbemicin oximă și Praziquantel

Doctorand **Todoran Denisa Diana**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Ognean Laurenț**



INTRODUCERE

Testarea bioechivalenței permite introducerea pe piață a produselor generice, care sunt similare și competitive cu cele originale, prezentând avantajul că, în comparație cu acestea, nu parcurg întregul protocol de testare, ceea ce conduce la reducerea costurilor. Studiile de bioechivalență permit compararea farmacocineticii și farmacodinamiei moleculelor active, precum și a metaboliților rezultați. În prezent, testarea bioechivalenței se efectuează exclusiv pe animale din specia-țintă, asigurând o evaluare adecvată a echivalenței, toleranței, siguranței și eficacității terapeutice (OGNEAN, 2019). Un astfel de studiu este abordat și în această teză, care are ca scop testarea bioechivalenței a două produse, Milbenin (generic) și Milbemax (referință), având ca substanțe active milbemycin oximă și praziquantel.

Milbemycin oxima (MO) este similară din punct de vedere chimic cu ivermectina și face parte din grupa lactonelor macrociclice (LM), pentru a căror descoperire a fost decernat Premiul Nobel, în 2015 la categoria Medicină și Fiziologie (WANG și col., 2020). MO este o moleculă activă care a generat progrese majore în științele biologice, cu implicații medicale semnificative, fiind utilizată în controlul unor parazitoze frecvente la om și animale. Pe lângă efectele antiparazitare, lactonele macrociclice prezintă și acțiuni antifungice, insecticide, antidiabetice, antivirale și anticancerigene (EL-SABER BATIHA și col., 2020). În numeroase regiuni (SUA, China, Japonia, Europa), MO este utilizată în combaterea parazitismului cu acarieni, helminți și insecte la animalele.

Praziquantelul (PZ) este un derivat acilat de pirazino-izochinolină, cu eficacitate ridicată în tratamentul cestodozelor și trematodozelor (WALTHER și col., 2014).

Asocierea MO cu PZ a fost recent introdusă pe piață, în special în medicina canină și felină, pentru prevenția infestațiilor cu *Dirofilaria immitis*, constituind un sinergism molecular cu rezultate clinice semnificative (TORANMAL și col., 2019).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul acestei teze doctorale constă în actualizarea informațiilor privind biodisponibilitatea, bioechivalența, toleranța și eficacitatea terapeutică a produselor antihelmintice cu Milbemycin oximă și Praziquantel, concretizată prin formularea și testarea bioechivalenței unui nou produs generic cu MO și PZ, interschimbabil în practica clinică canină.

Obiectivul general al cercetărilor a formularea și testarea prin studii de bioechivalență a produsului generic Milbenin, iar obiectivele specifice au inclus:

- Actualizarea legislației naționale și europene în raport cu specificul testării medicamentului veterinar la câine, ca specie-țintă, în corelație cu normele actuale privind protecția animalelor și buna practică;

- ❑ Elaborarea unui protocol de studiu unicentric, încrucișat și randomizat, cu două secvențe terapeutice, adecvat testării bioechivalenței noului produs generic Milbenin, tablete comestibile pentru câine, conținând MO și PZ;
- ❑ Analiza relevanței indicilor clinici și hemato-biochimici în evaluarea eligibilității subiecților selectați și monitorizarea stării de sănătate a acestora pe parcursul testării bioechivalenței produselor antihelmintice canine;
- ❑ Optimizarea procedurilor de recoltare a probelor sanguine seriate pentru testarea bioechivalenței produselor farmaceutice la câine, ca specie-țintă;
- ❑ Analiza concentrațiilor plasmatică ale moleculelor active în corelație cu parametrii farmacocinetici și statistici, care au stat la baza evaluării biodisponibilității și bioechivalenței produselor investigate;
- ❑ Analiza condițiilor profilactico-terapeutice și a oportunității interschimbării produsului de referință existent pe piață cu produsul generic testat;
- ❑ Evaluarea efectelor adverse și a toleranței produselor investigate;
- ❑ Evaluarea eficacității terapeutice, în condiții de teren, a noului produs [testat](#).

STRUCTURA TEZEI

Această lucrare doctorală, intitulată „**Analiza bioechivalenței și toleranței unui nou antihelmintic generic canin cu Milbemicin oximă și Praziquantel**” este structurată și redactată conform recomandărilor Școlii Doctorale a USAMV Cluj-Napoca, fiind avizată favorabil de Comisia de bioetică în domeniu (Decizia nr. 226/03.08.2020). Teza cuprinde un total de 130 de pagini, dintre care 43 (30,93%) revin primei părți, alcătuită din trei capitole, iar 96 de pagini (69,07%) sunt dedicate părții a doua, structurată în opt capitole.

PARTEA a I-a: Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte conturează un ansamblu bibliografic succint și de actualitate, care analizează comparativ principalele progrese realizate în domeniile abordate în această lucrare, axandu-se în principal pe legislația și procedurile de avizare a medicamentului veterinar, pe biodisponibilitatea și bioechivalența produselor antihelmintice de interes major în clinica canină, precum și pe impactul terapeutic al MO și PZ.

Capitolul 1, intitulat „*Actualități în studiul și avizarea medicamentului veterinar*”, analizează și actualizează, în trei subcapitole, progresele recente privind formularea, testarea și avizarea produselor medical-veterinare generice, comparativ cu cele originale, detaliind evaluarea siguranței și eficacității terapeutice a acestora.

Capitolul 2, „*Particularități ale bioechivalenței medicamentului veterinar*”, este organizat în patru subcapitole, care documentează și explică succesiunea etapelor testării biodisponibilității și bioechivalenței medicamentoase pe animale, incluzând

evaluarea eligibilității subiecților, alături de evaluările și analizele clinice, paraclinice, farmacocinetice și statistice specifice acestor studii de actualitate.

Capitolul 3, intitulat *“Impactul terapeutic al Milbemicin oximei și Praziquantelului”*, detaliază, în două subcapitole, noutățile privind toleranța, siguranța și eficacitatea terapeutică a produselor cu MO și PZ, ca molecule active, aparținând lactonelor macrociclice, respectiv derivaților de pirazino–isochinolină, în comparație cu alte grupe farmaceutice cu impact major în terapia antihelmintică la carnivore.

PARTEA a II-a: Contribuția personală

Partea a II-a, realizată în conformitate cu exigențele și cerințele studiilor doctorale din domeniul medicinei veterinare, cuprinde contribuțiile personale, dezvoltate în șase capitole, care detaliază cinci studii distincte, fiecare publicat sub forma unor lucrări originale în jurnale de specialitate cu factor de impact relevant pentru domeniul abordat.

Contribuția personală debutează, conform uzanței, cu prezentarea ipotezei de lucru, a scopului și a obiectivelor generale ale cercetărilor, precum și a locațiilor și particularităților în care au fost realizate studiile, în vederea obținerii rezultatelor preconizate.

Capitolul 4 este destinat prezentării materialului biologic utilizat și a echipamentului tehnic necesar, alături de analiza detaliată a metodologiei aplicate în studiile dezvoltate în cadrul tezei doctorale. În acest capitol sunt descrise în mod detaliat detaliat metodele și investigațiile utilizate în desfășurarea cercetărilor, care au stat la baza realizării celor cinci studii doctorale. Acestea au inclus documentarea și elaborarea protocolului fizio-farmaceutic de tip unicentric pentru testarea bioechivalenței medicamentoase la câini din rasa Husky Siberian (HS), metodologia de evaluare clinică, hematologică și biochimică sanguină a subiecților canini pe parcursul testării, analizele farmacocinetice și statistice specifice evaluării bioechivalenței medicamentoase, precum și designului de evaluare a eficacității terapeutice a noului produs generic formulat.

Capitolul 5 cuprinde primul studiu, intitulat **“Analiza designului implementat în studiul bioechivalenței”**. Acesta este conturat în schema redată în Tabelul 1, relevând detaliat, complexitatea protocolului utilizat în testarea bioechivalenței produsului generic investigat. A fost implementat un design de tip cross-over (unicentric), randomizat, cu două perioade și două secvențe, doză unică și două tratamente, la interval de 30 de zile între ele, incluzind următoarele etape:

- Zilele -7..-1: evaluarea și selectarea subiecților, validarea metodei LC-MS/MS (cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă) pentru cuantificarea parametrilor farmacocinetici ai moleculelor active de MO și PZ;

- Ziua 0: derularea fazei I - revizuirea loturilor și inițierea studiului;
- Ziua 1: recoltarea primei probe de sânge (timpul 0,00) și administrarea produselor test (Milbenin) și referință (Milbemax), conform listei de randomizare, urmate de recoltarea seriată postdoză a 16 probe de sânge;
- Zilele 2-21: continuarea recoltării probelor sanguine seriate la următoarele 15 intervale de timp, concomitente cu evaluarea clinică;
- Zilele 21-51: repausul de 30 zile, necesară pentru eliminarea completă a substanțelor active după prima doză;
- Derularea fazei a II-a, în care se repetă activitățile desfășurate în prima fază;
- Examinările finale și stabilirea nivelului de bioechivalență.

Tabel 1 . *Schema protocolului utilizat în testarea bioechivale*

	Screening	Faza I														Repaus 30 zile	
Ziua	-7-1	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	14	17	20			
Selectare loturi	•																
Evaluare criterii includere	•	•												•			
Ex. clinic	•																
Semnele vitale	•		•														
Biochimie sânge	•																
Hematologie	•																
Analize urină	•																
Analize serologice	•																
Administrare produs			•														
Recoltare probe sânge			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
Înregist. efecte adverse			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Faza II															Ex. final		
Ziua	-7-1	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	14	17	20			
Selectare loturi																	
Evaluare criterii includere/excludere															•		
Ex. clinic			•												•		
Semnele vitale															•		
Biochimie sânge															•		
Hematologie															•		
Analize urină															•		
Analize serologice																	
Administrare produs			•														
Recoltare probe sânge		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
Înregist. efecte adverse		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		

Capitolul 6, dedicat studiului intitulat *„Evaluarea clinică a câinilor în cursul testării”*, grupează ansamblul examinărilor clinice uzuale efectuate inițial pentru selectarea animalelor sănătoase, precum și evaluările realizate predoză și postdoză, în vederea monitorizării stării generale de sănătate, a toleranței medicamentoase și a eventualelor reacții adverse. Rezultatele obținute au evidențiat menținerea unui nivel bun al stării generale de sănătate la subiecții canini pe parcursul testării, studiile desfășurându-se fără necesitatea înlocuirii vreunui subiect, iar la examenele finale fiind înregistrate doar câteva abateri minore ale parametrilor investigați față de intervalele fiziologice.

Evaluarea postdoză a moleculelor active la eșantionul de câini incluși în testul de bioechivalență a demonstrat menținerea funcțiilor vitale în limite fiziologice, diferențiindu-se față de evaluarea predoză doar prin câteva variații izolate, lipsite de semnificație și impact clinic. Pe parcursul testării, precum și la două luni după finalizarea acesteia, niciun animal nu a prezentat reacții adverse cu manifestări clinice sau semne de intoleranță medicamentoasă. Analiza integrată a rezultatelor clinice indică faptul că cele două produse investigate sunt bine tolerate și prezintă un profil favorabil de siguranță la dozele utilizate, aspecte care consolidează validitatea și relevanța testului de bioechivalență.

Capitolul 7 detaliază studiul trei, intitulat *„Evoluția indicilor hematologici la câini în cursul testării”*, care analizează, într-o primă etapă, tehnicile de recoltare a probelor sanguine la câine și particularizarea acestora pentru rasa Husky Siberian (HS), la care manopera trebuie adaptată caracteristicilor morfofiziologice și comportamentale specifice. Totodată, este argumentată necesitatea optimizării procedurilor de prelevare a probelor sanguine seriate pentru testarea biodisponibilității și bioechivalenței moleculelor active la câine, ca specie-țintă, având în vedere variabilitatea rasială ridicată. Evaluarea tehnicilor de recoltare a evidențiat superioritatea flebocentezei realizate cu dispozitive de tip holder. Recoltările seriate efectuate pe parcursul întregii testări au însumat prelevarea a 72 de probe sanguine per subiect. Volumul zilnic de sânge recoltat a atins valoarea maximă de 85 mL/animal în prima zi a fiecăreia dintre cele două faze ale studiului, reducându-se progresiv odată cu avansarea testării, astfel încât volumul total recoltat a fost de 310 mL sânge/animal pe întreaga durată a testării. În urma recoltării acestui volum de sânge, nu au fost semnalate reacții adverse sau influențe negative semnificative asupra volemiei, profilului hematologic și stării generale de sănătate a animalelor. Se apreciază că prelevarea de probe sanguine seriate a afectat volemia într-o măsură mai redusă decât recoltarea a trei unități de sânge (450 mL/unitate), cantitate permisă pentru un donator canin cu greutatea de 20–25 kg pe parcursul unui an (Ognean, 2017). Comparativ, volemia estimată la 1,9 L de sânge a unui subiect canin, cu greutate medie de 22 kg, ar putea scădea cu 16,2% în urma recoltărilor seriate efectuate în testele de bioechivalență.

Riscul de hipovolemie este, așadar, redus, iar câinii din rasa Husky Siberian se pretează recoltărilor sanguine seriate, oportunitate confirmată și de abaterile nesemnificative ale parametrilor hematologici observate pe parcursul testării.

Capitolul 8, “Evoluția profilului biochimic sanguin la câinii testați”, documentează și prezintă ansamblul analizelor de profil metabolic efectuate la eșantionul de subiecți pe parcursul studiului de bioechivalență. Rezultatele acestui studiu au demonstrat relevanța deosebită a analizelor de profil metabolic în evaluarea stării de sănătate și în detectarea eventualelor reacții adverse la subiecții canini în cursul testării bioechivalenței produselor medicamentoase. Evoluția parametrilor de profil metabolic a evidențiat unele abateri ușoare față de intervalele fiziologice de referință, care, fiind lipsite de importanță clinică și de semnificație statistică, au exercitat influențe farmacocinetice și farmacodinamice minore asupra substanțelor active testate. Dintre abaterile înregistrate, se menționează creșteri ușoare ale valorilor AST, corelabile cu traumatisme musculare minore, precum și ale valorilor GGT, atribuite infestațiilor parazitare anterioare.

Oscilațiile parametrilor biochimici sanguini s-au caracterizat, de asemenea, prin creșteri nesemnificative ale proteinemiei, albuminemiei, globulinemiei, calcemiei și fosfatemiei, consecutive hemoconcentrației, deshidratării, efortului muscular sau stresului generat de recoltările seriate.

Se menționează totodată că nu au fost semnalate diferențe legate de sex în cazul parametrilor de profil metabolic la eșantionul de câini pe parcursul testării, constatare raportată și de alți cercetători în domeniu. Oscilațiile minore, lipsite de impact clinico-farmacologic, ale indicilor biochimici sanguini, înregistrate la screeningul inițial și la examenul final, au fost corelate cu rezultatele evaluărilor clinice, hematologice, farmacocinetice și statistice, în vederea confirmării bioechivalenței produsului generic investigat, precum și a oportunității interschimbării terapeutice a acestuia.

Capitolul 9, intitulat “Analiza bioechivalenței și toleranței produsului investigat”, grupează rezultatele fundamentale ale cercetării doctorale, care au confirmat bioechivalența și oportunitatea interschimbării terapeutice a produselor testate. Concentrațiile plasmatice (CP) ridicate ale moleculelor active investigate (Fig. 1 și 2) evidențiază durate îndelungate de contact cu paraziții adulți și, implicit, o eficacitate terapeutică bună în prevenția și tratamentul helmintozei mixte, inclusiv al dirofilariozei. În cazul MO, evoluția concentrațiilor plasmatice (CP) a depășit 400 de ore, în timp ce pentru praziquantel PZ nu a depășit 26 de ore, fapt ce demonstrează rata mai lentă de absorbție și persistența mai îndelungată a moleculei active MO în tubul digestiv al câinelui. Analiza valorii $t_{\max}$ CP ale MO (A3) indică faptul că valoarea maximă a fost atinsă la 2 ore de la administrarea dozei în cazul produsului testat și la 3 ore după administrarea produsului de referință, fiind totodată evidențiate valori detectabile ale CP chiar și după 480 de ore, în cazul ambelor produse.

Analiza valorii t_{max} pentru concentrațiile plasmatice ale PZ a evidențiat atingerea valorii maxime la o oră de la administrarea dozei în cazul formulei test (T) și la 1,5 ore în cazul produsului de referință (R). Concentrații plasmatice detectabile au fost înregistrate pentru produsul T până la 36 de ore, iar pentru produsul R până la 26 de ore. Valorile parametrilor farmacocinetici primari, secundari și adiționali, obținute în urma analizei statistice descriptive (Tabelul 1), trebuie corelate cu intervalul de încredere de 90% al raportului T/R pentru MO și PZ (Tabelul 2). Informația esențială care se desprinde din analiza acestui ansamblu de parametri constă în faptul că intervalul de încredere de 90% al parametrilor farmacocinetici primari se încadrează în limitele admise (0,80–1,25), confirmând bioechivalența produselor testate la subiecții canini și oportunitatea interschimbării terapeutice a acestora.

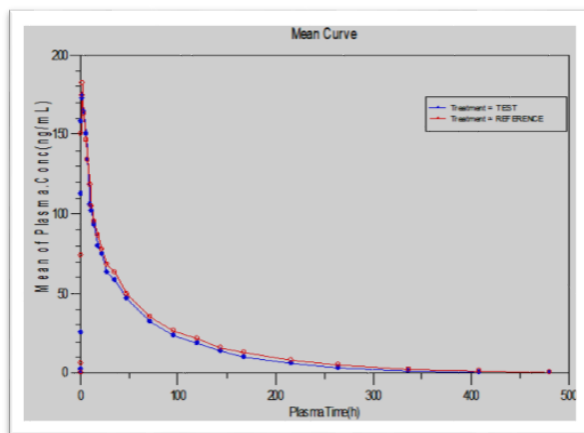


Fig. 1. *Evoluția CP ale MO după tratarea cu produsele test și referință*

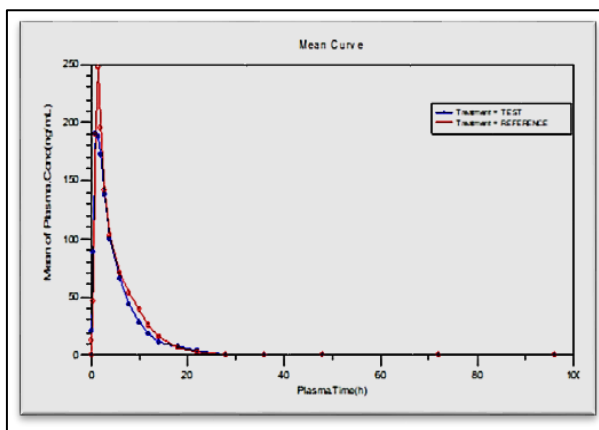


Fig. 2. *Evoluția CP ale PZ după tratarea cu produsele test și referință*

Tabel 2. *Valorile parametrilor farmacocinetici ai moleculelor active (MO și PZ) testate*

Parametru	Produs test			Produs referință		
	Media	Media Geo.	Dev. St.	Media	Media Geo.	Dev. St.
Milbemicin oxime (MO)						
C_{max} (μg/mL)	217.34	202.64	96.696	212.68	204.75	60.462
T_{max} (h)	3.3182	2.6431	2.3832	3.3636	2.8828	2.4358
AUC_{fin} <i>(μg·mL/h)</i>	7316	7022.8	2394.4	8169.6	7801.9	2585.6
AUC_{tot} <i>(μg·mL/h)</i>	7812.7	7525.5	2434.3	8737	8345.4	2758.7
T_{1/2} (h)	62.777	58.876	23.526	66.662	60.334	31.548
MRT (h)	79.437	73.972	31.543	86.142	78.233	40.425
Praziquantel (PZ)						
C_{max} (μg/mL)	274.64	258.75	92.967	304.09	273.94	136.78
T_{max} (h)	2.0909	1.6477	1.7904	2.0455	1.6341	2.0581
AUC_{fin} <i>(μg·mL/h)</i>	1037.1	911.1	635.31	1136	938.94	806.95
AUC_{tot} <i>(μg·mL/h)</i>	1056	930.21	637.13	1149.9	952.65	810.27
T_{1/2} (h)	3.1657	2.817	1.8738	2.8109	2.6182	1.0963
MRT (h)	4.7478	4.2767	2.4741	4.5563	4.215	2.0775

Tabel 3. *Valorile intervalului de încredere 90% ale parametrilor farmacocinetici primari pentru raportul test/referință (T/R) al MO și PZ la câini evaluați în tesul de bioechivalență*

Substanța/ Substance	Interval încredere/ Reference 90% CI	Media Geo raport/Geo mean ratio T/R	Referințe/Referențe 90% CI
C_{max}			
MO	0.87479 - 1.1197	0.989693	0.8-1.25
PZ	0.80184 - 1.1126	0.944543	0.8-1.25
AUC_{last}			
MO	0.8381 - 0.96676	0.900135	0.8-1.25
PZ	0.80655 - 1.1674	0.970344	0.8-1.25
AUC_{tot}			
MO	0.8381 - 0.96676	0.900135	0.8-1.25
PZ	0.80655 - 1.1674	0.970344	0.8-1.25

Capitolul 10, “Evaluarea eficienței terapeutice a produsului generic”, oferă rezultate relevante clinice și coproparazitologice privind nivelul ridicat de interschimbare și eficacitate terapeutică (90%) a produsului generic Milbenin utilizat în tratarea infestațiilor naturale cu *Toxocara canis* și *Dipylidium caninum* la câine.

Concluziile generale și recomandările formulate pe baza rezultatelor obținute în cadrul celor cinci studii doctorale, desăvârșesc conținutul tezei.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei grupează principalele noutăți și elemente de originalitate desprinse din cele cinci studii întreprinse, analizând caracterul inovativ al designurilor și analizelor efectuate, precum și contribuțiile aduse la diversificarea și augmentarea cunoștințelor în domeniu.

Bibliografia include un ansamblu bogat de referințe specifice în domeniu (193), conținând titluri cu actualitate și adecvate documentărilor și interpretărilor efectuate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. El-Saber Batiha G., Alqahtani A., Ilesanmi O. B., Saati A. A., El-Mleeh A., Hetta, H. F., Magdy Beshbishy A. (2020). Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. *Pharmaceuticals*, 13 (8), 196.
2. OGNEAN L., 2019, Fiziologie veterinară. Edit. Colorama, Cluj-Napoca.
3. OGNEAN L., 2017, Actualități în antigenitatea eritrocitară și transfuzia sanguină la animale, Edit. Colorama, Cluj Napoca.
4. TODORAN DIANA DENISA, OCTAVIA TAMAS-KRUMPE, S. COMAN, MELANIA CRIȘAN, D. NECULA, DARIA FENEȘAN, ANDREEA MÎRZA, L. OGNEAN (2025a). Analysis and bioequivalence evaluation of two oral anthelmintic formulas with milbemycin oxime and praziquantel in healthy dogs. *Rev Rom Med Vet*, 35|1: 101-107.
5. TODORAN DIANA DENISA, MELANIA IOANA CRIȘAN, OCTAVIA TAMAS-KRUMPE, D. NECULA, L. OGNEAN (2025b). Clinical evaluation of a new generic product with Milbemycin oxime and Praziquantel on dogs naturally infested with *Toxocara canis* and *Dypilidium caninum*. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 13 (3) 073 – 084.
6. Walther F. M., Fisara, P., Allan M. J., Roepke R. K., & Nuernberger M. C. (2014). Safety of concurrent treatment of dogs with fluralaner (Bravecto™) and milbemycin oxime-praziquantel. *Parasites & vectors*, 7, 1-3. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0481-y>
7. Wang Z., Li, J., Wang Y., Wang L., Yin Y., Yin L., Yin Y. (2020). Dietary vitamin A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets by affecting intestinal stem cells. *Journal of animal science*, 98(2).
8. Toranmal, S. S., Buchade, R. S., Tandale, S. D., Wagh, V. H., & Chaure, P. P. (2019). Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Estimation of Milbemycin Oxime and Praziquantel from Bulk and Marketed Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(9), 3108-3115, ISSN 0975-1459.