



Andrejs Šitovs

**Fluorhinolonu grupas pretmikrobu līdzeklis  
levofloksacīns veterinārmedicīnā  
un tā farmakokinētikas un  
farmakodinamikas pētījumi**

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes  
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija  
Apakšnozare – farmakoloģija

Rīga, 2024



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Andrejs Šitovs

ORCID 0000-0002-9529-8799

Fluorhinolonu grupas pretmikrobu līdzeklis  
levofloksacīns veterinārmedicīnā un tā  
farmakokinētikas un farmakodinamikas pētījumi

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – farmakoloģija

Rīga, 2024

Promocijas darbs izstrādāts RSU Farmakoloģijas katedrā, Latvijā

Promocijas darba vadītājas:

*Dr. pharm.* profesore **Dace Bandere**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Dr. med.* profesore **Santa Purvina**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskie konsultanti:

*Dr. chem. cert. pharmacol.* profesors **Mario Giorgi**, Pizas

Universitāte, Itālija

*Dr. med. vet.* profesore **Līga Kovaļčuka**, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

Oficiālie recenzenti:

*Dr. pharm.* docente **Inga Urtāne**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Dr. med. vet.* profesors **Ilmārs Dūrītis**, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

*Dr. med. vet.* profesors **Jose Luis Valverde Piedra**, Dabaszinātņu universitāte Ļubļinā, Polija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts RSU Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas, promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 26. martā plkst. 14.00 attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:  
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Pētījums ir izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda un Latvijas valsts budžeta finansējumu projektā Nr. 8.2.2.0/20/I/004 “Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā” Rīgas Stradiņa universitātē

Promocijas padomes sekretārs:

*Dr. pharm.* vadošais pētnieks **Konstantīns Logviss**

## Satura rādītājs

Satura rādītājs .....	3
Darbā izmantotie saīsinājumi .....	6
Ievads.....	8
Darba uzdevumi .....	9
Darba hipotēze.....	9
Darba novitāte .....	10
1. Materiāli un metodes .....	11
1.1. Levofloksacīns veterinārmedicīnā: literatūras apskats.....	11
1.2. Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem .....	11
1.2.1. Dzīvnieki.....	11
1.2.2. Ķīmiskās vielas un reaģenti .....	12
1.2.3. Eksperimenta dizains un paraugu vākšana .....	12
1.2.4. Asaru šķidrums savākšana un analīze.....	13
1.2.5. Plazmas hromatogrāfiskā analīze.....	14
1.2.6. Hromatogrāfiskās metodes validācija .....	14
1.2.7. Farmakokinētiskā analīze .....	14
1.2.8. Farmakokinētiskais un farmakodinamiskais indekss...	15
1.2.9. Zāļu uzkrāšanās prognozēšana.....	15
1.2.10. MIC robežpunktu prognozēšana .....	16
1.2.11. Teorētiski efektīvās dienas devas aprēķins .....	16
1.3. Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas lietošanas zosīm .....	16
1.3.1. Dzīvnieki.....	16
1.3.2. Ķīmiskās vielas un reaģenti .....	17
1.3.3. Eksperimenta dizains un paraugu vākšana .....	17
1.3.4. Plazmas un audu ekstrakcijas procedūra un hromatogrāfiskā analīze.....	18
1.3.5. Hromatogrāfiskās metodes validācija .....	19
1.3.6. Farmakokinētiskā analīze .....	20
1.4. Levofloksacīna antibakteriālā iedarbība <i>in vitro</i> un <i>ex vivo</i> pret <i>Pasteurella multocida</i> un <i>Escherichia coli</i> , kas izolēti no trušiem.....	20
1.4.1. Baktēriju izolāti.....	20

1.4.2.	Minimālās inhibējošās un minimālās baktericīdās koncentrācijas noteikšana buljonā un serumā.....	21
1.4.3.	Levofloksacīna seruma paraugi <i>ex vivo</i> baktēriju nonāvēšanas līknes laikā novērtēšanai.....	22
1.4.4.	<i>Pasteurella multocida</i> un <i>Escherichia coli</i> baktēriju nonāvēšanas līknes <i>in vitro</i> .....	22
1.4.5.	<i>Pasteurella multocida</i> un <i>Escherichia coli</i> baktēriju nonāvēšanas līknes <i>ex vivo</i> .....	23
1.4.6.	Farmakodinamiskā modelēšana un diennakts devas aprēķināšana .....	24
1.5.	Pētījumu ētiskie aspekti.....	25
2.	Statistiskā analīze .....	26
3.	Rezultāti.....	27
3.1.	Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem .....	27
3.1.1.	Dzīvnieki.....	27
3.1.2.	Farmakokinētiskie parametri .....	27
3.1.3.	Farmakokinētiskais un farmakodinamiskais indekss ...	30
3.1.4.	Ietekme uz asaru kvalitāti .....	30
3.2.	Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas ievadīšanas zosīm.....	31
3.2.1.	Dzīvnieki.....	31
3.2.2.	Analītiskās metodes validācija.....	31
3.2.3.	Farmakokinētiskie parametri .....	32
3.2.4.	Audu analīzes rezultāti.....	34
3.3.	Levofloksacīna <i>in vitro</i> un <i>ex vivo</i> antibakteriālā iedarbība pret no trušiem izolētiem <i>Pasteurella multocida</i> un <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.3.1.	Minimāla inhibējošā un minimāla baktericīda koncentrācija.....	35
3.3.2.	Levofloksacīna antibakteriālā aktivitāte un nonāvēšanas līknes laikā <i>in vitro</i> .....	38
3.3.3.	Levofloksacīna <i>ex vivo</i> antibakteriālā aktivitāte pēc intramuskulārās un subkutānās ievadīšanas un nonāvēšanas līknes laikā.....	40
3.3.4.	Farmakodinamiskā modelēšana un diennakts devas aprēķināšana .....	44

4. Diskusija.....	47
4.1. Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem .....	47
4.2. Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas lietošanas zosīm .....	52
4.3. Levofloksacīna antibakteriālā iedarbība pret <i>Pasteurella         multocida</i> un <i>Escherichia coli</i> , kas izolētas no trušiem <i>in vitro</i> un <i>ex vivo</i> .....	55
Secinājumi .....	60
Priekšlikumi.....	61
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu .....	62
Literatūras un avotu saraksts .....	64
Pateicības.....	70

## Darbā izmantotie saīsinājumi

AUC	Laukums zem koncentrācijas un laika līknes
AUMC	Laukums zem pirmā momenta līknes
$C_{\max}$	Maksimālā koncentrācija plazmā
CLSI	Klīnisko un laboratorijas standartu institūts, angl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Variācijas koeficients
E	Antibakteriāls levofloksacīna efekts
$E_0$	$\log_{10}$ baktēriju skaita starpība starp 0 un 24 stundām pēc inkubācijas kontroles paraugā
EMA	Eiropas Zāļu aģentūra
ES	Eiropas Savienība
F	Biopieejamība
HV	Harmoniskais vidējais
HPLC	Augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija, angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
$I_{\max}$	$\log_{10}$ starpība starp baktēriju skaitu starp 0 un 24 stundām kontroles paraugā ( $\log_{E0}$ ) un $\log_{10}$ baktēriju skaita starpību paraugā, kas inkubēts ar levofloksacīnu 24 stundas, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml
$IC_{50}$	$AUC_{24}/MIC$ attiecība, kas rada 50 % no maksimālā antibakteriālā efekta
IM	Intramuskulāri
IS	Iekšējais standarts
IV	Intravenozi
KI	Konfidences intervāls
KVV	Kolonijas veidojošās vienības
LBTU	Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
LOD	Noteikšanas robeža, angl. <i>Limit of detection</i>

LOQ	Kvantitatīvā noteikšana, angl. <i>Limit of quantification</i>
MBC	Minimālā baktericīda koncentrācija, angl. <i>Minimal bactericidal concentration</i>
MHB	<i>Muller Hinton</i> buljons
MIC	Minimālā inhibējošā koncentrācija, angl. <i>Minimal inhibitory concentration</i>
MRT	Vidējais uzturēšanās laiks, angl. <i>Mean residence time</i>
N/P	Nav piemērojams
FK	Farmakokinētika
PO	Perorāli
SC	Subkutāni
SN	Standartnovirze
STT	Šīrmera asaru tests, angl. <i>Schirmer Tear Test</i>
t	Laiks
$t_{1/2}$	Eliminācijas pusperiods
$t_{max}$	Maksimālās plazmas koncentrācijas laiks
TSA	Triptikāzes sojas agars
Vd	Izplatīšanas tilpums
WHO	Pasaules Veselības organizācija, angl. <i>World Health Organization</i>
$\lambda_z$	Līknes eliminācijas daļas slīpums
$\tau$	Dozēšanas intervāls



## Ievads

Infekcijas slimības ir svarīga veterinārmedicīnas problēma. Šo slimību ārstēšanas nolūkā dzīvniekiem nepieciešams ievadīt pretmikrobu līdzekļus, un to veic dzīvnieku īpašnieki vai atbildīgās personas. Lai padarītu antimikrobiālo terapiju efektīvāku, ir vajadzīga atbilstoša dozēšanas shēma, kas balstīta uz farmakokinētikas un farmakodinamikas datiem, gan infekciju ārstēšanai, gan rezistentu baktēriju celmu proliferācijas ierobežošanai (Toutain et al., 2002). Šī integrējošā pieeja ir pārbaudīts līdzeklis devas optimizēšanai (Toutain & Lees, 2004). Tajā tiek izmantoti tādi farmakokinētiskie parametri kā laukums zem koncentrācijas un laika līknes (AUC), maksimālā koncentrācija plazmā ( $C_{max}$ ) un farmakodinamiskie parametri – minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā bakteriocīda koncentrācija (MBC). Pieveca, kas balstās uz baktēriju iznīcināšanas līknēm laikā, faktiski uzrāda lielāku racionalitāti, salīdzinot ar pieeju, kas balstīta tikai uz MIC vērtību, kas ir statistisks parametrs (Ambrose et al., 2007). Fluorhinolonus bieži izmanto bakteriālu infekciju ārstēšanai gan cilvēkiem, gan veterinārmedicīnā. Fluorhinolonu farmakokinētiskie un farmakodinamiskie rādītāji norāda uz šīs grupas zāļu efektivitāti. Trešās paaudzes pretmikrobu fluorhinolonu līdzeklis levofloksacīns tiek izmantots gan cilvēku klīniskajā praksē, gan zināmā mērā veterinārmedicīnā (Sitovs et al., 2021). Tā izmantošana veterinārmedicīnā pašlaik ir ierobežota: to pilnībā aizliegts lietot veterinārmedicīnā Eiropas Savienībā, bet ASV tas tiek lietots ārpus marķējuma tikai mājdzīvniekiem. Levofloksacīna farmakokinētiskie parametri jau ir noteikti vairākām sugām – mājdzīvniekiem, lauksaimniecības dzīvniekiem un putniem. Pēdējos gados ir publicēti vairāki pētījumi par levofloksacīnu dzīvniekiem (Kilburn et al., 2023; Madsen et al., 2019; Vercelli et al., 2020; Wang et al., 2021), kas liecina par pieaugošu interesi par levofloksacīnu kā ārpus marķējuma zālēm lietošanai dzīvniekiem. Šī interese, iespējams, ir saistīta ar daudziem pašlaik apstiprinātiem veterinārajai lietošanai

paredzētiem antimikrobiālajiem līdzekļiem, kas neatbilst veterinārārstu vajadzībām pret antibiotikām rezistentu infekciju pārvaldībā (Papich, 2021). Tas nozīmē, ka levofloksacīns ir daudzsološs dzīvnieku infekciju ārstēšanā. Uzsākot darbu pie šī promocijas darba, publicētie zinātniskie pētījumi par levofloksacīna farmakokinētiku un aktivitāti trušiem bija ierobežoti, bet zosīm to nebija vispār.

## **Darba mērķis**

Izpētīt levofloksacīna kā pretmikrobu līdzekļa izmantošanas pamatojumu veterinārmedicīnā.

## **Darba uzdevumi**

1. Apkopot un pārskatīt esošus zinātniskus datus veterinārajā jomā saistībā ar levofloksacīnu.
2. Novērtēt un salīdzināt levofloksacīna farmakokinētiskos profilus veseliem mājas trušiem pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievades.
3. Novērtēt levofloksacīna farmakokinētiku zosīm pēc intravenozas un perorālas ievadīšanas un novērtēt tā izdalīšanas profilus no zosu audiem.
4. Izpētīt un novērtēt levofloksacīna antibakteriālo aktivitāti pret biežākajiem dzīvnieku infekciju izraisītājiem *P. multocida* un *E. coli*, kas izolēti no trušiem.

## **Darba hipotēze**

Levofloksacīnam piemīt labvēlīgas īpašības, lai to izmantotu kā pretmikrobu līdzekli veterinārmedicīnā.

## Darba novitāte

Šajā pētījumā tika identificēti, apkopoti un sistēmiski sakārtoti zinātniskie dati par levofloksacīna pētījumiem veterinārmedicinā. Šī informācija tagad ir publicēta starptautiskā līmenī, lai veterinārārsti un zinātnieki to izmantotu, pieņemot lēmumus par levofloksacīna lietošanu.

Šis ir pirmais pētījums, kurā ziņots par levofloksacīna farmakokinētiskajiem parametriem trušiem pēc intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas, kas potenciāli varētu būt noderīgi mājas trušu ārstēšanai, ko veic to īpašnieki.

Šis ir pirmais pētījums, kurā tika ziņots par levofloksacīna farmakokinētiskajiem profiliem zosīm un tā izsdalīšanas profiliem no atlasītajiem zosu audiem.

Šis ir pirmais pētījums, kurš novērtēja levofloksacīna pretmikrobu aktivitāti pret *P. multocida* un *E. coli*, kas izolēti no trušiem, un aprēķinātas piedāvātās dienas devas ekstravaskulārai levofloksacīna ievadīšanai.

# 1. Materiāli un metodes

## 1.1. Levofloksacīns veterinārmedicīnā: literatūras apskats

Levofloksacīnam ir paplašināta aktivitāte pret grampozitīvām baktērijām un atipiskiem intracelulāriem patogēniem (North et al., 1998). Levofloksacīnu lieto gan humānajā, gan veterinārajā medicīnā. Šī darba literatūras apskata sadaļa ietver galvenos atklājumus no publicētajiem datiem, kas saistīti ar levofloksacīnu veterinārajā jomā. Kā datu avoti tika izmantota *Scopus* datubāze (atslēgvārdi: *levofloxacin* un *veterinary*) un atrasto pētniecisko darbu atsauces. Pārskats, kas domāts praktizējošiem veterinārārstiem un zinātniekiem, lai izdarītu apzinātu izvēli par pareizu levofloksacīna lietošanu, ir publicēts rakstā *Levofloxacin in veterinary medicine: a literature review*.

## 1.2. Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem

### 1.2.1. Dzīvnieki

Sešas jauktās šķirnes trušu mātītes (*Oryctolagus cuniculus*) (ķermeņa masa  $4,21 \pm 0,74$  kg), kuras pētījuma sākumā bija 6 mēnešus vecas, tika iegūtas no Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskā institūta dzīvnieku novietnes. Dzīvnieki tika identificēti kā veseli, pamatojoties uz klīnisko izmeklēšanu, pilnīgu asins analīzi un pilnīgu acu izmeklēšanu, tostarp biomikroskopiju, netiešo oftalmoskopiju un tonometriju. Dzīvnieki pirms pētījuma nesaņēma nekādu ārstēšanu ar zālēm, un tiem ļāva aklimatizēties savos būros septiņas dienas pirms pētījuma sākuma. Truši tika izmitināti atsevišķos būros ar 12 stundu gaismas / 12 stundu tumsas cikliem un ar *ad libitum* piekļuvi dzeramajam ūdenim un sienam. Dzīvnieki vienu reizi dienā tika baroti ar standarta granulētu barību (*Purina Professional Rabbit Feed*, Purina, ASV). Telpas temperatūra tika uzturēta +20 °C. Pirms pētījuma

dzīvnieki nejaušības kārtā tika sadalīti trijās grupās pa divi, izmantojot zinātnisko randomizēšanas programmatūru.

### 1.2.2. Ķīmiskās vielas un reaģenti

Analītiskie levofloksacīna un enrofloksacīna (izmantots kā iekšējais standarts) standarti (tīrība > 98 %) un tetractilamonija hlorīds tika iegādāti no *Sigma-Aldrich* (ASV). Acetonitrils, metanols, nātrija dihidrogēnfosfāts, nātrija hidrogēnfosfāts, hloroforms un izopropanols bija augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfijas kvalitātes. Ievadīšanai dzīvniekiem izmantoja levofloksacīna šķīdumu *Levoflox 500 mg/100 ml (Clarix, Indija)*.

### 1.2.3. Eksperimenta dizains un paraugu vākšana

Tika izmantots trīsfažu, trīsievāžu krusteniskais pētījuma dizains. Levofloksacīna šķīdumu ievadīja kā vienu devu 5 mg/kg atbilstoši ķermeņa svaram. Katrā fāzē devas tika ievadītas šādi: intravenozais (IV) ceļš – 1 minūtes laikā bolus veidā marginālajā auss vēnā; intramuskulārais (IM) ceļš – puse no devas tika ievadīta katrā *musculus biceps femoris* secīgi; subkutānais (SC) ceļš – šķīdums ievadīts zem ādas kakla aizmugurē. Tika piemērots četrpadsmit dienu izskalošanās periods, kas ļāva dzīvniekiem pilnībā izvadīt zāles un atgūties no stresa, saistītu ar eksperimentālajām procedūrām. Dzīvnieku grupas levofloksacīna ievadīšanai tika rotētas, līdz tika pabeigtas visas trīs pētījuma fāzes. Katrā fāzē viens 24G katetrs tika ievietots centrālajā auss artērijā (asins savākšanai) un otrs katetrs marginālajā auss vēnā (IV zāļu ievadīšanai) pirms zāļu ievadīšanas eksperimenta sākuma dienā. Venoza katetrs tika izņemts uzreiz pēc IV zāļu ievadīšanas, bet arteriālais palika līdz asins savākšanai 10 stundas pēc ievadīšanas. Pēc asiņu savākšanas katetri tika izskaloti ar fizioloģisko šķīdumu, kas saturēja heparīnu. Asins paraugi (apmēram 0,5 ml) tika savākti tieši pirms levofloksacīna ievadīšanas un 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 un 48 stundas pēc levofloksacīna ievadīšanas. Asins paraugi pēc

24 un 48 stundām tika savākti ar šļirci no jūga vēnas. Savāktās asinis nekavējoties pārnesa uz litija heparīnu saturošām mēģenēm, centrifugēja ar  $1000 \times g$  apgriezīenu ātrumu 10 minūtes, un plazma tika savākta un uzglabāta  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā līdz analīzei. Pēc levofloksacīna ievadīšanas 0, 5, 2, 4, 8 un 10 stundām mēģenē bez antikoagulanta tika savākti papildu 0,5 ml asiņu, atstāti istabas temperatūrā, lai sarecētu, un serums tika savākts un uzglabāts  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā farmakodinamiskajam pētījumam.

#### **1.2.4. Asaru šķidruma savākšana un analīze**

Asaru šķidruma novērtējumi ietvēra asaru veidošanās un asaru plēves osmolaritātes testus. Visas analīzes tika veiktas dienu pirms levofloksacīna ievadīšanas, lai iegūtu sākotnējās vērtības, un pēc tam 1, 4, 8, 10, 24 un 48 stundas pēc katras levofloksacīna ievadīšanas. Šīrmera asaru testa (STT) vērtības asaru ražošanai tika iegūtas ar standartizētām sterilām STT I (*Eickemeyer*, Vācija) plāksnītēm, kas tika ievietotas un vienu minūti atstātas zem apakšējā plakstiņa sānu malas. STT plāksnītes mitrās daļas garums tika nekavējoties izmērīts milimetros (mm/min.). Asaru veidošanās tika novērtēta arī, abās acīs uzliekot *I-TEAR TEST* sloksnes (*I-MED Pharma Inc.*, Kanāda) tajā pašā laika posmā pēc levofloksacīna šķidruma ievadīšanas, kā tas tika veikts ar STT balsfītiem mērījumiem. Uz apakšējā plakstiņa meniska centra tika uzklāta sloksne, nepieskaroties radzenei vai konjunktīvai saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Tika iegūts milimetru skaits uz sloksnes, kas sasniegts piecās sekundēs (vienības: mm/5 sek.). Asaru plēves osmolaritāte tika novērtēta, izmantojot *I-PEN VET* ierīci (*I-MED Pharma Inc.*, Kanāda) uzreiz pēc asaru produkcijas testu veikšanas. *I-PEN VET* sensors tika uzlikts uz palpebrālās konjunktīvas, līdz atskanēja skaņas signāls, kas norāda uz mērījuma beigām (vienības: mOsm/L).

### 1.2.5. Plazmas hromatogrāfiskā analīze

Levofloksacīna koncentrācijas plazmas paraugos tika novērtētas, izmantojot šķidruma *Waters Acquity H Class Ultra Performance* hromatogrāfijas sistēmu, kas aprīkota ar fluorescences detektoru (*Waters Corporation, ASV*). Hromatogrāfiskā analītiskā metode un parauga sagatavošanas un attīrīšanas procedūras tika balstītas uz iepriekš aprakstītās metodes (Lee et al., 2017).

### 1.2.6. Hromatogrāfiskās metodes validācija

Zāles nesaturoša truša plazma tika izmantota gan standarta līknes veidošanai, gan kvalitātes kontroles metodes validācijai saskaņā ar Bioanalītisko metožu validācijas vadlīnijām EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (EMA, 2018a). Plazma, kas nesatur zāles, tika savākta un apvienota no visiem sešiem eksperimentālajiem trušiem (savākts 2 ml asiņu) tieši pirms eksperimenta pirmās fāzes sākuma, bet pēc katru ievietošanas. Kalibrēšanas līkne bija lineāra no 0,01 līdz 10 µg/ml ( $R^2 > 0,999$ ). Levofloksacīna izdalīšanās no plazmas bija  $96 \% \pm 3,5 \%$ . Apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža bija 0,01 µg/ml. Piecu līmeņu levofloksacīna kvalitātes kontroles standarti bija 0,01, 0,025, 0,05, 0,5 un 5 µg/ml.

### 1.2.7. Farmakokinētiskā analīze

Katram dzīvniekam pēc katra levofloksacīna ievadīšanas veida tika novērtēti individuālie farmakokinētiskie parametri. Novērtējumi veikti, izmantojot beznodalījumu analīzi un pamatojoties uz iegūtā grafika vizuālu pārbaudi ar atbilstošu programmatūru (*ThothPro* versija 1.6.66, Polija). Atsevišķu  $AUC_{0-pēdējais}$  vērtību skaitliskās atšķirības bija mazākas par 20 % no  $AUC_{0-\infty}$ , un terminālās fāzes regresijas līnijas  $R^2$  bija  $> 0,85$ . Ekstrakcijas attiecība (E %) pēc IV ievadīšanas tika aprēķināta, izmantojot klīrensa vērtību pēc IV ievadīšanas un sirds izviedes vērtību (t. i.,  $E \% = \text{klīrenss/sirds izviedes}$

tilpums  $\times 100$ ), kur sirds izsviedes tilpums =  $180 \times \text{ķermeņa svars}^{-0,19}$  (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b).

### 1.2.8. Farmakokinētiskais un farmakodinamiskais indekss

Tā kā levofloksacīna koncentrācija 24 stundās bija zemāka par LOQ, lai prognozētu  $AUC_{24}$  un aprēķinātu farmakokinētiski farmakodinamiskos surogātus, tika modelēta deva, kas piecas reizes pārsniedz ievadīto. Levofloksacīna koncentrācijas vērtības visiem asins paraugu savākšanas laikiem no 0,083 stundām līdz 10 stundām pēc ievadīšanas tika reizinātas ar 5. Piemērojot superpozīcijas principu un pieņemot tādu pašu pirmās kārtas kinētiku (Gabrielsson & Weiner, 2001), aptuvenās koncentrācijas vērtības pēc 24 stundām pēc ievadīšanas tika aprēķinātas katram dzīvniekam visiem trim ievadīšanas ceļiem. Beznodalījumu farmakokinētiskā analīze tika veikta atkārtoti, lai no šiem koriģētajiem datiem iegūtu  $AUC_{24}$  vērtību, un tika aprēķināts farmakokinētiski farmakodinamiskais surogāts  $AUC_{24}/MIC$ . Tā kā fluorhinoloni rada no koncentrācijas atkarīgu pretmikrobu efektu laika gaitā (Brown, 1996), tika izmantota mērķa  $AUC_{24}/MIC$  attiecība fluorhinoloniem 72 (Madsen et al., 2019).

### 1.2.9. Zāļu uzkrāšanās prognozēšana

Prognoze, kas balstīta uz vienreizējo ievadīšanu, tika izmantota, lai novērtētu iespējamo uzkrāšanās koeficientu ( $R$ ) 12 stundu dozēšanas intervālos ( $\tau$ ). Tika izmantota formula (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c):

$$R = \frac{1}{[1 - (0,5)^{\tau/t_{1/2}}]} \quad (1)$$

kur  $\tau$  ir dozēšanas intervāls un  $t_{1/2}$  ir eliminācijas pusperiods.



### 1.2.10. MIC robežpunktu prognozēšana

Pamatojoties uz vienādojumu  $AUC_{24}/MIC > 72$ , pretmikrobu aktivitātes robežpunkti trušiem ir teorētiski aprēķinātai devai 25 mg/kg, tātad tika pieņemts, ka minimālā inhibitorā koncentrācija jeb  $MIC < AUC_{24}/72$  ir efektīva (Madsen et al., 2019). AUC tika izteikts kā nesaistītās zāles. Iepriekš ziņots, ka trušiem levofloksacīns saistās ar plazmas olbaltumvielām 25 % apmērā (Destache et al., 2001).

### 1.2.11. Teorētiski efektīvās dienas devas aprēķins

Teorētiskā optimālā dienas deva tika aprēķināta visiem trim ievadīšanas ceļiem, pamatojoties uz šādu formulu (Toutain et al., 2002):

$$\text{Diennakts deva} = \frac{AUC_{24} \times MIC \times Cl}{f_u \times F} \times 24 \quad (2)$$

kur  $AUC_{24}/MIC$  ir optimālās efektivitātes attiecība (= 72),  $Cl$  = klīrens,  $f_u$  = zāļu brīvā frakcija plazmā (= 0,75) un  $F$  = biopieejamība (uzskata par 1, ja pilnīga).

## 1.3. Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas lietošanas zosīm

### 1.3.1. Dzīvnieki

Zosis piegādāja vietējā ferma (*Majątek Rutka, Puchaczów*, Polija). Dzīvnieku veselības stāvoklis tika novērtēts, pamatojoties uz pilnīgu fizisku pārbaudi, ko veterinārārsts veica pirms pētījuma sākuma, kā arī ikdienas uzvedību un apetīti. Pirms eksperimenta sākuma zosis tika aklimatizētas vienu nedēļu jaunajā vidē un uz kreisās kājas tām uzlikts gredzens ar identifikācijas kodu, lai atvieglotu atpazīšanu. Putni tika izmitināti 60 m<sup>2</sup> slēgtā teritorijā ar 8 m<sup>2</sup> lielu iekštelpu. Dzīvniekiem dienas laikā tika atļauts brīvi ganīties un tie baroti ar sabalansētu, bez zālēm granulētu barību (*Purina Duck Feed* granulas, *Purina Animal Nutrition, Grey Summit, MO, ASV*) divas reizes dienā, ūdens tika

piegādāts *ad libitum*. Pirms eksperimenta putni nesaņēma nekādu farmakoloģisko ārstēšanu.

### 1.3.2. Ķīmiskās vielas un reaģenti

Levofloksacīna un iekšējā standarta (IS) enrofloksacīna pulveris ar standarta tīrību 99 % tika iegādāts no *Sigma-Aldrich* (Milāna, Itālija). Augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas kvalitātes acetonitrils, metanols, trihlormetāns un izopropanols tika iegādāti no *Merck* (*Kenilworth, NJ, ASV*). Tetraetilamīns tika iegūts no *Sigma-Aldrich* (*St Louis, MI, ASV*). Ortofosforskābe, nātrija dihidrogēnfosfāts un kālija hidrogēnfosfāts tika iegādāti no *Carlo Erba Reagents* (Milāna, Itālija). Dejonizēts ūdens tika ražots, izmantojot ūdens sistēmu *Milli-Q Millipore* (Millipore, Darmštate, Vācija).

### 1.3.3. Eksperimenta dizains un paraugu vākšana

Pētījums sastāvēja no divām daļām – farmakokinētiskā pētījuma un izdalīšanas no audiem pētījuma. Farmakokinētiskajā pētījumā tika izmantoti 16 veseli Bilgorajska šķirnes zosu tēviņi (ķermeņa svars 3,4–4,9 kg; vecums 3–4 gadi), kas nejaušības kārtā sadalīti divās apakšgrupās ( $n = 8/\text{grupa}$ ). Pirmā apakšgrupa saņēma vienu IV devu (2 mg/kg) levofloksacīna (*Levofloxacin TEVA* 5 mg/ml; *Teva Pharmaceutical*, Ungārija), ievadot kreisajā brahiālā vēnā, izmantojot sterilas 26G 1,75 cm adatas. Otrās apakšgrupas zosīm tika ievadīta viena perorāla levofloksacīna deva (5 mg/kg). Iekššķīgi lietojamās devas tika sagatavotas, samaļot, homogenizējot un sadalot pieejamās zāļu formas (*Levofloxacin ACCORD* 250 mg/tablete; *Accord Healthcare Limited*, Apvienotā Karaliste), un ievadītas, aprēķinot attiecībā pret katra putna ķermeņa masu. Cietās zāļu formas pareizais svars tika iemaisīts ūdenī un ievadīts (trīs stundas pēc barošanas) ar barošanas zondi, izmantojot metāla katetrus ar noapaļotiem galiem. Asins paraugi (1 ml) tika savākti litija heparīna mēģenēs (BD, *Vaud*, Šveice) ar 24G katetriem, kas tika ievietoti tieši pirms eksperimenta labajā pleca

vēnā 0, 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 10, 24, 34 un 48 stundas pēc IV un 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 un 48 stundas pēc pēdējās perorālās levofloksacīna ievadīšanas. Pēc 12 stundām katetrs tika izņemts un asinis savāktas no kreisās brahiālās vēnas pa tiešo ar 24G šļirci. Katetru notīrīja, skalojot ar 1 ml 0,9 % fizioloģiskā šķīduma, pievienojot 10 SV/ml heparīna katrā savākšanas laika punktā. Katrā asins savākšanas reizē pirmie 0,2 ml asiņu tika izmesti. Mēģenes centrifugēja ar ātrumu  $1500 \times g$ , un savāktā plazma tika uzglabāta  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā līdz analīzei 30 dienu laikā pēc savākšanas.

Izdalīšanas no audiem izmēģinājuma daļā tika izmantotas 10 zosis, kurām tika ievadītas perorālas levofloksacīna devas (5 mg/kg), kā aprakstīts 2. apakšgrupai. Divi dzīvnieki tika humāni nogalināti, apduļinot un veicot atasiņošanu pēc 6, 10, 24, 34 un 48 stundām pēc levofloksacīna ievadīšanas. Aptuveni 4 g skeleta muskuļu, sirds, aknu, plaušu un nieru tika savākti un uzglabāti  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā līdz turpmākai analīzei.

#### **1.3.4. Plazmas un audu ekstrakcijas procedūra un hromatogrāfiskā analīze**

Plazmas alikvotu (0,2 ml) pievienoja 0,1 ml IS (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) šķīduma metanolā un 0,8 ml 0,1 M fosfāta buferšķīduma (pH 7,1). Tad paraugiem tika pievienoti 6 ml trihlormetāna un izopropanola maisījuma (5:1 tilp./tilp. %) un paraugus kratīja ar 60 svārstībām minūtē 10 minūtes, un centrifugēja pie  $4000 \times g$  piecas minūtes. Pēc tam 5 ml organiskā slāņa tika pārnesti tīrā mēģenē un žāvēti  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā slāpekļa plūsmā. Sausie atlikumi tika izšķīdināti 0,2 ml mobilās fāzes, sajaukti (vorteksējot), un alikvota daļa (50  $\mu\text{L}$ ) tika ievadīta HPLC sistēmā. Aknu, nieru, plaušu, sirds un muskuļu paraugi tika atkausēti un nekavējoties sadalīti mazos gabaliņos, un 1 g audu tika ievietoti 5 ml plastmasas mēģenēs, kas saturēja 3 ml homogenizācijas šķīduma (0,1 M fosfāta buferšķīdums, pH 7,1). Suspensiju homogenizēja aptuveni 40 sekundes un pēc tam tās 0,2 ml apstrādāja, kā aprakstīts plazmas paraugiem.

Tika izmantota augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas (HPLC) sistēma (*Jasco*, Japāna), kas sastāvēja no augstspiediena maisītāja sūkņa (modelis PU 980 Plus), spektrofluorometriskā detektora (modelis 2020 Plus), automātiskā paraugu ņemšanas bloka (modelis AS 950) un Peltjē sistēmas (modelis CO-4062). Injekcijas cilpas tilpums tika iestatīts uz 50  $\mu$ l. Dati tika apstrādāti, izmantojot programmatūru *CromNav 2,0* (*Jasco, Inc.*, Japāna). Hromatogrāfiskās analīzes metode tika modificēta no metodes, kas aprakstīta literatūrā (Lee et al., 2017).

### 1.3.5. Hromatogrāfiskās metodes validācija

Kvantitatīvā HPLC analīzes metode tika pilnībā validēta katram audu veidam (aknām, nierēm, plaušām, sirdij un muskuļiem) un plazmai linearitātes, dienas un starpdienu precizitātes, atgūstamības, noteikšanas robežu (LOD) un kvantitatīvās noteikšanas (LOQ) ziņā saskaņā ar EMA vadlīnijām (EMA, 2018a). Linearitāte tika noteikta ar lineārās regresijas analīzi, izmantojot kalibrēšanas līknes, kas izveidotas ar trim atkārtojumiem no kontroles zosu paraugiem, kuri bija papildināti ar levofloksacīnu koncentrācijās 0,005, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5  $\mu$ g/ml. Dienas un starpdienu precizitāte tika aprēķināta pēc sešu atkārtotu plazmas paraugu analīzes ar levofloksacīnu trijās dažādās koncentrācijās (0,005, 0,1 un 5  $\mu$ g/ml) ar to pašu instrumentu un to pašu operatoru attiecīgi tajā pašā un dažādās dienās. Precizitāte tika aprēķināta un izteikta kā variācijas koeficients (CV %). Ekstrakcijas atgūstamības dati tika iegūti, analizējot paraugus ar tādu pašu koncentrāciju (0,005, 0,1 un 5  $\mu$ g/ml), salīdzinot detektora signālu (mērot kā laukumu) augstam, vidējam un zēmam standartam un IS, kas pievienoti tukšajām zoss plazmas paraugam (kontrolē) ar līdzvērtīgu standartu signālam. Atgūstamība tika izteikta kā vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze (SN). LOD tika novērtēta kā zāļu koncentrācija plazmā un audos, kas radīja signāla un trokšņa attiecību 3, un LOQ tika noteikta kā zemākā koncentrācija plazmā, kas radīja signāla un trokšņa attiecību 10.

### 1.3.6. Farmakokinētiskā analīze

Levofloksacīna koncentrācija plazmā tika modelēta katram dzīvniekam, izmantojot beznodalījumu modeli, ar *ThothPro 4,3.0v* programmatūru ([www.thothpro.com](http://www.thothpro.com), Gdaņska, Polija).

Lai aprēķinātu levofloksacīna farmakokinētiskos parametrus visos audu paraugos, tika izmantota naiva apvienoto datu pieeja, izmantojot beznodalījumu analīzi (Pouplin et al., 2016). Levofloksacīna iekļūšana katrā audu veidā tika noteikta, salīdzinot AUC attiecības starp audiem un plazmu ( $AUC_{\text{audi}}/AUC_{\text{plazma}}$ ) pēc PO ievadīšanas (Sartini et al., 2020). Levofloksacīna koncentrācija atlasītajos audos tika izmantota, lai aprēķinātu provizoriskos ierobežojumu laikus (dzīvnieku produkcijas izmantošanai), izmantojot programmatūru *WT 1,4*, ko izstrādājusi Eiropas Zāļu aģentūra (EMA, 2018b). Tika noteikts, ka ierobežojumu laiks ir laiks, kad augšējā pielaišanas robeža (99 %) ar 95 % konfidences intervālu (KI) bija zem maksimālās atlieku robežas 0,1 µg/g levofloksacīna, kas atspoguļoja fluorhinolonu maksimālo atlieku līmeņus mājputnu aknās (EMA, 1997, 1999, 2002).

## 1.4. Levofloksacīna antibakteriālā iedarbība *in vitro* un *ex vivo* pret *Pasteurella multocida* un *Escherichia coli*, kas izolēti no trušiem

### 1.4.1. Baktēriju izolāti

Šajā pētījumā tika iekļauti *P. multocida* klīniskie izolāti (n = 10), *E. coli* izolāti (n = 5) un viens komerciāli pieejams izolāts *E. coli* ATCC 25922 (ATCC, ASV) kā references celms. Visi *E. coli* izolāti tika iegūti no taisnās zarnas uztriepes klīniski veselīgiem trušiem, kuri iepriekš nebija saņēmuši medikamentozu ārstēšanu. Veterinārārsts pārbaudīja veselības stāvokli un pilnu asins analīzi. Truši tika izmitināti fermā netālu no Rīgas, Latvijā. Taisnās zarnas uztriepes tika iegūtas, izmantojot *TRANSWAB® Gel Amies Plain* (MWE, Apvienotā Karaliste) ar gela barotni. Tās pašas dienas laikā paraugi tika nogādāti

Rīgas Stradiņa universitātes Mikrobioloģijas laboratorijā. Tamponi tika kultivēti uz *McConkey* agara un identificēti ar *VITEK2 Compact* sistēmu (*bio-Mérieux*, Francija). No viena truša tika atlasīts viens *E. coli* izolāts. Izolāti tika uzskatīti par nepatogēniem un par normālās floras daļu. Visi *P. multocida* izolāti bija no trušiem ar klīnisku rinītu un/vai pneimoniju. Sešus *P. multocida* izolātus piegādāja LBTU Veterinārmedicīnas fakultāte (Jelgava, Latvija), bet četrus izolātus – Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts (Rīga, Latvija). Pētījumā tika izmantots viens *P. multocida* izolāts no viena truša.

#### **1.4.2. Minimālās inhibējošās un minimālās baktericīdās koncentrācijas noteikšana buljonā un serumā**

Minimālās inhibējošās koncentrācijas vērtības tika noteiktas, izmantojot mikroatšķaidīšanas metodi saskaņā ar CLSI vadlīnijām M100 (CLSI, 2018a, 2018b). Levofloksacīna standartviela (> 99 %) tika iegādāta no *Sigma-Aldrich*. Levofloksacīna izejas šķīdumu (5120 µg/ml) sagatavoja *Milli-Q* īpaši attīrītā ūdenī (Millipore, ASV), pievienojot 0,1 M NaOH, un tālāk atšķaidīja līdz darba koncentrācijai ar katjoniem pielāgotu *Mueller Hinton* buljonu (MHB) vai attiecīgi komerciāli pieejamu sterilu trušu serumu bez zāļu vielām (*Biowest*, Francija). *Escherichia coli* MIC un MBC tika noteikti MHB un serumā. *Pasteurella multocida* MIC un MBC tika noteikti MHB, pievienojot 5 % defibrinētas aitas asinis (*bioTRADING Benelux B.V.*, Francija), un serumā. Pēc nakts augšanas agara platēs kolonijas tika suspendētas MHB, lai sasniegtu tādu pašu duļķainību kā Makfārlendas duļķainības standarts 0,5. Katra *E. coli* kultūra tika atšķaidīta 1:100 ar MHB, lai iegūtu baktēriju skaitu aptuveni 10<sup>6</sup> koloniju veidojošās vienības mililitrā (KVV/ml); katra *P. multocida* kultūra tika atšķaidīta 1:100 ar MHB, kas papildināts ar 5 % defibrinētām aitas asinīm. Levofloksacīna 128 µg/ml darba šķīdumi tika sagatavoti MHB un serumā. Beigu inkubācija 24 stundas 37 °C tika veikta ar levofloksacīna sērījveida atšķaidījumiem no 64 līdz 0,004 µg/ml abās barotnēs 5 × 10<sup>5</sup> KVV/ml baktēriju klātbūtnē. Pēc inkubācijas *E. coli* saturošās mikroatšķaidīšanas plates tika

nolasītas pie 600 nm, izmantojot *Infinite F50 Plus* mikroplašu lasītāju (*Tecan*, Šveice). MIC tika noteikta kā zemākā levofloksacīna koncentrācija, kas neuzrādīja duļķainību mikroplašu iedobēs. *P. multocida* MHB ar asinīm MIC tika noteikta kā zemākā koncentrācija, kurā vizuāli netika novērota krāsas maiņa no sarkanas uz brūnu. Lai noteiktu MBC, 10 µl mikroplašu iedobju, kurās nebija baktēriju augšanas, satura tika pārnesti uz platēm, kurās bija triptiskais sojas agars (TSA) *E. coli* un TSA, kas papildināts ar 5 % defibrinētām aitas asinīm *P. multocida*. Pēc 24 stundu inkubācijas 37 °C temperatūrā kolonijas tika skaitītas. Noteikšanas robeža bija 100 KVV/ml. Zemākā koncentrācija, kas neuzrādīja baktēriju augšanu, tika noteikta kā MBC. References kultūra *E. coli* ATCC 25922 MIC un MBC vērtības tika noteiktas tikai uz MHB. Eksperimenti tika veikti trijos atkārtojumos.

#### **1.4.3. Levofloksacīna seruma paraugi *ex vivo* baktēriju nonāvēšanas līknes laikā novērtēšanai**

Seruma paraugi, kas satur levofloksacīnu zināmās koncentrācijās, tika iegūti no iepriekšējā levofloksacīna farmakokinētiskā profila pētījuma trušos. Tur pēc katra levofloksacīna ievadīšanas veida seruma paraugi *ex vivo* pētījumam tika iegūti pēc 0,5, 1, 2, 4, 8 un 10 stundām. Šajā pētījumā tika izmantoti eksperimentālo trušu seruma paraugi (3 ml). Levofloksacīna koncentrācija apvienotajos seruma paraugos tika noteikta pirms levofloksacīna nonāvēšanas līknes laikā pētījuma ar validētu HPLC metodi (Sitovs et al., 2020).

#### **1.4.4. *Pasteurella multocida* un *Escherichia coli* baktēriju nonāvēšanas līknes *in vitro***

Viens *P. multocida* izolāts un viens *E. coli* izolāts tika izvēlēts izmantošanai baktēriju nonāvēšanas līknes laikā pētījumā. Baktēriju nonāvēšanas līknes pētījuma protokols tika balstīts uz literatūrā aprakstīto metodi (Lee et al., 2017). Levofloksacīna šķīdumi trušu serumā, kas nesatur zāles, tika pagatavoti koncentrācijās attiecībā pret baktēriju izolāta MIC serumā.

*P. multocida* koncentrācijas bija 0,00 µg/ml (kontrolē), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 un 64 reizes lielākas par MIC, un *E. coli* koncentrācijas bija 0,00 µg/ml (kontrolē), 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 un 32 reizes lielākas par MIC. Katra baktēriju izolāta 8 kolonijas no nakts augšanas agara plates tika pievienotas stobriņā ar 9 ml MHB un inkubētas 20 stundas 37 °C temperatūrā 5 % CO<sub>2</sub> klātbūtnē. Desmit mikrolitri buljona kultūras tika pievienoti 1 ml levofloksacīna šķīduma serumā, lai sasniegtu koncentrāciju aptuveni  $1,6 \times 10^6$  KVV/ml *P. multocida* izolātam un  $2 \times 10^7$  KVV/ml *E. coli* izolātam. Paraugus inkubēja 24 stundas 37 °C temperatūrā orbitālajā kratītājā; 20 µl no katra parauga tika izņemti pēc 3, 6 un 24 stundu inkubācijas laikā. Pirms izņemšanas paraugus saturošie stobriņi tika sajaukti vorteksējot. Lai skaitītu KVV, tika sagatavoti atšķaidījumi no 10<sup>-1</sup> līdz 10<sup>-8</sup> sterilajā 0,9 % fizioloģiskajā šķīdumā. Katra atšķaidījuma 10 µl tilpums tika paņemts, inokulēts uz TSA plates un inkubēts 16 stundas. TSA plates *P. multocida* paraugiem tika papildinātas ar 5 % defibrinētām aitas asinīm. KVV tika saskaitītas, un noteikšanas robeža bija 100 KVV/ml. Baktēriju skaits sākotnējā inokulātā tika apstiprināts ar tādu pašu atšķaidījumu sterilā fizioloģiskā šķīduma metodi. Eksperimenti tika veikti trijos atkārtojumos.

#### **1.4.5. *Pasteurella multocida* un *Escherichia coli* baktēriju nonāvēšanas līknes *ex vivo***

*Ex vivo* pētījumā tika izmantoti tie paši *P. multocida* un *E. coli* izolāti, kas tika izmantoti *in vitro* baktēriju nonāvēšanas pētījumā. Pētījuma protokols bija gandrīz identisks baktēriju nonāvēšanai *in vitro*. Atšķirība bija tāda, ka levofloksacīna atšķaidījumu vietā trušu serumā bez antibiotikām tika izmantoti seruma paraugi, kas iegūti no trušiem, kuriem parenterāli tika ievadīti 5 mg/kg levofloksacīna. Apvienotie seruma paraugi, kas savākti 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 un 10 stundas pēc ievadīšanas, saturēja 0,00, 3,26, 2,64, 1,48, 0,58, 0,13 un 0,07 µg/ml pēc IM un 0,00, 2,59, 2,70, 1,91, 0,75, 0,14 and 0,08 µg/ml pēc SC ievadīšanas ceļiem. Eksperimenti tika veikti trijos atkārtojumos.



#### 1.4.6. Farmakodinamiskā modelēšana un diennakts devas aprēķināšana

Lai noteiktu  $AUC_{24}/MIC$  attiecību, katra levofloksacīna koncentrācija *in vitro* tika reizināta ar 24 (inkubācijas periods) un pēc tam attiecīgi dalīta ar katra pārbaudītā baktēriju izolāta MIC vērtību. Saistība starp *in vitro*  $AUC_{24}/MIC$  un baktēriju skaita atšķirību  $\log_{10}$  no sākotnējā inokulāta līdz baktēriju skaitam pēc 24 inkubācijas stundām serumā tika novērtēta, izmantojot sigmoīdu inhibīcijas  $I_{max}$  modeli *Phoenix WinNonlin* programmatūrā (*Certara, ASV*). Akaiķes informācijas kritērijs tika piemērots, lai noteiktu piemēroftības pakāpi. Modelis ir aprakstīts ar šādu vienādojumu:

$$E = E_0 - \frac{I_{max} \times C^\gamma}{C^\gamma + IC_{50}^\gamma} \quad (3)$$

kur E – levofloksacīna antibakteriāls efekts;  $I_{max}$  –  $\log_{10}$  starpība starp baktēriju skaitu starp 0 un 24 stundām kontroles paraugā ( $\log E_0$ ) un  $\log_{10}$  baktēriju skaita starpību paraugā, kas inkubēts ar levofloksacīnu 24 stundas, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml;  $E_0$  –  $\log_{10}$  baktēriju skaita starpība starp 0 un 24 stundām pēc inkubācijas kontroles paraugā;  $IC_{50}$  ir  $AUC_{24}/MIC$ , kas rada 50 % no maksimālā antibakteriālā efekta; C ir  $AUC_{24}/MIC$  iedarbības nodalījumā (serumā);  $\gamma$  – Hilla koeficients, kas raksturo  $AUC_{24}/MIC$  atbildes līknes slīpumu.

Levofloksacīna antibakteriālā aktivitāte pret abām baktēriju sugām šajā pētījumā tika novērtēta, aprēķinot  $AUC_{24}/MIC$  vērtības, kas nepieciešamas bakteriostatiskajai, baktericīdai iedarbībai un baktēriju eliminācijai. Bakteriostatiskā efekta  $AUC_{24}/MIC$  tika aprēķināts, izmantojot  $E = 0$ , tas ir, pēc 24 stundu inkubācijas ar levofloksacīnu baktēriju skaits nemainījās. Baktericīdās iedarbības  $AUC_{24}/MIC$  tika aprēķināts, izmantojot  $E = -3$ , tas ir, baktēriju skaita samazināšanās par 99,9 % pēc 24 stundu inkubācijas ar levofloksacīnu.  $AUC_{24}/MIC$  baktēriju eliminācijas efektam tika aprēķināts, izmantojot zemāko

E vērtību, kad tika sasniegts maksimālais antibakteriālais efekts, tas ir, baktēriju skaita samazināšanās līdz kvantitatīvās noteikšanas robežai (100 KVV/ml) pēc 24 stundu inkubācijas ar levofloksacīnu. Farmakokinētiski farmakodinamiskās integrācijas rezultātā iegūtās antibakteriālās iedarbības  $AUC_{24}/MIC$  vērtības tika izmantotas, lai aprēķinātu optimālās devas trim iedarbības līmeņiem – bakteriostatiskajai, baktericīdai un baktēriju eliminācijai. Tika izmantota šāda formula (McKellar et al., 2004):

$$Diennakts\ deva = \frac{AUC_{24} \times MIC \times Cl}{f_u \times F} \times 24 \quad (4)$$

kur  $AUC_{24}/MIC$  ir bakteriostatiskas, baktericīdas un baktēriju eliminācijas iedarbības attiecības, MIC ir minimālā inhibējošā koncentrācija serumā, Cl ir klīrenss, F ir biopieejamība un  $f_u$  ir levofloksacīna brīva frakcija plazmā. Tika izmantotas šādas vērtības: Cl = 0,6 ml/g/st un F = 1 (Sitovs et al., 2020). Levofloksacīna saistīšanās ar proteīniem trušu plazmā bija 25 %, tādējādi,  $f_u$  = 0,75 (Destache et al., 2001).

## 1.5. Pētījumu ētiskie aspekti

Levofloksacīna farmakokinētikas un farmakodinamikas pētījumiem ar trušiem izmēģinājuma protokols apstiprināts LR Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku ētikas komitejā (Atļauja 025564). Pētījums veikts saskaņā ar vadlīnijām par laboratorijas dzīvnieku kopšanu un izmantošanu saskaņā ar Eiropas likumu (2010/63/UE). Levofloksacīna farmakokinētikas un izdalīšanas no audiem pētījumam zosīm izmēģinājuma protokolu apstiprināja Dabaszinātņu universitātes Ļubļinā (Polija) Institucionālā dzīvnieku kopšanas un lietošanas komiteja, un tas arī tika veikts saskaņā ar Eiropas likumu (2010/63/UE).

## 2. Statistiskā analīze

Farmakokinētikas pētījumā pēc levofloksacīna intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem farmakokinētisko parametru statistiskā analīze tika veikta, izmantojot SPSS (versija 21.0; *IBM Corporation*, ASV). Lielākā daļa statistisko parametru ir norādīti kā vidējās  $\pm$  standartnovirzes (SN) vērtības. Izņēmumi ir plazmas eliminācijas pusperiodi (tika aprēķināti harmoniskie vidējie) un  $t_{\max}$  (tiek dotas vidējās vērtības). Datu normalitāte tika novērtēta, izmantojot Šapiro-Vilka testu. Pāru t-testi tika izmantoti, lai salīdzinātu farmakokinētisko parametru statistiskās atšķirības ar normālu datu sadalījumu dažādās ievadīšanas grupās. Ja datiem nebija normāls sadalījums (piemēram,  $V_{\text{laukums}}/F$  pēc IM vai SC ievadīšanas), tika izmantots Vilkoksona tests. Tika uzskatīts, ka  $p$  vērtības, kas ir zemākas par 0,05, norāda uz statistisko nozīmīgumu. Farmakokinētikas un izdalīšanas no audiem pētījumos ar zosīm farmakokinētiskie parametri tika pārbaudīti uz normālo sadalījumu, izmantojot Šapiro-Vilka testu, un farmakokinētisko parametru vidējās vērtības tika salīdzinātas starp diviem ievadīšanas ceļiem, izmantojot nesapārotus t-testus, ar *GraphPad Prism v5.0* (*GraphPad Software, Inc.*, ASV). Tika uzskatīts, ka  $p$  vērtības, kas ir zemākas par 0,05, norāda uz statistisko nozīmīgumu.

### 3. Rezultāti

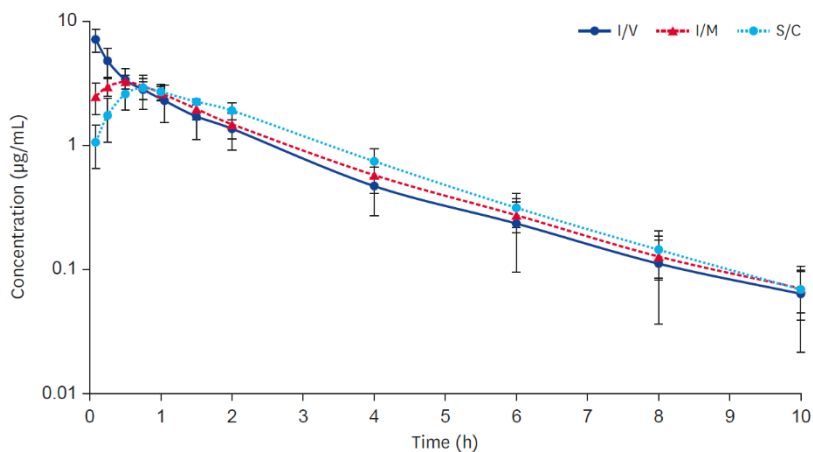
#### 3.1. Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem

##### 3.1.1. Dzīvnieki

Visi seši dzīvnieki saņēma levofloksacīnu IV vai IM; taču SC ievadīšana tika pabeigta tikai četriem. Krusteniskā dizaina pētījuma trešajā fāzē tika izslēgti divi dzīvnieki – viens dzīvnieks tika izslēgts, jo nebija iespējams fiksēt katetru nevienā no auss artērijām. Otrs dzīvnieks piedzīvoja krampjus pēc IV levofloksacīna ievadīšanas un nomira 48 stundu laikā pēc ievadīšanas. Šī dzīvnieka pēcnāves apskate neliecināja par elpceļu, nieru, kuņģa-zarnu trakta vai aknu anomālijām.

##### 3.1.2. Farmakokinētiskie parametri

Pēc visiem trim 5 mg/kg ievadīšanas veidiem levofloksacīns bija kvantitatīvi nosakāms plazmā līdz 10 stundām pēc ievadīšanas. Vidējo levofloksacīna plazmas koncentrāciju ( $\pm$  SN) puslogaritmiskie grafiki pēc 5 mg/kg vienreizējas devas visos trijos ievadīšanas veidos ir parādīti 3.1. attēlā. Iegūto farmakokinētikas parametru vidējās vērtības ( $\pm$  SN) norādītas 3.1. tabulā. Vidējās  $AUC_{0-pēdējā}$  vērtības bija attiecīgi 9,03 ( $\pm$  2,66), 9,07 ( $\pm$  1,80) un 9,28 ( $\pm$  1,56)  $\mu\text{g} \times \text{st/ml}$  pēc IV, IM un SC ievadīšanas. Maksimālā sasniegtā koncentrācija plazmā bija 3,33 ( $\pm$  0,39) un 2,91 ( $\pm$  0,56)  $\mu\text{g/ml}$  pēc IM un SC ievadīšanas. Vidēja ekstrakcijas attiecība pēc 5 mg/kg IV ievadīšanas bija 7,2 %  $\pm$  2,1 %.



3.1. attēls. Levofloksacīna vidējās koncentrācijas trušu plazmā, puslogaritmiski grafiki (klūdu joslas norāda standarta novirzes) pēc IV (n = 6), IM (n = 6) un SC (n = 4) levofloksacīna ievadīšanas 5 mg/kg

IV, intravenozi; IM, intramuskulāri; SC, subkutāni. *Concentration* – koncentrācija; *time* – laiks.

3.1. tabula

Levofloksacīna farmakokinētisko parametru vidējās ( $\pm$  SN) vērtības trušu plazmā pēc IV, IM vai SC ievadīšanas 5 mg/kg

FK parametrs	Mērvienība	IV (n = 6)	IM (n = 6)	SC (n = 4)
AUC <sub>0-pēdējā</sub>	µg × st/ml	9,03 ± 2,66	9,07 ± 1,80	9,28 ± 1,56
AUC <sub>0-∞</sub>	µg × st/ml	9,08 ± 2,64	9,07 ± 1,80	9,31 ± 1,50
AUMC <sub>0-pēdējā</sub>	µg × st × st/ml	22,93 ± 12,46	37,87 ± 18,35•	36,62 ± 17,35
AUMC <sub>0-∞</sub>	µg × st × st/ml	23,64 ± 12,17	37,89 ± 18,34•	36,98 ± 16,82
C <sub>max</sub>	µg/ml	N/P	3,33 ± 0,39	2,91 ± 0,56
C <sub>pirmā</sub>	µg/ml	7,13 ± 1,47	N/P	N/P
t <sub>max</sub> MEDIAN	st	N/P	0,50 (0,08–0,75)	0,75
t <sub>1/2λ<sub>z</sub></sub> HV	st	2,06 ± 0,18	2,01 ± 0,24	1,80 ± 0,14

## 3.1. tabulas turpinājums

FK parametrs	Mērvienība	IV (n = 6)	IM (n = 6)	SC (n = 4)
$\lambda_z$	l/st	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,03
MRT <sub>0-pēdējā</sub> HV	st	2,19 ± 0,83	3,75 ± 1,16•	3,44 ± 1,31
MRT <sub>0-∞</sub> HV	st	2,27 ± 0,80	3,75 ± 1,16•	3,52 ± 1,25
MAT HV	st	N/P	1,29 ± 0,61	0,45 ± 1,47
Cl	ml/g × st	0,60 ± 0,18	N/P	N/P
Cl/F	ml/g × st	N/A	0,57 ± 0,11	0,55 ± 0,10
V <sub>ss</sub>	ml/g	1,37 ± 0,39	N/P	N/P
V <sub>laukums</sub> /F	ml/g	N/P	1,66 ± 0,34	1,42 ± 0,18
F	%	N/P	105,69 ± 27,50	118,93 ± 40,51

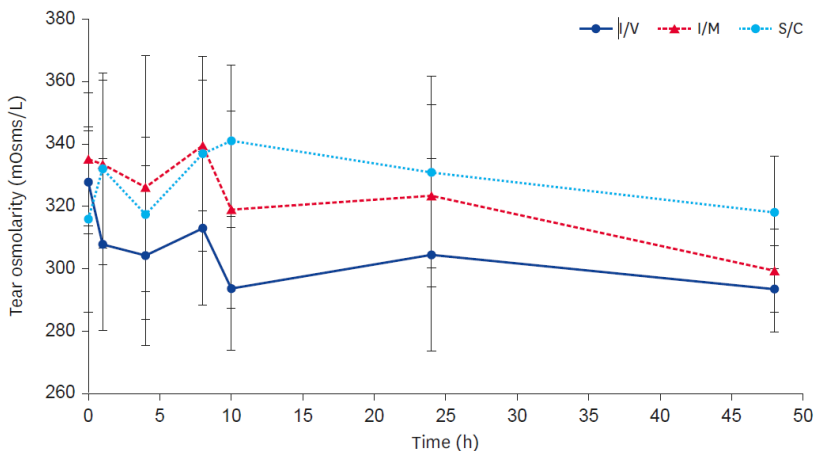
FK, farmakokinētiskas; AUC<sub>0-pēdējā</sub>, laukums zem plazmas koncentrācijas un laika līknes no 0 līdz pēdējam kvantitatīvi noteiktajam paraugu ņemšanas punkta laikam; AUC<sub>0-∞</sub>, laukums zem plazmas koncentrācijas un laika līknes no 0 ekstrapolēts līdz bezgalībai; AUMC<sub>0-pēdējā</sub>, laukums zem pirmā momenta līknes no 0 līdz pēdējam kvantitatīvi noteiktajam paraugu ņemšanas punkta laikam; AUMC<sub>0-∞</sub>, laukums zem pirmā momenta līknes no 0 ekstrapolēts līdz bezgalībai; C<sub>max</sub>, maksimālā zāļu koncentrācija plazmā; C<sub>pirmā</sub>, koncentrācija pirmajā paraugu savākšanas punktā; t<sub>max</sub>, maksimālās plazmas koncentrācijas laiks; t<sub>1/2λ<sub>z</sub></sub>, līknes eliminācijas daļas eliminācijas pusperiods; λ<sub>z</sub>, līknes eliminācijas daļas slīpums; MRT<sub>0-pēdējā</sub>, vidējais uzturēšanās laiks no 0 līdz pēdējam kvantitatīvi noteiktajam paraugu ņemšanas punkta laikam; MRT<sub>0-∞</sub>, vidējais uzturēšanās laiks no 0 ekstrapolēts līdz bezgalībai; MAT, vidējais absorbcijas laiks; Cl, kopējais plazmas klīrenss; Cl/F, plazmas klīrenss koriģēts atbilstoši biopiejamībai; V<sub>ss</sub>, izplatīšanas tilpums līdzsvara stāvoklī; V<sub>area</sub>/F, izplatīšanas tilpums koriģēts atbilstoši biopiejamībai; F, biopiejamība; n, izmēģinājuma dzīvnieku skaits, kuri saņēma levofloksacīnu atbilstošā ievadīšanas veidā; IV, intravenozi; IM, intramuskulāri; SC, subkutāni; N/P, nav piemērojams; HV, harmoniskais vidējais. • statistiski ticami atšķiras no IV ievadīšanas (p < 0,05); MEDIAN, mediānā vērtība.

### 3.1.3. Farmakokinētiskais un farmakodinamiskais indekss

*In silico* iegūtās  $AUC_{24}$  vērtības teorētiskajai devai 25 mg/kg bija  $44,98 \pm 12,54$  mg  $\times$  st/l pēc IV ievadīšanas,  $43,11 \pm 6,85$  mg  $\times$  st/l pēc IM ievadīšanas un  $43,62 \pm 13,65$  mg  $\times$  st/l pēc SC ievadīšanas. Tika prognozēts, ka levofloksacīna akumulācijas attiecība, lietojot divas reizes dienā ( $\tau = 12$  stundas), ir  $1,019 \pm 0,006$ . Izmantojot  $AUC_{24}/MIC$  vērtību 72 un ņemot vērā, ka 25 % levofloksacīna ir saistīti ar plazmas olbaltumvielām, tika aprēķināts, ka 25 mg/kg levofloksacīna IV ievadīšanas gadījumā būtu efektīvi pret patogēniem ar  $MIC < 0,47$   $\mu$ g/ml. IM un SC ievadīšanas ceļu gadījumā šī deva būtu efektīva pret patogēniem, kuru  $MIC < 0,45$   $\mu$ g/ml. Tādējādi IV ievadīšanai tika aprēķināta efektīva diennakts deva pret patogēniem ar  $MIC 0,5$   $\mu$ g/ml kā  $29 \pm 8$  mg uz kilogramu ķermeņa svara.

### 3.1.4. Ietekme uz asaru kvalitāti

Vidējā asaru izdalīšanās, kas novērota ar STT, bija attiecīgi  $6,4 \pm 3,1$  mm/min. un  $7,0 \pm 3,1$  mm/min., attiecīgi kreisajai un labajai acij (bez statistiski būtiskas atšķirības,  $p = 0,536$ ). Absolūtās vērtības svārstījās no 2 līdz 14 mm/min. 48 stundu laikā netika novērotas būtiskas izmaiņas asaru veidošanā pēc visiem zāļu ievadīšanas veidiem. Tiek uzskatīts, ka sloksnes meniskometrijas vērtības, kas iegūtas, ievērojot ražotāja norādījumus, ir 5 mm un augstākas, norāda uz normālu asaru veidošanos, savukārt mazākas vērtības liecina par samazinātu asaru veidošanos. Vidējie mērījumu rezultāti bija normāli, attiecīgi  $6,9 \pm 1,3$  mm/5 sek. un  $6,3 \pm 1,9$  mm/5 sek., attiecīgi kreisajai un labajai acij (bez statistiski būtiskas atšķirības,  $p = 0,145$ ). Pēc levofloksacīna IV, IM un SC ievadīšanas izmaiņas asaru veidošanā netika novērotas. Pirms zāļu ievadīšanas asaru osmolaritāte bija  $324 \pm 21$  mOsm/l un  $331 \pm 22$  mOsm/l abām acīm (labajā un kreisajā) un atšķirība nebija nozīmīga ( $p = 0,255$ ). Vidējā asaru osmolaritāte samazinājās pēc visiem trim ievadīšanas veidiem 48 stundu laikā. Asaru osmolaritātes izmaiņas līdz 48 stundām pēc levofloksacīna ievadīšanas ir apkopotas 3.2. attēlā.



3.2. attēls. Asaru osmolaritātes izmaiņas trušiem pēc vienreizējas 5 mg/kg levofloksacīna devas ievadīšanas IV (n = 6), IM (n = 6) vai SC (n = 4) (norādītas vidējās vērtības; kļūdu joslas norāda standarta novirzi)

IV, intravenozi; IM, intramuskulāri; SC, subkutāni. *Tear osmolarity* – asaru osmolaritāte; *time* – laiks.

## 3.2. Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas ievadīšanas zosīm

### 3.2.1. Dzīvnieki

Zosis neuzrādīja nekādus zāļu blakuseftus izmēģinājuma laikā vai pēc tā. Visi dzīvnieki saņēma levofloksacīnu IV vai PO ceļā, un viņi visi pabeidza pētījumu.

### 3.2.2. Analītiskās metodes validācija

Validētā analītiskā metode uzrādīja labu linearitāti diapazonā no 0,005 līdz 5 µg/ml katrai šajā pētījumā iekļautajai matricai. Galvenie rezultāti no analītiskās metodes validācijas plazmā un audos ir norādīti 3.2. tabulā.

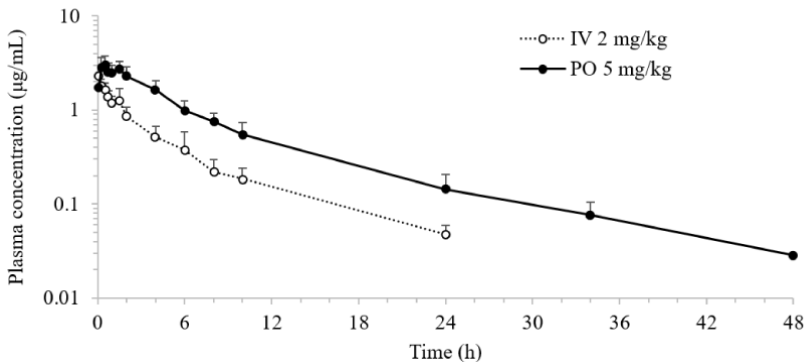


**Levofloksacīna HPLC analītiskās metodes validācijas rezultāti zosu plazmā un audos**

Parametrs	Mērvienības	Plazma	Muskuļi	Sirds	Aknas	Plaušas	Nieres
Dienas CV	%	5,6	6,1	5,9	6,0	8,9	7,2
Starpdienu CV	%	6,9	10,9	9,6	7,4	10,6	9,9
Atgūstamība	%	96 ± 5	94 ± 10	95 ± 8	98 ± 3	93 ± 8	91 ± 9
LOD	µg/ml	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
LOQ	µg/ml	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

### 3.2.3. Farmakokinētiskie parametri

Koncentrācijas plazmā pret laiku puslogaritmiskās līknes pēc vienas levofloksacīna devas IV un PO ievadīšanas attiecīgi 2 mg/kg un 5 mg/kg ir parādītas 3.3. attēlā. Levofloksacīna koncentrācija plazmā bija kvantitatīvi nosakāma līdz 24 stundām putniem, kuriem levofloksacīns tika ievadīts IV, un līdz 48 stundām pēc PO ievadīšanas. Eliminācijas fāzes slīpums abiem ievadīšanas veidiem ir līdzīgs (3.3. tabula).



3.3. attēls. Levofloksacīna koncentrācijas pret laiku puslogaritmiskās līknes plazmā pēc IV (—○—, n = 8) un PO (—●—, n = 8) ievadīšanas Bilgorajska zosīm devās 2 mg/kg un 5 mg/kg uz ķermeņa masas

3.3. tabulā parādīti galvenie levofloksacīna farmakokinētiskie parametri zosīm. Levofloksacīns pēc PO ievadīšanas ātri uzsūcas, uzrādot augstu biopieejamību. Zāles uzrādīja mērenu izplatīšanas tilpumu un ātru klīrensu. Eliminācijas pusperiods starp diviem ievadīšanas veidiem statistiski neatšķirās. Normalizējot devu,  $C_{max}$  un AUC statistiski neatšķirās starp diviem ievadīšanas veidiem ( $p > 0,05$ ).

3.3. tabula

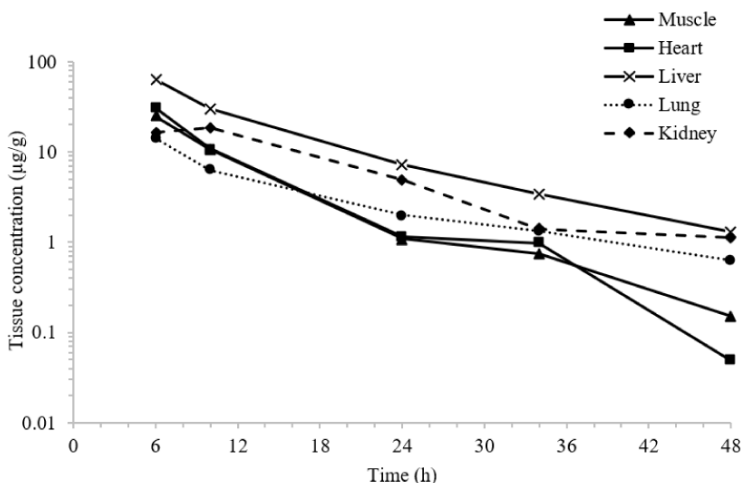
**Levofloksacīna farmakokinētisko parametru vidējās vērtības plazmā pēc IV ievadīšanas devā 5 mg/kg un PO ievadīšanas devā 2 mg/kg zosīm**

Parametrs	Mērvienība	IV (2 mg/kg)		PO (5 mg/kg)	
		Vidējais	SN	Vidējais	SN
$AUC_{0-pēdējā}$	mg × st/l	7,59	1,77	17,24	4,86
$AUC_{0-∞}$	mg × st/l	8,11	1,76	19,37	4,18
$MRT_{0-pēdējā}$	st	5,12	0,37	5,71	2,48
$MRT_{0-∞}$	st	7,08	0,97	7,65	2,17
$λ_z$	1/st	0,10	0,02	0,12	0,05
$t_{1/2}λ_z$	st	7,39	1,21	6,60	2,46
$V_{ss}$	ml/g	1,40	0,28	N/P	N/P
Cl	ml/g × st	0,28	0,06	N/P	N/P
$V_{ss}/F$	ml/g	N/P	N/P	1,63	0,49
Cl/F	ml/g × st	N/P	N/P	0,31	0,09
$C_{max}$	μg/ml	N/P	N/P	3,20	0,65
$t_{max} †$	st	N/P	N/P	0,38	(0,25–1,5)
F	%	N/P	N/P	95,57	20,61

$AUC_{0-pēdējā}$ , laukums zem plazmas koncentrācijas un laika līknes no 0 līdz pēdējam kvantitatīvi noteiktajam paraugu ņemšanas punkta laikam;  $AUC_{0-∞}$ , laukums zem plazmas koncentrācijas un laika līknes no 0 ekstrapolēts līdz bezgalībai;  $MRT_{0-pēdējā}$ , vidējais uzturēšanās laiks no 0 līdz pēdējam kvantitatīvi noteiktajam paraugu ņemšanas punkta laikam;  $MRT_{0-∞}$ , vidējais uzturēšanās laiks no 0 ekstrapolēts līdz bezgalībai;  $λ_z$ , līknes eliminācijas daļas slīpums;  $t_{1/2}λ_z$ , līknes eliminācijas daļas eliminācijas pusperiods;  $V_{ss}$ , izplatīšanas tilpums līdzsvara stāvoklī; Cl, kopējais plazmas klīrenss;  $V_{ss}/F$ , izplatīšanas tilpums koriģēts atbilstoši biopieejamībai; Cl/F, plazmas klīrenss koriģēts atbilstoši biopieejamībai;  $C_{max}$ , maksimālā zāļu koncentrācija plazmā;  $t_{max}$ , maksimālās plazmas koncentrācijas laiks; F, biopieejamība; †, mediānā vērtība un diapazons; N/P, nav piemērojams; IV, intravenozi; PO, perorāli.

### 3.2.4. Audu analīzes rezultāti

Audu levofloksacīna analīzes rezultāti ir parādīti 3.4. attēlā kā koncentrācijas un laika puslogaritmiskās līknes. Zāļu koncentrācijas bija visaugstākās pēc sešām stundām un pastāvīgi samazinājās, saglabājoties virs LOQ līdz 48 stundām (pēdējais savākšanas laiks) visos audos. Aknu paraugos bija visaugstākā levofloksacīna koncentrācija, kam sekoja koncentrācijas nieru paraugos (3.4. tabula).



3.4. attēls. Levofloksacīna koncentrācijas (logaritmiskā skala) muskuļos, sirdīs, aknās, plaušās un nierēs pēc PO ievadīšanas Bilgorajska zosīm (n = 2 / laika punkts) 5 mg/kg devā

*Muscle* – muskuļi, *heart* – sirds, *liver* – aknas, *lung* – plaušas, *kidney* – nieres, *tissue concentration* – koncentrācijas audos, *time* – laiks.

**Farmakokinētisko parametru vidējās vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot naivu apvienoto datu pieeju katram audam pēc PO ievadīšanas zosīm 2 mg/kg devā**

Parametrs	Mērvienība	Muskuļi	Sirds	Aknas	Plaušas	Nieres
AUC <sub>0-pēdējā</sub>	µg × st/ml	218,72	249,8	687,94	165,26	329,51
MRT <sub>0-pēdējā</sub>	st	10,41	9,94	12,56	14,31	13,58
t <sub>1/2λz</sub>	st	8,25	5,07	9,68	14,17	11,84
C <sub>max</sub>	µg/ml	24,95	30,55	64,2	14,13	18,64
t <sub>max</sub>	st	6	6	6	6	10
AUC <sub>audi</sub> /AUC <sub>plazma</sub>	–	11,87	13,56	37,35	8,97	17,89

### 3.3. Levofloksacīna *in vitro* un *ex vivo* antibakteriālā iedarbība pret no trušiem izolētiem *Pasteurella multocida* un *Escherichia coli*

#### 3.3.1. Minimāla inhibējošā un minimāla baktericīda koncentrācija

Visi 10 *P. multocida* izolāti un visi 6 *E. coli* izolāti (ieskaitot references celmu) bija jutīgi pret levofloksacīnu. Neviena no izolātiem netika uzskatīts par rezistentu. MIC un MBC vērtības un MBC/MIC attiecības visiem baktēriju izolātiem abās barotnēs ir attēlotas 3.5. un 3.6. tabulā. Izolāta savākšanas gads, kā arī diagnoze un izolāta izcelsme uzskaitīti 3.5. tabulā.

Trušu *Pasteurella multocida* izolātu levofloksacīnaminimālas inhibējošās un minimālās baktericīdās koncentrācijas

	MIC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MIC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MBC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC/MIC <sub>buljons</sub>	MBC/MIC <sub>serums</sub>	Diagnoze un un izolāta izcelsme
<i>P. multocida</i> 297 (2021)	0,03	0,03	0,06	0,125	2	4	Deguna katars, pneimonijs; deguna uztriepe
<i>P. multocida</i> 320 (2021)	0,03	0,03	0,125	0,125	4	4	Rinīts; noazolakrimāls šķidrums
<i>P. multocida</i> 306 (2021)	0,03	0,03	0,125	0,125	4	4	Rinīts; noazolakrimāls šķidrums
<i>P. multocida</i> 122 (2021)	0,008	0,008	0,008	0,015	1	2	Rinīts; noazolakrimāls šķidrums
<i>P. multocida</i> 2101 (2021)	0,008	0,008	0,015	0,015	2	2	Rinīts; deguna uztriepe
<i>P. multocida</i> 298 (2021)	0,015	0,015	0,03	0,03	2	2	Rinīts; Noazolakrimāls šķidrums
<i>P. multocida</i> 7697 <sup>a</sup> (2022)	0,015	0,015	0,03	0,03	2	2	Rinīts; deguna uztriepe
<i>P. multocida</i> 3178 (2022)	0,008	0,008	0,125	0,125	16	16	Rinīts; noazolakrimāls šķidrums

3.5. tabulas turpinājums

	MIC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MIC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MBC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC/MIC <sub>buljons</sub>	MBC/MIC <sub>serums</sub>	Diagnoze un un izolāta izcelsme
<i>P. multocida</i> 7042 (2022)	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	Rimīts; noazolakrimāls šķidrums
<i>P. multocida</i> 0634 (2022)	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	Rimīts; noazolakrimāls šķidrums

MIC – minimāla inhibējošā koncentrācija, MBC – minimāla baktericīdā koncentrācija, <sup>a</sup> – *P. multocida* izolāts izvēlēts *in vitro* un *ex vivo* baktēriju nonāvēšanas līknes laikā pētījumam.

3.6. tabula

**Trušu *Escherichia coli* izolātu un referenes celma *Escherichia coli* ATCC25922 levofloksacina minimālas inhibējošas un minimālas baktericīdās koncentrācijas**

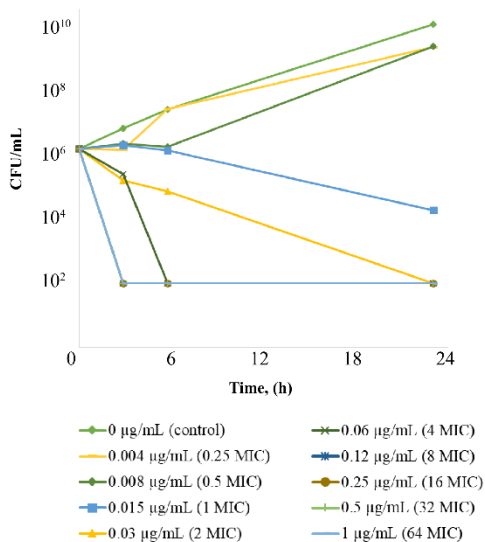
	MIC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MIC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC <sub>buljons</sub> (µg/ml)	MBC <sub>serums</sub> (µg/ml)	MBC/MIC <sub>buljons</sub>	MBC/MIC <sub>serums</sub>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,03	–	0,03	–	1	–
<i>E. coli</i> 1 <sup>a</sup>	0,03	0,03	0,25	0,25	8	8
<i>E. coli</i> 2	0,008	0,008	0,03	0,03	4	4
<i>E. coli</i> 5	0,015	0,015	0,06	0,06	4	4
<i>E. coli</i> 11	0,015	0,015	0,03	0,06	2	4
<i>E. coli</i> 12	0,008	0,008	0,03	0,03	4	4

MIC – minimāla inhibējošā koncentrācija, MBC – minimāla baktericīdā koncentrācija,

<sup>a</sup>*E. coli* izolāts izvēlēts *in vitro* un *ex vivo* baktēriju nonāvēšanas līknes laikā pētījumam.

### 3.3.2. Levofloksacīna antibakteriālā aktivitātē un nonāvēšanas līknes laikā *in vitro*

3.5. attēlā parādīta no laika atkarīgā levofloksacīna antibakteriālā aktivitātē *in vitro* pret izvēlēto *P. multocida* izolātu (izolāts Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml).



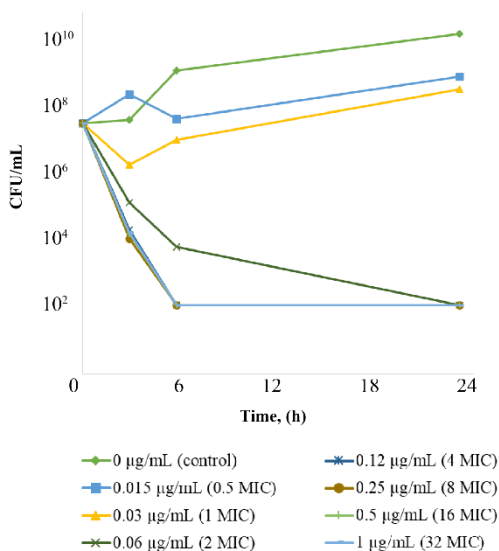
3.5. attēls. *In vitro* nonāvēšanas līknes laikā, kas atspoguļo *P. multocida* (Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām truša serumā

CFU – kolonijas veidojošās vienības, *time* – laiks.

Bez levofloksacīna klātbūtnes 24 stundu inkubācijas rezultātā baktēriju augšana bija aptuveni 3 log<sub>10</sub> KVV/ml. Levofloksacīna koncentrācija, kas līdzvērtīga 0,25 un 0,5 MIC, nespēja kavēt baktēriju augšanu, un pēc 24 stundu inkubācijas baktēriju skaits pārsniedza sākotnējo inokulātu. Koncentrācija, vienāda ar 1 MIC, samazināja baktēriju augšanu, bet pēc 24 stundu inkubācijas baktēriju skaits bija līdzīgs sākotnējam inokulātam. Levofloksacīna koncentrācijas, vienādas ar 2 un 4 MIC, pakāpeniski samazināja baktēriju skaitu

pēc trim un sešām inkubācijas stundām un iznīcināja baktērijas pēc 24 stundu inkubācijas. Levofloksacīna koncentrācija, kas pārsniedza 4 MIC, samazināja baktēriju skaitu līdz noteikšanas robežai jau pēc trim inkubācijas stundām.

3.6. attēlā parādīta no laika atkarīgā levofloksacīna antibakteriālā aktivitāte *in vitro* pret izvēlēto *E. coli* izolātu (izolāts Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml).



3.6. attēls. *In vitro* nonāvēšanas līknes laikā, kas atspoguļo *E. coli* (Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām truša serumā

CFU – kolonijas veidojošās vienības, *time* – laiks.

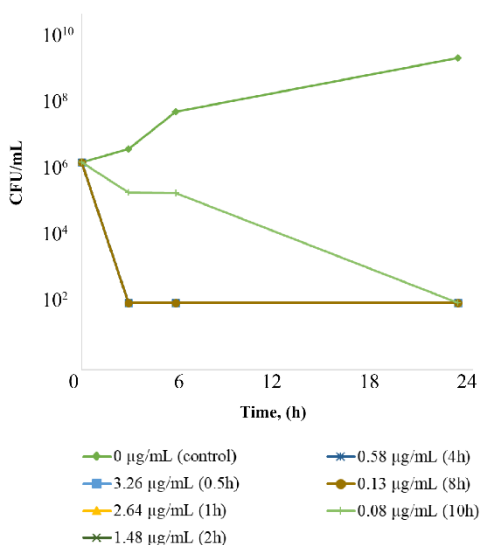
Bez levofloksacīna klātbūtnes 24 stundu inkubācijas rezultātā baktēriju augšana bija aptuveni 3 log<sub>10</sub> KVV/ml. Levofloksacīna koncentrācija, kas līdzvērtīga 0,5 un 1 MIC, nespēja kavēt baktēriju augšanu, un pēc 24 stundu inkubācijas baktēriju skaits pārsniedza sākotnējo inokulātu. Levofloksacīna koncentrācija, kas vienāda ar 2 MIC, pakāpeniski samazināja baktēriju skaitu pēc trim un sešām inkubācijas stundām un iznīcināja baktērijas pēc 24 stundu ilgas inkubācijas. Levofloksacīna koncentrācija, kas bija vienāda ar 4 MIC un



augstākās koncentrācijās, samazināja baktēriju skaitu līdz noteikšanas robežai jau pēc trim inkubācijas stundām.

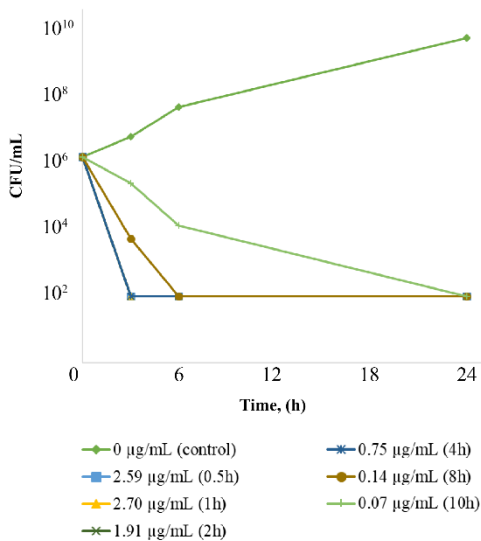
### 3.3.3. Levofloksacīna *ex vivo* antibakteriālā aktivitāte pēc intramuskulārās un subkutānās ievadīšanas un nonāvēšanas līknes laikā

3.7. un 3.8. attēlā ir ilustrētas levofloksacīna baktēriju nonāvēšanas līknes laikā *ex vivo* pret izvēlēto *P. multocida* izolātu (izolāts Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) pēc 5 mg/kg levofloksacīna IM un SC ievades trušiem.



3.7. attēls. *Ex vivo* nonāvēšanas līknes laikā, kas atspoguļo *P. multocida* (Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām seruma paraugos, kas iegūti pēc 5 mg/kg intramuskulāras ievadīšanas veseliem trušiem (n = 6)

CFU – kolonijas veidojošās vienības, time – laiks.

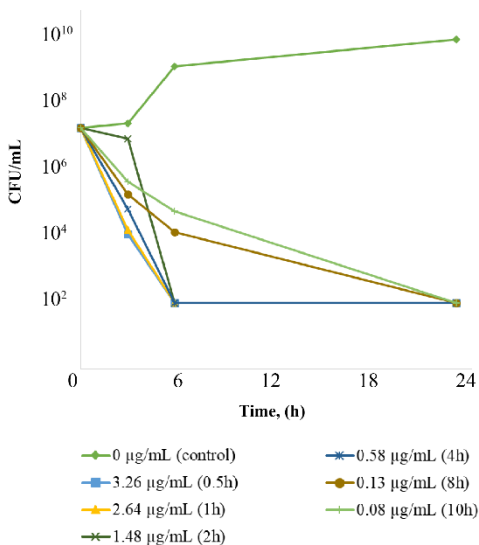


3.8. attēls. *Ex vivo* nonāvēšanas līknes laikā, kas atspoguļo *P. multocida* (Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām seruma paraugos, kas iegūti pēc 5 mg/kg subkutānās ievadīšanas veseliem trušiem (n = 4)

CFU – kolonijas veidojošās vienības, *time* – laiks.

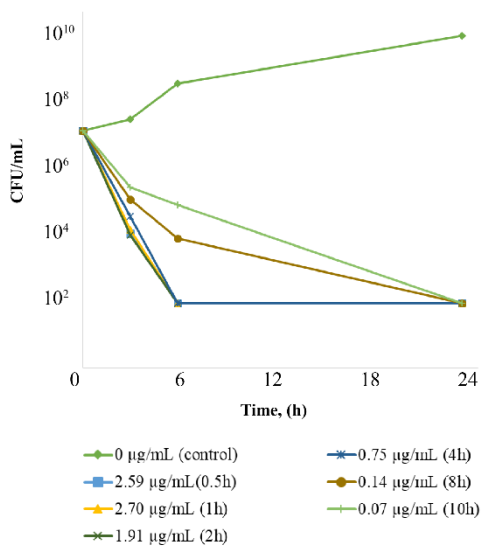
Levofloksacīna koncentrācijas serumā, kas tika sasniegtas pēc 0,5, 1, 2 un 4 stundām gan pēc IM, gan pēc SC ievadīšanas, samazināja baktēriju skaitu līdz noteikšanas robežai jau pēc trīs stundu ilgas inkubācijas. Ņemot vērā 25 % saistīšanos ar olbaltumvielām, brīvā levofloksacīna koncentrācija šajos seruma paraugos bija 2,45 (163 MIC), 1,98 (132 MIC), 1,11 (74 MIC) un 0,44 (29 MIC) µg/ml un 1,94 (130 MIC), 2,03 (135 MIC), 1,43 (96 MIC) un 0,56 (38 MIC) µg/ml attiecīgi IM un SC paraugiem. Pēc 24 stundu inkubācijas visi levofloksacīnu saturošie seruma paraugi spēja samazināt *P. multocida* baktēriju skaitu līdz kvantitatīvās noteikšanas robežai.

3.9. un 3.10. attēlā ir ilustrētas levofloksacīna baktēriju nonāvēšanas līknes laikā *ex vivo* pret izvēlēto *E. coli* izolātu (izolāts Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml) pēc levofloksacīna IM un SC 5 mg/kg devas ievades trušiem.



3.9. attēls. *Ex vivo* nonāvēšanas līknes laikā, kas atspoguļo *E. coli* (Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām seruma paraugos, kas iegūti pēc 5 mg/kg intramuskulāras ievadīšanas veseliem trušiem (n = 6)

CFU – kolonijas veidojošās vienības, *time* – laiks.



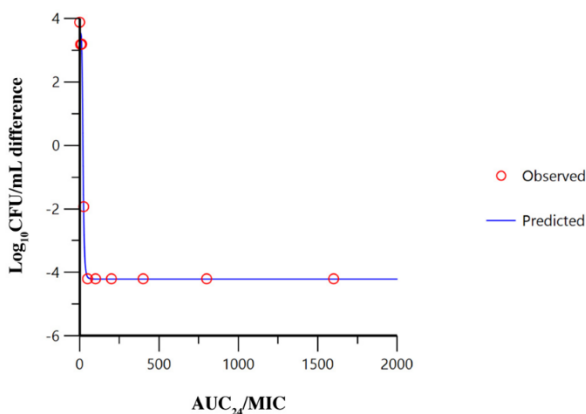
3.10. attēls. *Ex vivo* nonāvēšanas liknes laikā, kas atspoguļo *E. coli* (Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml) augšanu ar dažādām levofloksacīna koncentrācijām seruma paraugos, kas iegūti pēc 5 mg/kg subkutānās ievadīšanas veseliem trušiem (n=4)

CFU – kolonijas veidojošās vienības, *time* – laiks.

Tikai seruma paraugi, kas savākti pēc 0,5, 1 un 2 stundām (kas parāda visaugstākās levofloksacīna koncentrācijas), spēja samazināt baktēriju skaitu līdz kvantitatīvās noteikšanas robežai pēc trīs stundu inkubācijas. Ņemot vērā 25 % saistīšanos ar olbaltumvielām, brīvā levofloksacīna koncentrācija šajos seruma paraugos bija 2,45 (82 MIK), 1,98 (66 MIC) un 1,11 (37 MIC) µg/ml un 1,94 (65 MIC), 2,03 (68 MIC) un 1,43 (48 MIC) µg/ml attiecīgi IM un SC paraugiem. Pēc 24 stundu inkubācijas visi seruma paraugi, kas satur levofloksacīnu, spēja samazināt *E. coli* baktēriju skaitu līdz kvantitatīvās noteikšanas robežai.

### 3.3.4. Farmakodinamiskā modelēšana un diennakts devas aprēķināšana

Farmakodinamiskās analīzes  $AUC_{24}/MIC$  attiecību pret baktēriju skaita izmaiņām pēc 24 stundu inkubācijas grafiki izvēlētajiem *P. multocida* un *E. coli* izolātiem ir parādīti attiecīgi 3.11. un 3.12. attēlā. Farmakodinamiskie dati, iegūti no  $I_{max}$  modeļa, proti,  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, ir nepieciešami bakteriostatiskajam, baktericīdam un baktēriju eliminācijas efektam izvēlētajiem *P. multocida* un *E. coli* izolātiem, dati parādīti attiecīgi 3.7. un 3.8. tabulā. Aprēķinātās parenterāli ievadāmā levofloksacīna diennakts devas, kas nepieciešamas antibakteriālas iedarbības sasniegšanai, ir norādītas 3.9. tabulā. Aprēķinātās diennakts devas *P. multocida* izolātiem ar visaugstāko MIC vērtību (0,5 µg/ml) bakteriostatiskajam, baktericīdam un baktēriju eliminācijas efektam ir attiecīgi 8,30, 11,55 un 30,18 mg/kg diennaktī.



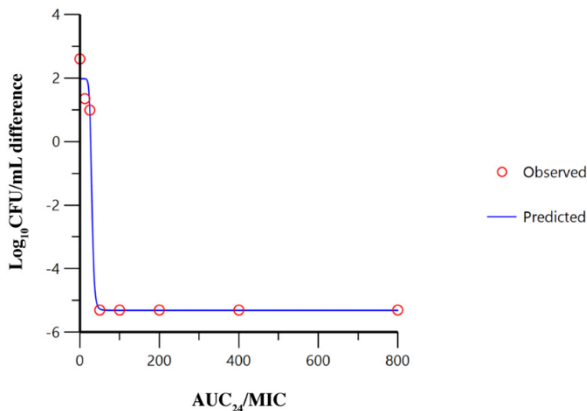
3.11. attēls.  $AUC_{24}/MIC$  attiecību pret *P. multocida* (Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) baktēriju skaitu starpību grafiks levofloksacīnu saturošā truša serumā *in vitro*

*Observed* – novērotās vērtības, *predicted* – prognozētās vērtības, CFU – kolonijas veidojošās vienības.

**Farmakokinētiski farmakodinamiskā datu integrācija *P. multocida*  
(Nr. 7697, MIC = 0,015 µg/ml) *in vitro* augšanas inhibīcijai ar  
levofloksacīnu**

Parametrs	Mērvienība	Paredzamā vērtība
$I_{max}$	$\text{Log}_{10}$ KVV/ml	7,75
$E_0$	$\text{Log}_{10}$ KVV/ml	3,54
$E_0 - I_{max}$	$\text{Log}_{10}$ KVV/ml	-4,21
$IC_{50}$	st	21,41
AUC <sub>24</sub> /MIC bakteriostatiskais	st	20,76
AUC <sub>24</sub> /MIC baktericīdais	st	28,88
AUC <sub>24</sub> /MIC baktēriju eliminācija	st	75,46
Slīpums ( $\gamma$ )	N/P	5,64

$I_{max}$  – starpība starp  $\text{log}_{10}$  baktēriju skaita izmaiņām no 0 un 24 stundām kontroles paraugā ( $\text{log}_{E0}$ ) un  $\text{log}_{10}$  baktēriju skaita izmaiņām paraugā, kas inkubēts ar levofloksacīnu 24 stundas, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml;  $E_0$  –  $\text{log}_{10}$  baktēriju skaita izmaiņas starpība no 0 līdz 24 inkubācijas stundām kontroles paraugā;  $E_0 - I_{max}$  –  $\text{log}_{10}$  baktēriju skaita izmaiņas starpība no 0 līdz 24 inkubācijas stundām paraugos, kas inkubēti ar levofloksacīnu, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml;  $IC_{50}$  – AUC<sub>24</sub>/MIC attiecība, kas rada 50 % no maksimālā antibakteriālā efekta;  $\gamma$  – Hilla koeficients, AUC<sub>24</sub>/MIC atbildes līknes slīpums; N/P – nav piemērojams.



**3.12. attēls. AUC<sub>24</sub>/MIC attiecību pret *E. coli* (Nr. 1,  
MIC = 0,03 µg/ml) baktēriju skaitu starpību grafiks  
levofloksacīnu saturošā truša serumā *in vitro***

*Observed* – novērotās vērtības, *predicted* – prognozētās vērtības, CFU – kolonijas veidojošās vienības.

3.8. tabula

**Farmakokinētiski farmakodinamiskā datu integrācija *E. coli* (Nr. 1, MIC = 0,03 µg/ml) *in vitro* augšanas inhibīcijai ar levofloksacīnu**

Parametrs	Mērvienība	Paredzamā vērtība
$I_{max}$	Log <sub>10</sub> KVV/ml	7,28
$E_0$	Log <sub>10</sub> KVV/ml	1,98
$E_0 - I_{max}$	Log <sub>10</sub> KVV/ml	-5,30
IC <sub>50</sub>	st	30,08
AUC <sub>24</sub> /MIC bakteriostatiskais	st	27,25
AUC <sub>24</sub> /MIC baktericīdais	st	32,49
AUC <sub>24</sub> /MIC baktēriju eliminācija	st	59,62
Slīpums ( $\gamma$ )	N/P	9,98

$I_{max}$  – starpība starp log<sub>10</sub> baktēriju skaita izmaiņām no 0 un 24 stundām kontroles paraugā (log<sub>10</sub> $E_0$ ) un log<sub>10</sub> baktēriju skaita izmaiņām paraugā, kas inkubēts ar levofloksacīnu 24 stundas, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml;  $E_0$  – log<sub>10</sub> baktēriju skaita izmaiņas starpība no 0 līdz 24 inkubācijas stundām kontroles paraugā;  $E_0 - I_{max}$  – log<sub>10</sub> baktēriju skaita izmaiņas starpība no 0 līdz 24 inkubācijas stundām paraugos, kas inkubēti ar levofloksacīnu, kad ir sasniegta noteikšanas robeža 100 KVV/ml; IC<sub>50</sub> – AUC<sub>24</sub>/MIC attiecība, kas rada 50 % no maksimālā antibakteriālā efekta;  $\gamma$  – Hilla koeficients, AUC<sub>24</sub>/MIC atbildes līknes slīpums; N/P – nav piemērojams.

3.9. tabula

**Aprēķinātās diennakts devas levofloksacīna parenterālai ievadīšanai  
trušiem pret *P. multocida* (MIC = 0,015 µg/ml) and *E. coli*  
(MIC = 0,03 µg/ml)**

Diennakts deva	<i>P. multocida</i> (MIC = 0,015 µg/ml)	<i>E. coli</i> (MIC = 0,03 µg/ml)
Bakteriostatiskais efekts	0,25 mg/kg	0,65 mg/kg
Baktericīds efekts	0,35 mg/kg	0,78 mg/kg
Baktēriju eliminācija	0,91 mg/kg	1,43 mg/kg

## 4. Diskusija

### 4.1. Levofloksacīna farmakokinētika pēc intravenozas, intramuskulāras un subkutānas ievadīšanas trušiem

Cik mums ir zināms, šajā pētījumā levofloksacīna farmakokinētiskie profili pēc IM un SC ievadīšanas veseliem trušiem tika aprakstīti pirmo reizi, lai gan IV ievadīšana iepriekš tika pārbaudīta uz *S. pneumoniae* inficētiem trušiem.

Šajā pētījumā izmantotā 5 mg/kg deva tika balstīta uz devu, kas bija izmantota iepriekšējā levofloksacīna pētījumā ar cāļiem – broileriem (Lee et al., 2017). Šī deva atrodas devu diapazonā, kas iepriekš tika pārbaudīta citās zīdītāju un putnu sugās (Aboubakr, 2012; Aboubakr & Soliman, 2014; Albarellos et al., 2005; Kumar et al., 2012; Urzúa et al., 2020; Varia et al. al., 2009); deva, kas saistīta ar zemu blakusparādību risku. Mūsu pētījuma laikā nomira viens trusis, un nāvi var saistīt ar paraugu ņemšanas procedūru radīto stresu. Lai gan autopsija neuzrādīja manāmas orgānu izmaiņas trušiem, ir ziņots, ka viena levofloksacīna IV deva cilvēkiem izraisīja kardiovaskulāras blakusparādības – sirdsdarbības ātruma palielināšanos un QT intervāla pagarināšanos (Basyigit et al., 2005). Tādējādi truša nāve varētu būt izskaidrota arī ar iespējamo levofloksacīna kardiovaskulāro ietekmi.

Visi trīs šajā pētījumā izmantotie ievadīšanas ceļi (IV, IM un SC) sniedza ļoti līdzīgus rezultātus attiecībā uz galvenajiem farmakokinētiskajiem parametriem. To var izskaidrot ar ātru levofloksacīna uzsūkšanos un ātru izplatīšanos pēc ekstravaskulāras ievadīšanas, kas atdarina IV ievadīšanas farmakokinētisko profilu. Šajā pētījumā AUC vērtības visiem trim ievadīšanas ceļiem bija līdzīgas un tika ziņots par pilnīgu (aprēķināto augstāk nekā 100 %) levofloksacīna sistēmisko biopieejamību gan pēc IM, gan pēc SC ievadīšanas. Maksimālā koncentrācija plazmā abiem ekstravaskulārajiem ceļiem tika sasniegta aptuveni vienā laikā (30–45 minūtes pēc ievadīšanas), un tai bija līdzīga vērtība (apmēram 3 µg/ml). Līdzīgi rezultāti tika novēroti pēc SC un IM



ievadīšanas vidējiem uzturēšanās laikiem, klīrensiem un izplatīšanas tilpumiem. Šīs FK līdzības liecina, ka, lietojot levofloksacīnu 5 mg/kg devā, no visiem trim ievadīšanas ceļiem var sagaidīt vienādu zāļu efektivitāti. Turklāt iepriekšējie pētījumi ar citiem fluorhinoloniem trušiem (Fernandez-Varon et al., 2005; Marín et al., 2008) un ar levofloksacīnu citās dzīvnieku sugās (Lee et al., 2017; Madsen et al., 2019; Patel et al., 2012a) pēc dažādiem ievadīšanas ceļiem uzrādīja ļoti līdzīgus farmakokinētiskos profilus. Mūsu pētījumā levofloksacīna terminālais plazmas eliminācijas pusperiods bija viens no īsākajiem starp pētītām sugām (1,8–2,06 stundas atkarībā no parenterālās ievadīšanas veida).

Levofloksacīna izplatīšanas tilpums līdzsvara stāvoklī pēc IV ievadīšanas ar vērtību 1,37 ml/g liecina par mērenu zāļu iekļūšanu caur ķermeņa bioloģiskajām membrānām. Šī vērtība ir diapazonā, kas publicēts, pētot levofloksacīnu farmakokinētiku putnu un zīdītāju sugām, 0,56 ml/g aitām (Sartini et al., 2020a) un 2,88–3,25 ml/g broileriem (Lee et al., 2017; Varia et al., 2009).

Beznodalījuma farmakokinētiskās analīzes rezultāti parādīja, ka biopieejamības vērtības pēc IM un SC ievadīšanas pārsniedza 100 %. Par levofloksacīna pilnīgu biopieejamību pēc ekstravaskulāras ievadīšanas ziņots arī citās sugās (Vercelli et al., 2020; Goudah & Abo-El-Sooud, 2009; Lee et al., 2017; Madsen et al., 2019; Sartini et al., 2021). Interesanti, ka arī citi fluorhinoloni, kas pētīti trušos pēc IM un SC ievadīšanas, ir uzrādījuši pilnīgu biopieejamību, un faktiskās vērtības pārsniedz 100 % (Fernandez-Varon et al., 2007; Marín et al., 2008; Marín et al., 2018). Tas var būt saistīts ar dažādiem faktoriem, kas jau ir aprakstīti literatūrā (Brown, 1996; Martinez et al., 2006; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a), piemēram, nelineāro klīrensu. Ir ziņots, ka orbifloksacīna, norfloksacīna, danofloksacīna un marbofloksacīna biopieejamība pēc IM ievadīšanas trušiem pārsniedz 100 % (Abo-El-Sooud & Goudah, 2010; Fernandez-Varon et al., Marín et al., 2005; 2008; Marín et al., 2018). Turklāt

subkutānā ofloksacīna, orbifloksacīna un danofloksacīna ievadīšana trušiem arī uzrādīja pilnīgu biopieejamību (Fernandez-Varon et al., 2007; Marangos et al., 1997; Marín et al., 2008). Šie novērojumi liecina, ka kopumā fluorhinoloni labi uzsūcas un plaši izplatās pēc IM un SC ievadīšanas trušiem. Nodalījuma farmakokinētiskās analīzes lietošana, izmantojot *PKanalix* programmatūru (*Lixoft, Simulations Plus, ASV*), tām pašām levofloksacīna plazmas koncentrācijām, kas iegūtas mūsu pētījumā ar trušiem, apstiprināja pilnīgu levofloksacīna biopieejamību trušiem pēc parenterālas ievadīšanas. IM ievadīšanas dati vislabāk tika pielāgoti divu nodalījumu eliminācijas modelim ar centrālo un perifērālo nodalījumu un lineāro pirmās kārtas absorbciju. Akaikes informācijas kritērijs tika piemērots, lai noteiktu piemērotības pakāpi. Aprēķināts, ka vidējā biopieejamība bija 97 %. SC ievadīšanas dati vislabāk tika piemēroti viena nodalījuma un lineārās eliminācijas modelim ar pirmās kārtas absorbciju. Vidējā biopieejamība bija 108 %.

Salīdzinot mūsu pētījumu ar levofloksacīna pētījumu ar trušiem, kas inficēti ar *S. pneumoniae* (Destache et al., 2001), levofloksacīna AUC vērtības mūsu pētījumā bija stipri zemākas (vismaz divās reizēs, ja koriģētas atbilstoši ievadītajai devai). Zāļu eliminācijas pusperiods plazmā bija vismaz trīs reizes garāks nekā mūsu pētījumā novērotais. Šīs atšķirības varētu būt saistītas ar atšķirībām trušu šķirnē (tajā pētījumā bija izmantoti Jaunzēlandes baltās šķirnes dzīvnieki), dzīvnieku izmēriem divos pētījumos (2–3 kg Destache et al. pētījumā pret vidēji 4,2 kg mūsu pētījumā) un citu medikamentu izmantošanu (piemēram, anestēzijas ievadīšana). Turklāt infekcijas klātbūtne, iespējams, palēnināja zāļu izvadīšanu no organisma līdzīgi tam, kāds tika novērots PK pētījumā par trušiem, inficētiem ar marbofloksacīnu (Abo-El-Sooud & Goudah, 2010).

Mūsu publicētas AUC vērtības trušiem ir vienas no zemākajām starp citām pētītajām sugām, ņemot vērā ievadītās devas atšķirības. Tas varētu būt saistīts ar ātru zāļu izvadīšanu no truša organisma. Levofloksacīna vidējais

plazmas klīrenss bija  $0,6 \text{ ml/g} \times \text{st}$  ar zināmām atšķirībām starp pētījuma dzīvniekiem. Tā ir līdz šim augstākā publicētā klīrensa vērtība no visām iepriekš pētītajām zīdītāju un putnu sugām, izņemot aitas, kurām bija līdzīgs klīrenss ar vērtību  $0,55 \text{ ml/g} \times \text{st}$  (Patel et al., 2012a) un eliminācijas pusperiods (2,38 stundas aitām pret 2,06 stundām trušiem). Tomēr cits pētījums ar aitām uzrādīja zemāku klīrensa vērtību  $0,2 \text{ ml/g} \times \text{st}$  un ilgāku eliminācijas pusperiodu (3,3 stundas), taču šis pētījums tika veikts, izmantojot aitas ar gandrīz divreiz lielāku ķermeņa masu, iespējams, tā rezultātā tika novērota arī lēnākā eliminācija (Goudah & Hasabelnaby, 2010). Kilburn et al. (2022) ziņoja par garāko levofloksacīna eliminācijas pusperiodu pēc ekstravaskulāras ievadīšanas Āzijas ziloņiem (līdz 12,11 stundām). Ātra levofloksacīna eliminācija trušiem var būt saistīta ar to lielo sirds izsviedes tilpumu un sirdsdarbības ātrumu (Mitchell & Tully, 2008). Pēc citu fluorhinolonu ievadīšanas trušiem tiek novērots augstāks klīrenss; orbifloksacīns, norfloksacīns, danofloksacīns un moksifloksacīns tiek izvadīti pat ātrāk nekā levofloksacīns ar klīrensa vērtībām attiecīgi 0,9, 0,8, 0,8 un  $0,8 \text{ ml} \times \text{g/st}$  (Fernandez-Varon et al., 2005; Fernandez-Varon et al., 2007; Marín et al., 2008; Marín et al., 2018). Šie rezultāti liecina, ka parenterālai fluorhinolonu ievadīšanai trušiem būs nepieciešama bieža dozēšana. Alternatīvi, ievadīšanas veidu var arī mainīt, lai ņemtu vērā veterinārārstu ērtības un/vai samazinātu inficētā dzīvnieka stresu, saistītu ar ārsta manipulācijām.

Zema ekstrakcijas attiecība (apmēram 7 %) var norādīt, ka levofloksacīns nav pilnībā metabolizēts un var izdalīties neizmainītā veidā caur nierēm (Brown, 1996; Martinez et al., 2006). Tas liecina par perorāli ievadāmu zāļu formu lietošanas iespējamību (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Lai gan ekstrakcijas attiecības vērtības netika aprēķinātas citām sugām, kurām tika noteikta levofloksacīna farmakokinētika, mēs aprēķinājām aptuvenas ekstrakcijas attiecības iepriekš minētajiem pētījumiem. Kaķiem, suņiem un trušiem tika prognozēti zemi levofloksacīna ekstrakcijas rādītāji (apmēram 2 %),

pamatojoties uz klīrensu un vidējo dzīvnieku ķermeņa svaru (Albarellos et al., 2005; Destache et al., 2001; Landoni & Albarellos, 2019; Madsen et al., 2019). Arī lauksaimniecības pārtikas dzīvniekiem levofloksacīna ekstrakcijas ātrums ir zems. Pamatojoties uz literatūrā sniegtajiem datiem par kazām (Goudah & Abo-El-Sooud, 2009), aītām (Goudah & Hasabelnaby, 2010; Patel et al., 2012) un kamieļiem (Goudah, 2009), ekstrakcijas attiecību vērtības ir attiecīgi 3,2 %, 3,9 % un 9,5 %. Aprēķinātās ekstrakcijas attiecību vērtības visās pētītajās dzīvnieku sugās norāda uz līdzīgām zāļu eliminācijas spējām starp sugām.

Tā kā levofloksacīna eliminācijas pusperiods visiem trim ievadīšanas veidiem bija īss, būtu nepieciešama bieža ievadīšana, kas dzīvniekam var radīt stresu. Tāpēc autori neuzskata, ka kāds no šiem parenterālajiem ceļiem ir piemērots regulārai levofloksacīna klīniskai lietošanai pētītajā zāļu formā. Lai gan par fluorhinolonu terapeitisko efektivitāti var secināt, novērtējot farmakokinētisko un farmakodinamisko surogātindeksu un izmantojot  $AUC_{24}/MIC$  attiecību, zemā AUC vērtība un nespēja noteikt levofloksacīna daudzumu truša plazmā 24 stundas pēc zāļu ievadīšanas izraisīja nespēju veikt šos surogātaprēķinus, pamatojoties uz eksperimentālajiem datiem. Pamatojoties uz šī pētījuma rezultātiem, maz ticams, ka levofloksacīna deva 5 mg/kg radīs terapeitisku efektu trušiem. Aprēķinātā levofloksacīna efektīvā diennakts deva, pamatojoties uz *Enterobacteriaceae* MIC vērtību 0,5 µg/ml, par ko ziņots suņiem (Madsen et al., 2019), bija  $29 \pm 8$  mg/kg. Aprēķins sakrīt ar perorālo devu 25 mg/kg suņiem, kam vajadzētu sasniegt līdzīgus terapeitiskos mērķus. Trušu ārstēšanā visbiežāk tiek izmantots perorālais zāļu ievadīšanas veids (ārstnieciskajā barībā vai ūdenī). Ir ziņots, ka levofloksacīnam ir pilnīga perorāla biopieejamība divām mājdzīvnieku zīdītāju sugām – suņiem ( $104 \pm 30$  %) (Albarellos et al., 2005; Madsen et al., 2019) un kaķiem ( $86 \pm 43$  %) (Albarellos et al., 2005). Ja šī perorālās biopieejamības tendence arī trušiem ir līdzīga, mūsu pētījumā aprakstīto efektīvo levofloksacīna dienas devu var pievienot granulētai

trušu barībai vai dzeramajam ūdenim. Tomēr, tā kā inficētie dzīvnieki var zaudēt apetīti, saglabājot ūdens uzņemšanu, mēs iesakām dienas devu pagatavot 50–100 ml dzeramā ūdens (t. i., trušu vidējā ūdens daudzuma dienā) (Harcourt-Brown, 2002).

Šis pētījums ir pirmais, kurā pētīta levofloksacīna sistēmiskas ievadīšanas ietekme uz dažiem trušu acu parametriem. Asaru kvalitatīvo parametru lielā atšķirība starp atsevišķiem dzīvniekiem pirms un pēc ārstēšanas ar levofloksacīnu apgrūtināja tendenču noteikšanu. Autori norāda, ka deva, iespējams, bija pārāk maza vai vienreizēja ievadīšana bija nepietiekama, lai radītu jebkādu pamanāmu ietekmi uz asaru veidošanos. Asaru izdalīšanās pamatlīmenis, kas novērtēts ar STT metodi ( $7 \pm 3$  mm/min.), bija nedaudz augstāks nekā Angoras trušiem un Holandiešu trušiem (attiecīgi 5,4 un 4,6 mm/min.) (Rajaei et al., 2016). Neatkarīgi no tā asaru osmolaritāte nedaudz, bet statistiski ticami ( $p = 0,002$ ) samazinājās 48 stundas pēc zāļu ievadīšanas. Tāpēc mēs secinām, ka levofloksacīna ievadīšana 5 mg/kg devā, visticamāk, neizraisīs būtiskas izmaiņas asaru kvalitatīvajās un kvantitatīvajās īpašībās. Tomēr pētījumi ar vairāku devu ievadīšanu un lielāku dzīvnieku skaitu būtu vajadzīgi, lai izdarītu pārlicinošus secinājumus.

Saskaņā ar iegūtajiem pētījuma rezultātiem levofloksacīna 5 mg/kg deva, visticamāk, nebūs efektīva trušiem. Turklāt vienreizēja šīs devas ievadīšana, visticamāk, neietekmēs asaru parametrus. Pamatojoties uz aprēķiniem, 29 mg/kg dienas deva var būt efektīva levofloksacīna IV ievadīšanai.

#### **4.2. Levofloksacīna farmakokinētika un koncentrācijas audos pēc perorālas lietošanas zosīm**

Zosis neuzrādīja nekādus levofloksacīna blakuseftus pētījuma laikā vai pēc tā. Deva tika izvēlēta, pamatojoties uz iepriekšējo pētījumu ar cāļiem (Lee et al., 2017). Šis ir pirmais pētījums, kurā aplūkota levofloksacīna farmakokinētika zosīm. Zāles uzrādīja mērenu eliminācijas pusperiodu (7,39 stundas), kas ir

salīdzināms ar rezultātiem, kuri iegūti no cāļiem – 6,93 stundas (Lee et al., 2017), bet bija garāks nekā pīlēm – 2,76 stundas (Aboubakr & Soliman, 2014), ar lēnāku klīrensu (zosīs – 0,28 ml/g × st, pīles – 0,41 ml/g × st). Izplatīšanas tilpums zosīm 1,40 ml/g bija līdzīgs vērtībai, iegūtai pētījumā ar pīlēm – 1,37 ml/g. Levofloksacīns parādīja augstākas AUC vērtības (7,59 μg × st/ml) pēc devas normalizēšanas, nekā publicētos pētījumos ar pīlēm (4,89 μg × st/ml) un cāļiem (5,09 μg × st/ml) (Aboubakr & Soliman, 2014; Lee et al., 2017). Iespējams, ka to cēlonis ir sugu specifiskās atšķirības, piemēram, vielmaiņā, saistīšanās ar plazmas olbaltumvielām vai absorbcijas procesos. Pēc perorālas lietošanas levofloksacīns uzrādīja ātrāku uzsūkšanos (īsāks  $t_{max}$ ) un augstāku maksimālo koncentrāciju zosīm nekā pīlēm, tītariem un vistām (Aboubakr & Soliman, 2014; Aboubakr et al., 2014; Lee et al., 2017; Patel et al., 2012b; Varia et al., 2009). Klimatiskie apstākļi vai izmantotās barības atšķirības varētu būt veicinājušas šādas atšķirības. Levofloksacīna perorālā biopieejamība putnu sugām kopumā ir augsta (pīlēm 73,6 %; cāļiem 59,5 %; Livorno vistām 71,6 %; tītariem 79,9 %), taču visaugstākā tā ir zosīm (95,6 %), kas liecina, ka perorālais ceļš ir praktisks ievadīšanas veids putniem, īpaši zosīm (Aboubakr & Soliman, 2014; Aboubakr et al., 2014; Patel et al., 2012; Varia et al., 2009).

Levofloksacīna MIC vērtības vēl nav noteiktas baktērijām, kas izolētas no zosīm. Attiecībā uz šajā pētījumā iegūto  $AUC_{24}$  vērtību pēc perorālas lietošanas (5 mg/kg) levofloksacīns zosīm izrādījās efektīvs pret baktērijām ar  $MIC < 0,24$  μg/ml. Izmantojot levofloksacīna MIC vērtību pret *E. coli*, kas izolēts no broilercāļiem (0,125 μg/ml, Lee et al., 2017), tika aprēķināta  $AUC_{24}/MIC$  attiecība 136, kas liecina, ka šajā pētījumā izmantotais dozēšanas režīms varētu būt efektīvs zosīm. Levofloksacīna saistīšanās ar plazmas olbaltumvielām nav novērtēta zosīm, bet cāļiem tā bija 25 % (Lee et al., 2017), un to var uzskatīt par nenozīmīgu farmakokinētisko un farmakodinamisko indeksu aprēķinos. Tomēr ir nepieciešami turpmāki pētījumi, lai noteiktu, vai

levofloksacīna saistīšanās ar plazmas olbaltumvielām zosīm atbilst tai, kas konstatēta citām putnu sugām.

Levofloksacīns tika konstatēts visos izvēlētajos zosu audos, un tā koncentrācija bija visaugstākā pēc sešām stundām pēc ievadīšanas un pakāpeniski samazinājās 48 stundu laikā. Ņemot vērā, ka cilvēkiem aptuveni 90 % levofloksacīna ātri uzsūcas no zarnu trakta caur aknu vārtu vēnu un, tāpat kā citi fluorhinoloni, tas galvenokārt izdalās neizmainītā veidā ar urīnu (Fish & Chow, 1997), bija pamatoti sagaidīt augstākās levofloksacīna koncentrācijas zosu aknās un nierēs. Iespējamie tropismi, kas saistīti ar levofloksacīnu, vēl nav novērtēti. Šajā pētījumā konstatētais levofloksacīna izdalīšanas profils no audiem bija līdzīgs konstatētajam cāļos (Kyuchukova et al., 2013; Lee et al., 2017). Šajā pētījumā muskuļu levofloksacīna koncentrācija, kas tika normalizēta pret devu, bija augstāka nekā koncentrācija, kas konstatēta cāļos (Kyuchukova et al., 2013; Lee et al., 2017). Šis atšķirības varētu būt saistītas ar sugām raksturīgām atšķirībām vai izmantotajām dažādajām analīzes metodēm.

Fluorhinolonu maksimālās atlieku robežas mājputnu aknās ir aptuveni 0,1 µg/g (EMA, 1997, 1999, 2002). Pamatojoties uz šo vērtību, ir aprēķināts provizorisks ierobežojumu laiks (TI 95 %) aknām – 89,7 stundas. Kaut gan tas labi saskanēja ar datiem no pētījuma ar cāļiem – četras dienas (Ravikumar et al., 2015), mazā populācijas izlases lieluma dēļ jāievēro piesardzība. Lai apstiprinātu šo konstatējumu, ir nepieciešami turpmāki pētījumi. Zāļu iekļūšanu audos var aprakstīt, izmantojot  $AUC_{\text{audi}}/AUC_{\text{plazmā}}$  attiecību. Attiecības vērtība, kas lielāka par 1, norāda uz salīdzinoši augstāku zāļu koncentrāciju audos nekā asinīs ar iespējamu uzkrāšanos audos (Bellmann et al., 2004). Mūsu pētījumā  $AUC_{\text{audi}}/AUC_{\text{plazmā}}$  attiecība bija augsta visos audos un īpaši aknās. Turpmākie pētījumi varētu izskaidrot šo parādību (piemēram, vai levofloksacīns tiek deponēts hepatocītos).

### 4.3. Levofloksacīna antibakteriālā iedarbība pret *Pasteurella multocida* un *Escherichia coli*, kas izolētas no trušiem *in vitro* un *ex vivo*

Cik mums ir zināms, mūsu pētījums ir pirmais, kas apraksta levofloksacīna nonāvēšanas liknes laikā *P. multocida* un *E. coli* izolātiem no trušiem. Nevieni no šajā pētījumā iekļautajiem baktēriju izolātiem neuzrādīja rezistenci pret levofloksacīnu. Tomēr publicētie raksti un ziņojumi liecina par *P. multocida* un *E. coli* rezistenci pret šīm zālēm (Saha et al., 2021; Sitovs et al., 2021). MIC vērtības gan *P. multocida*, gan *E. coli* izolātiem bija zemas, salīdzinot ar citu patogēnu MIC, par ko ziņots literatūrā. Divi *P. multocida* izolāti (Nr. 7042 un 0634) uzrādīja salīdzinoši augstas MIC vērtības (0,5 µg/ml). Tā kā pašlaik nav klīniski apstiprināto levofloksacīna robežpunktu attiecībā uz *P. multocida* izolātiem no trušiem, piemērojot CLSI M100 (CLSI, 2018b) levofloksacīna robežpunktus, šos izolātus varētu uzskatīt par jutīgiem. Piemērojot fluorhinolonu (pradofloksacīns, enrofloksacīns un danofloksacīns) klīniskos robežpunktus *P. multocida*, kas izraisa elpceļu infekcijas dzīvniekiem saskaņā ar CLSI VET08 (CLSI, 2018a), šie izolāti vairs netiktu uzskatīti par jutīgiem (jutīgi definēti kā MIC ≤ 0,25 µg/ml). Visiem pārējiem šī pētījuma *P. multocida* izolātiem MIC vērtības (0,008–0,03 µg/ml) atbilst MIC<sub>90</sub> vērtībām, kuras noteiktas veterinārajiem fluorhinoloniem un to aktīvajiem metabolītiem pret *P. multocida* – difloksacīnam, enrofloksacīnam, ciprofloksacīnam, marbofloksacīnam, orbifloksacīnam (0,008–0,05 µg/ml) (Riviere & Papich, 2018). MIC<sub>90</sub> vērtības tiem pašiem veterinārajiem fluorhinoloniem pret *E. coli* (0,03–0,39 µg/ml) bija nedaudz augstākas, salīdzinot ar *E. coli* MIC vērtībām, kas iegūtas mūsu pētījumā (0,008–0,03 µg/ml). Mūsu pētījumā tika izmantoti tikai 15 baktēriju izolāti, tādēļ vēl nav skaidrs, vai levofloksacīns ir ievērojami pārāks par citiem veterinārmedicīnā izmantotajiem fluorhinoloniem.

Mūsu pētījumā levofloksacīna minimālo baktericīdo koncentrāciju attiecības pret minimālo inhibējošām koncentrācijām nebija augstas.



*P. multocida* un *E. coli* izolātiem vidējās attiecības attiecīgi bija 2 un 4. Šādi rādītāji ir līdzīgi attiecībām, kas ir aprakstītas literatūrā cilvēku izolātiem. Tur tika ziņots, ka levofloksacīns panāk KVV/ml samazinājumu par  $\geq 99,9\%$  vairākumā bakterēmiju etioloģijās, salīdzinot ar citiem fluorhinoloniem (Akinjogunla et al., 2022). Tika ziņots, ka MBC/MIC attiecība  $> 8$  ir saistīta ar antibiotiku toleranci (Gonzalez et al., 2013). Mūsu farmakodinamiskā pētījuma rezultāti neliecina par tolerances attīstību pret levofloksacīnu trušiem.

AUC<sub>24</sub>/MIC attiecība ir aprakstīta kā vissvarīgākais rādītājs, lai noteiktu no koncentrācijas atkarīgo antibakteriālo zāļu, tostarp fluorhinolonu, efektivitāti (Aliabadi & Lees, 2001). Mūsu pētījumā *ex vivo* AUC<sub>24</sub>/MIC izmantošana nebija piemērota farmakokinētiskai un farmakodinamiskai modelēšanai ar nonāvēšanas līknes laikā metodi. Iemesls tam bija baktēriju skaita samazināšanās līdz noteikšanas robežai pēc 24 stundu inkubācijas ar visām eksperimentāli iegūtajām levofloksacīna koncentrācijām truša serumā. Visos paraugos, kas savākti pēc IM un SC 5 mg/kg ievadīšanas visos laika punktos, levofloksacīna koncentrācija bija augstāka par 1 MIC abiem pētījumā izmantotajiem baktēriju izolātiem. Tā vietā modelēšanai tika izmantoti *in vitro* AUC<sub>24</sub>/MIC dati. AUC<sub>24</sub>/MIC vērtības, kas iegūtas zemākām levofloksacīna koncentrācijām (0,25, 0,5 un 1 MIC, kas nesamazināja baktēriju skaitu līdz noteikšanas robežai), sniedza vairāk datu modeļa izveidei. Kad tika vizuāli salīdzinātas nonāvēšanas līknes laikā *in vitro* un *ex vivo* eksperimentiem, to līdzība atspoguļoja gandrīz identiskus baktēriju nonāvēšanas modeļus. Tas attaisnoja *in vitro* AUC<sub>24</sub>/MIC datu izmantošanu modelēšanai.

*In vitro* eksperimentā tika novērots nedaudz lēnāks baktēriju nonāvēšanas ātrums, salīdzinot ar *ex vivo* eksperimentu. Tas varētu būt saistīts ar ķīmiskajām atšķirībām starp mūsu pētījuma trušu serumu un komerciāli pieejamo trušu serumu, ko izmantoja *in vitro* eksperimentā. Hilla koeficienta vērtības abos modeļos šajā pētījumā bija augstas – attiecīgi 5,64 *P. multocida* un 9,98 *E. coli*

izolātiem. Šīs vērtības ilustrē strauju levofloksacīna aktivitātes pieaugumu ar nelielu koncentrācijas pieaugumu. Literatūrā ir aprakstīts nedaudz mazāk stāvs levofloksacīna līknes slīpums – 5,21 pret *E. coli*, kas izolēta no broilercāļiem (Lee et al., 2017). Levofloksacīns mūsu pētījumā uzrādīja līdzīgas  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, kas nepieciešamas *P. multocida* bakteriostatiskam, baktericīdam un baktēriju eliminācijas efektam (attiecīgi 20,76, 28,88 un 75,46 stundas), salīdzinot ar marbofloksacīnu (attiecīgi 20,9, 45,2 un 71,7 stundas) *P. multocida* izolāta no cūkām gadījumā (Dorey et al., 2017), un nedaudz zemākas attiecības pār marbofloksacīnu *P. multocida* izolātiem no teļiem (attiecīgi 48,6, 64,9 un 74,8 stundas) (Potter et al., 2013).  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, kas nepieciešamas bakteriostatiskam, baktericīdam un baktēriju eliminācijas efektam mūsu pētījumā pret *E. coli* (attiecīgi 27,25, 32,49 un 59,62 stundas), bija augstākas, salīdzinot ar vērtībām, kas aprakstītas pētījumā ar broilercāļiem (attiecīgi 18,77, 24,02 un 36,27 stundas) (Lee et al., 2017). Danofloksacīna  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, kuras iegūtas pret *E. coli*, kas izolēta no tītariem, bija ievērojami zemākas (attiecīgi 0,42, 1,90 un 6,73 stundas) (Haritova et al., 2006). Enrofloksacīna  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, kuras iegūtas pret *E. coli*, kas izolētas no cāļiem, bija stipri augstākas – 257,40 un 2794,40 stundas, attiecīgi bakteriostatiskajam un baktēriju eliminācijas efektam (Haritova & Russenova, 2010). Neskatoties uz iepriekšējo secinājumu no mūsu levofloksacīna farmakokinētiskā pētījuma ar trušiem, ka 5 mg/kg levofloksacīna deva, visticamāk, nebūs efektīva trušiem, *ex vivo* nonāvēšanas līknes laikā liecināja par baktēriju skaita samazināšanos līdz kvantitatīvās noteikšanas robežai 24 stundās. Aprēķinātās diennakts devas bija vēl zemākas. Mūsu farmakokinētiski farmakodinamiskajā pētījumā ieteicamās diennakts devas, kas nepieciešamas bakteriostatiskam, baktericīdam un baktēriju eliminācijas efektam (0,25–1,43 mg/kg diennaktī), bija mazākas nekā levofloksacīna devas, kas tika aprēķinātas broilieriem (1,1–4,3 mg/kg diennaktī) (Lee et al., 2017) un trušiem (29 mg/kg

diennaktī) (Sitovs et al., 2020). Iepriekš publicēta diennakts deva bija līdz 100 reizēm augstāka nekā šajā pētījumā aprēķinātās devas. Salīdzinot ar iepriekš publicēto devu, šajā pētījumā tika izmantoti eksperimentāli iegūtie farmakodinamiskie dati no jutīgo baktēriju nonāvēšanas līknēm laikā, savukārt iepriekšējie farmakodinamiskie dati bija balstīti uz avotiem no publicētās literatūras. Devu atšķirības starp diviem pētījumiem izriet no aprēķinos izmantotās augstākas  $AUC_{24}/MIC$  attiecības, 72 stundām, kā ziņots literatūrā (Madsen et al., 2019), un aprēķinos iepriekš izmantotajām zemākām MIC vērtībām. Šajā mūsu pētījumā devas tika aprēķinātas, pamatojoties uz eksperimentāli iegūtajām MIC vērtībām, savukārt iepriekš mēs izmantojām  $MIC = 0,5 \mu\text{g/ml}$  (Sitovs et al., 2020). Devas, kas aprēķinātas, izmantojot augstāko *P. multocida* MIC ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ), mazāk atšķirtos no devas, kas publicēta levofloksacīna farmakokinētikas pētījumā par trušiem, tās būtu 8,30, 11,55 un 30,18 pret 29 mg/kg dienā. Pēdējā pētījumā devas aprēķinos tika izmantotas reālās, nevis teorētiskās, MIC vērtības. Tā kā mēs noskaidrojām, ka levofloksacīna biopieejamība trušiem pēc IM un SC ievadīšanas ir aptuveni 100 %, tā tika uzskatīta par pilnīgu. No biopieejamības skatpunkta, ieteicamajām dienas devām nav atšķirības starp IM un SC ievadīšanu. Tomēr, salīdzinot ar SC, IM ievadīšana parasti ir sāpīgāka un, ņemot vērā salīdzinoši mazu muskuļu masu trušiem, tiek izmantota reti (Shellim, 2011). Papildu faktori, kas var ietekmēt levofloksacīna diennakts devas aprēķināšanu, ir saistīti ar fluorhinolonu farmakokinētikas izmaiņām trušiem patoloģiskajos stāvokļos. Piemēram, *P. multocida* infekcija izraisa izmaiņas marbofloksacīna primāros farmakokinētiskos parametros, pirmām kārtām klīrensā (Abo-El-Sooud & Goudah, 2010). Ja tas pats attiecas uz levofloksacīnu, infekcijas klātbūtne var ietekmēt tā devas aprēķināšanu. Lai to pierādītu, būtu nepieciešami papildu farmakokinētiskie pētījumi ar levofloksacīnu inficētiem dzīvniekiem.

Mūsu pētījumā ir arī daži ierobežojumi. Pirmām kārtām neliels skaits dzīvnieku farmakokinētikas pētījumā neaptver visas iespējamās atšķirības starp dzīvniekiem klīrensā, kas nepieciešams diennakts devas aprēķināšanai. Šajā pētījumā netika ņemta vērā infekcijas ietekme, jo tika izmantoti seruma paraugi no veselīgiem trušiem. Neliels šajā pētījumā izmantoto baktēriju izolātu skaits neatspoguļo visu MIC variabilitāti visu baktēriju populācijā. *Ex vivo* pētījumā nav ņemta vērā dzīvnieku organisma imunitātes ietekme, kas varētu pastiprināt baktēriju iznīcināšanu un, iespējams, ļautu izmantot mazākas antimikrobiālā līdzekļa devas. Baktēriju inokula sākotnējās koncentrācijas ietekme netika izvērtēta attiecībā uz levofloksacīna pretmikrobu aktivitāti. Mūsu pētījums arī neparedzēja turpmāku rezistences attīstību pret levofloksacīnu izvēlētajiem mikrobu izolātiem, un šajā pētījumā netika aprēķinātas mutantu novēršanas koncentrācijas vērtības. Tomēr fluorhinolonu rezistence ir svarīgs globālās veselības jautājums (Brown, 1996; PVO, 2019). Visbeidzot, levofloksacīna izvēlē un iespējamās lietošanās trušiem gadījumā ir jāapsver antimikrobiālo līdzekļu pārvaldības principu ievērošana (Lloyd & Page, 2018).

## Secinājumi

Levofloksacīnam piemīt lietošanai labvēlīgi farmakokinētiskie profili. Gan trušiem, gan zosīm levofloksacīns parasti bija labi panesams. Levofloksacīna deva 5 mg/kg, visticamāk, būs efektīva pētītajām dzīvnieku sugām, un pat mazākas devas ir aktīvas jutīgu baktēriju gadījumos. Mūsu pētījumi sniedz provizorisku novērtējumu galvenajiem dozēšanas režīma farmakokinētiskajiem un farmakodinamiskajiem elementiem trušiem un zosīm. Augstākā levofloksacīna koncentrācija audos tika novērota aknās un nierēs, kas liecina par iespējamu zāļu akumulāciju.

Šī pētījuma rezultāti nemudina lietot levofloksacīnu parasto veterināro antibakteriālo līdzekļu vietā, bet sniedz jaunāko informāciju par levofloksacīnu, kas palīdzēs veterinārārstiem un zinātniekiem izdarīt apzinātu izvēli par atbilstošu levofloksacīna lietošanu.

## Priekšlikumi

Drošai un efektīvai antibakteriālo līdzekļu, ieskaitot levofloksacīnu, lietošanai ir jārisina papildu problēmas.

1. Lai gan vairākos pētījumos ir ziņots par baktēriju izolātu jutīgumu pret levofloksacīnu, tie neizslēdz turpmāku rezistences attīstību. Rezistences veidošanās iespējamību pret levofloksacīnu un tās mehānismus interesējošajiem baktēriju izolātiem ieteicams novērtēt, izmantojot mutācijas novēršanas koncentrācijas noteikšanu.
2. Ieteicams veikt levofloksacīna devas optimizāciju veterinārmedicīnā. To varētu panākt, izmantojot populācijas farmakokinētikas metodes un izmantojot plašus MIC datus, iegūtus no pētījumiem ar interesējošajiem mikroorganismiem.
3. Ieteicams novērtēt dzīvnieku inficētā stāvokļa ietekmi, lai ņemtu vērā farmakokinētiskās atšķirības reālos klīniskos gadījumos, kad tiks spriests par levofloksacīna lietošanu.
4. Valstīs, kurās levofloksacīnu izmanto lauksaimniecības dzīvniekiem pārtikas ražošanā, ieteicams noteikt levofloksacīna maksimālās atlieku robežas.

## Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

### Publikācijas:

1. Sitovs, A., Voiko, L., Kustovs, D., Kovalcuka, L., Bandere, D., Purvina, S., & Giorgi, M. (2020). Pharmacokinetic profiles of levofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Journal of veterinary science, 21(2), e32. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e32>
2. Sartini, I., Łebkowska-Wieruszewska, B., Sitovs, A., Lisowski, A., Poapolathep, A., & Giorgi, M. (2021). Levofloxacin pharmacokinetics and tissue residue concentrations after oral administration in Bilgorajska geese. British poultry science, 62(2), 193–198. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1842855>
3. Sitovs, A., Sartini, I., & Giorgi, M. (2021). Levofloxacin in veterinary medicine: a literature review. Research in veterinary science, 137, 111–126. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.031>
4. Sitovs, A., Skadins, I., Purvina, S., & Bandere, D. (2023). *In vitro* and *ex vivo* antibacterial activity of levofloxacin against *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli* isolated from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) – A preliminary study. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 10.1111/jvp.13383. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jvp.13383>

### Ziņojumi un tēzes:

1. Sitovs, A., Kustovs, D., Giorgi, M., Kovalcuka, L., Voiko, L., Purviņa, S., Bandere, D. 2019. Levofloxacin Assay in Rabbit Plasma: UPLC Method Optimisation and Validation – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts April 1–3, 2019, 396.
2. Sitovs, A., Kustovs, D., Giorgi, M., Kovalcuka, L., Voiko, L., Purviņa, S., Bandere, D. 2019. Pharmacokinetics of levofloxacin after three different routes of single parenteral administration to domestic rabbits – 4th conference “Current approach to health and diseases in animals and humans”. Lublin, Poland: Abstracts, September 19–20, 2019, Oral presentation II.O.7.
3. Sitovs, A., Voiko, L., Purviņa, S., Bandere, D., Giorgi, M., 2020. Levofloxacin pharmacokinetics and efficacy prediction in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). ICECVM 2<sup>nd</sup> International Conference of the European College of Veterinary Microbiology, Online: Abstracts, October 25–27, 2020, Oral presentation.
4. Sitovs, A., Skadins, I., Dovbenko, A., Purvina, S., Bandere, D. 2021. Levofloxacin efficacy against *E. coli* isolated from pet rabbits: a pilot study – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts March 24–26, 2021, 393.

5. Sartini, I., Łebkowska-Wieruszewska, B., Sitovs, A., Lisowski, A., Poapolathep, A., Giorgi, M. 2021. Levofloxacin pharmacokinetics and tissue residues after oral administration in geese – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts March 24–26, 2021, 394.
6. Sitovs, A., Sartini, I., Giorgi, M. 2021. The role of levofloxacin in veterinary medicine currently – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts March 24–26, 2021, 398.
7. Sitovs, A., Skadins, I., Bandere, D. 2023. Levofloxacin Antibacterial Activity against *Pasteurella multocida* Isolated from Domestic Rabbits – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts March 30–31, 2023.
8. Sitovs, A., Skadins, I., Purvina, S., Bandere, D. 2023. *In vitro* and *Ex vivo* Levofloxacin Antibacterial Activity against *Escherichia coli* Isolated from Domestic Rabbits – Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts March 30–31, 2023.
9. Sitovs, A., Skadins, I., Purvina, S., Bandere, D. 2023. *In vitro* and *ex vivo* antibacterial effects of levofloxacin against *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli* isolated from rabbits – EAVPT 15th International congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and toxicology, Bruges, Belgium: Abstracts July 2–5, 2023.



## Literatūras un avotu saraksts

1. Abo-El-Sooud, K., & Goudah, A. (2010). Influence of *Pasteurella multocida* infection on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 33(1), 63-68.
2. Aboubakr, M. (2012). Pharmacokinetics of levofloxacin in Japanese quails (*Coturnix japonica*) following intravenous and oral administration. *British Poultry Science*, 53(6), 784-789. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.745928>
3. Aboubakr, M., & Soliman, A. (2014). Comparative pharmacokinetics of levofloxacin in healthy and renal damaged Muscovy ducks following intravenous and oral administration. *Veterinary medicine international*, 2014.
4. Aboubakr, M., Uney, K., & Elmas, M. (2014). Bioavailability and pharmacokinetic profile of levofloxacin following intravenous, intramuscular and oral administration in turkeys. *British Poultry Science*, 55(1), 115-119. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.860214>
5. Akinjogunla, O. J., Odeyemi, A. T., Alozie, M. F., Ehinmore, I., Ukpong, U. E., Ediomu, J., & Akpanson, E. K. (2022). Fluoroquinolone antibiotics: in vitro antibacterial and time-kill bactericidal evaluation against etiology of bacteremia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 135.
6. Albarellos, G., Ambros, L., & Landoni, M. (2005). Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 28(4), 363-369.
7. Aliabadi, F. S., & Lees, P. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration. *American journal of veterinary research*, 62(12), 1979-1989.
8. Ambrose, P. G., Bhavnani, S. M., Rubino, C. M., Louie, A., Gumbo, T., Forrest, A., & Drusano, G. L. (2007). Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clinical Infectious Diseases*, 44(1), 79-86.
9. Basyigit, I., Kahraman, G., Ilgazli, A., Yildiz, F., & Boyaci, H. (2005). The effects of levofloxacin on ECG parameters and late potentials. *American journal of therapeutics*, 12(5), 407-410.
10. Baynes, R. E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., & Riviere, J. E. (2016). Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chemical Toxicology*, 88, 112-122.
11. Bellmann, R., Kuchling, G., Dehghanyar, P., Zeitlinger, M., Minar, E., Mayer, B. X., Müller, M., & Joukhadar, C. (2004). Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. *Br J Clin Pharmacol*, 57(5), 563-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02059.x>

12. Brown, S. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(1), 1-14.
13. CLSI. (2018a). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI report VET08. In: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
14. CLSI. (2018b). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Supplement M100. In: Clinical and Laboratory Standards Institute
15. Destache, C. J., Pakiz, C. B., Larsen, C., Owens, H., & Dash, A. K. (2001). Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetics of levofloxacin in an experimental rabbit meningitis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 611-615.
16. Dorey, L., Pelligand, L., & Lees, P. (2017). Prediction of marbofloxacin dosage for the pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* by pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *BMC Veterinary Research*, 13, 1-10.
17. EMA. (1997). Danofloxacin: Summary Report (2). European Medicines Agency. Retrieved February 1, 2020 from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/danofloxacin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/danofloxacin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf)
18. EMA. (1999). Marbofloxacin: Summary Report (2). European Medicines Agency. Retrieved February 1, 2020 from [https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/marbofloxacin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/marbofloxacin-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf)
19. EMA. (2002). Enrofloxacin: Summary Report (5). European Medicines Agency. Retrieved February 1, 2020 from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-foodproducing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-foodproducing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal_en.pdf)
20. EMA. (2018a). Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009). In: London: Committee for Medicinal Products for Human Use.
21. EMA. (2018b). Guideline on Determination of Withdrawal Periods for Edible Tissues. European Medicines Agency. Retrieved February 1, 2020 from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1_en.pdf)
22. Fernandez-Varon, E., Bovaira, M., Espuny, A., Escudero, E., Vancraeynest, D., & Cárceles, C. (2005). Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of moxifloxacin in rabbits after intravenous, intramuscular and oral administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 28(4), 343-348.
23. Fernandez-Varon, E., Marin, P., Escudero, E., Vancraeynest, D., & Cárceles, C. (2007). Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin after

- intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 30(1), 18-24.
24. Fish, D. N., & Chow, A. T. (1997). The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clinical pharmacokinetics*, 32, 101-119.
  25. Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2001). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications*.
  26. Gonzalez, N., Sevillano, D., Alou, L., Cafini, F., Gimenez, M.-J., Gomez-Lus, M.-L., Prieto, J., & Aguilar, L. (2013). Influence of the MBC/MIC ratio on the antibacterial activity of vancomycin versus linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a pharmacodynamic model simulating serum and soft tissue interstitial fluid concentrations reported in diabetic patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), 2291-2295.
  27. Goudah, A. (2009). Pharmacokinetics of levofloxacin in male camels (*Camelus dromedarius*). *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(3), 296-299.
  28. Goudah, A., & Abo-El-Sooud, K. (2009). Pharmacokinetics, urinary excretion and milk penetration of levofloxacin in lactating goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1), 101-104.
  29. Goudah, A., & Hasabelnaby, S. (2010). Disposition kinetics of levofloxacin in sheep after intravenous and intramuscular administration. *Veterinary medicine international*, 2010.
  30. Harcourt-Brown, F. (2002). *Infectious diseases of domestic rabbits. Textbook of rabbit medicine*. Elsevier.
  31. Haritova, A., & Russenova, N. (2010). In vitro antibacterial effect of enrofloxacin determined by time-killing curves analysis. *Bulg J Vet Med*, 13(4), 218-226.
  32. Haritova, A. M., Rusenova, N. V., Parvanov, P. R., Lashev, L. D., & Fink-Gremmels, J. (2006). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of danofloxacin in turkeys. *Veterinary research communications*, 30, 775-789.
  33. Kilburn, J. J., Schmitt, D., Kiso, W., Papich, M. G., & Backues, K. A. (2023). Pharmacokinetics Of Rectally And Orally Administered Levofloxacin In Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *J Zoo Wildl Med*, 53(4), 670-678. <https://doi.org/10.1638/2022-0011>
  34. Kumar, A., Anu, R., Ram, R., Atul, P., Rajesh, M., & Garg, S. (2012). Pharmacokinetics of levofloxacin following intravenous and intramuscular administration in cattle calves. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(10), 1006-1013.
  35. Kyuchukova, R., Urumova, V., Lyutskanova, M., Petrov, V., & Pavlov, A. (2013). Levofloxacin residues in chicken meat and giblets. *Bulg. J. Vet. Med*, 16(1), 216-219.

36. Landoni, M. F., & Albarellos, G. A. (2019). Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous, oral and subcutaneous administration to dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 42(2), 171-178.
37. Lee, H. K., DeVito, V., Vercelli, C., Tramuta, C., Nebbia, P., Re, G., Kovalenko, K., & Giorgi, M. (2017). Ex vivo antibacterial activity of levofloxacin against *Escherichia coli* and its pharmacokinetic profile following intravenous and oral administrations in broilers. *Research in veterinary science*, 112, 26-33.
38. Lloyd, D. H., & Page, S. W. (2018). Antimicrobial stewardship in veterinary medicine. Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals, 675-697.
39. Madsen, M., Messenger, K., & Papich, M. G. (2019). Pharmacokinetics of levofloxacin following oral administration of a generic levofloxacin tablet and intravenous administration to dogs. *American journal of veterinary research*, 80(10), 957-962.
40. Marangos, M., Zhu, Z., Nicolau, D., Klepser, M., & Nightingale, C. (1997). Disposition of ofloxacin in female New Zealand white rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20(1), 17-20.
41. Marín, P., Fernandez-Varon, E., Escudero, E., Vancraeynest, D., & Cárceles, C. (2008). Pharmacokinetic–pharmacodynamic integration of orbifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31(1), 77-82.
42. Marín, P., García-Martínez, F., Hernández, V., & Escudero, E. (2018). Pharmacokinetics of norfloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 41(1), 137-141.
43. Martinez, M., McDermott, P., & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 172(1), 10-28.
44. McKellar, Q. A., Sanchez Bruni, S. F., & Jones, D. G. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 503-514.
45. Mitchell, M., & Tully, T. N. (2008). *Manual of exotic pet practice*. Elsevier Health Sciences.
46. North, D. S., Fish, D. N., & Redington, J. J. (1998). Levofloxacin, a second-generation fluoroquinolone. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 18(5), 915-935.
47. Papich, M. G. (2021). Antimicrobial agent use in small animals what are the prescribing practices, use of PK-PD principles, and extralabel use in the United States? *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 44(2), 238-249.

48. Patel, J. H., Bhavsar, S. K., & Thaker, A. M. (2012a). Pharmacokinetics of levofloxacin following intravenous and subcutaneous administration in sheep. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(1), 85-93.
49. Patel, J., Varia, R., Vihol, P., Singh, R., Patel, U., Bhavsar, S., & Thaker, A. (2012b). Pharmacokinetics of levofloxacin in white leghorn birds. *Indian Veterinary Journal*, 89(8), 69.
50. Potter, T., Illambas, J., Pelligand, L., Rycroft, A., & Lees, P. (2013). Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *The Veterinary Journal*, 195(1), 53-58.
51. Pouplin, T., Bang, N. D., Toi, P. V., Phuong, P. N., Dung, N. H., Duong, T. N., Caws, M., Thwaites, G. E., Tarning, J., & Day, J. N. (2016). Naïve-pooled pharmacokinetic analysis of pyrazinamide, isoniazid and rifampicin in plasma and cerebrospinal fluid of Vietnamese children with tuberculous meningitis. *BMC infectious diseases*, 16(1), 1-13.
52. Rajaei, S. M., Rafiee, S. M., Ghaffari, M. S., Masouleh, M. N., & Jamshidian, M. (2016). Measurement of Tear Production in English Angora and Dutch Rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 55(2), 221-223.
53. Ravikumar, C., Sanganal, J., Shridhar, N., Narayanaswamy, H., Kamran, C. A., & Ramachandra, S. (2015). Estimation of withdrawal period of levofloxacin in liver and breast muscle tissue of dual purpose chicken. *Electronic Journal of Environmental Sciences*, 8, 43-48.
54. Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2018). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. John Wiley & Sons.
55. Saha, O., Islam, M. R., Rahman, M. S., Hoque, M. N., Hossain, M. A., & Sultana, M. (2021). First report from Bangladesh on genetic diversity of multidrug-resistant *Pasteurella multocida* type B: 2 in fowl cholera. *Veterinary World*, 14(9), 2527.
56. Sartini, I., Łebkowska-Wieruszewska, B., Kim, T. W., Lisowski, A., Poapolathep, A., & Giorgi, M. (2020). Pharmacokinetic and tissue analyses of levofloxacin in sheep (*Ovis aries* Linnaeus) after multiple-dose administration. *Research in veterinary science*, 128, 124-128.
57. Sartini, I., Łebkowska-Wieruszewska, B., Sitovs, A., Lisowski, A., Poapolathep, A., & Giorgi, M. (2021). Levofloxacin pharmacokinetics and tissue residue concentrations after oral administration in Bilgorajska geese. *British Poultry Science*, 62(2), 193-198.
58. Shellim, C. (2011). Parenteral drug administration. *Veterinary Nursing Journal*, 26(4), 117-119.
59. Sitovs, A., Sartini, I., & Giorgi, M. (2021). Levofloxacin in veterinary medicine: a literature review. *Research in veterinary science*, 137, 111-126.

60. Sitovs, A., Skadins, I., Purvina, S., & Bandere, D. (2023). *In vitro* and *ex vivo* antibacterial activity of levofloxacin against *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli* isolated from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) – A preliminary study. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. <https://doi.org/10.1111/jvp.13383>
61. Sitovs, A., Voiko, L., Kustovs, D., Kovalcuka, L., Bandere, D., Purvina, S., & Giorgi, M. (2020). Pharmacokinetic profiles of levofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Vet Sci*, 21(2), e32. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e32>
62. Toutain, P.-L., & Bousquet-Mélou, A. (2004a). Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 455-466.
63. Toutain, P.-L., & Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma clearance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 415-425.
64. Toutain, P.-L., & Bousquet-Mélou, A. (2004c). Plasma terminal half-life. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 427-439.
65. Toutain, P.-L., Del Castillo, J. R., & Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in veterinary science*, 73(2), 105-114.
66. Toutain, P., & Lees, P. (2004). Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 467-477.
67. Varia, R., Patel, J., Patel, U., Bhavsar, S., & Thaker, A. (2009). Disposition of levofloxacin following oral administration in broiler chickens. *Israel journal of veterinary medicine*, 64(4), 118.
68. Vercelli, C., Łebkowska-Wieruszewska, B., Barbero, R., Lisowski, A., Re, G., & Giorgi, M. (2020). Pharmacokinetics of levofloxacin in non-lactating goats and evaluation of drug effects on resistance in coliform rectal flora. *Res Vet Sci*, 133, 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.028>
69. Wang, C., Deng, L., Zhu, Y., Wu, K., Wei, M., Huang, S., Wei, R., Liu, W., Huang, Y., & Zhang, H. (2021). Pharmacokinetics of levofloxacin mesylate in healthy adult giant panda after single-dose administration via different routes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 44(4), 644-649.
70. WHO. (2019). Critically important antimicrobials for human medicine. In: World Health Organization.
71. WHO. (2021). The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines, 2021 (including the 22nd WHO model list of essential medicines and the 8th WHO model list of essential medicines for children). In: World Health Organization.

## Pateicības

Šī darba sagatavošana bija ilgs un darbietilpīgs process, kas bija iespējams tikai ar nenovērtējamu palīdzību un atbalstu no maniem zinošajiem darba vadītājiem – profesores Daces Banderes un mūžībā aizgājušās profesores Santas Purviņas. Esmu viņām abām bezgala pateicīgs un dziļi apbēdināts, ka profesore Purviņa nebūs klāt promocijas darba aizstāvēšanā.

Esmu no visas sirds pateicīgs savam mentoram zinātnē, pētniekam, iedvesmotājam, profesoram Mario Džordži. Šis darbs nebūtu pilnīgs bez manu līdzstrādnieku Līgas Kovaļčukas, Dmitrija Kustova, Beātes Ļebkovskas-Vieruševskas, Andžeja Lisovska, Amnarta Poapolatepa, Irēnas Sartīni, Ingusa Skadiņa un Lauras Voiko līdzdalības, kuriem izsaku sirsnīgu atzinību. Esmu pateicīgs izcilajām zinātniecēm Viktorijai Levellinai, Anelijai Milanovai un Kristīnai Verčelli par viņu nenovērtējamo padomu un palīdzību. Visbeidzot es vēlos izteikt pateicību savai JC ģimenei!

Šajā zinātniskajā ceļā divi nezinātnieki, kuri vienmēr mani atbalstīja, ir mana mīļotā sieva Viktorija un mans draugs Igors. Es jūs apsveicu!