الجمهوريـــة العربيـــة
الســـــــــــــورية
جامعـــــة حمـــــاة
كليــة الطـب البيطـري
قسم وظـائف الأعضـاء

دراسة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين في جرعاته المختلفة عن طريق الفم لدى دجاج اللحم السليم والمصاب بالمايكوبلازما

رسالة مقدمة لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية اختصاص "الأدوية البيطرية"

إعداد طالب الدراسات العليا

بهاء يوسف الخوالده

إشـــراف

الدكتورة سلوى الدبس

2026-2025

كلمة الشكر

بسم الله الرحمن الرحيم، الحمد لله الذي بنعمته تتمّ الصالحات، والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين. اللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك، ولك الشكر على ما أنعمت به من توفيقٍ وعونٍ وصبرٍ حتى أتممت هذا العمل، وأسألك أن تجعله خالصاً لوجهك الكريم، نافعاً للعلم وأهله، ومباركاً في نتائجه وأثره.

أتقدّم بخالص الشكر وعظيم الامتنان إلى السادة أعضاء لجنة الحكم والمناقشة الموقّرين، لتفضّلهم بقبول مناقشة هذه الرسالة، وما سيبدونه من ملاحظات علمية قيّمة من شأنها أن تثري هذا العمل وترتقي بمضمونه، فجزاهم الله خير الجزاء.

كما أتوجّه بجزيل الشكر والتقدير إلى كلية الطب البيطري في حماة، ممثّلةً بعميدها الدكتور عبدالكريم حلاق، لما قدّمته الكلية من بيئة علمية مناسبة، وما وفرته من دعمٍ وتسهيلات أسهمت في إنجاز هذه الرسالة.

وأخصّ بالشكر والتقدير والامتنان مشرفتي الفاضلة الدكتورة سلوى الدبس، لما أحاطتني به من رعاية علمية، وتوجيهات سديدة، ومتابعة دقيقة، وصبر كريم طوال مراحل إعداد هذه الرسالة، فكان لتشجيعها ودعمها الأثر الكبير في إتمام هذا العمل على الوجه المطلوب.

كما أتقدّم بالشكر الجزيل إلى الدكتور حسان حسن، رئيس قسم وظائف الأعضاء، لما قدّمه من دعمٍ وتعاون، وإلى جميع أعضاء القسم الكرام، لما أبدوه من مساعدة وتوجيه وتشجيع خلال فترة الدراسة والبحث.

كما أتقدّم بجزيل الشكر والتقدير إلى الدكتورة مها عرفة، لما قدّمته من مساعدة قيّمة وجهود مشكورة في تنفيذ التجربة العملية، وكان لتعاونها أثر واضح في إنجاز الجانب العملي من هذه الدراسة.

ولا يسعني في هذا المقام إلا أن أرفع أسمى آيات الشكر والعرفان إلى والديّ الكريمين، حفظهما الله وأطال في عمرهما، لما غرسا في نفسي حب العلم والاجتهاد، وما قدّماه لي من تضحيات ودعوات صادقة كانت خير سندٍ وعون. كما أتوجّه بالشكر والمحبة إلى إخوتي وأخواتي الأعزاء، على دعمهم المستمر ومساندتهم الصادقة وتشجيعهم الدائم.

وشكرٌ خاص ممزوج بأصدق الدعوات إلى زوجتي الغالية، التي كانت نعم السند والرفيق، فبصبرها وتحملها ومساندتها الدائمة خفّفت عني مشقة الطريق، وشاركتني عناء هذه الرحلة العلمية بكل محبة وإخلاص. أسأل الله تعالى أن يجزيها عني خير الجزاء، وأن يبارك فيها، ويحفظها، ويديم عليها الصحة والسعادة والتوفيق.

وأتوجّه بالشكر إلى أصدقائي الأعزاء، وإلى كل من ساندني ووقف إلى جانبي، وقدم لي كلمة طيبة أو دعماً صادقاً أو نصيحة نافعة، وأسهم في تذليل الصعوبات خلال هذه المسيرة.

وفي الختام، أسأل الله تعالى أن يجعل هذا العمل خالصاً لوجهه الكريم، وأن ينفع به، وأن يوفق الجميع لما فيه الخير والنجاح.

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة، هو نتيجة بحث قام به المرشح الطالب بهاء الخوالده تحت إشراف الدكتور سلوى الدبس مدرس علم الأدوية والسموم في قسم وظائف الأعضاء، في كلية الطب البيطري - جامعة حماة، وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص.

المرشح **المشرف العلمي**

بهاء الخوالدة **د. سلوى الدبس**

CERTIFICATE

We certify that the work described in this thesis is the result of research conducted by candidate **Bahaa Al-Khawaldeh** under the supervision of **Dr. Salwa Al-Dibs**, Lecturer of Pharmacology and toxicology in the Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University. Any reference to other research on this topic is documented within the text.

Candidate	Supervisor
Bahaa Al-Khawaldeh	Dr. Salwa Al-Dibs

تصريح

أصرح بأن هذا البحث الموسوم بعنوان:

(دراسة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين في جرعاته المختلفة عن طريق الفم لدى دجاج اللحم السليم والمصاب بالمايكوبلازما)

لم يسبق أن قُبِل للحصول على أية شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى، وأصرح على مسؤوليتي الكاملة أن العمل المقدم فيما يلي من إنتاجي بالكامل وكل المعلومات المأخوذة من مصادر أخرى فيه مُسندة إلى أصولها بكل دقّة وإن الاقتباسات الحرفية من الأعمال الأخرى إن وجدت لا تتجاوز الحجم الأعلى للاقتباس ومبينة بوضوح ومسندة صراحة إلى مصادرها

المرشح

بهاء الخوالده

Declaration

I declare that this research, entitled:

"**Study of the Bioavailability of Doxycycline when Administered Orally in Different Doses to Healthy and Mycoplasma Infected Broiler Chickens**"

has not previously been accepted for any certification, nor is it currently submitted for any other certification. I declare, under full responsibility, that the work presented below is entirely my own production, and all information taken from other sources within it is accurately attributed to its original sources. Any verbatim quotations from other works, if any, do not exceed the maximum quotation size and are clearly indicated and explicitly attributed to their sources.

Candidate

Bahaa Al-Khawaldeh

الفهرس

المحتويات

الملخص باللغة العربية XII

abstract.....XV

الفصل الأول المقدمة Introduction :

1-1- المقدمة (Introduction).....1

2-1- أهداف البحث: Objectives.....3

الفصل الثاني الدراسة المرجعية Literature review :

2-1- عائلة التتراسيكلينات(Tetracyclines).....4

2-2- لمحة عن مركب الدوكسي سايكلين (Doxycycline) 6

2-3-آلية عمل مركب الدوكسي سايكلين Mechanism of action of doxycycline.....7

2-4- الخصائص الكيميائية والفيزيائية لعقار الدوكسي سايكلين Chemical and physical properties of doxycycline.....7

2-5- السلوك الكيميائي وتشكيل المعقدات (Chelation) 8

2-6- الحركية الدوائية والفعالية الحيوية لمركب الدوكسي سايكلين Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline.....8

2-7- الآثار الجانبية والتداخلات الدوائية لمركب الدوكسي سايكلين Side effects and drug interactions of doxycycline.....14

2-8- آليات المقاومة البكتيرية Mechanisms of bacterial resistance.....16

2-9- التحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط للدوكسي سايكلين 16

2-10- أهمية تربية الدجاج والاصابة بالمايكوبلازما 19

2-11- أهمية مكافحة مرض بالمايكوبلازما في الدجاج:.....20

2-12- اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA) للكشف عن المايكوبلازما ...20

2-13- الدراسات السابقة حول استخدام مركب الدوكسي سايكلين 19

الفصل الثالث: مواد وطرائق العمل Material and methods :

3-1- حيوانات التجارب:.....30

3-2- تصميم التجربة :.....30

3-3- دراسة مستويات الدوكسي سايكلن في البلازما في الطيور بعد تناوله عن طريق الفم. 31
3-4- طريقة العمل 32
3-5- تحليل مركب الدوكسي سايكلين في مصل الدم باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC) 34
3-6- اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA) 36
3-7- العتيدة التشخيصية لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA)..... 39
3-8- محتويات العتيدة التشخيصية..... 39
الفصل الرابع النتائج Results..... 41
4-1- التحليل الإحصائي Statistical analysis 51
الفصل الخامس المناقشة Discussion 52
الفصل السادس الاستنتاجات Conclusions 69
الفصل السابع التوصيات Recommendations..... 70
المراجع References..... 71

فهرس الجداول:

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
الجدول (1)	مكونات المجموعة التشخيصية لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنظيم	39
الجدول (2)	تفسير نتائج اختبار الإليزا	43
الجدول (3)	متوسطات تراكيز الدوكسي سايكلين في مصل الدم عند مجموعات التجربة جميعها وفي الأزمنة المختلفة	44
الجدول (4)	متوسطات قيم تحليل الأنزيم الكبدي ALT	48

فهرس الأشكال:

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
الشكل (1)	الصيغة الهيكلية للدوكسي سايكلين	6
الشكل (2)	مركب الدوكسي سايكلين البيور المستخدم في التجربة	32
الشكل (3)	جهاز الكروماتوجرافية السائلة عالية الآداء (HPIC) المستخدم لتحليل عينات التجربة	34
الشكل (4)	مخطط توزيع مصل الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي وأمصال العينات المختبرة في طبق الإليزا.	40
الشكل (5)	مكونات العتيدة التشخيصية المستخدمة للكشف عن الحالات الإيجابية لمرض المايكوبلازما في العينات التي تم جمعها من طيور الدراسة	40
الشكل (6)	شكل القمم (البيكات) لمركب الدوكسي سايكلين الخام في عينة الشاهد	41
الشكل (7)	شكل القمم (البيكات) لمركب الدوكسي سايكلين في العينات	41
الشكل (8)	صورة توضيحية لشكل أنابيب الكاردريج (C18)	42
الشكل (9)	يبين مخطط (1) متوسطات التغيرات في نتائج تحليل جهاز الـ HPLC	45
الشكل (10)	يبين مخطط (2) متوسطات قيم تحليل الأنزيم الكبدي ALT	49

الملخص باللغة العربية

Summary

الملخص العربي:

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم التوافر الحيوي للدوكسي سايكلين المُعطى فموياً بجرعات متدرجة في دجاج اللحم، مع مقارنة التوافر الحيوي والحركية الدوائية لمركب الدوكسي سايكلين في الطيور السليمة والمصابة تجريبياً بالمايكوبلازما. استُخدمت في هذه الدراسة خمس مجموعات كل مجموعة ضمت (25) طيراً بعمر (28يوم) وهي كالتالي:

المجموعة الأولى (G1): وهي مجموعة الشاهد السلبي والتي تضم 25طيراً وهذه المجموعة لم تتلقى أية علاج (مجموعة غير معالجة وغير مصابة).

المجموعة الثانية (G2): ضمت هذه المجموعة 25 طيراً تم إعطاؤها جرعة علاجية واحدة فقط من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم بجرعة مقدارها 20 ملغ/كغ (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة غير مصابة ومعالجة بجرعة علاجية واحدة).

المجموعة الثالثة (G3): ضمت هذه المجموعة 25طيراً تم إعطاؤها جرعة واحدة فقط ضعف علاجية من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم والجرعة ضعف العلاجية هي 40 ملغ/كغ (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة غير مصابة ومعالجة بجرعة ضعف علاجية واحدة).

المجموعة الرابعة (G4): ضمت هذه المجموعة 25 طيراً وهذه المجموعة مصابة بالمايكوبلازما، حيثُ تم إعطائها جرعة علاجية واحدة فقط من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم، مقدارها 20 ملغ/كغ (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة مصابة ومعالجة بجرعة علاجية واحدة).

المجموعة الخامسة (G5): ضمت هذه المجموعة 25 طيراً وهذه المجموعة مصابة بالمايكوبلازما، حيثُ تم إعطائها جرعة علاجية يومياً ولمدة 5 أيام من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم، والجرعة العلاجية هي 20 ملغ/كغ (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة مصابة ومعالجة بجرعة علاجية يومياً ولمدة 5 أيام).

ثُم جُمعت عينات المصل من الوريد الجناحي بعد إجراء التعقيم المناسب بعد (نصف ساعة، 2ساعة، 4ساعة، 8ساعة، 16ساعة، 32ساعة)، وحُللت تراكيز الدواء بتقنية HPLC، كما تم قياس أنزيم ALT الكبدي بعد 24 ساعة.

أظهرت النتائج وجود فُروق معنوية ($P < 0.05$) بين جميع المجموعات والأزمنة، مع تسجيل الشاهد تراكيز صفرية تؤكد دقة الطريقة. بلغ تركيز الدواء ذروته (C_{max}) عند الساعة الثانية في كل المجموعات، وسجلت المجموعة الخامسة المصابة والمعالجة لمدة 5 أيام تراكيز أعلى للدواء من المجموعات السليمة (الثانية والثالثة)، مما يشير إلى أن الاصابة بالمايكوبلازما يعزز التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين عبر زيادة النفاذية الوعائية المعوية. كما أظهرت النتائج في المجموعة الخامسة الى وجود هضبة (ارتفاع/قمة) بين الساعتين 2–3 تعزى لإعادة التدوير المعوي الكبدي المطيلة لنصف العمر الحيوي.

أما بالنسبة للأنزيم الكبدي ALT فقد لوحظ وجود ارتفاع معنوي في المجموعات المعالجة (G2 & G3 & G4 & G5) مقارنةً مع مجموعة الشاهد، مما يُشير إلى وجود سمية كبدية معتمدة على الجرعة. وقد تم تسجيل أعلى مستوى لأنزيم ALT في المجموعة (الرابعة) المصابة والمعالجة بجرعة علاجية واحدة فقط مما يُشير إلى وجود أذية كبدية، بينما كان مستوى الأنزيم الكبدي ALT في المجموعة المصابة (الخامسة والمعالجة يومياً ولمدة 5 أيام) أقل من المجموعة (الرابعة) بشكل معنوي وقد يُعزى ذلك إلى التكيف الكبدي الوقائي.

من هذه الدراسة نستنتج تأثير الحالة الصحية للطيور في تعديل الحركية الدوائية لمركب الدوكسي سايكلين، لذلك يجب مراجعة الجرعات العلاجية أثناء الاصابة بمرض المايكوبلازما مع اجراء دراسات نسيجية وحساب فترة السحب الدوائي لمركب الدوكسي سايكلين لضمان سلامة المستهلك.

الكلمات المفتاحية :الدوكسي سايكلين، التوافر الحيوي، الحركية الدوائية، دجاج اللحم، المايكوبلازما، HPLC، ALT، السمية الكبدية.

الملخص باللغة الإنكليزية:

Abstract

Abstract

This study aimed to evaluate the bioavailability of orally administered doxycycline in graded doses in broiler chickens, comparing the bioavailability and pharmacokinetics of doxycycline in healthy birds and those experimentally infected with mycoplasma. Five groups were used in this study, each consisting of 25 birds aged 28 days, as follows:

Group 1 (G1): This was the negative control group, comprising 25 birds that received no treatment (untreated and uninfected).

Group 2 (G2): This group consisted of 25 birds that received a single therapeutic dose of the antibiotic doxycycline orally at a dose of 20 mg/kg (Anadón et al., 1994; El-Gendi et al., 2010) (uninfected and treated with a single therapeutic dose).

Group 3 (G3): This group consisted of 25 birds that received a single, twice-therapeutic dose of the antibiotic doxycycline orally. The twice-therapeutic dose was 40 mg/kg (Anadón et al., 1994; El-Gendi et al., 2010). (This was an uninfected group treated with a single twice-therapeutic dose).

Group 4 (G4): This group consisted of 25 birds infected with mycoplasma. They received a single, twice-therapeutic dose of the antibiotic doxycycline orally at a dose of 20 mg/kg (Anadón et al., 1994; El-Gendi et al., 2010). (This was an infected group treated with a single therapeutic dose).

Group Five (G5): This group included 25 birds. This group was infected with mycoplasma, and they were given a daily therapeutic dose of the antibiotic doxycycline by oral administration for 5 days. The therapeutic dose was 20 mg/kg (Anadón et al., 1994; El-Gendi et al., 2010) (Infected group treated with a daily therapeutic dose for 5 days).

Serum samples were then collected from the flank vein after appropriate sterilization at (half an hour, 2 hours, 4 hours, 8 hours, 16 hours, 32 hours), and drug concentrations were analyzed using HPLC technology. Liver ALT enzyme was also measured after 24 hours.

The results showed significant differences ($P < 0.05$) between all groups and time points, with the control group recording zero concentrations, confirming the accuracy of the method. Peak drug concentration (Cmax) was reached at hour 2 in all groups. The infected group (Group 5), treated

for 5 days, recorded higher drug concentrations than the healthy groups (Groups 2 and 3), indicating that mycoplasma infection enhances the bioavailability of doxycycline by increasing intestinal vascular permeability. The results in Group 5 also showed a plateau (peak) between hours 2 and 3, attributed to enterohepatic recycling that prolongs the drug's half-life.
Regarding the liver enzyme ALT, a significant increase was observed in the treated groups (G2, G3, G4, and G5) compared to the control group, indicating dose-dependent hepatotoxicity. The highest ALT level was recorded in the infected group (G4), which received only a single therapeutic dose, suggesting liver damage. Conversely, the ALT level in the infected group (G5), which received daily treatment for five days, was significantly lower than in the infected group (G4), possibly due to protective hepatic adaptation.
This study suggests that the birds' health status influences the pharmacokinetics of doxycycline. Therefore, therapeutic doses should be reviewed during mycoplasma infection, along with histological studies and calculation of the doxycycline withdrawal period, to ensure consumer safety.

Keywords: Doxycycline, bioavailability, pharmacokinetics, broiler chickens, mycoplasma, HPLC, ALT, hepatotoxicity

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1-1- المقدمة: Introduction

تُعدّ المضادات الحيوية من أهم الاكتشافات الطبية والبيطرية التي أسهمت في الحد من الخسائر الناجمة عن الأمراض الجرثومية، وأصبحت ركيزة أساسية في برامج العلاج والوقاية في الإنسان والحيوان على حدّ سواء. وفي قطاع الدواجن على وجه الخصوص، يُستخدم عدد كبير من المضادات الحيوية للسيطرة على الإصابات التنفسية والهضمية والجهازية، وللمحافظة على الكفاءة الإنتاجية وتقليل نسب النفوق والخسائر الاقتصادية (Prescott et al., 2000)، ويُعدّ الاستخدام الصحيح لهذه المركبات عاملاً حاسماً في نجاح المعالجة، إذ يعتمد التأثير العلاجي على وصول الدواء إلى التوافر الفعّال في موقع الإصابة والمحافظة عليه لمدة زمنية مناسبة، وهو ما يرتبط ارتباطاً مباشراً بخصائصه الحركية الدوائية والتوافر الحيوي.

ومن بين المضادات الحيوية واسعة الاستخدام في الطب البيطري، يبرز الدوكسي سايكلين(Doxycycline) ، وهو مضاد حيوي نصف صنعي ينتمي إلى مجموعة التتراسيكلينات، يتميز بطيف واسع من الفعالية ضد العديد من الجراثيم موجبة وسالبة الغرام، إضافة إلى فعاليته ضد المفطورات (Mycoplasma spp.) وبعض الريكتسيا والكلاميديا، مما جعله من أكثر الأدوية استخدامًا في علاج الإصابات التنفسية لدى الدواجن والحيوانات الأخرى (Riviere and Papich, 2009). كما يمتاز الدوكسي سايكلين بسرعة امتصاصه النسبي بعد الإعطاء الفموي، وارتفاع درجة ذوبانه النسبي مقارنةً ببعض التتراسيكلينات الأخرى، وطول نصف عمره الحيوي، الأمر الذي يجعله مناسبًا للمعالجة عبر مياه الشرب أو العلف في القطعان الكبيرة (Toutain et al., 2010)

ويُعرّف التوافر الحيوي للدواء (Bioavailability) بأنه النسبة المئوية من الجرعة المعطاة التي تصل إلى الدوران الجهازي في صورتها الفعالة، ويُعدّ من أهم المؤشرات الدوائية التي تحدد كفاءة المستحضرات الدوائية ونجاح الإعطاء الفموي. إلا أن هذا المؤشر لا يبقى ثابتاً في جميع الظروف، إذ يتأثر بعوامل متعددة تشمل العمر، والنوع، والحالة الغذائية، وسلامة الجهاز الهضمي، والحالة الصحية العامة للطائر (Martinez and Modric, 2010)، ولذلك فإن التوافر الحيوي للدوكسي سايكلين قد يختلف بين الطيور السليمة والطيور المصابة، نتيجة التبدلات المرضية التي تطرأ على الامتصاص المعوي، ووظائف الكبد والكلى، ومستوى بروتينات البلازما.

وقد أظهرت دراسات دوائية متعددة أن الإصابة بالأمراض الجهازية أو التنفسية قد تؤدي إلى تغيرات مهمة في الحركية الدوائية للأدوية، تشمل تأخر الامتصاص، أو انخفاضه، أو تغير حجم التوزع، أو بطء الاستقلاب والإطراح، مما ينعكس على تراكيز الدواء في الدم والأنسجة وعلى فعاليته السريرية (Lees and Shojaee

(Aliabadi, 2002 ،ففي حالات الالتهاب والحمّى، قد يحدث انخفاض في استهلاك الماء والعلف، واضطراب في حركة القناة الهضمية، وتبدُل في نفوذية الأغشية الحيوية، إضافة إلى تغيرات في الجريان الدموي الكبدي والكلوي، وكلها عوامل قد تُحدث اختلافاً واضحاً في التوافر الحيوي والمعايير الحركية الدوائية مقارنة بالحيوانات السليمة (Giguère et al., 2013).

وفي دجاج اللحم، تُعدّ الإصابة بالمفطورات Mycoplasma من أكثر الأمراض التنفسية شيوعاً وأشدها أثراً اقتصادياً، حيث تؤدي إلى مرض تنفسي مزمن، وانخفاض معدلات النمو، وتراجع كفاءة التحويل الغذائي، وازدياد قابلية الطيور للإصابات الثانوية (Bradbury et al., 1993). وفي محاولة للسيطرة على هذه الأمراض، غالباً ما يلجأ المربين إلى استخدام المضادات الحيوية، والتي تُعرّف بأنها مركبات طبيعية أو مُصنّعة كيميائياً قادرة بتراكيز ضئيلة على تثبيط أو قتل المسببات المرضية (Bradford, 2001; Hodgson and Kizior, 2003). إلا أن الاستخدام العشوائي والمفرط لهذه المضادات وبدون استشارة طبية أدى إلى تفاقم مشكلة عالمية خطيرة تتمثل في ظهور سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية (Mims et al., 2004). ونظراً لأن الدوكسي سايكلين يُستخدم على نطاق واسع في مكافحة هذه الإصابات، وافتراض تماثل جرعته وخصائصه الدوائية بين الطيور السليمة والمصابة قد لا يكون دقيقاً علمياً، خصوصاً في ظل ما قد تُحدثه الإصابة من اضطرابات فزيولوجية واستقلابية تؤثر في مصير الدواء داخل الجسم.

كما لابُدَ من إجراء دراسات لمقارنة تقييم التوافر الحيوي والحركية الدوائية للدوكسي سايكلين بعد إعطائه فموياً في دجاج اللحم السليم والمصاب بالمايكوبلازما، بهدف الوصول إلى أسس علمية دقيقة لتعديل الجرعات وتحسين النتائج العلاجية وتقليل الخسائر الاقتصادية المرتبطة بالأمراض التنفسية في مزارع الدواجن. وبناءً على الأهمية الاقتصادية لقطاع الدواجن، وفي ظل الاستخدام الواسع لمضاد الدوكسي سايكلين لعلاج الإصابات التنفسية، تبلورت فكرة هذا البحث.

1-2- أهداف البحث: Objectives

1. مقارنة التوافر الحيوي ونصف العمر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين في مصل الدم عند إعطائه عن طريق الفم بجرعة علاجية وجرعة ضعف علاجية.
2. مقارنة التوافر الحيوي ونصف العمر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين في مصل الدم لدى دجاج اللحم السليم والمصاب بالمايكوبلازما.
3. دراسة تأثير مركب الدوكسي سايكلين على الأنزيم الكبدي ALT عند اعطائه عن طريق الفم بجرعات مختلفة لدى دجاج اللحم السليم والمصاب بالمايكوبلازما.

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

Literature Review

2- الدراسة المرجعية(Literature Review) :

2-1- عائلة التتراسيكلينات(Tetracyclines):

تُعدّ مجموعة التتراسكلينات (Tetracyclines) من المضادات الحيوية واسعة الطيف التي اكتسبت أهمية كبيرة في الطب البشري والبيطري منذ منتصف القرن العشرين، وذلك لما تتميز به من فعالية ضد طيف واسع من الأحياء الدقيقة ولسهولة استخدامها وانخفاض تكلفتها النسبية. وقد بدأ اكتشاف هذه المجموعة مع عزل مركب الكلور تتراسكلين (Chlortetracycline) من بعض أنواع Streptomyces، ثم تبع ذلك تطوير مركبات أخرى طبيعية ونصف مصنّعة ذات خصائص دوائية أفضل، مثل الأوكسي تتراسكلين(Oxytetracycline) ، والتتراسكلين(Tetracycline) ، والدوكسي سايكلين(Doxycycline) ، والمينوسيكلين (Minocycline) (Chopra and Roberts, 2001).

وتُعرَّف التتراسكلينات بأنها مضادات حيوية ذات بنية كيميائية متعددة الحلقات، تعمل بشكل رئيسي على تثبيط تصنيع البروتين الجرثومي من خلال ارتباطها بالوحدة الريبوزومية (S30) داخل الخلية الجرثومية، مما يمنع ارتباط الحمض الريبي الناقل (tRNA) بموقع الريبوزوم ويؤدي إلى إيقاف استطالة السلسلة البروتينية، ولذلك تُعدّ مضادات ذات تأثير مثبط لنمو الجراثيم (Bacteriostatic) أكثر من كونها قاتلة لها (Riviere and Papich, 2018)

وتتميّز هذه المجموعة بطيف علاجي واسع (Broad Spectrum) ، إذ تُظهر فعالية ضد عدد كبير من الجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام، إضافة إلى فعاليتها ضد المفطورات (Mycoplasma) ، والريكتسيا (Rickettsia)، والكلاميديا(Chlamydia) ، وبعض الأوالي والطفيليات الأولية في حالات معينة. ولهذا السبب استُخدمت التتراسكلينات لعقود طويلة في علاج الإصابات التنفسية، والهضمية، والتناسلية، والجلدية، وبعض الأمراض الجهازية في الإنسان والحيوان (Prescott, 2013).

ومن الناحية الدوائية، تختلف مركبات هذه المجموعة فيما بينها من حيث الامتصاص، والانحلال، والارتباط بالبروتينات، ونصف العمر الحيوي، وقدرتها على النفاذ إلى الأنسجة. ويُعدّ الدوكسي سايكلين والمينوسيكلين من أكثر المركبات انحلالاً في الدهون، مما يمنحهما امتصاصاً أفضل وانتشاراً نسيجياً أوسع ونصف عمر أطول مقارنةً بالتتراسكلين التقليدي أو الأوكسي تتراسكلين، وهو ما يجعلها أكثر ملاءمة لبعض الاستخدامات السريرية (Papich, 2016)

وفي الطب البشري، استُخدمت التتراسكلينات في علاج العديد من الحالات المرضية، مثل التهابات الجهاز التنفسي، وحب الشباب، والأمراض المنقولة بالقراد، والكلاميديا، والكوليرا، وبعض حالات الملاريا بالمشاركة مع أدوية أخرى، كما يُعدّ الدوكسي سايكلين من الأدوية المهمة في علاج الأمراض المنقولة بالمفصليات والوقاية منها (Nelson and Levy, 2011).

أما في الطب البيطري، فتُستخدم التتراسكلينات على نطاق واسع في علاج أمراض الدواجن والمجترات والحيوانات الأليفة، وخصوصاً الإصابات التنفسية والمعوية والتناسلية. ففي الدواجن تُستخدم بصورة شائعة للسيطرة على أمراض الجهاز التنفسي الناتجة عن المفطورات والباستوريلا وبعض الإنتانات الثانوية، كما يمكن إعطاؤها عبر مياه الشرب أو العلف أو الحقن تبعاً لنوع المستحضر والحالة المرضية (Giguère et al., 2013).

وعلى الرغم من الأهمية العلاجية الكبيرة لهذه المجموعة، فإن استخدامها المفرط أو غير المنظم أدى إلى تطور مقاومة جرثومية واسعة النطاق، تمثلت بآليات متعددة مثل تقليل دخول الدواء إلى الخلية، أو زيادة طرحه عبر مضخات الإخراج، أو إنتاج بروتينات تحمي الريبوزوم من تأثير الدواء. لذلك أصبحت التوصيات الحديثة تؤكد على ضرورة الاستخدام الرشيد للتتراسكلينات بناءً على التشخيص الدقيق، واختبارات الحساسية الجرثومية، والالتزام بالجرعات وفترات السحب (Chopra and Roberts, 2001). أثبتت العديد من الدراسات أن التتراسيكلينات، وبشكل خاص الدوكسي سايكلين، تمتلك خصائص معدِّلة للمناعة (Immunomodulatory) . يُمكن توظيف هذه الخصائص للسيطرة على الاستجابة الالتهابية في عدة أمراض، كالتهاب المفاصل الروماتيدي وهشاشة العظام؛ حيث يعمل الدوكسي سايكلين على تثبيط إنزيم مُصنّع أكسيد النيتريك (Nitric oxide synthase)، ويمنع هجرة كريات الدم البيضاء نحو موقع الالتهاب من خلال تثبيط التجمع الأنبوبي الدقيق المعتمد على الكالسيوم، فضلاً عن الحد من تكاثر الخلايا الليمفاوية (Sapadin and Fleischmajer, 2006; Chukwudi, 2016).

تضم عائلة التتراسيكلينات عدة مركبات مضادة للحيوية، من أهمها (Barragry, 1994; Riviere and Spoo, 1995):

1. الكلورتتراسيكلين.(Chlorotetracycline)
2. الأوكسي تتراسيكلين.(Oxytetracycline)
3. التتراسيكلين.(Tetracycline)

4. الدوكسي سايكلين.(Doxycycline)

5. المينوسايكلين.(Minocycline)

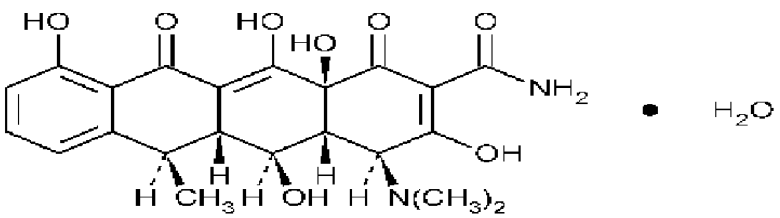
6. الديميكلوسايكلين.(Dimeclocycline)

2-2- لمحة عن مركب الدوكسي سايكلين (Doxycycline) :

يُعد الدوكسي سايكلين أحد أبرز مشتقات عائلة التتراسيكلينات، وهو مضاد حيوي واسع الطيف، يمتلك تأثيراً كابحاً (مثبطاً) لنمو وتكاثر مجموعة واسعة من الجراثيم موجبة وسالبة صبغة الغرام. يتميز بفعاليته العالية في علاج العديد من الحالات المرضية، مثل: المايكوبلازما (المفطورات)، الكوليرا، التولاريميا، التيفوس، وعدوى الريكيتسيا، فضلاً عن دوره في الوقاية من الملاريا وعلاجها، ومعالجة التهابات الجلد (كحب الشباب الشائع والأمراض الجلدية الفقاعية)، والأمراض المنقولة جنسياً مثل الكلاميديا والزهري (Cross et al., 2016; Webster and Del Rosso, 2007). وينتمي الدوكسي سايكلين إلى الجيل الثاني من التتراسيكلينات، ويتميز بكونه أكثر محبة للدهون (Lipophilic) بنحو عشرة أضعاف مقارنة بالمشتقات السابقة مثل الأوكسي تتراسيكلين (Weilacher, 1981). هذه الخاصية تمنحه ميزتين هامتين في علاج دجاج اللحم:

- **كفاءة الامتصاص المعوي:** يؤدي ارتفاع معامل الذوبان في الدهون إلى امتصاص شبه كامل وسريع من القناة الهضمية بعد الإعطاء الفموي.
- **الانتشار والارتباط النسيجي:** تتيح له هذه الخاصية اختراق الحواجز الخلوية بفعالية، مما يسمح بالوصول إلى التركيزات العلاجية المطلوبة داخل الأنسجة المستهدفة ومكافحة المايكوبلازما في مواقع نموها.(Barza et al., 1975)

يبين الشكل رقم 1: الصيغة الهيكلية للدوكسي سايكلين (الصيغة الجزيئية: $C_{22}H_{24}O_8N_2$) (المصدر: RIVIERE and SPOO., 2001)



الشكل رقم (1) الصيغة الهيكلية للدوكسي سايكلين

2-3- آلية عمل مركب الدوكسي سايكلين (Mechanism of action of doxycycline):

يعمل الدوكسي سايكلين ضمن الجرعات العلاجية كعامل كابح للجراثيم (Bacteriostatic)، حيث يثبط نمو وتكاثر المايكوبلازما دون القضاء المباشر عليها، وبالرغم من إمكانية تحقيق تأثير مبيد للجراثيم (Bactericidal) عند رفع الجرعة إلى مستويات تزيد بمقدار 15 إلى 300 ضعف النطاق العلاجي، إلا أن ذلك لا يستحب تطبيقه إكلينيكياً نظراً لاحتمالية وجود مخاطر السمية (Laskin & Last, 1971).

آلية التثبيط الحيوي لتخليق البروتين:

يعتمد التأثير العلاجي للدوكسي سايكلين على منع تخليق البروتين البكتيري عبر مسار ثنائي الطور:

- النفاذ الخلوي: يخترق الدواء جدار الخلية البكتيرية عبر الانتشار السلبي، ثم يتم امتصاصه بنشاط إلى داخل السيتوبلازم بواسطة أنظمة نقل خلوية متخصصة (Chambers, 2005).
- تثبيط الريبوسومات : يرتبط الدوكسي سايكلين بالوحدة الفرعية 30S للريبوسوم البكتيري بشكل عكسي. هذا الارتباط يعيق استطالة السلسلة الببتيدية عن طريق منع ارتباط مركب (aminoacyl-tRNA) بمواقع الاستقبال على الريبوسوم ونتيجة لفشل هذا الارتباط، تتوقف مرحلة استطالة سلسلة البوليببتيد، مما يعيق إنتاج البروتينات الأساسية ويؤدي في النهاية إلى القضاء على البكتيريا (Kroker et al., 2002)
- الاصطفائية : يتميز الدوكسي سايكلين بألفة منخفضة جداً تجاه الريبوسومات من نمط (80S) الموجودة في حقيقيات النوى (Eukaryotes)، مما يفسر سميته المنخفضة لخلايا العائل (الدجاج) (Kroker et al., 2002)

2-4- الخصائص الكيميائية والفيزيائية لعقار الدوكسي سايكلين:

أولاً: الخصائص الكيميائية لعقار الدوكسي سايكلين:

1- البنية الجزيئية والتصنيف: يُصنف الدوكسي سايكلين (Doxycycline) كمشتق نصف اصطناعي (Semi-synthetic) من مجموعة التتراسيكلينات، حيث يتم تصنيعه انطلاقاً من الأوكسي تتراسيكلين أو الميثاسيكلين. كيميائياً، يُعرف الدواء باسم (alpha-6-deoxy-5-oxytetracycline) (Riviere & Spoo, 2001)، يحتوي التركيب الأساسي للدواء على نظام حلقة النفثاسين (Naphthacene ring system)، ويكمن الاختلاف الهيكلي الجوهري بينه وبين الأوكسي تتراسيكلين في فقدان مجموعة الهيدروكسيل عند الموضع رقم 6 في الحلقة مما يمنحه وزناً جزيئياً يقدر بـ 462.46 دالتون (Steigbigel et al., 1968).

ثانياً: الخصائص الفيزيائية والثباتية:

يظهر الدوكسي سايكلين في صورته الخام كمادة صفراء بلورية، عديمة الرائحة، ذات طعم مر قليلاً، وتتميز بخاصية الامتصاص للرطوبة (Hygroscopic). كما يمتلك الدواء خاصية التألق (Fluorescence) تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية. ومن الناحية الكيميائية، يُعد الدواء مستقراً في شكله البلوري، إلا أنه يتعرض للتحلل إلى نواتج ثانوية (فوق مائية أو لا مائية) عند التخزين في ظروف رطبة، أو عند التعرض لدرجات حرارة مرتفعة وضوء مباشر (Riond & Riviere, 1988).

2-5- السلوك الكيميائي وتشكيل المعقدات (Chelation) :

يتميز الدوكسي سايكلين بكونه مركباً تذبذبياً (Amphoteric) ، حيث يشكل أملاحاً قابلة للذوبان مع الأحماض والقواعد على حد سواء. وتعتبر ثباتيته في الأوساط الحمضية متفوقة على بقية أفراد مجموعة التتراسيكلين، بينما تتشابه ثباتيته مع الأوكسي تتراسيكلين في الأوساط القلوية ويصل نشاطه الأمثل عند درجة حموضة تتراوح بين (pH=6.1-6.6) (Winkler & Weih, 1967)،

من أهم الخصائص المؤثرة على الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين هي قدرته العالية على تشكيل معقدات (Chelates)مع الشوارد ثنائية وثلاثية التكافؤ (مثل الكالسيوم والمغنيسيوم). ونظراً لطبيعته المحبة بشدة للدهون(Lipophilic) ، فإن ذوبانيته في الماء تعتبر محدودة وثباتيته في المحاليل المائية أقل استقراراً (Kroker et al., 2002).

2-6- الحركية الدوائية (Pharmacokinetics) والفعالية الحيوية للدوكسي سايكلين:

يتمتع الدوكسي سايكلين بـ **نصف عمر حيوي (Biological Half-life)** أطول من مركبات المجموعة الأخرى، مما يضمن بقاء مستوياته في بلازما الطيور ضمن المدى العلاجي لفترات ممتدة، وهذا يعزز من نشاطه المثبط للبكتيريا (Bacteriostatic activity). وبالإضافة إلى ذلك، يمتاز الدوكسي سايكلين بأنه أقل تأثيراً سلبياً على **الفلورا المعوية (Microbial Flora)** للدجاج مقارنة بمركبات المجموعة الأخرى، مما يقلل من الاضطرابات الهضمية أثناء فترة العلاج (Chambers, 2005).

2-6-1- الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين (Pharmacokinetics) :

تُعنى **الحركية الدوائية** بدراسة مسار الدواء داخل الكائن الحي عبر أربع عمليات رئيسية: الامتصاص، التوزيع، الاستقلاب، والإطراح. ويُعد التوافر الحيوي (Bioavailability) مؤشراً حاسماً يعبر عن نسبة الجرعة المعطاة

التي تصل إلى الدوران الجهازي في صورتها الفعالة (Richard, 2015). كما يمثل نصف العمر الحيوي ($T_{1/2}$) عن الزمن اللازم لانخفاض تركيز الدواء في البلازما إلى نصف قيمته الأصلية، وهو محدد رئيسي لتكرار الجرعات (Richard, 2015).

تكتسب دراسة الحركية الدوائية لمركب الدوكسي سايكلين أهمية خاصة في الطب البيطري، وذلك نظراً لاستخدامه الواسع في علاج الإصابات التنفسية والهضمية والجهازية في الحيوانات والدواجن، وضرورة ضبط جرعته بما يحقق التراكيز العلاجية المطلوبة دون حدوث سمية أو بقايا دوائية في المنتجات الحيوانية (Riviere and Papich, 2018).

أولًا: الامتصاص(Absorption):

الامتصاص هو انتقال الدواء من موضع إعطائه إلى الدوران الجهازي. ويتميّز الدوكسي سايكلين بامتصاص جيد نسبياً بعد الإعطاء الفموي مقارنةً ببعض أفراد مجموعة التتراسكلينات الأخرى، ويرجع ذلك إلى ارتفاع نسبة انحلاله في الدهون، مما يساعده على عبور الأغشية الحيوية بكفاءة أعلى (Papich, 2016).

يحدث امتصاص الدوكسي سايكلين بشكل رئيسي في الأمعاء الدقيقة عبر الانتشار السلبي، وتتأثر سرعة ودرجة الامتصاص بعدة عوامل، من أهمها:

1. وجود الطعام في القناة الهضمية : قد يؤخر الطعام الامتصاص أو يُنقصه بدرجات متفاوتة .
2. وجود الشوارد ثنائية أو ثلاثية التكافؤ مثل الكالسيوم والمغنزيوم والحديد، إذ تُشكل مع الدواء معقدات غير قابلة للامتصاص، مما يخفض التوافر الحيوي .
3. سلامة الجهاز الهضمي : تؤثر الالتهابات المعوية أو اضطراب حركة الأمعاء في امتصاصه .
4. شكل المستحضر الصيدلاني : تختلف معدلات الامتصاص بين المساحيق والمحاليل والكبسولات (Boothe, 2012).

ويُعدّ التوافر الحيوي (Bioavailability) للدوكسي سايكلين مرتفعاً نسبياً بعد الإعطاء الفموي، وهو ما جعله خياراً مناسباً للعلاج الجماعي في الدواجن عبر مياه الشرب. تتباين مجموعة التتراسيكلينات في كفاءة امتصاصها من القناة الهضمية؛ حيث يتميز الدوكسي سايكلين والمينوسيكلين بأعلى معدلات امتصاص تصل إلى 95–100%، متفوقين بذلك على الأوكسي تتراسيكلين (60–70%) والكلورتتراسيكلين (30%) (Anadon et al., 1994). ويمتص الدوكسي سايكلين بشكل شبه كامل من الأجزاء العليا للقناة المعدية المعوية، بينما تساهم الكميات الضئيلة المتبقية في تجويف الأمعاء في تعديل الفلورا المعوية وتُطرح مع الزرق (Anadon et al., 1994). يتأثر امتصاص التتراسيكلينات بشكل ملحوظ عند وجود الشوارد المعدنية ثنائية وثلاثية التكافؤ في

العليقة، مثل الكالسيوم(Ca^{+2})، المغنيسيوم(Mg^{+2})، الحديد(Fe^{+3})، والألمنيوم (Al^{+3}) ، حيث تشكل هذه الشوارد معقدات مخلبية (Chelates) غير قابلة للامتصاص، وهو ما يحدث عند تناول الدواء مع منتجات الألبان أو مضادات الحموضة (Riviere et al., 1991). وتُعزى التباينات في قيم التوافر الحيوي الفموي إلى الخصائص الكيميائية للدواء؛ حيث يميل الدوكسي سايكلين للارتباط بأيونات المعادن متعددة التكافؤ المتواجدة في الوسط المعوي. يؤدي هذا الارتباط إلى تكوين معقدات مخلبية (Chelates) ضعيفة الذوبان مع كاتيونات مثل الكالسيوم، المغنيسيوم، والحديد، مما يعيق عملية العبور عبر الغشاء المعوي ويقلل من كفاءة الامتصاص (Murakawa, 1993; Stahlmann & Lode, 2001).

2-6-2- العوامل المؤثرة على الامتصاص :

تأثير الحالة الغذائية (Feeding Status) :

تؤثر الحالة الغذائية بشكل واضح في امتصاص الدوكسي سايكلين لدى الدواجن، إذ يؤدي وجود الغذاء في الجهاز الهضمي إلى إبطاء الامتصاص وتقليل التوافر الحيوي مقارنةً بالطيور الصائمة (Laczay et al., 2001) ، ومع ذلك يُعد الدوكسي سايكلين الأقل تأثراً بالغذاء بين مجموعة التتراسيكلينات، حيث لا يتجاوز انخفاض امتصاصه نحو 20%، بينما يتأثر امتصاص التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين بدرجة أكبر بكثير (Plumb, 2008).

ثانياً: التوزع(Distribution)

بعد امتصاص الدواء ووصوله إلى الدم، يتوزع الدوكسي سايكلين في سوائل وأنسجة الجسم المختلفة. ويتميّز بحجم توزع مرتفع نسبياً وقدرة فائقة على التغلغل في الأنسجة العميقة وتجاوز الحواجز الخلوية، الأمر الذي يؤدي بالضرورة إلى فترة بقاء أطول في الجسم وذلك لأنه يتمتع بقابلية للذوبان في الدهون (Lipophilicity) تزيد بمقدار 5 إلى 10 مرات مقارنةً ببعض التتراسكلينات الأخرى وهذا ما يُفسر قدرته الجيدة على النفاذ إلى الأنسجة وارتباطه المعتدل إلى المرتفع ببروتينات البلازما (Riviere and Papich, 2018) . حيث تتجاوز تركيزاته في معظم أعضاء الجسم مستوياته في المصل (Archimbault et al., 1983; Dorrestein et al., 1986a). وتتوزع أعلى التركيزات في أعضاء الإطراح (الكبد، الصفراء، الكلى، والجهاز الهضمي)، تليها أنسجة الرئتين، الطحال، العضلات، والعظام (Traub, 1982).

وعلى الرغم من نفاذيته العالية، إلا أن تركيزاته في الجهاز العصبي المركزي والسائل النخاعي تظل منخفضة نسبياً (Riviere & Spoo, 2001) ، بينما تظهر مستويات ضئيلة جداً في الأنسجة الدهنية والجلد (Dorrestein et al., 1991).

يمتلك الدوكسي سايكلين القدرة على عبور حاجز المبيض (Ovarian barrier) في الطيور، حيث يمكن الكشف عن بقاياه في البيض (Yoshimura et al., 1991) ، كم أنه يعبر الحاجز اللبني وبالتالي يفرز في حليب الثدييات (Chambers, 2005). ويعد هذا الانتقال مهماً عند دراسة التأثيرات المحتملة على الأجنة أو معدلات الفقس. ويُعد حجم التوزيع مؤشراً حاسماً على مدى انتشار الدواء خارج الوعاء الدموي. وقد حددت الدراسات قيم (Vd) (التوزع الظاهري Volume of Distribution) في الدجاج والديوك الرومية بعمر 6 أسابيع بنحو 1.3 إلى 1.4 لتر/كغم (Dorrestein et al., 1991; Santos et al., 1996). وتعتبر هذه القيم أعلى من تلك المسجلة في البشر (0.75 لتر/كغم) والقطط (0.9 لتر/كغم)، وأقل قليلاً من قيمتها في الكلاب (1.7 لتر/كغم) (Kroker, 2006).

يتميز الدوكسي سايكلين بقدرة عالية على الارتباط ببروتينات البلازما، حيث تتراوح نسبة الارتباط في الطيور والدواجن ما بين 70% إلى 90% (Santos et al., 1996) ، وهي نسبة مشابهة لما سُجل لدى البشر والثدييات المنزلية الأخرى .(Bethke, 1995; Riond & Riviere, 1989) وتكمن أهمية هذا الارتباط في كونه ارتباطاً عكسياً(Reversible binding) ؛ حيث يعمل البروتين كمخزن للدواء يحرره تدريجياً في صورة فعالة، مما يساهم في إطالة نصف عمر الدواء في الدوران الجهازي (Schach von Wittenau & Yeary, 1963).

و يُظهر نصف العمر الحيوي للدوكسي سايكلين تبايناً ملحوظاً باختلاف النوع الحيواني وطريقة الإعطاء:

- في الدجاج : يتراوح نصف العمر الحيوي ما بين 4 إلى 8 ساعات عند الإعطاء التقليدي (Anadon et al., 1994).
- في الأنواع الأخرى : يبلغ في الأبقار حوالي 14 ساعة، وفي الكلاب ما بين 7 إلى 10 ساعات، بينما ينخفض في القطط ليتراوح بين 4 إلى 6 ساعات (Riond & Riviere, 1989).
- عند البشر: يسجل الدواء نصف عمر طويل نسبياً يتراوح بين 12 إلى 18 ساعة (Kroker et al., 2002).

عند إعطاء الدوكسي سايكلين فموياً للطيور بجرعة 50 ملغم/كغم، سُجلت قيم لنصف العمر تتراوح بين 4 و10 ساعات، وقد تصل في بعض الحالات إلى أكثر من 20 ساعة (Flammer, 1997)، مما يعكس تأثير الفروق الفردية والحالة الفسيولوجية على إطراح الدواء.

ويصل الدوكسي سايكلين إلى تراكيز جيدة في:

- الرئتين والجهاز التنفسي، وهو ما يفسر فعاليته في الإصابات التنفسية .
- الكبد والكلى .
- السوائل المصلية .
- الأنسجة الالتهابية .

كما يمتلك قدرة على العبور إلى داخل الخلايا، ما يجعله فعالًا ضد الممرضات داخل الخلوية مثل Mycoplasma و Chlamydia و Rickettsia (Prescott et al., 2000).

ويتأثر التوزع بعدة عوامل، منها:

1. درجة الارتباط ببروتينات البلازما.
2. درجة التروية الدموية للعضو.
3. الحالة المرضية مثل الحمى أو التجفاف أو الالتهاب.
4. درجة حموضة الوسط (pH) (Riviere & Papich, 2018).

ثالثاً: الاستقلاب الحيوي(Metabolism)

الاستقلاب هو التغير الكيميائي الذي يطرأ على الدواء داخل الجسم، وغالبًا ما يحدث في الكبد. إلا أن الدوكسي سايكلين يتميز بأنه يُستقلب بدرجة محدودة نسبياً مقارنةً بعدد من المضادات الحيوية الأخرى، حيث يطرح جزء كبير منه بشكله الفعّال دون تغيرات كبيرة.

ولهذه الخاصية أهمية سريرية، إذ:

- تقلل الاعتماد الكامل على الكبد في التخلص من الدواء.
- تطيل مدة بقائه في الجسم.
- تساعد في الحفاظ على تراكيز علاجية لفترة أطول.

ومع ذلك، فإن حالات القصور الكبدي أو الأمراض الجهازية الشديدة قد تؤثر في معدل الاستقلاب وفي طرح الدواء (Papich, 2016).

رابعاً: الإطراح (Excretion)

الإطراح هو التخلص من الدواء أو مستقلباته خارج الجسم، ويتم طرح الدوكسي سايكلين عبر مسارين رئيسيين:

1. عن طريق الصفراء والبراز : يُعدّ طريقاً مهماً نسبياً.
2. عن طريق الكلى عبر البول : بنسبة أقل من بعض التتراسكلينات التقليدية.

ولهذا السبب يُعد الدوكسي سايكلين أكثر أماناً نسبياً في بعض حالات القصور الكلوي مقارنةً بالتتراسكلين التقليدي (Boothe, 2012).

كما يخضع جزء من الدواء إلى الدوران المعوي الكبدي (Enterohepatic circulation)، مما قد يساهم في إطالة نصف العمر الحيوي واستمرار تأثيره العلاجي. وتُطرح التتراسيكلينات بشكل أساسي عبر الصفراء دون خضوعها لاستقلاب كبدي مكثف، حيث يصل تركيزها في الصفراء إلى عشرة أضعاف مستواها في المصل. يساهم جزء من الدواء المطروح في الدورة الدموية المعوية الكبدية (Enterohepatic circulation) ، مما يساعد في الحفاظ على ثبات مستويات الدواء في الدم لفترات أطول (Chopra & Roberts, 2001). بينما تُطرح نسبة تتراوح بين 10–50% عن طريق الترشيح الكبيبي في الكلى، يتميز الدوكسي سايكلين باعتماده الكبير على الإطراح الصفراوي، مما يجعله العقار الأكثر أماناً والاختيار الأول في حالات القصور الكلوي لعدم حاجته لتعديل الجرعات (Chopra & Roberts, 2001).

يلعب الإفراز الكلوي دوراً ثانوياً لمركب الدوكسي سايكلن، على عكس التتراسيكلينات الأقدم. يتم إخراج حوالي 30% إلى 40% فقط من الدوكسي سايكلن عن طريق الكلى لأنه يتم إعادة امتصاصه بقوة في النبيب بسبب محبته للدهون (Aronson, 1980). في الكلاب، يتم إخراج حوالي 25% عن طريق الترشيح الكبيبي، وفي البشر حوالي 55% (Schach Von Wittenau and Twomey, 1971). عن طريق زيادة قلوية البول، يمكن زيادة الإفراز عن طريق الكلى بشكل ملحوظ (Jaffe *et al.*, 1974).

بسبب ذوبانه العالي في الدهون، فإن غالبية الدوكسي سايكلن ينتشر بشكل نشط ميكروبيولوجياً مباشرة من مجرى الدم إلى تجويف الأمعاء، خاصة في منطقة الاثني عشر (Schach Von Wittenau *et al.*, 1972)، ولم يتم تحويله مسبقاً في الكبد. تم العثور على أكثر من 90% من الجرعة المعطاة من الدوكسي سايكلن في براز البشر والجرذان والكلاب (Schach Von Wittenau *et al.*, 1972; Schach Von Wittenau and Twomey, 1971). تدخل نسبة صغيرة (<5%) من الدوكسي سايكلن إلى الأمعاء من خلال الإفراز الصفراوي (Plumb, 2008). في الأمعاء، يتم تعطيل الدوكسي سايكلن جزئياً عن طريق تكوين مترافق أو عملية استحلاب، مما يمنع إعادة الامتصاص (Riviere and Spoo, 2001). يمكن أن يدخل الجزء غير المنضم إلى الدورة الدموية المعوية الكبدية (Stahlmann and Lode, 2001). من خلال تنشيط الإنزيمات المعوية، يمكن أن ينخفض التوافر البيولوجي لدى الكلاب من 75% إلى 45% بعد الاستخدام المتكرر (Kroker et al., 2002). يتسم الدوكسي سايكلين بسرعة الإطراح عند الإعطاء بجرعات مفردة؛ ففي

الديوك الرومية، يتم إفراز حوالي 90% من الجرعة المعطاة (25 ملغم/كغم) خلال 48 ساعة من زمن التطبيق (Santos et al., 1996; Wilson, 1988). وتعد هذه المعلومة حاسمة عند تحديد فترات السحب (Withdrawal periods)لضمان سلامة المنتجات الغذائية.

2-6-4- أهم المعايير الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين:

تعتمد دراسة الحركية الدوائية على مجموعة من المؤشرات الأساسية، أهمها:

- Cmax : أعلى تركيز يصل إليه الدواء في البلازما.
- Tmax : الزمن اللازم للوصول إلى أعلى تركيز.
- AUC : المساحة تحت منحنى التركيز–الزمن، وتعكس مقدار التعرض الكلي للدواء.
- T½ : نصف العمر الحيوي، ويُعد طويلًا نسبيًا في الدوكسي سايكلين.
- Cl : التصفية الدوائية (Clearance).
- Vd : حجم التوزع الظاهري.

وتُستخدم هذه القيم في تحديد الجرعة المناسبة والفاصل الزمني بين الجرعات (Toutain et al., 2010).

2-7- الآثار الجانبية والتداخلات الدوائية لمركب الدوكسي سايكلين:

على الرغم من فعاليته العلاجية، يترافق استخدام الدوكسي سايكلين مع بعض الآثار الجانبية والتداخلات، أهمها:

1. في الخيول يمنع استخدام التتراسايكلينات بشكل قطعي وخاصة الدوكسي سايكلين حيث أثبتت الدراسات أن استخدام الدوكسي سايكلين غير ممكن وخاصةً وريدياً أو عن طريق الفم؛ لما له من آثار خطيرة، منها:

- ✓ الموت المفاجئ (Fatal Cardiac Aroughtia) : حيث سُجلت حالات انهيار قلبي وموت مفاجئ ويعزى ذلك إلى قدرة الدواء على الارتباط بكالسيوم عضلة القلب مما يدفعه لوقف عملية الانقباض أو عدم انتظام في ضربات القلب وبالتالي إلى النفوق المفاجئ (Kroker, 2006).
- ✓ التهاب القولون الحاد: تمتلك الخيول جهازاً هضمياً حساساً جداً، و يؤدي إعطاء الدوكسي سايكلين عن طريق الفم إلى اضطرابات قوية في الفلورا المعوية الحساسة المسؤولة عن هضم وتخمير الألياف، وبالتالي تنشيط العدوى الانتهازية مما يوفر المجال لنمو الجراثيم الانتهازية وخاصة "السالمونيلا" أو "الكلوستريديوم" حيثُ تبدأ بالتكاثر السريع وإفراز السموم، مسببةً إسهالات حادة قد تكون مميتة (Riviere and Spoo, 2001).

2. التداخلات الدوائية: يؤدي التزامن في إعطاء الدوكسي سايكلين مع الوارفارين إلى تعزيز التأثير المضاد للتخثر نتيجة التنافس على الارتباط بالألبومين (Hasan, 2007).

3. سمية الدوكسي سايكلن أقل مقارنة بالتتراسيكلينات الأخرى (Kroker, 2006). في حين أن الجرعة المميتة للنصف (LD50) في الوريد عند الفئران هي 150 ملغ / كغ من وزن الجسم، فإن الكلاب تتحمل جرعة فموية قدرها 250 ملغ / كغ من وزن الجسم دون أعراض سريرية (Kühnert, 1991)، كما حدد الباحث (Drumev et al., 1982) أن الجرعة القاتلة للنصف (LD50) بمقدار 2500 ملغ/كغ من وزن الجسم للدوكسي سايكلين في الدجاج. وتم وصف الآثار الجانبية للدوكسي سايكلين في الدراسات عند الطيور بعد تناول جرعة علاجية عن طريق الفم لعلاج عدوى مايكوبلازما المفطورات (مستويات البلازما> 1 ميكروغرام / مل) لمدة 45 يوماً. وقد حدثت على شكل تليف الكبد السام الحاد، مع زيادة في مستوى AST، LDH والأحماض الصفراوية. وشملت العلامات السريرية في الطيور المعالجة فقدان الشهية، فقدان الوزن، الخمول، انتفاخ الريش، الإسهال (Flammer, 2001; Flammer, 2006).

4. بعد الاستخدام الفموي أو الوريدي للتتراسيكلين، غالباً ما تحدث اضطرابات في الجهاز الهضمي مع القيء وانتفاخ البطن والإسهال، إما بسبب التهيج المباشر من الدواء غير الممتص أو بسبب الاضطرابات في البنية المعوية الفيزيولوجية (Kroker, 2006). وقد بين الباحثان Smith و Leydon أن للدوكسي سايكلين تأثيرات على الجهاز الهضمي حيث يُسبب الغثيان والتقيؤ ويُعزى ذلك إلى التهيج الموضعي المباشر على الجهاز الهضمي (Smith and Leydon, 2005). أشار Baxter وزملاؤه إلى أن الدوكسي سايكلين قد يسبب الالتهاب الغشائي المعوي القولوني الكاذب Pseudomembranous entero colitis (Baxter et al., 2008).

5. يُمنع استخدام التتراسيكلينات بشكل عام أثناء الحمل والرضاعة بسبب تأثيراتها المشوهة المثبتة، كما قد تُسبب تلبكاً أو خللاً في وظيفة الأمعاء لدى بعض الحيوانات كالخيول (Lucchetti et al., 2019).

6. التأثيرات الكبدية : في حالات نادرة، قد يتسبب الدواء في إصابة كبدية (تتراوح بين ركود صفراوي أو إصابة مختلطة) بعد أسبوع إلى أسبوعين من بدء العلاج. وقد سُجلت حالات من التهاب الكبد السام المترافق مع ارتفاع ملحوظ في إنزيمات الكبد(ALT, AST, ALP, GGT) نخر في الفصيص المركزي الكبدي (Chavant et al., 2008; Mailhol et al., 2010). وقد ذكر كل من الباحث

Thiim و Alestig أنه من المحتمل أن تُسبب التتراسكلينات ضعف لوظائف الكبد أو ما يسمى بتسمم الكبد Hepatotoxicity وبالأخص في أثناء الحمل وفي الحيوانات المصابة بخلل أو ضعف أو اضطراب مسبق في وظائف الكبد أو عند إعطاء جرعة عالية عن طريق الوريد (Alestig, 1973 ; Thiim and Friedman, 2003).

7. التأثيرات القلبية الوعائية : قد يؤدي الإعطاء الوريدي السريع إلى انخفاض حجم الضربة القلبية وزيادة المقاومة الطرفية نتيجة إطلاق الهيستامين الداخلي (Gross et al., 1981).

8. الاستخلاب (إزالة الكالسيوم) : تمتلك هذه المركبات قدرة على الارتباط بأيونات الكالسيوم (Chelation)، مما قد يؤدي إلى نقص كالسيوم الدم المفاجئ، خاصة بعد الحقن الوريدي السريع، لذلك يُفضل استخدام بروتوكولات الحقن العضلي الآمنة لتجنب هذا التفاعل (Boothe, 2012).

2-8- آليات المقاومة البكتيرية:

طورت الجراثيم آليات متعددة لمقاومة التتراسيكلينات، تشمل: مضخات التدفق(Efflux pumps) ، التحلل الإنزيمي، وطفرات الحمض النووي الريبوزي .(rRNA) تلعب بروتينات الحماية الريبوسومية البكتيرية، مثل Tet(O)وTet(M) ، دوراً بارزاً في هذه المقاومة ؛ حيث يمنع بروتين Tet(O) المضاد الحيوي من الارتباط بموقعه الأساسي، حيثُ يُعتبر Tet(O) أحد بروتينات الحماية الريبوسومية (Ribosomal Protection Proteins) التي تنتجها بعض البكتيريا كآلية لمقاومة مضادات التتراسكلينات. لا يقوم هذا البروتين بتكسير المضاد الحيوي أو تعطيله كيميائياً، وإنما يعمل على حماية هدف الدواء داخل الخلية البكتيرية أي الريبوسوم ، في حين يعمل كلا البروتينين على إزاحة التتراسيكلينات من الريبوسوم، وزيادة ثابت التفكك(Kd) ، مما يسمح لـ (aa-tRNA) بالارتباط بالموقع (A) واستئناف تخليق البروتين (Connell et al., 2003).

2-9- التحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط للدوكسي سايكلين:

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

تُعدّ الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) من أهم التقنيات المستخدمة في الكيمياء التحليلية الحديثة، حيث تُستخدم لفصل مكونات الخليط، والتعرّف عليها، وتقدير تراكيزها بدقة عالية أي أنها تستخدم لتحليل المادة الدوائية بشكل كمي ونوعي. وتعتمد هذه التقنية على تمرير الطور المتحرك، وهو مذيب سائل أو مزيج من المذيبات، تحت ضغط عالٍ عبر عمود يحتوي على

طور ثابت، مما يؤدي إلى فصل مكونات العينة نتيجة اختلاف تفاعلاتها مع الطور الثابت (Skoog et al., 2014). تعتمد آلية الفصل في HPLC على مفهوم انتقال الكتلة (Mass Transfer) والتوازن الديناميكي بين الطور المتحرك والطور الثابت، حيث تتوزع الجزيئات بين الطورين وفقًا لقوى فيزيائية وكيميائية متعددة، ويؤدي اختلاف شدة هذه التآثرات إلى اختلاف زمن بقاء كل مركب داخل العمود، وهو ما يُعرف بزمن الاحتفاظ (Retention Time) (Snyder et al., 2010).

يتكوّن نظام HPLC من عدة وحدات أساسية تشمل: مزيل الغازات لإزالة الفقاعات من الطور المتحرك، والمضخات عالية الضغط التي تؤمّن تدفقًا ثابتًا، وحاقن العينة، وعمود الفصل الذي يحتوي على الطور الثابت، والكاشف الذي يسجل مرور المركبات، بالإضافة إلى نظام معالجة البيانات الذي يحول الإشارات إلى مخطط استشرابي (Chromatogram) (Dong, 2006).

تُستخدم ألياف السيلكا في تعبئة أعمدةHPLC ، يتراوح حجمها عادة بين 2–50 ميكرومتر، مما يزيد من مساحة السطح ويُحسّن كفاءة الفصل. وتتراوح أبعاد الأعمدة التحليلية غالبًا بين 2.1 إلى 4.6 مم في القطر و30 إلى 250 مم في الطول. ويساهم استخدام ضغوط عالية (تتراوح بين 50 و350 بار أو أكثر) في تسريع عملية الفصل وتحسين دقتها مقارنة بالكروماتوغرافيا السائلة التقليدية التي تعتمد على الجاذبية (Meyer, 2010).

يمكن إجراء الفصل في HPLC بطريقتين رئيسيتين:

- الإمرار المتساوي (Isocratic Elution): حيث يكون تركيب الطور المتحرك ثابتًا طوال عملية الفصل .
- الإمرار المتدرج (Gradient Elution): حيث يتغير تركيب الطور المتحرك مع الزمن، وهذا يعني أن تركيب الطور المتحرك (Mobile Phase) لا يبقى ثابتًا أثناء التحليل، بل يتغيّر تدريجياً مع الزمن بهدف تحسين فصل المركبات المختلفة. أي أن قوة الطور المتحرك تزداد مع الزمن مما يُحسن فصل المركبات ذات الخصائص المختلفة ويتم هذا التغيير بواسطة مضخات جهاز HPLC المبرمجة إلكترونياً، وتُستخدم هذه الطريقة لعدة أسباب منها:

بعض المركبات:

- تخرج بسرعة كبيرة من العمود .

- وبعضها يرتبط بقوة بالطور الثابت ويحتاج وقتًا طويلًا للخروج .

لذلك فإن تغيير تركيب الطور المتحرك يساعد على:

- تحسين فصل المركبات المختلفة .
- تقليل زمن التحليل .
- إعطاء قمم (Peaks) أوضح وأكثر انتظاماً. (Snyder et al., 2010).

تعتمد عملية الكشف على أجهزة متنوعة، أكثرها شيوعًا كاشف الأشعة فوق البنفسجية–المرئية(UV–Vis) ، وكاشف مصفوفة الثنائيات الضوئية(PDA) ، إضافة إلى كواشف أكثر تطورًا مثل مطياف الكتلة(MS) ، والذي يُستخدم عند الحاجة إلى تحديد بنية المركبات بدقة عالية.(Skoog et al., 2014)

يُعدّ زمن الاحتفاظ من أهم المعايير في التحليل الكروماتوغرافي، حيث يمثل الزمن الذي يستغرقه المركب للانتقال من مدخل العمود إلى الكاشف. ويظهر المخطط الاستشرابي على شكل قمم (بيكات)، حيث تعبّر ارتفاع القمة عن تركيز المركب، بينما يدل موقعها على زمن الاحتفاظ (Dong, 2006).

تُستخدم تقنية HPLC في العديد من المجالات، مثل:

1. الصناعات الدوائية (تحليل الأدوية وضبط الجودة)
2. التحاليل السريرية (مثل قياس الفيتامينات والهرمونات)
3. الطب الشرعي (الكشف عن المخدرات والمنشطات)
4. الصناعات الغذائية والبيئية
5. الأبحاث الكيميائية والبيولوجية (Meyer, 2010)

تاريخياً، تطورت هذه التقنية بشكل ملحوظ منذ ستينيات القرن العشرين، حيث أدى تصغير حجم جسيمات الطور الثابت وتطوير أنظمة الضخ والكشف إلى زيادة الكفاءة بشكل كبير. كما أدى ظهور تقنيات الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء (UHPLC) إلى تحقيق سرعات فصل أعلى ودقة أكبر، باستخدام ضغوط تصل إلى أكثر من 100 ميغاباسكال.(Snyder et al., 2010)

وبفضل دقتها العالية، وسرعتها، وإمكانية استخدامها لتحليل مركبات معقدة وغير متطايرة، أصبحت تقنية HPLC من أكثر التقنيات استخدامًا في المختبرات البحثية والصناعية على حد سواء.

2-10- أهمية تربية الدجاج والاصابة بالمايكوبلازما:

بدأ تدجين الدجاج منذ 5000 عام في مصر القديمة، واستمر حتى يومنا هذا في تربية الدجاج وتنتشر فصيلة الدجاج (Columbidae) في جميع أنحاء العالم وتضم 60 جنساً وأكثر من 300 نوع (Hoffmann, 1969). تبرز عدوى المايكوبلازما (Mycoplasmosis) من التحديات الجوهرية في صناعة الدواجن، لما لها من تأثير مباشر على التنوع والحالة الصحية للقطعان. ورغم استمرار الإجراءات الأمنية الحديثة في الرعاية الصحية البيطرية التي تحد من تطور المرض، إلا أن العامل الممرض لا يزال يحتل أهمية مركزية في خطط الصحة للدواجن (Hooimeijer, 2006; Pennycott, 2008).

1- الانتشار والإصابة:

تباينت الدراسات في نسب الإصابة بالعدوى؛ حيث تشير بعض الدراسات التشخيصية إلى وجود المايكوبلازما بحوالي 20-40% من فحوصات الدجاج (Lüthgen, 2006) ،

2- العدوى وانتقال المرض :

المايكوبلازما هي كائنات مجهرية تتصف بقدرة عالية على البقاء والمقاومة في البيئة المحيطة. وتنتقل العدوى عبر عدة طرق:

- الانتقال الأفقي: من طير لآخر، أو عبر الإفرازات التنفسية والفضلات الملوثة (Pennycott, 2008; Andersen & Vanrompay, 2003).
- انتقالي عمودي (رأسي): حيث يمكن للعامل الممرض أن ينتقل من الأمهات عبر البيض إلى الصيصان الفاقسة (Lüthgen, 2006; Unkrieg, 1995) .

3- المسار المرضي:

تتراوح فترة حضانة المرض بين ثلاثة أيام وثلاثة أشهر، وتعتمد بشدة على زيادة السلالة البكتيرية والحالة المناعية للمضيف. وتلخص الأعراض الإكلينيكية فيما يلي:

- الأعراض التنفسية والعينية: يعاني المصاب من التهاب الملتحمة (التهاب الملتحمة)، والتهاب الأنف، والتهاب القصيبات الهوائية، وبالتالي بإفرازات أنفية.(Vogel et al., 1999; Tully, 2006)
- أعراض هضمية: قد تصاحب الإصابة بالتهاب غير طبيعي في المراحل الصغيرة، ويرافق ذلك خمول، وفقدان الشهية، وهزال واضح (Smith and Leydon, 2005).

- مجالات المعالجة: تصل نسبة النفوق في الحالات المفيدة إلى 10%، وقد تصل إلى مستويات كارثية في حالة غياب العلاج أو وجود عوامل مثبطة للمناعة كالعدوى الثانوية، أما في الحالات المزمنة ففي حال تعافي الطيور تبقى الطيور حاملة للعامل الممرض(Asymptomatic Carriers) ، مما يجعل السبب موجود دائماً لتهديد الصحة للقطيع (Gerlach, 1999). و يقتصر تأثير الدوكسي سايكلين على المايكوبلازما في أطوارها النشطة أيضياً (Metabolically active)، ولا يؤثر على المسببات الكامنة داخل البلاعم غير النشطة. ونظراً لأن ارتباط الدواء بالريبوسومات ارتباط عكسي، فإن المايكوبلازما قد تستعيد قدرتها على التكاثر بعد نحو 5 أيام من انقطاع العلاج إذا لم يقم الجهاز المناعي للطائر بالتخلص من البقايا الجرثومية (Gerbermann & Pauels, 1982).

2-11- أهمية مكافحة مرض المايكوبلازما في الدجاج:

تُعدّ عدوى المايكوبلازما من الأمراض المهمة في تربية الدواجن نظراً لقدرتها على الانتشار بين الدجاج وأنواع الطيور الأخرى، بما في ذلك طيور الزينة، مما يجعل دخولها إلى مزارع الدواجن خطراً صحياً واقتصادياً كبيراً (Duan et al., 1999 ; Andersen & Vanrompay., 2003). وتؤثر هذه العدوى بشكل ملحوظ في الديوك الرومية والبط والإوز، حيث قد تصل نسبة الإصابة في البط إلى 80% مع معدلات نفوق تتراوح بين 0–30%، بينما تؤدي في الديوك الرومية إلى انخفاض إنتاج البيض بنسبة 10–20% إضافةً إلى حدوث نفوق متفاوت حسب ضراوة العترة الممرضة (Brand., 1989 ; Andersen & Vanrompay., 2003). لذلك يُعدّ التبليغ عن الإصابات المؤكدة إجراءً أساسياً لدعم المراقبة الوبائية والحد من انتشار المرض. وتعتمد الوقاية على تطبيق إجراءات الأمن الحيوي الصارمة ومنع اختلاط الطيور المنزلية بالطيور البرية، إلى جانب تنفيذ برامج التطهير والإدارة الصحية المناسبة عند الاشتباه بالإصابة. أما التشخيص فيرتكز على الكشف المباشر عن العامل الممرض أو الاستجابة المناعية باستخدام تقنيات مثل ELISA وPCR، ويُعد الأخير الأكثر حساسية ونوعية للكشف عن الحمض النووي للمايكوبلازما (Gerbermann et al., 1992 ; Janeczek., 1989). وعلى الرغم من أن القضاء التام على العدوى بالمضادات الحيوية ليس مضموناً دائماً، فإن العلاج المناسب يسهم في تخفيف شدة المرض وتقليل انتشار العامل الممرض داخل القطيع، شريطة اختيار المضاد الحيوي الملائم والالتزام بالجرعات وفترة العلاج الموصى بها (Andersen & Vanrompay, 2003).

2-12- اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA) للكشف عن المايكوبلازما:

الكشف المصلي عن Mycoplasma gallisepticum في دجاج اللحم باستخدام اختبار ELISA (Crowther, 2000):

تُعد بكتيريا Mycoplasma gallisepticum من أهم المسببات المرضية في الدواجن، حيث ترتبط بحدوث مرض الجهاز التنفسي المزمن (CRD) ، والذي يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة نتيجة انخفاض معدلات النمو وكفاءة التحويل الغذائي وزيادة معدلات النفوق.(Stipkovits et al., 1993)

تتميز هذه البكتيريا بغياب الجدار الخلوي، مما يمنحها قدرة عالية على الالتصاق بالخلايا الظهارية للجهاز التنفسي والتسبب باضطرابات وظيفية فيه (Ley, 2003). كما تنتقل العدوى أفقيًا عبر الرذاذ التنفسي وعموديًا عبر البيض، مما يسهم في انتشارها السريع داخل قطعان الدواجن (World Organisation for Animal Health., 2021). نظرًا لصعوبة العزل البكتيري والحاجة إلى تقنيات سريعة، يُعد اختبار ELISA من أكثر الطرق استخدامًا في التشخيص المصلي للمايكوبلازما، نظرًا لحساسيته العالية وقدرته على تحليل عدد كبير من العينات خلال وقت قصير (Abo Elyazeed et al., 2020؛ Crowther, 2000).

و يُعد اختبار ELISA أداة فعالة في الدراسات الوبائية للكشف عن Mycoplasma gallisepticum، حيث يتميز بحساسية ونوعية مرتفعة مقارنة بالاختبارات التقليدية مثل اختبار تثبيط التلازن الدموي (HI) (Abo Elyazeed et al., 2020). كما يسمح بتحليل عدد كبير من العينات في وقت قصير، مما يجعله مناسبًا لبرامج المراقبة الصحية في مزارع الدواجن.

المبدأ العلمي للاختبار: يعتمد اختبار ELISA غير المباشر (Indirect ELISA) على تفاعل نوعي بين المستضد(Antigen) والأجسام المضادة (Antibodies). حيث تُثبَّت مستضدات Mycoplasma gallisepticum على سطح قاع صفيحة الاختبار، وعند إضافة مصل الدم، ترتبط الأجسام المضادة النوعية – في حال وجودها – بهذه المستضدات. بعد ذلك، يُضاف جسم مضاد ثانوي مرتبط بإنزيم (غالبًا إنزيم بيروكسيداز HRP)، والذي يرتبط بالأجسام المضادة الأولية. وعند إضافة الركيزة اللونية(TMB) ، يحدث تفاعل إنزيمي ينتج عنه لون أزرق يتحول إلى أصفر بعد إضافة محلول الإيقاف، وتكون شدة اللون الناتج متناسبة طردياً مع تركيز الأجسام المضادة في العينة (Crowther, 2000). ويتم قياس شدة اللون باستخدام جهاز قارئ ELISA عند طول موجي 450 نانومتر.

الأدوات والأجهزة المطلوبة لإنجاز اختبار الأليزا: (Crowther, 2000)

1- قارئ اليزا (جهاز الطيف الضوئي وبطول موجة 450 nm).

2- حوجلة زجاجية بحجم 2–1 ليتر.

3- رجاج الكتروني.

4- أحواض من أجل تمديد محلول الغسيل ومحلول الاقتران.

5- ميكروبيبيت متعدد الرؤوس من أجل نقل المحاليل الممددة وتوزيعها على حفر الطبق بسرعة.

6- ميكروبيبيت ذو رأس واحد من أجل نقل العينات.

7- رؤوس ماصات.

8- ماء مقطر أو مياه مؤينة لأغراض التمديد.

9- غطاء للأطباق من ورق الألمنيوم.

10- حاضنة من أجل التحضين بدرجة حرارة + 37°م.

تتضمن المواد المستخدمة صفيحة ELISA مطلية بمستضد Mycoplasma gallisepticum، أمصال الدم، شواهد موجبة وسالبة، محلول الغسيل، الكونجوجيت المرتبط بالإنزيم، الركيزة اللونية(TMB) ، ومحلول إيقاف التفاعل. كما يُستخدم جهاز قارئ ELISA لقياس الكثافة الضوئية عند 450 نانومتر. (والكونجوجيت في اختبار ELISAهو مادة تتكوّن من جسم مضاد (Antibody) أو أحيانًا مستضد مرتبط كيميائياً بإنزيم معيّن، أي أنه مركب مزدوج؛ لذلك يُسمى "كونجوجيت" أي "مقترن." وظيفته الأساسية هي الكشف عن حدوث الارتباط المناعي داخل الحفر في صفيحة ELISA).

الكواشف المتضمنة في العتيدة التشخيصية: (Crowther, 2000)

1-طبق الإليزا ELISA يحتوي على 96 حفرة ميكروليترية مرقمة من A1 وحتى H12 مغطاة بمستضد المايكوبلازما.

2-مصل الشاهد الإيجابي (Positive control) الحاوي على الأضداد النوعية للمسبب.

3-مصل الشاهد السلبي Negative control)) الخالي تماما من الأضداد النوعية للمسبب.

4-محلول التمديد رقم 13 (Dilution Buffer 13): يستخدم من أجل لتمديد أمصال العينات بنسبة 10/1.

5-محلول التمديد رقم 3 (Dilution Buffer 3): يستخدم هذا المحلول لتمديد محلول الاقتران بنسبة 10/1.

6-محلول الغسيل 20 (Washing Solution×): يستخدم بحله بالماء المقطر أو المؤين تركيز ×20.

7-محلول الاقتران (Conjugate): الذي سيرتبط مع معقد (المستضد - الأضداد النوعية) والمقترن عبارة عن protein G peroxidase conjugate الممدد بنسبة 10/1.

8-محلول الكاشف اللوني للأنزيم substrate solution: وهو جاهز للاستخدام والذي سيكشف كمية الارتباط بين محلول الاقتران المرتبط بالأنزيم ومعقد (المستضد – الأضداد النوعية) عن طريق إظهار درجة التلوين والتي يمكن قياسها عبر قارئ الإليزا.

9-محلول إيقاف التفاعل (Stop Solution): يضاف بعد انتهاء فترة حضانة الكاشف اللوني للأنزيم لإيقاف وإنهاء التفاعل الحاصل ويتكون من محلول حمض الكبريت 0.5 M (H2SO4 0,5 M solution).

طريقة التمديد:

محلول الغسيل (Washing Solution): يمدد محلول الغسيل المركز بتركيز 1×20 بنسبة 20/1 من الماء المقطر أو المؤين.

محلول الاقتران (Conjugate): يمدد المقترن بنسبة 1% من محلول التمديد رقم (3).

1/ 100 من محلول التمديد (Dilution Buffer 3) وعادة يكفي تمديد 100 ميكروليتر من المقترن إلى 10 مل من محلول التمديد 3.

2-13- الدراسات السابقة حول استخدام مركب الدوكسي سايكلين:

- **التطوير الدوائي:** يُعزى الفضل في اكتشاف وتطوير مركب الدوكسي سايكلين إلى العالم **Schach von Wittenau** عام 1962. (Schach von Wittenau & Yeary, 1963) وقد دخل حيز الاستخدام الرسمي في ألمانيا عام 1967(Frimmer & Lämmler, 1977) ، وهو العام ذاته الذي شهد طرح شركة "فايزر" لأول مستحضر تجاري تحت الاسم الشهير Vibramycin®.

- **طرق اعطاء مركب الدوكسي سايكلين في الدواجن:**

الدوكسي سايكلين (Doxycycline): وهو البديل الأكثر كفاءة وتوافرية، في الدراسات السريرية المقارنة، أظهر الدوكسي سايكلين تفوقاً ملحوظاً في الكفاءة العلاجية (Flammer, 1997). وتعود أهمية دراسة "التوافر الحيوي" للدوكسي سايكلين (موضوع البحث الحالي) إلى قدرته العالية على النفاذ للأنسجة التنفسية المصابة بالتهاب الأكياس الهوائية، حيث تتأثر حركيته الدوائية (Pharmacokinetics) بشكل مباشر بالحالة الصحية للطائر (سليم مقابل مصاب بالمايكوبلازما).

ويُعد الدوكسي سايكلين (Doxycycline) الخيار المفضل حالياً في بروتوكولات العلاج الكيميائي لعدوى المايكوبلازما في الدواجن، نظراً لفعاليته المتفوقة وخصائصه الحركية المتميزة مقارنة بمجموعة التتراسيكلينات الكلاسيكية (Flammer, 1997; Edison, 2002).

ويمكن إعطاء الدوكسي سايكلين في الطيور عن طريق الحقن أو عن طريق التجريع الفموي. أمّا في الإعطاء الحقني، فقد أشارت بعض الدراسات إلى إمكانية استخدام جرعات عضلية ممتدة المفعول وفق جداول زمنية متدرجة لضمان السيطرة على العدوى والحفاظ على تراكيز علاجية مناسبة في البلازما .(Pees, 2004) كما وُصفت بروتوكولات تعتمد على الحقن العضلي المتكرر في حالات الإصابة بالمايكوبلازما بهدف تحقيق مستويات دوائية كافية واستمرار التأثير العلاجي (Lüthgen, 2006)، وفي المقابل، يُعدّ الإعطاء الفموي للدوكسي سايكلين من أكثر الطرق استخداماً ولا سيما في قطعان الدواجن، نظراً لسهولة التطبيق وانخفاض الإجهاد الناتج عن المعالجة مقارنةً بالحقن المتكرر. ويمكن تقديم الدواء مباشرةً عن طريق التجريع الفموي الفردي أو عبر ماء الشرب في المعالجات الجماعية، مع ضرورة مراعاة استهلاك الماء اليومي والعوامل البيئية التي قد تؤثر في الجرعة الفعلية المتناولة من قبل الطيور (Anadón et al., 1994).

كما ينبغي التنبيه إلى أن إعطاء الدوكسي سايكلين عبر ماء الشرب قد يواجه بعض التحديات، مثل انخفاض ثباتية الدواء في الماء لفترات طويلة، أو ترسبه، أو تباين استهلاك الماء بين الطيور المريضة والسليمة؛ لذا يُنصح بتجديد المحلول يومياً ومراقبة الاستهلاك الفعلي. وفي الطيور الفردية أو طيور الزينة، يبقى التجريع الفموي المباشر أكثر دقة لضمان وصول الجرعة الكاملة إلى الطائر (Papich, 2022).

وبصورة عامة، فإن الإعطاء الفموي للدوكسي سايكلين يمثل خياراً علاجياً عملياً وفعالاً في العديد من أنواع الطيور، إلا أن تحديد الجرعة المثلى والفاصل الزمني بين الجرعات يجب أن يستند إلى النوع الطيري، شدة الإصابة، العامل الممرض المستهدف، والمعطيات الحركية الدوائية الخاصة بكل نوع.

وتتوافر مستحضرات الدوكسي سايكلين البيطرية بعدة أشكال صيدلانية تختلف تبعاً للنوع الحيواني المستهدف والغرض العلاجي، **وتشمل أبرز هذه المستحضرات:**

- المساحيق القابلة للذوبان في مياه الشرب (Water-soluble powders) وهي أكثر الأشكال استخداماً في دجاج اللحم والديوك الرومية، نظراً لإمكانية تطبيق العلاج على مستوى القطيع بالكامل بسهولة وكفاءة، مع ضمان توزيع الجرعة العلاجية بصورة متجانسة بين الطيور (European Commission, 2024) ،كما تتوافر مستحضرات على هيئة محاليل فموية مركزة (Oral solutions) تُضاف إلى مياه الشرب، وتمتاز بسهولة الاستخدام وثباتها الكيميائي الجيد وقدرتها على توفير تراكيز علاجية مستقرة خلال فترة المعالجة (Zhang et al., 2025) .

- وتوجد أيضاً مستحضرات على هيئة إضافات علفية (Premixes) تُستخدم بصورة رئيسية في بعض الحيوانات المنتجة للغذاء، حيث تُخلط مع العلف لتحقيق المعالجة الجماعية للحيوانات المصابة بالأمراض التنفسية البكتيرية.

- أما الأقراص والكبسولات الفموية فتُستخدم غالباً في الحيوانات الصغيرة مثل الكلاب والقطط والطيور الفردية ذات القيمة العالية، ولا تُعد مناسبة للاستخدام في نظم تربية الدواجن وذلك بسبب صعوبة إعطائها لأعداد كبيرة من الطيور (Papich, 2021).

وهناك أيضاً مستحضرات قابلة للحقن ولكن على الرغم من فعالية الإعطاء، إلا أن هذا الأسلوب يواجه عوائق إكلينيكية وتشريحية في الدجاج، منها:

- **التلف النسيجي** : تسبب الأحجام الكبيرة من محاليل الحقن تهيجاً موضعياً قد يصل إلى **النخر العضلي** (**Muscle Necrosis**) في عضلات الصدر.(Dorrestein et al., 1986a)
- **التكلفة المادية:** حيث يعتبر العلاج بالحقن مكلفاً اقتصادياً وغير عملي عند التعامل مع القطعان الكبيرة (Lüthgen, 2006).

وقد ساهم التطور الحديث في الصناعات الدوائية البيطرية في تطوير مستحضرات عالية الذوبان والثبات من الدوكسي سايكلين مخصصة للاستخدام في الدواجن، الأمر الذي عزز من كفاءة المعالجة الجماعية ورفع التوافر الحيوي للدواء بعد إعطائه عبر مياه الشرب، مما جعله أحد أهم المضادات الحيوية المستخدمة في برامج مكافحة المايكوبلازما والأمراض التنفسية البكتيرية في قطعان دجاج اللحم (Zhang et al., 2025 ; Swayne et al., 2020).

وهنا تبرز أهمية الدراسة الحالية في تقييم **التوافر الحيوي** (**Bioavailability**) للدوكسي سايكلين فموياً، لسد النقص المعرفي في سلوك هذا الدواء داخل جسم دجاج اللحم، سواء في الحالة السليمة أو تحت ظروف الإصابة بالمايكوبلازما.

– وقد أشارت الدراسات المختبرية (In vitro) التي أجريت على سلالات متعددة من المايكوبلازما إلى أن قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) للدوكسي سايكلين تتراوح عموماً بين (0.05 و 0.2 mg/ml) (Butaye et al., 1997)، بينما سجلت دراسات أخرى قيماً أكثر حساسية تتراوح بين (0.01 و 0.08 mg/ml) (Santos et al., 1997).

– أظهرت دراسة Gbylik–Sikorska وزملائه أن الإصابة بـ Mycoplasma gallisepticum والتعرض المتزامن للإنروفلوكساسين يؤثران في حركية الدوكسي سايكلين وتراكمه في أنسجة دجاج اللحم. فبعد إعطاء الدوكسي سايكلين بجرعة 20 ملغ/كغ من وزن الجسم كل 24 ساعة لمدة خمسة أيام، بلغ التركيز الأقصى للدواء في الطيور السليمة 2103.5 نانوغرام/غرام، في حين بلغ 2130.8 نانوغرام/غرام في الطيور المصابة بالمايكوبلازما. كما ارتفع هذا التركيز إلى 3194.5 نانوغرام/غرام عند الطيور المعرضة للإنروفلوكساسين بالتزامن مع العلاج بالدوكسي سايكلين. كذلك ازداد نصف العمر الحيوي للدواء من 7.5 ساعات في الطيور السليمة إلى 12.7 ساعة في الطيور المصابة، ليصل إلى 18.1 ساعة في المجموعة المعرضة للإنروفلوكساسين، مما يشير إلى أن الإصابة المرضية والتداخلات الدوائية قد تؤثر في توزيع الدوكسي سايكلين وإطراحه وتراكمه النسيجي في دجاج اللحم (Gbylik–Sikorska et al., 2016).

– وفي الدراسة التي قام بها الباحث Pai–Feng وزملاؤه عام 2016 وجد أنه عند إعطاء مركب الدوكسي سايكلين بجرعة عالية مقدراها 200ملغ/لتر الماء (ضعف الجرعة العلاجية التي تقدر بـ100 ملغ/لتر) لمدة 5 أيام في مياه الشرب تم الوصول لحالة ثبات steady–state الدوكسي سايكلين DC)) عند التركيز (8.3± 0.9 ميكروغرام / مل) في اليوم الثالث من العلاج، وقد كان نصف العمر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين هو (14.9± 1.4 ساعة) بينما كان ثابت الإزالة هو (0.05 ± 0.01 1/ ساعة)، كما أظهرت الدراسة أن فترة سحب الدوكسي سايكلين من أنسجة الكبد والكلى والصدر والفخذ تقدر بـ 7 أيام (Pai–Feng, H et al., 2016).

– وفي دراسة أخرى قام بها الباحث Anadón وزملاؤه عام 1994 والباحث El–Gendi وزملاؤه عام 2010 حيث أُعطي الدوكسي سايكلين عن طريق الفم بجرعة مقدارها20 ملغ / كجم من وزن الجسم (BW) يوميًا لمدة 4–5 أيام فأظهرت النتائج أن مستويات الدوكسي سايكلين (DC) في العضلات والكبد والكلى في اليوم الخامس بعد العلاج النهائي كانت كلها أقل من الحدود القصوى المسموح بها لبقايا الدوكسي سايكلين (Anadón et al., 1994; El–Gendi et al., 2010). حيث حدد الاتحاد الأوربي الحدود القصوى لبقايا الدوكسيسايكلين في الدواجن بـ 100 نانوغرام / غرام للعضلات، و 300 نانوغرام / غرام للكبد والجلد، و 600 نانوغرام / غرام للكلى.

– كما أظهرت الدراسة التي قام بها الباحث Gajda وزملاؤه عام 2014 حيثُ تم فيها إعطاء الدوكسي سايكلين DC)) بجرعة أقل (10 ملغ / كجم) لمدة 5 أيام متتالية أشارت النتائج إلى أن بقايا (DC) في اليوم السابع بعد

سحب الدواء كانت آمنة وضمن الحدود المسموح بها، ومع ذلك لم يتم التحقيق في مستويات بقايا الدوكسي سايكلين في الأنسجة عند استخدام تركيز مضاعف (Gajda et al., 2014).

– أما في الدراسة التي قام بها الباحث Fan,Yang عام 2018 حيثُ تم إعطاء الدوكسي سايكلينDC بالتجريع عن طريق الفم لـ 10 دجاجات لحم صحيّة بجرعة 20 ملغ/كجم من وزن الجسم كل 24 ساعة، وتم جمع عينات البلازما من الطيور عند 5، 10، 20، 30 دقيقة و 1، 2، 4، 6، 8، 12 ساعة بعد الجرعة الأولى، وعند 0.25، 0.5، 0.45، 1، 2، 3، 4 و 6 و 7 و 13.5 و 24 و 36 و 48 و 60 و 72 ساعة بعد آخر جرعة. كما تم جمع عينات بلازما إضافية على مدار 24 ساعة. وتم تحديد تراكيز الدوكسي سايكلين بواسطة الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC) وتمت مقارنة خصائص الحرائك الدوائية بعد الجرعات الأولى والأخيرة عن طريق الفم. وبعد الجرعة الأولى، تم تحديد نصف العمر الحيوي حيثُ كان 7.78 ساعة، ذروة التركيز 5.65 ميكروغرام/مل، الوقت للوصول إلى ذروة التركيز 3.50 ساعة، بينما كانت القيم المقابلة لهذه المؤشرات بعد آخر جرعة هي كالتالي نصف العمر الحيوي 19.90 ساعة، ذروة التركيز 5.71 ميكروغرام / مل، الوقت للوصول إلى ذروة التركيز 7.25 ساعة. كما أظهرت النتائج أنه بعد الجرعات المتعددة عن طريق الفم أصبح كل من الامتصاص والإطراح أبطأ، بينما كان التوزيع أكثر شمولاً من ذلك بعد جرعة واحدة. ومع ذلك بعد تناول جرعات متعددة عن طريق الفم لم يلاحظ تراكم الدوكسي سايكلين في البلازما بمتوسط عامل تراكم قدره 1.11 (Fan Yang et al., 2018).

– وأكدت الدراسات أن مستويات الدوكسي سايكلين البلازمية الفعالة تؤدي إلى تثبيط إفراز المايكوبلازما، إلا أن مدة "الخلو من المسبب" بعد توقف العلاج تعتمد بشكل مباشر على الجرعة المستخدمة .(Gerbermann, 1992) ففي التجارب التي أجريت على بعض أنواع الطيور، أدت الجرعات المرتفعة إلى إطالة فترة غياب الإفراز الجرثومي لمدة تصل إلى 4.5 أشهر، بينما في الجرعات المنخفضة عادت المسببات للظهور بعد فترة أقصر، مما يبرز أهمية تحديد الجرعة المثلى لتحقيق الاستجابة العلاجية المستدامة (Gerbermann, 1992; Gerbermann & Pauels, 1982).

– وتشير الدراسات إلى أن الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين عند اعطائه عن طريق الفم يُمتص بعد الإعطاء الفموي بدرجات متفاوتة تبعاً للنوع الطيري والعمر والحالة الصحية. ففي دجاج اللحم، أدى إعطاء جرعة مقدارها 20ملغم/كغم فموياً إلى امتصاص سريع مع بلوغ التركيز الأعظمي البلازمي خلال فترة قصيرة، وبلغ التوافر الحيوي الفموي نحو 41.3%، مما يدل على كفاءة جيدة للإعطاء الفموي في هذا النوع (Anadón et al., 1994).

– وفي السمان الياباني، أظهرت دراسة أحدث أن الجرعة نفسها 20) ملغم/كغم (حققت تركيزات علاجية مناسبة، إلا أن التوافر الحيوي الفموي كان أقل وبلغ حوالي 25.8%، مع نصف عمر حيوي يقارب 11ساعة، وهو ما يشير إلى وجود فروق نوعية واضحة بين الأنواع الطيرية تستوجب عدم تعميم الجرعات بين الأنواع المختلفة دون أسس علمية (Tekeli et al., 2020).

– أما في الإوز، فقد وُجد أن إعطاء الدوكسي سايكلين فموياً بجرعة 20ملغم/كغم أدى إلى توافر حيوي متوسط بلغ قرابة 43%، مع نصف عمر حيوي طويل نسبياً (نحو 13 ساعة)، كما أظهرت الدراسات الدوائية أن جرعة 10ملغم/كغم يومياً لمدة خمسة أيام قد تكون كافية لتحقيق فعالية علاجية جيدة ضد بعض أنواع المايكوبلازما دون الوصول إلى تراكيز مرتفعة غير ضرورية (Toutain et al., 2021).

ومن الناحية السريرية، يُستخدم الإعطاء الفموي للدوكسي سايكلين بصورة واسعة في علاج أمراض الجهاز التنفسي المزمنة في الطيور، خاصةً العدوى المرتبطة بـ .Mycoplasma و Chlamydia psittaci وبعض الجراثيم الحساسة الأخرى، ويُفضَّل غالباً في الحالات التي تتطلب علاجاً ممتداً لعدة أيام أو أسابيع. إلا أن نجاح المعالجة الفموية يعتمد على انتظام الاستهلاك، وسلامة القناة الهضمية، وعدم وجود فقد شهية أو تجفاف، لأن هذه العوامل قد تُخفض الجرعة الممتصة فعلياً .(Papich, 2022)

– وقد أظهرت الدراسات أن حقن الدوكسي سايكلين عضلياً بجرعة 75ملغم/كغم في الدجاج يؤدي إلى الوصول للتركيز البلازمي الأقصى (C_{max}) بعد ساعة واحدة فقط من الحقن، مع الحفاظ على مستويات علاجية تزيد عن 1 mg/ml لمدة تتراوح بين 96 إلى 120 ساعة .(Dorrestein et al., 1991) أما عند الإعطاء الفموي بجرعات تتراوح بين 2.5 إلى 10 ملغم/كغم في الدجاج، فقد سجلت ذروة التركيز البلازمي (5.3 mg/ml) بعد مرور 4 ساعات من التطبيق (Huber, 1988) . وبالمقارنة مع الثدييات، لوحظ أن الوصول للتركيزات القصوى في الدجاج يستغرق وقتاً أطول قليلاً من الماعز والبشر.

– كما أظهرت الدراسات أن الإعطاء عبر المسارات غير المعوية (الحقن العضلي وتحت الجلد) يؤدي إلى إطالة نصف العمر الحيوي بشكل ملموس ليصل إلى 40 و37 ساعة على التوالي. وتُعزى هذه الإطالة إلى ظاهرة الامتصاص المستمر (Flip-flop kinetics) من موقع الحقن، حيث يتم تحرر الدواء وامتصاصه ببطء وثبات، مما يؤخر عملية الإطراح النهائي (Dorrestein et al., 1986) فعلى سبيل المثال، أدى الحقن العضلي بجرعة مقدراها 75 ملغم/كغم إلى الحفاظ على مستويات بلازمية تزيد عن 1 mg/ml حتى اليوم الخامس من المعالجة (Traub, 1982).

– درس الباحث (Padilla *et al.*, 2005) فعالية الدوكسي سايكلن في علاج المايكوبلازما. حيث أجريت دراسة ميدانية على طيور الفاكهة وطيور الخشب في حديقة حيوان سانت لويس، عندما تم إعطاء محلول مياه الشرب الذي يحتوي على 500 ملغ من الدوكسي سايكلن هيكلات / لتر من ماء الشرب، تم توثيق الفعالية السريرية الجيدة على مدى 45 يوماً. حققت غالبية الحيوانات مستوى بلازما قدره 1 ميكروغرام/مل، لكن بعض الطيور لم تتمكن من الحفاظ على هذا المستوى طوال فترة الدراسة. في حين أنه من الممكن اكتشاف المفطورات في مسحات الزرق في 60% من الحيوانات قبل العلاج، إلا أن جميع الحيوانات كانت سلبية بعد العلاج، ولم يُلاحظ أي آثار جانبية.

– وقد أجرى الباحث Dorrestein وزملاؤه (1999) دراسة لتقييم الحرائك الدوائية للدوكسي سايكلين في الدجاج بعد إعطائه فموياً بجرعة 40 ملغ/كغ من وزن الجسم باستخدام مستحضر Vibramycin® (Pfizer Ltd)، وهو عبارة عن معلق من معقد الدوكسي سايكلين–الكالسيوم بتركيز 10 ملغ/مل. وأظهرت النتائج أن الدواء وصل إلى تركيزه الأعظمي في البلازما (Cmax) البالغ 7.56 ميكروغرام/مل بعد 3.7 ساعات من الإعطاء(Tmax) ، في حين بلغ التوافر الحيوي الفموي نحو 35%، مما يشير إلى امتصاص متوسط نسبياً للدواء عبر الجهاز الهضمي. كما بلغ نصف العمر الحيوي 5.3 ساعات، وهو ما يدل على بقاء الدواء في الدوران الدموي لفترة تسمح بالحفاظ على تراكيز علاجية مناسبة بعد الإعطاء الفموي (Dorrestein et al., 1999) ،وعند مقارنة هذه النتائج مع البيانات التي تم الحصول عليها في الديك الرومي، لاحظ الباحثون وجود فروق في الحركية الدوائية بين النوعين، حيث عُزيت هذه الاختلافات إلى التباين في معدل الاستقلاب والخصائص الفيزيولوجية المرتبطة بكتلة الجسم ومعدل الأستقلاب بين الطيور المختلفة (Dorrestein et al., 1999) ،وتشير هذه النتائج إلى أن الاستجابة الدوائية للدوكسي سايكلين قد تختلف باختلاف النوع الحيواني، الأمر الذي يستوجب أخذ الخصائص الفيزيولوجية لكل نوع بعين الاعتبار عند تحديد البرامج العلاجية والجرعات المناسبة.

وعلى الرغم من تشابه العديد من الدراسات للحرائك الدوائية للدوكسي سايكلين بين الطيور والثدييات، وكذلك بين الأنواع المختلفة من الطيور، فإن الاعتماد على البيانات المستخلصة من نوع حيواني واحد قد لا يكون كافياً لتعميم النتائج على الأنواع الأخرى. لذلك تبرز أهمية إجراء دراسات حرائك دوائية متخصصة لكل نوع من أنواع الدواجن بهدف تحديد الجرعات المثلى وضمان تحقيق الفعالية العلاجية المطلوبة عند الاستخدام الفموي للدوكسي سايكلين في الممارسة البيطرية (Dorrestein et al., 1999).

الفصل الثالث

مواد وطرائق العمل

Material and Methods

3- مواد وطرائق العمل: Material and Methods

3-1- حيوانات التجارب:

تم إجراء التجربة على طيور الدجاج من سلالة (Ross) بعمر 28 يوم من كلا الجنسين تتراوح الأوزان بين 1500 غ – 1600 غ ضمن مدجنة خاصة وضمن ظروف التربية النموذجية.

تم تقسيم وتجهيز مكان اجراء التجربة بحيث يكون بشكل مجموعات، حيث تم جمع العينات بشكل عشوائي، وقد قُسمت العينات إلى 4مجموعات كل مجموعة تحتوي على 25طير، وتم فرش الأرض بنشارة خشب جديدة (فرشة)، كانت درجة الحرارة 22 درجة مئوية و16 ساعة اضاءة. وتم تأمين العليقة المتعارف عليها للطيور في جميع المجموعات طيلة فترة التجربة، وتم تقديم ماء الشرب بشكل حر طيلة فترة التجربة.

تم تحديد الحالة الصحية من خلال الفحص السريري العام، والفحص الميكروبيولوجي بأخذ مسحات من الحلق والغدة الدرقية ومسحات من المذرق واجراء فحص طفيلي لها، وتم تقييم الحالة السريرية للطيور يومياً عن طريق الفحص البيطري، تم إجراء الفحص وفقاً لـ Scope, (2007a).

– قبل البدء بالتجربة تم أخذ عينات دم من الوريد الجناحي بعد إجراء التعقيم اللازم وذلك للحصول على المصل من أجل إجراء اختبار الأليزا في مخبر خاص للتأكد من وجود أو عدم وجود إصابة بالمايكوبلازما من أجل البدء بالتجربة وجمع العينات.

3-2- تصميم التجربة :

تم توزيع طيور التجربة توزيعاً عشوائياً إلى 5 مجموعات كل مجموعة تحوي على (25) طير بعمر (28يوم) وهي كالتالي:

المجموعة الأولى (G1): وهي مجموعة الشاهد السلبي والتي تضم 25طير وهذه المجموعة لم تأخذ أي علاج أي تبقى على حالها دون أية معالجة (مجموعة غير معالجة وغير مصابة).

المجموعة الثانية (G2): تضم هذه المجموعة 25طير وهذه مجموعة تم إعطائها جرعة علاجية واحدة فقط 20 ملغ/كغ من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة غير مصابة ومعالجة بجرعة علاجية واحدة).

المجموعة الثالثة (G3): تضم هذه المجموعة 25طير وهذه المجموعة تم إعطائُها جرعة واحدة فقط ضعف علاجية 40 ملغ/كغ من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة غير مصابة ومعالجة بجرعة ضعف علاجية واحدة).

المجموعة الرابعة (G4): تضم هذه المجموعة 25طير وهذه المجموعة مصابة بالمايكوبلازما، حيثُ تم إعطائها جرعة علاجية واحدة فقط 20 ملغ/كغ من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة مصابة ومعالجة بجرعة علاجية واحدة).

المجموعة الخامسة (G5): تضم هذه المجموعة 25طير وهذه المجموعة مصابة بالمايكوبلازما، حيثُ تم إعطائها جرعة علاجية 20 ملغ/كغ يومياً ولمدة 5 أيام من المضاد الحيوي الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم (Anadón *et al.*, 1994; El-Gendi *et al.*, 2010) (مجموعة مصابة ومعالجة بجرعة علاجية يومياً ولمدة 5 أيام).

3-3- دراسة مستويات الدوكسي سايكلن في البلازما عند الطيور بعد تجريعها عن طريق الفم:

الإعداد للتجربة:

تم إجراء الدراسة باستخدام مستحضر الدوكسي سايكلين بشكل بيور. تم توفير هذا المسحوق من قبل شركة تجارية، وتم تحضير محلول تركيزه 30% من الدوكسي سايكلين ضمن المخبر وذلك عن طريق إذابة 30غرام من مستحضر الدوكسي سايكلين البيور في 1لتر ماء مقطر، وتم المزج جيداً لضمان ذوبان المادة الفعالة ضمن الماء المقطر، وتم استخدام البيور بهدف تجنب التلاعب بتركيز الدوكسي سايكلين ضمن المنتجات المصنعة ولضمان الحصول على نتائج دقيقة في الدراسة. **يبين الشكل رقم (2) مركب الدوكسي سايكلين البيور المستخدم في التجربة.**

الشكل رقم (2) مركب الدوكسي سايكلين البيور المستخدم في التجربة

3-4- طريقة العمل:

أولاً- قبل البدء بالتجربة تم أخذ عينات دم من الوريد الجناحي بشكل عشوائي بعد إجراء التعقيم اللازم وذلك للحصول على المصل من أجل إجراء اختبار الأليزا للتأكد من وجود إصابة بالمايكوبلازما ضمن المجموعات المصابة (G4&G5)، كما تم أخذ عينات دم من الوريد الجناحي لإجراء الإختبار على المجموعات السليمة أيضاً (G1&G2&G3) وذلك للتأكد من خلوها من الإصابة لضمان دقة النتائج من أجل البدء بالتجربة وجمع العينات.

ثانياً- تم أخذ عينات الدم بشكل عشوائي من 7 طيور من المجموعة الأولى الشاهد السلبي (G1)، حيثُ تم سحب عينات الدم من الوريد الجناحي بعد إجراء التعقيم المناسب وذلك للتأكد من خلوها من الدوكسي سايكلين.

ثالثاً- تم أخذ عينات الدم بشكل عشوائي من 7 طيور من كل مجموعة من (G4 & G3 & G2) وذلك بعد إعطاء الدواء عن طريق التجريع الفموي، حيثُ تم سحب عينات الدم من الوريد الجناحي بعد إجراء التعقيم المناسب بعد (نصف ساعة، 2ساعة، 4ساعة، 8ساعة، 16ساعة، 32ساعة)، وقد تم إجراء عملية سحب دم إضافية أثناء فترة التجربة من أجل التحليل وذلك بهدف الحصول على نتائج أكثر دقة، حيثُ تم أخذ عينات الدم بشكل عشوائي من 7 طيور من كل مجموعة من (G4 & G3 & G2) وذلك بعد (15دقيقة، 1ساعة، 3ساعة، 5ساعة، 6ساعة، 7ساعة، 9ساعة، 10ساعة، 12ساعة، 24ساعة)، وتم جمع عينات الدم لتحديد زمن

الوصول للتركيز الأعظمي لمركب الدوكسي سايكلين، وتحديد نصف العمر الحيوي $T_{1/2}$ للعقار، وبعد سحب عينات الدم تم تفريغ هذه العينات في انابيب غير حاوية على مانع تخثر، وتم تثفيل العينات بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق للحصول على المصل، حيث تم الاحتفاظ به بدرجة الحرارة −20° لحين إجراء الاختبارات وذلك من أجل معرفة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين، وتم إجراء الاختبارات على جهاز الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء High-performance Liquid Chromatography جهاز الـ (HPLC)، لتحديد التالي:

- أعلى تركيز يصل لهُ الدواء.
- نصف العمر الحيوي $T_{1/2}$ للمضاد الحيوي الدوكسي سايكلين.

رابعاً- تم أخذ عينات الدم بشكل عشوائي من 7 طيور من المجموعة الخامسة (G5) بعد آخر جرعة علاجية، حيثُ تم إعطاء الدواء لهذه المجموعة بجرعة علاجية عن طريق التجريع الفموي يومياً ولمدة 5 أيام، وتم سحب عينات الدم بعد آخر جرعة من الوريد الجناحي وذلك بعد إجراء التعقيم المناسب بعد (نصف ساعة، 2ساعة، 4ساعة، 8ساعة، 16ساعة، 32ساعة)، كما قد تم إجراء عملية سحب دم إضافية أثناء فترة التجربة من أجل التحليل وذلك بهدف الحصول على نتائج أكثر دقة، حيثُ تم أخذ عينات الدم بشكل عشوائي من 7 طيور وذلك بعد (15دقيقة، 1ساعة، 3ساعة، 5ساعة، 6ساعة، 7ساعة، 9ساعة، 10ساعة، 12ساعة، 24ساعة)، وتم جمع هذه العينات لتحديد زمن الوصول للتركيز الأعظمي لمركب الدوكسي سايكلين، وتحديد نصف العمر الحيوي $T_{1/2}$ للعقار، وبعد سحب عينات الدم تم تفريغ هذه العينات في انابيب غير حاوية على مانع تخثر، ثم تم تثفيل العينات بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق للحصول على المصل، حيث تم الاحتفاظ به بدرجة الحرارة −20° لحين إجراء الاختبارات وذلك من أجل معرفة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين، وتم إجراء الاختبارات على جهاز الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء High-performance Liquid Chromatography جهاز الـ (HPLC)، لتحديد التالي:

- أعلى تركيز يصل لهُ الدواء.
- نصف العمر الحيوي T1/2للمضاد الحيوي الدوكسي سايكلين.

خامساً- وقد تم استخدام قسم من المصل المحفوظ بدرجة حرارة - 20° وذلك من أجل قياس مستوى الأنزيم الكبدي ALT عند المجموعات (G2 & G3 & G4 & G5) ومقارنة النتائج مع مجموعة الشاهد الطبيعي (G1). **يبين الشكل رقم (3) جهاز الكروماتوجرافية السائلة عالية الآداء (HPIC) المستخدم لتحليل عينات التجربة.**

الشكل رقم (3) جهاز الكروماتوجرافية السائلة عالية الآداء (HPIC)

3-5- تحليل الدوكسي سايكلين في مصل الدم باستخدام HPLC-FLD مع استخدام الديميكلو سايكلين كمعيار داخلي:

المبدأ العلمي للطريقة:

تعتمد الطريقة على استخلاص الدوكسي سايكلين من مصل الدم باستخدام محلول McIlvaine- EDTA لتحريره من ارتباطاته مع البروتينات والأيونات المعدنية، حيث يعمل EDTA كعامل مخلب يقلل من ظاهرة الارتباط (Chelation) (Oka H. et al., 1985).

تم استخدام الديميكلو سايكلين كمعيار داخلي (Internal Standard) نظرًا لتشابهه البنيوي والكيميائي مع الدوكسي سايكلين، مما يضمن سلوكًا كروماتوغرافيًا مماثلًا ويُحسّن دقة القياس ويعوض الفقد أثناء الاستخلاص (Hamscher G. et al., 2002).

تُزال البروتينات باستخدام الميثانول، ثم تُنقّى العينة باستخدام الاستخلاص بالطور الصلب (SPE) نظرًا لضعف الفلورية الذاتية للتتراسيكلينات، يتم تكوين معقد فلوري مع Mg^{2+} لتعزيز الحساسية (Samanidou V. F. & Nisyriou S. A., 2008).

طريقة العمل:

1- **تحضير العينة وإضافة المعيار الداخلي:**

يتم نقل 1 مل من مصل الدم إلى أنبوب طرد مركزي، ثم يُضاف حجم معلوم من محلول الديميكلو سايكلين تركيز ثابت مثلاً (1 µg/mL كمعيار داخلي).

تُعد هذه الخطوة أساسية لتصحيح التغيرات الناتجة عن الاستخلاص أو الحقن.

الاستخلاص باستخدام McIlvaine–EDTA :

يُضاف 2 مل من محلول McIlvaine–EDTA (pH = 4) ، ويُخلط جيدًا لمدة دقيقة لتحرير الدوكسي سايكلين من الارتباطات البروتينية والمعدنية.

2- **ترسيب البروتينات:**

يُضاف 1 مل من الميثانول، وتُرجّ العينة لمدة 2–3 دقائق، ثم تُثفَّل عند 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. تساعد هذه الخطوة في إزالة البروتينات وتقليل التداخلات.

3- **فصل الطور السائل:**

يُنقل الجزء الطافي إلى أنبوب نظيف مع تجنب الراسب.

5- التنقية باستخدام SPE :

- تهيئة الخرطوشة بـ 5 مل ميثانول ثم 5 مل ماء.
- تحميل العينة بمعدل تدفق منتظم.
- غسل بـ 5 مل ماء لإزالة الشوائب.
- تجفيف الخرطوشة بالهواء لمدة 2 دقيقة.
- الإذابة باستخدام 5–6 مل من محلول حمض الأوكساليك الميثانولي.

تُحسن هذه الخطوة من الانتقائية وتقلل من تأثير المصفوفة (Matrix effect).

6-الاشتقاق(Derivatization):

يُضاف محلول ($MgCl_2$ (0.1 M لتكوين معقد فلوري مع الدوكسي سايكلين والديميكلو سايكلين، مما يزيد من شدة الإشارة.

7- تحضير العينة للحقن:

يُستكمل الحجم إلى 10 مل بالماء منزوع الأيونات، ثم يُرشّح (0.22 µm).

8- شروط التحليل الكروماتوغرافي:

- العمود: C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)
- الطور المتحرك: محلول حمض الأوكساليك : أسيتونتريل : ميثانول
- الموجة 350
- التدفق: 1-2 مل/دقيقة
- حجم الحقن: 10-60µL

معالجة النتائج:

يتم حساب تركيز الدوكسي سايكلين بالاعتماد على نسبة مساحة القمة (Peak area ratio) بين الدوكسي سايكلين والمعيار الداخلي (الديميكلو سايكلين)، مما يزيد من دقة النتائج ويقلل من الأخطاء التحليلية.

التحقق من الطريقة(Validation)

تم تقييم الطريقة وفق إرشادات AOAC International، وأظهرت:

- خطية عالية($R^2 \geq 0.999$)
- استرجاع: 85-105%
- دقة: RSD < 5%
- حساسية عالية (LOD ضمن ng/mL)

3-7- اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA):

خطوات إجراء الاختبار: (Crowther, 2000)

- **توزيع المصل Depositing The Serum:**

يتم ذلك بالطريقة التالية:

يضاف 90 ميكروليتر من محلول التمديد 13 (ويُستخدم هذا المحلول في اختبار ELISA لتخفيف (تمييع) مصل الدم قبل الفحص) في كل حفرة ومن ثم يضاف 10 ميكروليتر من المصل المراد فحصه ويضاف 10 ميكروليتر من مصل الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي في الحفر المحددة (A1، B1، C1، D1 ....). يوضح الشكل رقم (4) عملية توزيع مصل الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي وأمصال العينات التي تم جمعها في طبق الإليزا.

A	P	5											
B	P	6											
C	N												
D	N												
E	1												
F	2												
G	3												
H	4												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

(N: الشاهد السلبي، P: الشاهد الايجابي، 1: العينة رقم 1، 2: العينة رقم 2، 3: .....)

الشكل رقم (4) مخطط توزيع مصل الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي وأمصال العينات المختبرة في طبق الإليزا.

يتم تجانس محتويات الحفر في الطبق بالهز اللطيف عن طريق وضعه على رجاج كهربائي ومن ثم يتم تغطية الطبق برقاقة من ورق الألمنيوم ويتم تحضين الطبق في الحاضنة لمدة ساعة في درجة حرارة 37°م.

- **عملية الغسيل الأولى Washing:** بعد انتهاء مدة التحضين تم إجراء عملية الغسيل الأولى كالتالي: تم إفراغ كافة محتويات حفر طبق الإليزا جيدا بقلبه ومن ثم أجري التنشيف بقلب الطبق على ورق نشاف نظيف وجاف عدة مرات ومن ثم يتم ملء الحفر في الطبق بمحلول الغسيل ويتم

إفراغها ثانية وتكرر عملية الغسيل ثلاث مرات لإزالة جميع الارتباطات غير النوعية بين الأضداد والمستضد.

- **توزيع محلول الاقتران Depositing the Conjugate:** بعد الانتهاء من عملية الغسيل وتفريغ محتويات طبق الإليزا تم إضافة 100 ميكروليتر لكل حفرة من محلول الاقتران الممدد بنسبة 100/1 من محلول التمديد (Dilution Buffer 3) بواسطة ماصة متعددة الرؤوس (12 رأس) واستبعاد رؤوس الماصة ومن ثم تم تغطية الطبق بورق الألمنيوم ووضعه في الحاضنة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 37°م.
- **عملية الغسيل الثانية Washing:** بعد انتهاء مدة التحضين تم إجراء عملية الغسيل الثانية كالتالي: تم إفراغ كافة محتويات حفر طبق الإليزا جيدا بقلبه ومن ثم أجري التنشيف بقلب الطبق على ورق نشاف نظيف وجاف عدة مرات ومن ثم يتم ملء الحفر في الطبق بمحلول الغسيل ويتم إفراغها ثانية وتكرر عملية الغسيل ثلاث مرات.
- **إضافة الكاشف اللوني Revelation:** يضاف 100 ميكروليتر من محلول الكاشف اللوني Ready to use substrate solutionالجاهز للاستخدام إلى كل حفرة من حفر طبق الإليزا ثم تم تحضين الطبق بدرجة حرارة 37°م لمدة عشرين دقيقة في مكان بعيد عن الضوء.
- **إضافة محلول إيقاف التفاعل Stop Solution:** بعد الانتهاء من مدة التحضين تم إضافة 100 ميكروليتر من محلول إيقاف التفاعل Stop Solution إلى كل حفرة ومن ثم تم هز الطبق بلطف حتى يتجانس محلول التلوين ويجب مسح أسفل الطبق بحذر.

قراءة النتائج Resulted Reading: (World Organisation for Animal Health, 2021)

1- يتم قراءة نتيجة الاختبار على الطبق باستخدام جهاز قارئ الإليزا على طول موجة nm 450 حيث تظهر قيم الامتصاصية الضوئية OD (الكثافة الضوئية) (optical densities) لكل حفرة من حفر طبق الإليزا (ELISA).

2- يتم تقدير متوسط الامتصاص الضوئي للشاهد الإيجابي باستخدام قيم الامتصاص حسب العلاقة التالية (مجموع القيم مقسمة على عددها) في الحفر A1 و B1.

3- يتم تقدير متوسط الامتصاص الضوئي للشاهد السلبي باستخدام قيم الامتصاص في الحفر C1 و D1 حسب العلاقة (مجموع القيم تقسيم عددها).

4- يتم طرح متوسط الامتصاص الضوئي للشاهد السلبي من متوسط الامتصاص الضوئي للشاهد الإيجابي المصحح Corrected positive.

5- يتم تقدير المعدل الإيجابي لكل عينة مختبرة sample to positive (S / P) حسب المعادلة التالية:

$$S/P\% = \frac{\text{corrected OD450 of the sample}}{\text{mean corrected OD450 of the positive control)}} \times 100$$

3-8- العتيدة التشخيصية لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالانظيم (الاليزا):

Diagnostic kit of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

استخدم اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم النوعي لمرض المايكوبلازما والمصنع من قبل الشركة الإسبانية INGEZIM PPR COMPAC

3-9- محتويات العتيدة التشخيصية Kit contents:

يبين الجدول رقم (1) والشكل رقم (5) مكونات العتيدة التشخيصية المستخدمة لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنظيم.

الجدول رقم (1) مكونات المجموعة التشخيصية لاختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنظيم (Crowther, 2000)

المكونات Components	الكمية Quantity
1- أطباق المغطاة بمستضد النوعي Coated microplates	5
2- محلول الغسيل المركز x 20 concentrated(20x)wash solution	عبوة 1 x 60 ml
3- محلول التمديد 3 Dilution Buffer 3	عبوة 1 x60 ml
4- محلول التمديد 13 Dilution Buffer 13	عبوة 1 x60 ml
5- الشاهد الإيجابي (سائل) Positive control	عبوة 1 ml

6- الشاهد السلبي (سائل) Negative control	عبوة 1 ml
7-protein G peroxidase conjugate	عبوة 3 ml
8- محلول الكاشف اللوني للأنزيم جاهز للاستخدام Ready to use substrate solution	عبوة 1 x60 ml
9- محلول ايقاف التفاعل Stop Solution (H_2SO_4 0,5 M solution)	عبوة 1 x60 ml

الشكل رقم (5) مكونات العتيدة التشخيصية المستخدمة للكشف عن الحالات الإيجابية لمرض المايكوبلازما في العينات التي تم جمعها من طيور الدراسة

الفصل الرابع

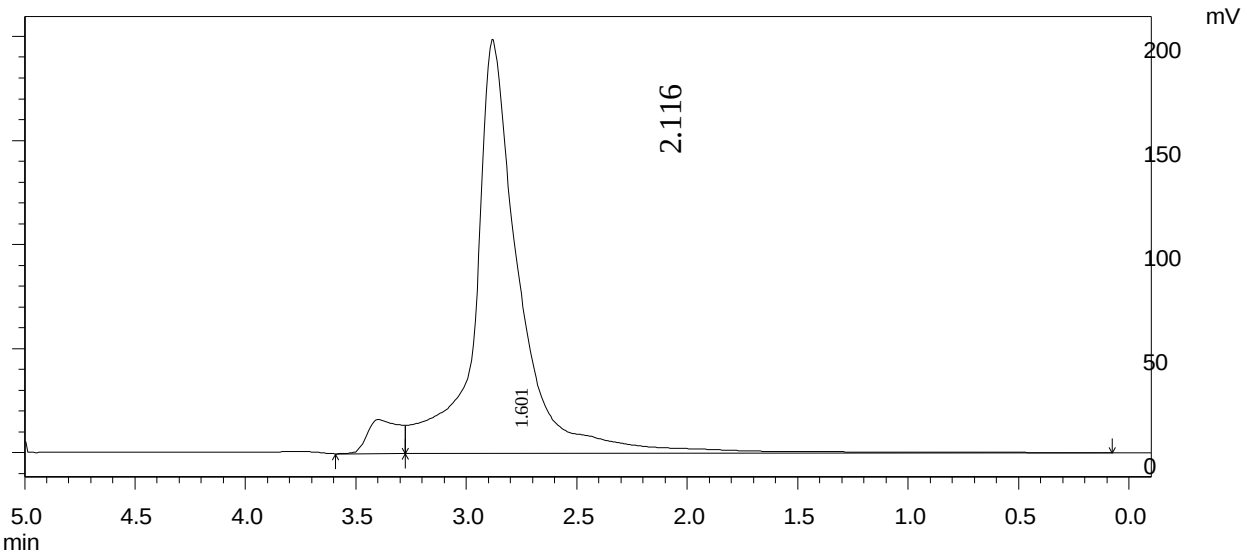
النتائج

Results

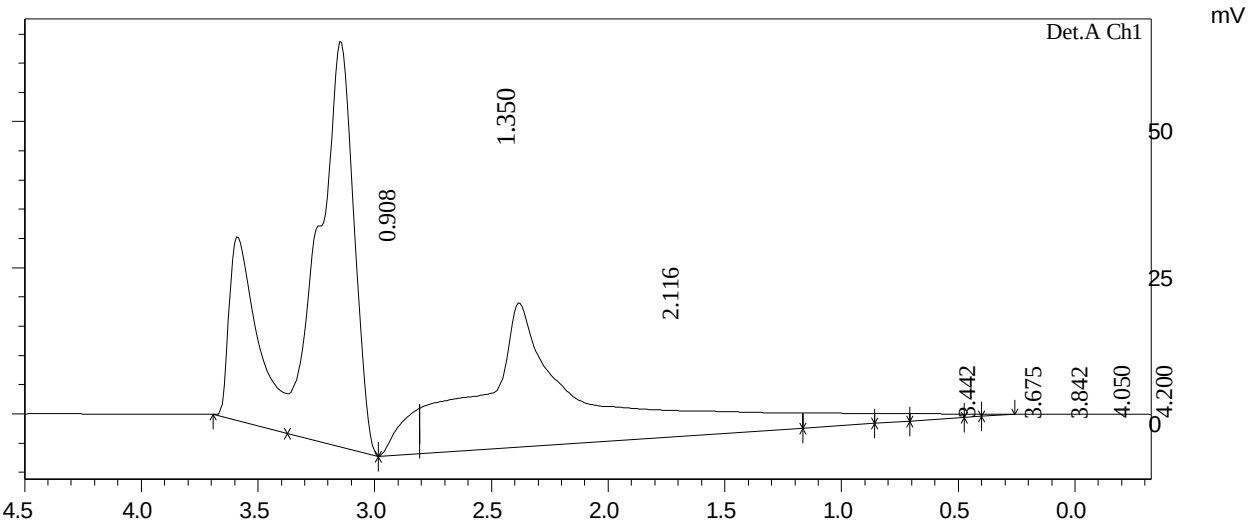
1- النتائج: Results

من الشكل (6) و (7) نلاحظ أن مركب الدوكسي سايكلين أثناء التحليل باستخدام تقنية الـ HPLC فقد ظهر الدوكسي سايكلين عند الزمن (2.11) دقيقة على شكل مخطط استشرابي (بيكات).

يبين الشكل رقم (6) و (7) شكل القمم (البيكات) التي ظهرت أثناء تحليل مركب الدوكسي سايكلين باستخدام تقنية HPLC ، كما يبين الشكل رقم (8) صورة توضيحية لشكل أنابيب الكاردريج (C18)



الشكل رقم (4) شكل القمم (البيكات) لمركب الدوكسي سايكلين الخام في عينة الشاهد



الشكل رقم (5) شكل القمم (البيكات) لمركب الدوكسي سايكلين في العينات

الشكل رقم (6) صورة توضيحية لشكل أنابيب الكاردريج (C18)

اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA):

تُعد نتائج الاختبار مقبولة وذات موثوقية عالية عند تحقق المعايير التالية:

أن تكون قيمة متوسط الكثافة الضوئية غير المصححة للشاهد الإيجابي أكبر من 0.350 ، وأن تتجاوز النسبة بين متوسط الكثافة الضوئية المصححة (OD) للشاهد الإيجابي ومتوسط الكثافة الضوئية المصححة للشاهد السلبي، المقاسة عند طول موجي 450 نانومتر قيمة 0.3. وتشير النتائج الإيجابية للاختبار إلى وجود أجسام مضادة ضد Mycoplasma gallisepticum، مما يدل على تعرض الطيور السابق للعدوى أو للاستجابة المناعية الناتجة عن التلقيح.. ومع ذلك، لا يمكن التمييز بين العدوى الحالية والسابقة باستخدام ELISA فقط، لذلك يُفضل تأكيد النتائج باستخدام تقنيات أخرى مثل PCR (World Organisation for Animal Health, 2021).

تفسير النتائج Interpretation of Results:

تُفسَّر نتائج اختبار ELISA اعتماداً على قيمة النسبة المئوية لـS/P ، حيث تُعد الحيوانات سلبية النتيجة عند كون قيمة S/P أقل من أو تساوي 50%، بينما تُصنَّف النتائج على أنها مشتبه بها عندما تتراوح قيمة S/P بين 50% و60%. أما إذا كانت قيمة S/P تساوي أو تتجاوز 60% فتُعتبر الحيوانات إيجابية لوجود أضداد Mycoplasma gallisepticum كما تُصنَّف النتائج ذات القيم المرتفعة جداً من S/P على أنها إيجابية بدرجة عالية. ويوضح الجدول رقم (2) آلية تفسير نتائج اختبار الإليزا وفقًا لمعايير (World Organisation for Animal Health, 2021).

الجدول رقم (2) تفسير نتائج اختبار الاليزا.

قيمة% S/P	تفسير النتيجة	الرمز
50% ≥	سلبية	–
60% > – 50% <	مشتبه بها	D
100% > – 60% ≤	إيجابية	+
100% ≤	إيجابية جداً	++

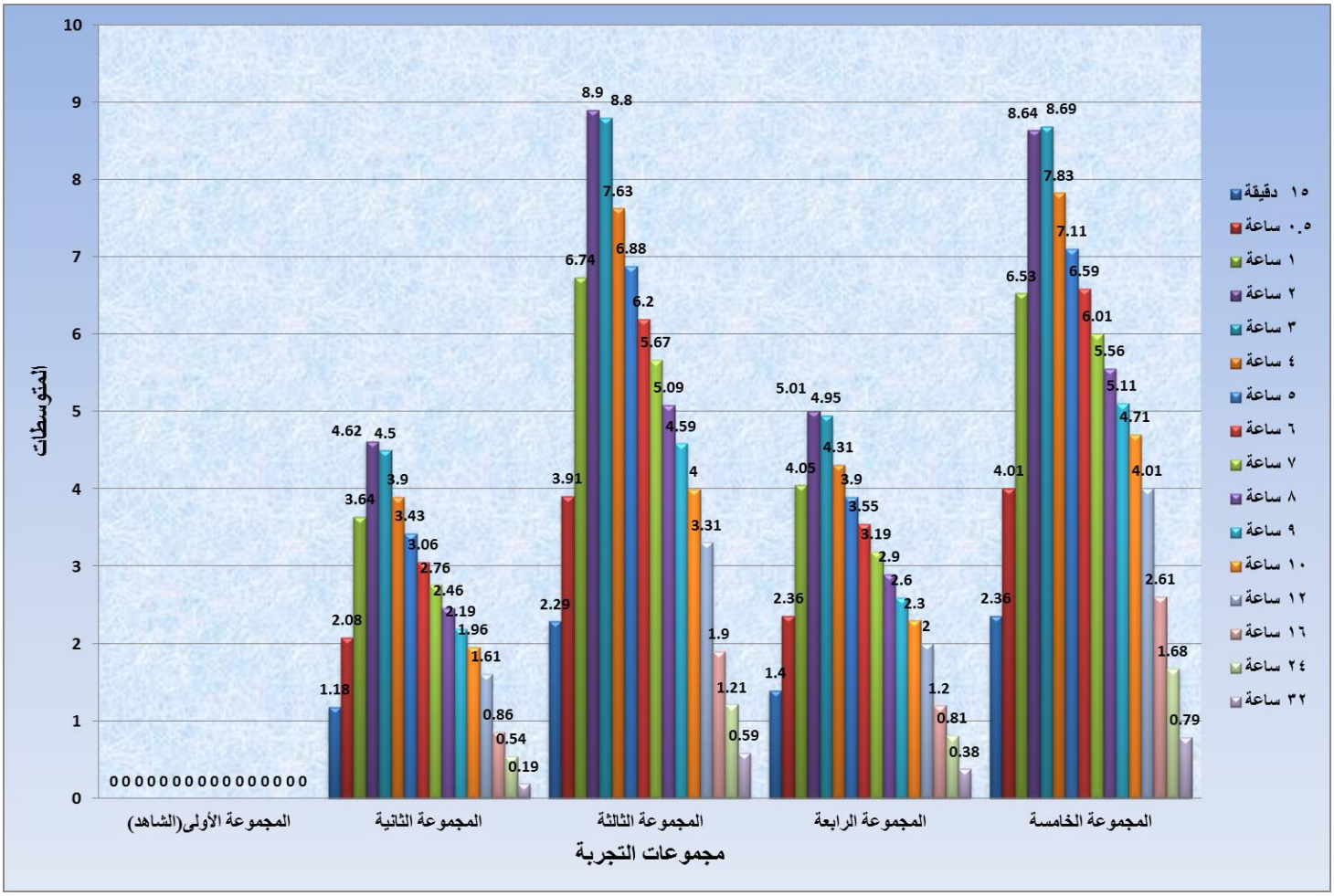
4-1-التغيرات في تركيز الدواء باستخدام جهازHPLC

جدول رقم (3): متوسطات تراكيز الدوكسي سايكلين في مصل الدم عند مجموعات التجربة جميعها وفي الأزمنة المختلفة مقدرة بـ(مايكروغرام/مل µg/mL)، كما ظهرت على جهاز الـHPLC

	المجموعات	المجموعة الأولى (الشاهد)	المجموعة الثانية سليمة/جرعة علاجية واحدة 20mg\kg	المجموعة الثالثة سليمة/جرعة ضعف علاجية واحدة 40mg\kg	المجموعة الرابعة مصابة/جرعة علاجية واحدة 20mg\kg	المجموعة الخامسة مصابة/جرعة علاجية واحدة يومياً لمدة 5 أيام 20mg\kg
	زمن أخذ العينة	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري
1	15 دقيقة	$^{A}0.00^{a} \pm 0.00$	$A1.18^{b} \pm 0.08$	$A2.29^{c} \pm 0.13$	$A1.40^{d} \pm 0.06$	$A2.36^{e} \pm 0.11$
2	0.5 ساعة	$^{B}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{B}2.08^{b} \pm 0.10$	$^{B}3.91^{c} \pm 0.18$	$^{B}2.36^{d} \pm 0.11$	$^{B}4.01^{e} \pm 0.15$
3	1 ساعة	$^{C}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{C}3.64^{b} \pm 0.16$	$^{C}6.74^{c} \pm 0.28$	$^{C}4.05^{d} \pm 0.16$	$^{C}6.53^{e} \pm 0.22$
4	2 ساعة	$^{D}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{D}4.62^{b} \pm 0.20$	$^{D}8.90^{c} \pm 0.30$	$^{D}5.01^{d} \pm 0.14$	$^{D}8.64^{e} \pm 0.25$
5	3 ساعة	$^{D}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{D}4.50^{b} \pm 0.10$	$^{D}8.80^{c} \pm 0.18$	$^{D}4.95^{d} \pm 0.08$	$^{D}8.69^{e} \pm 0.16$
6	4 ساعة	$^{E}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{E}3.90^{b} \pm 0.12$	$^{E}7.63^{c} \pm 0.28$	$^{E}4.31^{d} \pm 0.13$	$^{E}7.83^{e} \pm 0.22$
7	5 ساعة	$^{F}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{F}3.43^{b} \pm 0.15$	$^{F}6.88^{c} \pm 0.28$	$^{F}3.90^{d} \pm 0.12$	$^{F}7.11^{e} \pm 0.22$
8	6 ساعة	$^{G}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{G}3.06^{b} \pm 0.15$	$^{G}6.20^{c} \pm 0.30$	$^{G}3.55^{d} \pm 0.15$	$^{G}6.59^{e} \pm 0.25$
9	7 ساعة	$^{H}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{H}2.76^{b} \pm 0.15$	$^{H}5.67^{c} \pm 0.28$	$^{H}3.19^{d} \pm 0.14$	$^{H}6.01^{e} \pm 0.23$
10	8 ساعة	$^{I}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{I}2.46^{b} \pm 0.17$	$^{I}5.09^{c} \pm 0.28$	$^{I}2.90^{d} \pm 0.14$	$^{I}5.56^{e} \pm 0.26$
11	9 ساعة	$^{J}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{J}2.19^{b} \pm 0.13$	$^{J}4.59^{c} \pm 0.28$	$^{J}2.60^{d} \pm 0.14$	$^{J}5.11^{e} \pm 0.22$
12	10 ساعة	$^{K}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{K}1.96^{b} \pm 0.14$	$^{K}4.00^{c} \pm 0.26$	$^{K}2.30^{d} \pm 0.14$	$^{K}4.71^{e} \pm 0.22$
13	12 ساعة	$^{L}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{L}1.61^{b} \pm 0.13$	$^{L}3.31^{c} \pm 0.30$	$^{L}2.00^{d} \pm 0.14$	$^{L}4.01^{e} \pm 0.22$
14	16 ساعة	$^{M}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{M}0.86^{b} \pm 0.11$	$^{M}1.90^{c} \pm 0.25$	$^{M}1.20^{d} \pm 0.13$	$^{M}2.61^{e} \pm 0.23$
15	24 ساعة	$^{N}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{N}0.54^{b} \pm 0.09$	$^{N}1.21^{c} \pm 0.18$	$^{N}0.81^{d} \pm 0.11$	$^{N}1.68^{e} \pm 0.18$
16	32 ساعة	$^{O}0.00^{a} \pm 0.00$	$^{O}0.19^{b} \pm 0.04$	$^{O}0.59^{c} \pm 0.13$	$^{O}0.38^{d} \pm 0.07$	$^{O}0.79^{e} \pm 0.13$

تشير الأحرف الصغيرة المختلفة (a,b,c,d,e) ضمن الصف الواحد إلى وجود فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية بين مجموعات التجربة المختلفة عند نفس الزمن المدروس، وذلك عند مستوى دلالة (P≤0.05). وقد تم تحديد هذه الفروقات باستخدام اختبار تحليل التباين أحادي الاتجاه (One-Way ANOVA) ضمن البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 25، حيث يُعد اختلاف الأحرف دليلاً على وجود اختلاف معنوي حقيقي بين المتوسطات الحسابية للمجموعات، بينما يشير تشابه الأحرف إلى عدم وجود فروقات معنوية بينها.

أما الأحرف الكبيرة المختلفة (A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O) ضمن العمود الواحد وفي المجموعة نفسها، فتشير إلى وجود فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية بين الأزمنة المختلفة ضمن نفس المجموعة عند مستوى دلالة ($P\leq0.05$). يعني ذلك أن اختلاف الأحرف الكبيرة يدل على حدوث تغير معنوي في تراكيز الدوكسي سايكلين بمرور الزمن داخل المجموعة الواحدة، في حين أن تشابه الأحرف يشير إلى عدم وجود تغيرات معنوية بين الأزمنة المقارنة.



الشكل (9): يبين المخطط (1) مخطط متوسطات التغيرات في نتائج تحليل جهاز الـHPLC

نسبة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين ضمن مصل الدم:

من جدول متوسطات تراكيز مركب الدوكسي سايكلين في مصل الدم عند مجموعات التجربة جميعها كانت قيم التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين ضمن المجموعات كالتالي:

- سجلت المجموعة الثانية (السليمة- والمعالجة بجرعة علاجية مفردة عن طريق الفم مقدارها 20 ملغ/كغ) نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 13.5 %

– بينما سجلت المجموعة الثالثة (السليمة– والمعالجة بجرعة ضعف علاجية مفردة عن طريق الفم مقدارها 40 ملغ/كغ) نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 25.7 %

– أما المجموعة الرابعة (المصابة بالمايكوبلازما– والمعالجة بجرعة علاجية مفردة عن طريق الفم مقدارها 20 ملغ/كغ) فقد سجلت نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 15.5 %

– والمجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما – والمعالجة بجرعة علاجية يومياً ولمدة 5 أيام متتالية عن طريق الفم مقدارها 20 ملغ/كغ) فقد سجلت نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 29 %

أ. أظهرت النتائج في الجدول رقم (3) والمخطط البياني رقم (1) وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية ($P < 0.05$) بين جميع مجموعات التجربة المدروسة (الشاهد، الثانية، الثالثة، الرابعة، الخامسة) عند كل زمن من الأزمنة المدروسة. كذلك، أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين الأزمنة المدروسة ضمن كل مجموعة على حدة، مما يشير إلى وجود تأثير معنوي لكل من عاملي الجرعة والزمن، إضافة إلى التفاعل بينهما.

وكانت المجموعة الأولى (الشاهد) تسجل تركيزات صفرية (0.00) طوال فترات التجربة، مما يؤكد عدم وجود تداخل دوائي في هذه المجموعة.

في جميع الأزمنة المدروسة، أظهرت المجموعة G5 أعلى تركيزات دوائية، تليها المجموعة G3، ثم G4، وأخيراً المجموعة G2 التي سجلت أقل التركيزات بين المجموعات المعالجة.

أما بالنسبة لتغير التركيز عبر الزمن (السعات الزمنية)، فقد لوحظ نمط نموذجي لامتصاص الدواء وذروته ثم انخفاضه. بلغ التركيز ذروته عند الساعة الثانية (2ساعة) من بدء التجربة في معظم المجموعات (خاصة G3) حيثُ سجلت المجموعة الثالثة 8.90 µg/mL.، أما بالنسبة للمجموعة الخامسة فقد بلغ التركيز ذروته عند الساعة الثالثة (3ساعة) حيثُ سجلت المجموعة الخامسة 8.69 µg/mL ، بعد ذلك، بدأ التركيز بالانخفاض التدريجي، وإن بقي لمدة 32 ساعة.

ب. التحليل الأفقي: المقارنة بين المجموعات في كل زمن:

أثبتت الرموز (a, b, c, d, e) أن جميع المجموعات اختلفت فيما بينها في كل زمن، القيمة (0.00 ± 0.00) في مجموعة الشاهد عند جميع الأزمنة تؤكد خلو مجموعة الشاهد من أي تلوث أو تداخل دوائي، وتؤكد خصوصية الطريقة التحليلية المستخدمة.

ت. التحليل العمودي: المقارنة بين الأزمنة ضمن كل مجموعة:

دلت الرموز (A, B, C,..., O) الموجودة في كل عمود على وجود نمط حركي متغير باختلاف الزمن، حيث مرت جميع المجموعات المعالجة بأطوار حركية دوائية متكاملة: الامتصاص، ذروة التركيز، التوزع، ثم الإطراح.

ث. نتائج مجموعة الشاهد:

سجلت المجموعة الأولى (الشاهد) تركيزات صفرية (0.00 ± 0.00) بشكل ثابت طوال فترات التجربة كافة. هذه النتيجة تؤكد سلامة تصميم التجربة وعدم تعرض هذه المجموعة للدواء، كما تثبت نقاء التحليل الكروماتوغرافي وعدم تداخل أي من مكونات مصل الدجاج مع قمة (Peak) الدواء في جهاز الـ HPLC.

ج. المقارنة بين المجموعات وفقاً للحالة الصحية والجرعة:

عند مقارنة المجموعات في كل زمن، سجلت المجموعة الثالثة (السليمة والمعالجة بجرعة ضعف علاجية واحدة 40 mg\kg / 8.90 µg/mL) وهي أعلى متوسطات لتركيز الدواء في المصل مقارنة بباقي المجموعات. بينما سجلت المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما 8.69 µg/mL / (تركيزات أقل من المجموعة الثالثة). وقد سجلت المجموعة الرابعة (المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة بجرعة علاجية واحدة فقط 20 mg\kg / 5.01 µg/mL (تركيزات أعلى من المجموعة الثانية). بينما سجلت المجموعة الثانية (السليمة والمعالجة بجرعة علاجية واحدة 20 mg\kg / 4.62 µg/mL)، وهي أقل متوسطات لتركيز الدواء في المصل مقارنة بباقي المجموعات.

تُشير هذه النتيجة بوضوح إلى أن الإصابة بالمايكوبلازما (المجموعات الرابعة، الخامسة) أدت إلى تغير في حركية الدواء وزيادة توافره الحيوي نسبياً مقارنة بالمجموعة (الثانية والثالثة)، مما قد يُعزى لتأثير المرض على نفاذية الأوعية الدموية وعمليات الأيض الكبدي.

ح. مسار تركيز الدواء عبر الزمن:

بلغ تركيز الدواء ذروته في معظم المجموعات المعالجة عند الساعة الثانية (2 ساعة) بعد التجريع، وهو ما يمثل زمن الذروة (C_max).

بينما سجلت المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما/ 8.69 µg/mL) تركيزاً عالياً بلغ عند الساعة الثالثة (3 ساعة)

وسجلت المجموعة الثالثة (السليمة والمعالجة بجرعة ضعف علاجية واحدة 40 mg\kg / 8.90 µg/mL) عند الساعة الثانية (2 ساعة) بعد التجريع، وهي أعلى متوسطات لتركيز الدواء في المصل مقارنة بباقي المجموعات.

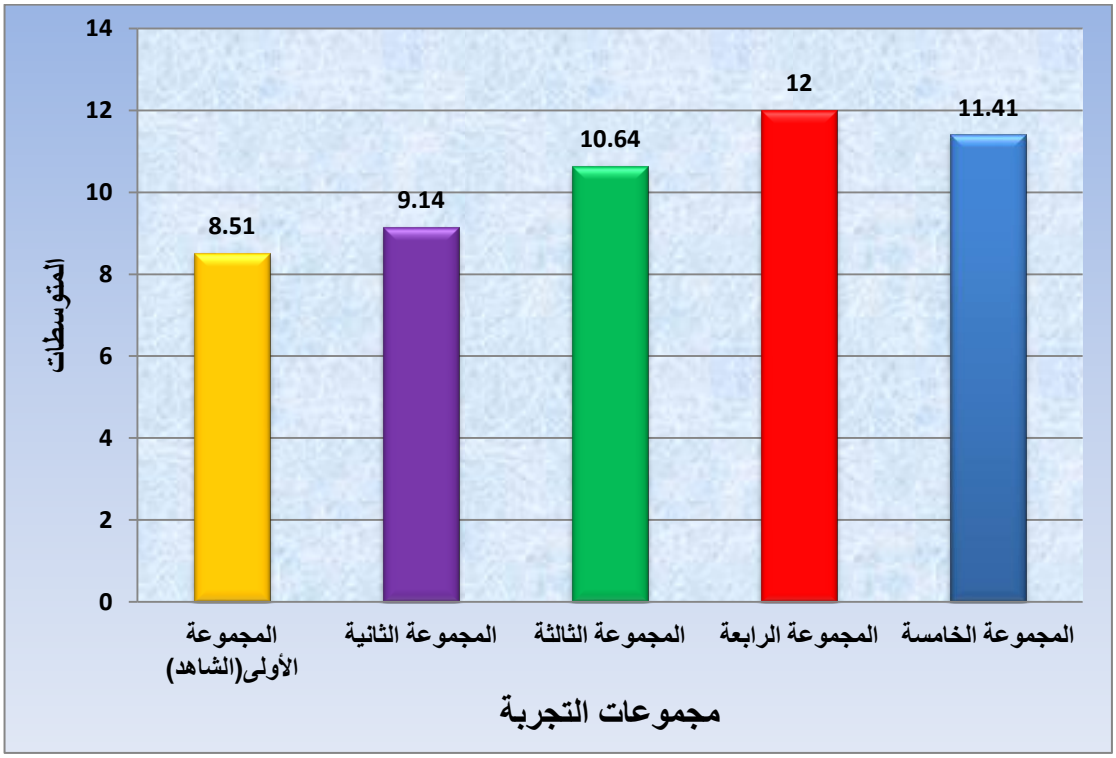
بعد ذروة التركيز، لوحظت مرحلة "هضبة (Plateau Phase) "بين الساعتين 2 و3 حيث لم تتغير الرموز المعنوية(D) ، مما يشير إلى ثبات نسبي في تركيز البلازما قبل بدء مرحلة الإطراح النهائي. استمر وجود الدواء في المصل حتى 32 ساعة بتراكيز قابلة للقياس، مما يدل على نصف عمر طويل في الدجاج.

4-2- نتائج تأثير التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين على الإنزيم الكبدي ALT:

جدول رقم (4): متوسطات قيم تحليل الأنزيم الكبدي ((ALT (U/L) بعد 24 ساعة من إعطاء المادة الدوائية الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم لمجموعات التجربة وذلك لمقارنتها بمجموعة الشاهد

المجموعات	المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري مقدراً بـ (U/L)
المجموعة الأولى (الشاهد)	$^{a}8.51 \pm 0.23$
المجموعة الثانية سليمة/جرعة علاجية واحدة 20mg\kg	$^{b}9.14 \pm 0.28$
المجموعة الثالثة سليمة/جرعة ضعف علاجية واحدة 40mg\kg	$^{c}10.64 \pm 0.35$
المجموعة الرابعة مصابة/جرعة علاجية واحدة 20mg\kg	$^{d}12.00 \pm 0.35$
المجموعة الخامسة مصابة/جرعة علاجية واحدة يومياً لمدة 5 أيام 20mg\kg	$^{e}11.41 \pm 0.34$

تدل الرموز a,b,c,d,e على وجود فروقات معنوية ذات دلالة احصائية عند مستوى الدلالة 5% في حال اختلافها ضمن نفس العمود ، عند المقارنة بين مجموعات التجربة الخمسة فيما بينها، باستخدام اختبار تحليل التباين أحادي الاتجاه (One-Way-ANOVA)،في البرنامج الإحصائي SPSS 25 حيث اعتُبِرَت الفروقات معنوية عند مستوى الدلالة (الاحتمالية) ($p\leq0.05$).



الشكل (10): يبين المخطط (2) متوسطات قيم تحليل الأنزيم الكبدي ((ALT (U/L) بعد 24 ساعة من إعطاء المادة الدوائية الدوكسي سايكلين بالتجريع عن طريق الفم لمجموعات التجربة وذلك لمقارنتها بمجموعة الشاهد

بعد التأكد من مستوى تركيز الدواء في مصل الدم لدى مجموعات التجربة، كان من الضروري تقييم أثر هذه التراكيز على الوظيفة الكبدية، وذلك عبر تحديد مستوى ناقلة أمين الألانين (ALT)، وهو أنزيم خلوي يُعد مؤشراً حيوياً شديد الحساسية والنوعية للضرر الكبدي.

بعد 24 ساعة من الإعطاء الفموي للدواء، أظهرت نتائج تحليل إنزيم ALT ارتفاعاً ملحوظاً طبقاً لزيادة الجرعة ،حيث تمثل المجموعات الخمس مستويات جرعات مختلفة أو فترات علاجية مختلفة، وقد وجد أن المجموعة الأولى هي الأقل جرعة والرابعة هي الأعلى جرعة.
سجلت المجموعة الرابعة أعلى قيمة (0.35 ± 12.00)، تليها المجموعة الخامسة (0.34 ± 11.41)، ثم تليها المجموعة الثالثة حيثُ سجلت قيم تراكيز (0.35 ± 10.64)، بينما سجلت المجموعة الثانية قيم تراكيز (0.28 ± 9.14)، و كانت أقل القيم في المجموعة الأولى (0.23 ± 8.51)

جميع المجموعات أظهرت فروقات معنوية عند مستوى ($p < 0.05$) مقارنة ببعضها البعض، مما يشير إلى أن التأثير على خلايا الكبد يعتمد على الجرعة.

أظهرت النتائج أن المجموعة الرابعة (المصابة بالمايكوبلازما) سجلت أعلى قيمة ALT (12.00 U/L)، متجاوزةً بذلك المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما) التي سجلت (11.41 U/L). جميع المجموعات اختلفت معنوياً عن بعضها، مما يشير إلى أن تلف الكبد يعتمد على كل من الجرعة والحالة الصحية. الانخفاض النسبي في المجموعة الخامسة المصابة مقارنة بالرابعة رغم تلقي الجرعة المتكررة لمدة 5أيام يستدعي انتباهاً خاصاً حول استجابة الكبد تحت وطأة المرض.

وقد دلت الرموز a, b, c, d, e على أن جميع المجموعات كانت مختلفة معنوياً عن بعضها البعض في قراءة ALT بعد 24 ساعة.

التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الإحصائي (**IBM SPSS STATISTICS**) بالإصدار 25 حيث تمت مقارنة المتوسطات الحسابية للمتغيرات المدروسة ما بين مجموعات التجربة فيما بينها عن طريق اختبار تحليل التباين أحادي الاتجاه (**One-Way-ANOVA**)، وتمت مقارنة المتوسطات الحسابية للمتغيرات المدروسة ما بين الأزمنة المدروسة فيما بينها عن طريق اختبار تحليل التباين أحادي الاتجاه (**One-Way-ANOVA**)،حيث اعتُبرَت الفروقات معنوية وذلك عند مستوى الدلالة (الاحتمالية) ($\mathbf{p \leq 0.05}$).

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

5- المناقشة: Discussion

1- مناقشة نتائج التوافر الحيوي للدوكسي سايكلين على جهاز الـ HPLC:

تعتبر دراسة حركية الدواء في الدواجن أمراً بالغ الأهمية نظراً للاختلافات الفيزيولوجية عن الثدييات. تتفق النتائج التي تم التوصل إليها مع الأسس العلمية التي تؤكد أن الدوكسي سايكلين سريع الامتصاص في أمعاء الدجاج. وتشير نتائج الحركية الدوائية (Pharmacokinetics) إلى نمط امتصاص سريع للدوكسي سايكلين بعد الإعطاء الفموي، وهو ما يتوافق مع طبيعة هذا الدواء كونه من زمرة التتراسيكلينات عالية الذوبان في الدهون. يمكن تحليل هذه النتائج من خلال عدة زوايا علمية:

أ. مرحلة الامتصاص (0 – 2 ساعة):

أظهرت النتائج ارتفاعاً سريعاً وواضحاً في تراكيز الدوكسي سايكلين خلال الساعتين الأوليتين بعد التجريع في جميع المجموعات المعاملة، إذ بدأت التراكيز بالقيم المشار إليها بالحرف (A) عند 15 دقيقة، ثم ازدادت تدريجياً إلى (B) و (C)و (D)حتى الوصول إلى أعلى تركيز خلال الساعة الثانية. ويُعزى هذا الارتفاع السريع إلى الطبيعة المحبة للدهون (Lipophilic Nature) التي يتميز بها الدوكسي سايكلين، مما يسهل مروره عبر الأغشية الخلوية للخلايا المعوية بواسطة آلية الانتشار السلبي(Passive Diffusion) ، وبالتالي يحقق امتصاصاً فموياً مرتفع الكفاءة (Agwuh & MacGowan, 2006). كما أن الدوكسي سايكلين يمتلك توافراً حيوياً فموياً عالياً يتجاوز 90%، الأمر الذي يفسر وصوله السريع إلى الدوران الدموي بعد إعطائه فموياً (Nelson & Levy, 2011).

وتتفق النتائج الحالية مع ما ذكره الباحثان Toutain و Bousquet حيثُ بينت دراستهما أن المضادات الحيوية التابعة لمجموعة التتراسيكلينات تتميز بسرعة الامتصاص والانتشار الواسع في الأنسجة بسبب خواصها الفيزيائية والكيميائية، لاسيما قابليتها العالية للذوبان في الدهون (Toutain & Bousquet-Mélou., 2004). كما أشارت دراسة Papich إلى أن الدوكسي سايكلين يصل إلى ذروة تركيزه البلازمي خلال فترة قصيرة نسبياً بعد الإعطاء الفموي، وهو ما ينسجم مع القيم المسجلة في هذه الدراسة خلال أول ساعتين من التجربة (Papich., 2016).

ب. مرحلة الانتشار والتوزع (ذروة التركيز C_max) :

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن أعلى متوسط تركيز (C_max) تم بلوغه عند الزمن 2ساعة (D) في غالبية المجموعات بعد الإعطاء الفموي للدوكسي سايكلين، باستثناء المجموعة الخامسة حيثُ تم بلوغ أعلى متوسط تركيز (C_max) عند الزمن 3ساعة، وهو ما يتوافق مع ما ذكره Ismailو El-Kattan، حيثُ بينت دراستهما أن الدوكسي سايكلين في الدجاج يصل إلى أعلى تركيز خلال مدة تتراوح بين 2–4 ساعات بعد التجريع الفموي، مما يعكس سرعة امتصاص الدواء وارتفاع توافره الحيوي في الطيور الداجنة (Ismail & El-Kattan, 2004). ويُعزى هذا الامتصاص السريع إلى الطبيعة الدهنية النسبية للدوكسي سايكلين وقدرته العالية على العبور عبر الأغشية الحيوية، إضافةً إلى تمتعه بتوافر حيوي مرتفع مقارنةً بعدد من المضادات الحيوية الأخرى التابعة لمجموعة التتراسيكلينات (Agwuh & MacGowan, 2006). ،كما تتوافق هذه الدراسة مع ما أشار إليه الباحثان Agwuh و MacGowan عام (2006)، حيثُ أوضحا أن الدوكسي سايكلين يتميز بسرعة امتصاصه من الجهاز الهضمي مع الوصول إلى ذروة التركيز الأعظمي (C_max) خلال مدة تتراوح بين ساعتين وثلاث ساعات من الجرعة الفموية. كما بيّنت الدراسة أن الدواء يمتلك توافراً حيوياً مرتفعاً يتجاوز 90%، وأن امتصاصه لا يتأثر بصورة كبيرة بالطعام مقارنةً بمعظم أفراد مجموعة التتراسيكلينات، مما يفسر ثبات نمط الامتصاص رغم اختلاف الجرعات (Agwuh & MacGowan, 2006).

وتتفق هذه النتائج مع مبادئ الحركية الدوائية المعروفة للدوكسي سايكلين، إذ يتميز بارتفاع نسبة ذوبانه في الدهون وبطول نصف العمر الحيوي، الأمر الذي يساهم في تحقيق تراكيز علاجية مستقرة داخل البلازما والأنسجة لفترات زمنية أطول، مع إمكانية إعطائه بجرعات أقل تكراراً مقارنةً ببعض المضادات الحيوية الأخرى من نفس الفئة الدوائية (Brunton et al., 2023).

وقد دعمت دراسة Welling وزملائه (1977) هذه الملاحظات، إذ أظهرت أن تناول العليقة قد يؤدي إلى تباطؤ طفيف في معدل الامتصاص دون أن يؤثر بصورة جوهرية في كمية الدواء الممتصة كلياً، وهو ما يفسر استمرار المحافظة على التوافر الحيوي المرتفع للدوكسي سايكلين وثبات خصائصه الحركية الدوائية رغم تناول العليقة (Welling et al., 1977).

واللافت للانتباه علمياً أن قيم C_max في المجموعة الثالثة (8.90) تجاوزت بشكل طفيف قيم المجموعة الخامسة (8.64) عند الساعة الثانية، رغم بقاء المجموعة الخامسة الأعلى في معظم الأزمنة اللاحقة نتيجة تكرار الجرعة وتأثير التراكم الدوائي. وقد يشير ذلك إلى احتمال حدوث تغيرات محدودة في ديناميكية ارتباط الدوكسي سايكلين ببروتينات البلازما عند التراكيز المرتفعة، الأمر الذي قد يؤثر بصورة طفيفة في حجم التوزع الظاهري (V_d) خلال الطور الأولي من منحنى الحرائك الدوائية. وتنسجم هذه الملاحظة مع الخصائص الحركية المعروفة للدوكسي سايكلين، إذ يتميز بنسبة ارتباط مرتفعة ببروتينات البلازما تتراوح بين 80–95%، مع إمكانية تأثر هذا الارتباط بتغير التراكيز الدوائية (Brunton ؛ Agwuh & MacGowan., 2006 et al., 2023).

ومن الملاحظات المهمة أيضاً في الدراسة أن المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة بجرعات متكررة) أظهرت تراكيز أعلى من المجموعة الرابعة في معظم الأزمنة المقاسة، رغم تشابه الظروف التجريبية العامة. ويمكن تفسير ذلك جزئياً بتأثير تكرار الجرعات وما يسببه من تراكم دوائي تدريجي داخل البلازما والأنسجة، إلا أن الحالة الالتهابية الناتجة عن الإصابة بالمايكوبلازما قد تكون عاملاً إضافياً مهماً في تفسير هذا الارتفاع. إذ تؤدي العدوى الالتهابية إلى تغيرات فيزيولوجية تشمل توسع الأوعية الدموية وزيادة نفاذية الشعيرات الدموية المعوية، مما قد يسهم في تعزيز الامتصاص السلبي لبعض الأدوية، ولاسيما المركبات ذات الذوبانية العالية في الدهون مثل الدوكسي سايكلين (Sumano et al., 2003).

كما أن الالتهاب قد يسبب تغيرات واضحة في الحرائك الدوائية من خلال التأثير في حجم التوزع الظاهري (V_d) ، ومعدل الارتباط ببروتينات البلازما، وكفاءة الإطراح الكبدي والكلوي، وهو ما ينعكس على التراكيز الدوائية المقاسة في المصل. وقد أشار Sumano وزملاؤه (2003) إلى أن الحالات الالتهابية في الدواجن يمكن أن تُحدث تغيرات ملحوظة في حجم توزع الأدوية، الأمر الذي يؤدي إلى اختلافات في التراكيز البلازمية وفترة بقاء الدواء داخل الجسم مقارنةً بالحيوانات السليمة (Sumano et al., 2003). وتتفق هذه النتائج أيضاً مع ما ذكرته المراجع الحديثة في الحرائك الدوائية البيطرية، والتي أوضحت أن الأمراض التنفسية المزمنة مثل المايكوبلازما قد تؤثر بصورة غير مباشرة في امتصاص وتوزع المضادات الحيوية نتيجة التغيرات الالتهابية الجهازية، وخصوصاً في الأدوية التي تعتمد بدرجة كبيرة على الانتشار

السلبي والارتباط النسيجي (Riviere & Papich, 2018 ؛ Papich, 2016) كما أن زيادة نفاذية الأغشية الحيوية أثناء الالتهاب قد تساهم في تسهيل انتقال الدواء إلى الأنسجة المصابة، مما يرفع من كفاءته العلاجية لكنه قد يؤدي أيضاً إلى تغيرات في منحنى التركيز–الزمن مقارنةً بالحالات غير المصابة.

ج. مرحلة الاستقلاب:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود اختلافات واضحة ومعنوية بين مجموعات التجربة، إذ ارتفعت تراكيز الدواء تدريجياً بعد التجريع الفموي حتى الوصول إلى الذروة خلال الساعات الأولى، ثم بدأت بالانخفاض التدريجي نتيجة عمليات الاستقلاب والإطراح. ويُعد هذا النمط متوافقاً مع خصائص الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين بوصفه مضاداً حيوياً ينتمي إلى مجموعة التتراسيكلينات طويلة التأثير ذات الامتصاص الفموي العالي والتوزع النسيجي الواسع ونصف العمر الحيوي الطويل نسبياً في الطيور الداجنة (Anadon et al., 1994).

وقد سجلت المجموعة الثالثة (السليمة والمعاملة بجرعة مضاعفة 40 ملغم/كغم) قيماً أعلى بصورة معنوية من المجموعة الثانية (20 ملغم/كغم)، إذ بلغ أعلى تركيز بلازمي (Cmax) حوالي (8.90 ميكروغرام/مل) بعد ساعتين من التجريع مقارنةً بـ (4.62 ميكروغرام/مل) في المجموعة الثانية. ويُفسَّر ذلك بوجود علاقة طردية بين الجرعة المعطاة والتركيز البلازمي الناتج، حيث تؤدي زيادة الجرعة إلى زيادة كمية الدواء الممتصة والمتاحة حيوياً داخل الدوران الدموي، مما يؤدي إلى ارتفاع قيمتي C_{max} (Maximum Plasma Concentration) و AUC (Area Under the Concentration–Time Curve). وتتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه الباحثان Agwuh و MacGowan عام (2006) من أن الدوكسي سايكلين يمتلك حرائك دوائية شبه خطية ضمن المجال العلاجي، وأن زيادة الجرعة تؤدي إلى زيادة واضحة في التراكيز المصلية دون حدوث تشبع ملحوظ في الامتصاص (Agwuh and MacGowan., 2006).

كما أظهرت النتائج أن المجموعة الخامسة المصابة بالمايكوبلازما والمعاملة بجرعة علاجية يومية لمدة خمسة أيام سجلت أعلى تراكيز بلازمية وأكثرها استمراراً مقارنةً بمجموعات التجربة الأخرى، حيث بلغت الذروة البلازمية حوالي (8.69 ميكروغرام/مل) عند الساعة الثالثة واستمرت التراكيز مرتفعة حتى الأزمنة المتأخرة. ويُعزى ذلك إلى ظاهرة التراكم الدوائي الناتجة عن إعطاء جرعات متكررة، فضلاً عن تأثير الإصابة بالمايكوبلازما في الكفاءة الوظيفية للكبد، مما يؤدي

إلى انخفاض معدل تصفية الدواء وإبطاء عمليات الاستقلاب الحيوي. وقد أوضح الباحث Kumar وزملاؤه أن الإصابات التنفسية المزمنة في الدواجن تؤدي إلى تغيرات مرضية تؤثر في الحركية الدوائية للمضادات الحيوية، وخاصةً تلك التي تعتمد بصورة رئيسية على الكبد في عمليات التحول الحيوي (Kumar *et al.*, 2014).

إن الانخفاض التدريجي البطيء في تراكيز الدوكسي سايكلين بعد الوصول إلى الذروة، ولاسيما في المجموعة الخامسة، يشير إلى بطء عمليات الاستقلاب والإطراح مقارنةً ببقية مجموعات التجربة. ويحدث استقلاب الدوكسي سايكلين بصورة رئيسية في الكبد عبر منظومة إنزيمات السيتوكروم P450، ثم يُطرح جزء كبير منه عن طريق الصفراء إلى الأمعاء، بينما يُطرح جزء أقل عن طريق الكلية (Riond and Riviere, 1988). ولذلك فإن أي اضطراب مرضي في الوظائف الكبدية أو زيادة في الحمل الالتهابي قد يؤدي إلى انخفاض معدل الاستقلاب وإطالة نصف العمر الحيوي للدواء.

وقد بينت الدراسة الحالية أن الإصابة بالمايكوبلازما أدت إلى استمرار التراكيز البلازمية المرتفعة لفترة أطول مقارنةً بالمجموعات السليمة، الأمر الذي قد يرتبط بتثبيط نشاط الإنزيمات الكبدية المسؤولة عن استقلاب الأدوية نتيجة إفراز السيتوكينات الالتهابية أثناء الإصابة المزمنة. وقد أشار الباحث Waxman إلى أن الالتهابات الجهازية تؤدي إلى انخفاض نشاط إنزيمات CYP450 الكبدية، مما يسبب بطء استقلاب العديد من الأدوية وارتفاع تراكيزها في البلازما (Waxman., 1999).

وتنسجم هذه النتائج أيضاً مع ما ذكره الباحث Martinez وزملاؤه حيثُ أوضحوا أن الإصابات التنفسية المزمنة في الدواجن تؤدي إلى تغيرات في تدفق الدم الكبدي ونشاط الإنزيمات الكبدية، مما ينعكس على تصفية المضادات الحيوية وإطالة فترة بقائها داخل الجسم (Martinez et al., 2021). كما بيّن الباحثان Landoni و Albarellos أن التتراسيكلينات طويلة التأثير، ومنها الدوكسي سايكلين، تُظهر ميلاً للتراكم النسبي عند استخدام الجرعات المتكررة بسبب ارتفاع ارتباطها البروتيني والتوزع النسيجي الواسع (Landoni and Albarellos., 2015).

ومن الملاحظ أيضاً أن تراكيز الدوكسي سايكلين بقيت قابلة للكشف حتى بعد 32 ساعة من التجريع في جميع مجموعات التجربة، مما يدل على ارتفاع التوافر الحيوي وبطء التخلص من الدواء. وتتوافق هذه النتائج مع دراسة الباحث El-Gendi وزملاؤه والتي أشارت إلى أن

الدوكسي سايكلين يحافظ على تراكيز علاجية فعالة لفترات طويلة في بلازما وأنسجة دجاج اللحم، مما يجعله فعالاً ضد الإصابات التنفسية المزمنة مثل المايكوبلازما (El-Gendi et al., 2010).

كما يمكن تفسير استمرار التراكيز العلاجية لفترات طويلة بارتفاع نسبة ذوبان الدوكسي سايكلين في الدهون وقدرته العالية على اختراق الأنسجة المختلفة، وخاصةً أنسجة الجهاز التنفسي، الأمر الذي يجعله مناسباً لعلاج إصابات المايكوبلازما في الدواجن (Sumano and Ocampo, 2006). وقد أكدت دراسة الباحث Abd El-Aziz وزملاؤه عام (2012) أن الجرعات المتكررة من الدوكسي سايكلين تؤدي إلى زيادة واضحة في قيم AUC وإطالة فترة بقاء الدواء في الجسم نتيجة التراكم التدريجي داخل الأنسجة المختلفة (Abd El-Aziz et al., 2012).

ومن الناحية العلاجية، فإن النتائج الحالية تشير إلى أن الدوكسي سايكلين يمتلك خصائص حركية دوائية ملائمة لعلاج الإصابات التنفسية في دجاج اللحم، حيث يحافظ على تراكيز علاجية فعالة لفترات زمنية طويلة نسبياً، إلا أن ذلك قد يتطلب مراعاة فترات السحب الدوائي لتجنب بقايا المضاد الحيوي في لحوم الدواجن، خاصةً عند استخدام الجرعات العالية أو المعالجات طويلة الأمد. كما تؤكد النتائج أن الحالة المرضية للحيوان يمكن أن تؤثر بصورة مباشرة في استقلاب الدواء وتوافره الحيوي، وهو ما ينبغي أخذه بنظر الاعتبار عند تصميم البرامج العلاجية أثناء معالجة دجاج اللحم.

الثبات النسبي (Relative stability) بين الساعة 2 و3:

بفحص الرموز للأزمنة عند 2 ساعة و3 ساعات، نلاحظ أن جميع المجموعات حملت نفس الرمز (D) عند الزمنين، مما يشير إلى غياب فرق معنوي بين تركيز الساعة 2 والساعة 3 في كل المجموعات. هذه الظاهرة الحركية تعرف بـ "الهضبة" "plateau " وهي واضحة نسبياً في منحنى التركيز البلازمي للدوكسي سايكلين خلال الفترة الممتدة بين الساعة الثانية والثالثة بعد الإعطاء الفموي في جميع المجموعات التجريبية، وهي مرحلة حرجة جداً في حركية الدواء.

تفسير هذه الهضبة يمكن أن يكون بسبب:

1- استمرار الامتصاص مع بدء الإطراح: دخول الدواء من الأمعاء لا يزال مستمراً بمعدل يساوي تقريباً معدل إطراحه الكبدي أو الكلوي.

2- إعادة التدوير المعوي الكبدي (Enterohepatic Recirculation): حيثُ تُعزى المحافظة النسبية على تراكيز الدوكسي سايكلين في البلازما لفترات زمنية ممتدة جزئياً إلى ظاهرة إعادة التدوير المعوي الكبدي (Enterohepatic Recirculation)، وهي إحدى الخصائص الحركية الدوائية المهمة لبعض أفراد مجموعة التتراسيكلينات. ففي هذه العملية يُطرح جزء من الدواء أو مستقلباته عبر الصفراء إلى الأمعاء، ثم يُعاد امتصاصه مرة أخرى إلى الدوران الدموي، مما يسهم في إطالة مدة بقاء الدواء داخل الجسم والمحافظة على تراكيز بلازمية مستقرة نسبياً مع انخفاض معدل الإطراح الكلي. ويُعتقد أن هذه الآلية تشارك بصورة مباشرة في إطالة نصف العمر الحيوي للدوكسي سايكلين وتحسين استمرارية تأثيره العلاجي، خاصةً عند إعطائه بجرعات متكررة (Brunton et al., 2023). وتتفق هذه الملاحظة مع ما أوضحه Fabre وزملاؤه (1971)، إذ بيّنوا أن إعادة التدوير المعوي الكبدي تمثل عاملاً مهماً في استدامة تراكيز التتراسيكلينات في الدم والمساهمة في إطالة نصف عمرها الحيوي، نتيجة إعادة امتصاص جزء من الدواء المطروح عن طريق الصفراوء إلى الجهاز الدوري مرة أخرى (Fabre et al., 1971) كما أن الطبيعة الدهنية النسبية للدوكسي سايكلين وارتفاع درجة ارتباطه ببروتينات البلازما يساعدان على تعزيز هذه الظاهرة الحركية، الأمر الذي يفسر استمرار وجود تراكيز دوائية فعالة لفترات أطول مقارنةً ببعض المضادات الحيوية الأخرى من نفس المجموعة الدوائية (Agwuh & MacGowan, 2006). وقد أشارت المراجع الدوائية الحديثة أيضاً إلى أن هذه الخصائص الحركية تسهم في تقليل تذبذب التراكيز البلازمية بين الجرعات وتحسين الاستجابة العلاجية للمرضى (Brunton et al., 2023). ومن الناحية السريرية، فإن إعادة التدوير المعوي الكبدي قد تفسر جزئياً سبب إمكانية إعطاء الدوكسي سايكلين بجرعة أو جرعتين يومياً فقط مع الحفاظ على فعالية علاجية جيدة، إضافةً إلى مساهمتها في تقليل التذبذب الحاد في تراكيز الدواء بين الجرعات المتتالية، مما يدعم استمرارية التأثير المضاد للبكتيريا لفترة زمنية أطول (Brunton et al., 2023 ؛ Agwuh & MacGowan, 2006). كما أن التركيب التشريحي والفيزيولوجي الخاص بالطيور، ولاسيما الدجاج، قد يسهم في تعزيز وضوح هذه المرحلة مقارنةً ببعض الثدييات. فالطيور تتميز باختلافات في الجهاز اللمفاوي والهضمي وآلية طرح العصارة الصفراوية، إضافةً إلى خصوصية حركة القناة الهضمية وسرعة مرور المحتويات المعوية، وهي عوامل تؤثر بصورة مباشرة في إعادة الامتصاص المعوي للأدوية المطروحة عن

طريق الصفراء. وقد أُشير إلى أن هذه الخصائص قد تجعل إعادة التدوير المعوي الكبدي لبعض المضادات الحيوية أكثر وضوحاً في الطيور مقارنةً بالعديد من الثدييات، حيث يكون الإطراح الكلوي في بعض الأنواع أسرع نسبياً، مما يؤدي إلى انخفاض أسرع في التراكيز البلازمية بعد الوصول إلى الذروة الدوائية (Riviere & Papich, 2018).

وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Laczay وزملاؤه (2001)، إذ وجدوا أن الدوكسي سايكلين يمتلك نصف عمر حيوي طويل نسبياً في الدجاج، الأمر الذي يسمح بالحفاظ على تراكيز علاجية فعالة لفترات ممتدة وإمكانية إعطائه بجرعة واحدة يومياً دون فقدان فعاليته العلاجية، كما أوضحت الدراسة أن الامتصاص الجيد للدواء مع بطء الإطراح النسبي يسهمان في تشكيل مرحلة استقرار واضحة ضمن منحنى التركيز–الزمن (Laczay et al., 2001).

ومن جهة أخرى، تختلف هذه النتائج عن بعض الدراسات الحركية الدوائية التي أُجريت في الكلاب والجرذان، حيث لوحظ انخفاض أكثر حدة في تراكيز الدوكسي سايكلين بعد مرحلة الذروة نتيجة الاختلافات بين الأنواع الحيوانية في معدل الإطراح الكلوي، والتوزع النسيجي، وكفاءة إعادة التدوير المعوي الكبدي (Papich., 2016 ؛ Wilson et al., 1988) لذلك فإن الاختلافات الفيزيولوجية بين الطيور والثدييات تُعد عاملاً أساسياً في تفسير التباين في أنماط منحنيات الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين بين الأنواع المختلفة.

3- تباطؤ التوزع في الأنسجة العميقة (Deep Tissue Distribution):

يُعزى الاستقرار النسبي في تراكيز الدوكسي سايكلين خلال المراحل اللاحقة من منحنى الحرائك الدوائية إلى التوزع التدريجي للدواء داخل الأنسجة العميقة (Deep Tissue Distribution)، إذ يستمر انتقال الدواء من البلازما إلى الأنسجة حتى الوصول إلى حالة من التوازن الديناميكي بين الحيز الوعائي والحيز النسيجي. ويؤدي هذا التوازن إلى انخفاض معدل التغير في التركيز البلازمي وظهور مرحلة شبه مستقرة نسبياً في المنحنى الدوائي. وتُعد هذه الخاصية من السمات المعروفة للدوكسي سايكلين نتيجة ارتفاع ذوبانيته في الدهون وامتلاكه حجماً ظاهرياً مرتفعاً للتوزع (V_d) ، مما يسمح له بالنفاذ إلى العديد من الأنسجة والسوائل الحيوية بكفاءة عالية (Brunton et al., 2023 ؛Agwuh & MacGowan., 2006).

كما أن استمرار وجود تراكيز علاجية فعالة داخل الأنسجة يرتبط بقدرة الدوكسي سايكلين على الارتباط النسبي بالمكونات النسيجية والبروتينات، وهو ما يساهم في تحرير الدواء تدريجياً إلى الدوران الدموي والمحافظة على استقرار تراكيزه لفترة أطول.

وقد وُصفت هذه الظاهرة في العديد من دراسات الحركية الدوائية للتتراسيكلينات في الإنسان والحيوان، حيث أظهرت أن مرحلة التوزع قد تكون ممتدة نسبياً مقارنةً بمضادات حيوية أخرى أقل ذوبانية في الدهون (Agwuh & MacGowan., 2006 ؛ Fabre et al., 1971).

وتختلف هذه الملاحظات جزئياً عن بعض النماذج الحركية الدوائية للدوكسي سايكلين في الكلاب، إذ أشار Wilson وزملاؤه (1988) إلى حدوث انخفاض أكثر حدة في التركيز البلازمي مباشرة بعد الوصول إلى الذروة الدوائية، مقارنةً بما يُلاحظ في الإنسان أو بعض الأنواع الحيوانية الأخرى (Wilson et al., 1988). ويمكن تفسير هذا الاختلاف بالاختلافات الفيزيولوجية بين الأنواع الحيوانية، خاصةً فيما يتعلق بآلية إفراز الصفراء وإعادة التدوير المعوي الكبدي. فالكلاب، بخلاف بعض الأنواع الأخرى، تمتلك نمطاً مختلفاً في تنظيم إفراز الصفراء وحركة الجهاز الهضمي، مما قد يؤدي إلى اختلاف معدل إعادة امتصاص الدواء المطروح صفراوياً وبالتالي اختلاف شكل منحنى التركيز–الزمن. كما أن الفروقات بين الأنواع في معدل الاستقلاب الكبدي، ونسبة الارتباط ببروتينات البلازما، وحجم التوزع النسيجي، تؤدي مجتمعةً إلى تباين الخصائص الحركية للدوكسي سايكلين بين الحيوانات والإنسان (Papich, 2016).

وقد دعمت دراسات أُجريت على المجترات والخيول هذه الفرضية، حيث لوحظ أن اختلاف فيزيولوجية الجهاز الهضمي وطبيعة الدوران الصفراوي يؤثر بصورة مباشرة في مدة بقاء الدواء داخل الجسم ومعدل انخفاض تراكيزه البلازمية. ففي الحيوانات ذات إعادة التدوير المعوي الكبدي الأكثر وضوحاً، تميل التراكيز الدوائية إلى الاستقرار لفترات أطول مقارنةً بالحيوانات التي يكون فيها الإطراح الصفراوي أسرع أو أقل إعادةً للامتصاص (Riviere & Papich, 2018).

د. مرحلة الإطراح (Elimination Phase) من الساعة 4 إلى 32:

ابتداءً من الزمن (E) عند الساعة الرابعة بعد التجريع الفموي، بدأت التراكيز البلازمية لـ Doxycycline بالانخفاض التدريجي في جميع مجموعات التجربة، وقد ترافق ذلك مع تغير متتابع في الرموز الحرفية الإحصائية (E, F, G, …O) ، مما يدل على وجود فروقات معنوية حقيقية بين الأزمنة المختلفة ضمن كل مجموعة، ويشير بوضوح إلى انتقال الدواء من مرحلة

التوزع (Distribution Phase) إلى طور الإطراح النهائي (Terminal Elimination Phase)، وهي المرحلة التي تصبح فيها سرعة انخفاض التركيز ضمن البلازما معتمدة بصورة أساسية على كفاءة عمليات الاستقلاب الكبدي والإطراح الكلوي والصفراوي (Riond and Riviere, 1988).

وقد أظهرت المقارنة بين مجموعات الدراسة أن المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما والمعاملة بجرعة علاجية يومية لمدة خمسة أيام) احتفظت بأعلى التراكيز البلازمية خلال طور الإطراح مقارنةً ببقية مجموعات التجربة، إذ بلغ تركيز الدواء فيها (8.64 ميكروغرام/مل) عند الساعة الثانية، ثم انخفض إلى (4.71 ميكروغرام/مل) عند الساعة العاشرة، أي إلى ما يقارب نصف القيمة خلال فترة تقارب ثماني ساعات. مما يُشير إلى امتلاك الدوكسي سايكلين نصف عمر حيوي ($t_{1/2}$) طويل نسبياً في هذه المجموعة، الأمر الذي يدل على بطء التخلص من الدواء واستمرارية بقائه داخل الجسم لفترات زمنية ممتدة.

في المقابل، أظهرت المجموعة الثانية (السليمة والمعاملة بجرعة علاجية واحدة 20 ملغم/كغم) انخفاضاً أسرع في التراكيز البلازمية، إذ تراجع التركيز من (4.62 ميكروغرام/مل) عند الساعة الثانية إلى (1.96 ميكروغرام/مل) عند الساعة العاشرة، مما يشير إلى قصر نسبي في نصف العمر الحيوي مقارنةً بالمجموعة الخامسة. أما المجموعة الثالثة (السليمة والمعاملة بجرعة مضاعفة 40 ملغم/كغم) فقد أظهرت تراكيز مرتفعة نسبياً خلال مرحلة الإطراح، إلا أن معدل الانخفاض كان أسرع من المجموعة الخامسة وأبطأ من المجموعة الثانية، مما يعكس تأثير الجرعة المرتفعة في زيادة التوافر الحيوي دون الوصول إلى مستوى التراكم الدوائي الناتج عن الجرعات المتكررة في المجموعة الخامسة.

وتُظهر هذه النتائج بصورة واضحة أن الإصابة بالمايكوبلازما مع تكرار الجرعات العلاجية أدت إلى إبطاء معدل تصفية الدواء (Drug Clearance) وإطالة نصف العمر الحيوي مقارنةً بالمجموعات السليمة. ويُفسر ذلك بالتأثيرات المرضية المزمنة للمايكوبلازما في الكبد والجهاز الدوري، إذ تؤدي الالتهابات التنفسية المزمنة إلى انخفاض نشاط الإنزيمات الكبدية المسؤولة عن التحول الحيوي للأدوية، فضلاً عن حدوث تغيرات في التروية الدموية الكبدية، مما ينعكس على سرعة الاستقلاب والإطراح (Waxman., 1999).

وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره الباحث Anadon وزملاؤه الذين أشاروا إلى أن الدوكسي سايكلين يمتلك نصف عمر حيوي أطول مقارنةً ببقية التتراسيكلينات نتيجة ارتفاع ذوبانيته الدهنية وارتباطه العالي بالبروتينات البلازمية، مما يؤدي إلى بطء خروجه من النسج والدورة الدموية (Anadon et al., 1994). كما بيّن الباحثان Agwuh و MacGowan أن الدوكسي سايكلين يتميز بانخفاض معدل التصفية الدوائية واعتماده النسبي على الإطراح الصفراوي أكثر من الإطراح الكلوي، وهو ما يفسر استمرار وجود تراكيزه لفترات طويلة نسبياً داخل الجسم (Agwuh and MacGowan,. 2006).

وعند مقارنة التراكيز البلازمية عند الساعة الرابعة والعشرين (N)، يظهر بوضوح استمرار بقاء الدواء في المجموعة الخامسة بتراكيز أعلى من بقية مجموعات التجربة، إذ بلغت (0.18 ± 1.68 ميكروغرام/مل)، مقارنةً بـ (1.21 ميكروغرام/مل) في المجموعة الثالثة، و (0.18 ميكروغرام/مل) في المجموعة الرابعة، و (0.54 ميكروغرام/مل) فقط في المجموعة الثانية. وتشير هذه النتائج إلى أن تكرار الجرعات مع وجود الإصابة المرضية أدى إلى زيادة تراكم الدواء وإطالة مدة بقائه في البلازما مقارنةً بالمجموعات السليمة أو المعاملة بجرعة واحدة.

إن استمرار وجود تراكيز قابلة للكشف بعد مرور 24 ساعة يعكس ظاهرة دوائية مهمة تُعرف بالتأثير ما بعد المضاد الحيوي (Post-Antibiotic Effect; PAE)، والذي يتمثل باستمرار تثبيط النمو الجرثومي حتى بعد انخفاض تركيز المضاد الحيوي إلى مستويات دون التركيز المثبط الأدنى (MIC). ويُعد هذا التأثير من الخصائص المهمة للدوكسي سايكلين بسبب آلية عمله المعتمدة على تثبيط تصنيع البروتين الجرثومي عبر الارتباط بالوحدة الريبوسومية 30S، مما يؤدي إلى استمرار التأثير المثبط لفترة زمنية طويلة حتى عند انخفاض التراكيز البلازمية (Craig, 1998).

وتتوافق هذه النتائج مع دراسة الباحثان Toutain و Lees التي أوضحت أن التتراسيكلينات، ومنها الدوكسي سايكلين، تمتلك فعالية دوائية تعتمد على الزمن (Time-dependent antibacterial activity) إضافةً إلى تأثير ما بعد المضاد الحيوي، الأمر الذي يسمح باستمرار الفعالية العلاجية رغم انخفاض التركيز المصلي (Toutain and Lees., 2004). كذلك أشار الباحثان Sumano و Ocampo إلى أن الدوكسي سايكلين يمتلك قدرة عالية على

النفاذ إلى أنسجة الجهاز التنفسي والتراكم داخلها، مما يجعله فعالاً بصورة خاصة ضد إصابات المايكوبلازما المزمنة في الدواجن (Sumano and Ocampo., 2006).

ومن جهة أخرى، فإن استمرار التراكيز المرتفعة نسبياً في المجموعة الخامسة مقارنةً بباقي مجموعات التجربة الأخرى يعكس حدوث تراكم دوائي واضح ناتج عن الجرعات المتكررة، وهو ما أكدته دراسة الباحثان Landoni و Albarellos التي بينت أن الاستخدام المتكرر للدوكسي سايكلين يؤدي إلى زيادة قيم AUC وإطالة زمن بقاء الدواء داخل البلازما والأنسجة، مما يعزز فعاليته العلاجية ولكنه قد يزيد في المقابل من احتمالية بقاء المتبقيات الدوائية في لحوم الدواجن عند عدم الالتزام بفترات السحب الدوائي (Landoni and Albarellos., 2015).

وبصورة عامة، تؤكد النتائج الحالية أن الدوكسي سايكلين يمتلك خصائص حركية دوائية متميزة في دجاج اللحم، تتمثل بطول نصف العمر الحيوي، وبطء الإطراح، واستمرار التأثير المضاد للبكتيريا لفترات طويلة، خاصةً في الطيور المصابة بالمايكوبلازما والمعاملة بجرعات متكررة، مما يدعم كفاءته العلاجية في السيطرة على الإصابات التنفسية المزمنة في الدواجن.

مناقشة نتائج التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين بعد الإعطاء الفموي في دجاج اللحم تراوح بين 13.5% و29% تبعاً للحالة الصحية ونظام التجريع، إذ سجلت المجموعة الثانية (السليمة والمعالجة بجرعة علاجية مفرد ة مقدارها 20 ملغ/كغ) نسبة توافر حيوي بلغت 13.5%، بينما ارتفعت إلى 25.7% في المجموعة الثالثة التي تلقت جرعة مضاعفة (40 ملغ/كغ)، في حين بلغت 15.5% لدى الطيور المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة بجرعة علاجية مفردة، وارتفعت إلى 29% لدى الطيور المصابة التي تلقت جرعات علاجية يومية متكررة لمدة خمسة أيام متتالية.

تشير هذه النتائج إلى وجود تأثير واضح لكل من الجرعة والحالة المرضية ونمط الإعطاء على التعرض الجهازي للدواء. ويُلاحظ أن قيم التوافر الحيوي المسجلة في الدراسة الحالية كانت أقل من العديد من القيم المنشورة في الأبحاث العلمية الخاصة بالأنواع الطيرية الأخرى، الأمر الذي يؤكد وجود فروق نوعية كبيرة في التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين بين الأنواع المختلفة.

ففي دراسة أجراها Anadón وزملاؤه على دجاج اللحم، بلغ التوافر الحيوي الفموي للدوكسي سايكلين حوالي 41.3% بعد إعطاء جرعة مقدارها 20 ملغ/كغ، وهي قيمة أعلى بشكل ملحوظ

من القيمة المسجلة في المجموعة الثانية من الدراسة الحالية (13.5%). ويمكن تفسير هذا الاختلاف بعدة عوامل تشمل الاختلاف في السلالة المستخدمة، والعمر، والظروف البيئية، وتركيب العليقة، والأهم هو عدد الجرعاتالمستخدمة أثناء التجربة، فضلاً عن الفروقات المحتملة في المستحضرات الدوائية المستخدمة. كما أن وجود الكالسيوم والمعادن ثنائية التكافؤ في العلف قد يؤدي إلى تكوين معقدات مخلبية مع الدوكسي سايكلين داخل الجهاز الهضمي، مما يحد من امتصاصه ويؤدي إلى انخفاض التوافر الحيوي الفموي (Anadón et al., 1994).

كما أن نتائج الدراسة الحالية جاءت أقل من القيم المسجلة لدى السمان الياباني، حيث وجد الباحث Tekeli وزملاؤه أن التوافر الحيوي الفموي للدوكسي سايكلين بلغ 25.8% بعد إعطاء جرعة مقدارها 20 ملغ/كغ، مع نصف عمر إطراح يقارب 11 ساعة. وتقترب هذه القيمة من النسبة المسجلة في المجموعة الثالثة من الدراسة الحالية (25.7%) رغم اختلاف الجرعة، الأمر الذي قد يشير إلى أن زيادة الجرعة في دجاج اللحم ساهمت في تحسين الامتصاص النسبي أو زيادة التعرض الجهازي للدواء. كما تدعم هذه الملاحظة وجود اختلافات نوعية في خصائص الامتصاص والتوزع والاستقلاب بين الأنواع الطيرية المختلفة، مما يجعل تعميم الجرعات بين الأنواع المختلفة أمراً غير دقيق من الناحية العلمية (Tekeli et al., 2020).

وبالمقارنة مع الإوز، فقد أظهرت الدراسات أن التوافر الحيوي للدوكسي سايكلين قد يصل إلى نحو 43% بعد الإعطاء الفموي بجرعة 20 ملغ/كغ، مع نصف عمر حيوي طويل نسبياً يصل إلى 13 ساعة تقريباً (Toutain et al., 2021), وتفوق هذه القيمة جميع النسب المسجلة في الدراسة الحالية، مما يعكس وجود اختلافات جوهرية بين الأنواع الطيرية في خصائص الامتصاص المعوي والتخلص من الدواء. ويُعتقد أن الفروقات التشريحية والفسيولوجية في الجهاز الهضمي ومعدل مرور المحتويات المعوية واختلاف التعبير عن نواقل الدواء في الأمعاء قد تلعب دوراً مهماً في هذه التباينات بين الأنواع .

ومن النتائج اللافتة في الدراسة الحالية ارتفاع التوافر الحيوي من 13.5% إلى 15.5% عند الإصابة بالمايكوبلازما رغم ثبات الجرعة العلاجية. ويُحتمل أن يكون الالتهاب الناجم عن العدوى قد أدى إلى تغيرات فيزيولوجية أثرت في التوافر الحيوي للدواء، مثل زيادة نفاذية الأغشية الحيوية أو تغير الارتباط ببروتينات البلازما أو انخفاض معدلات الإطراح. وقد أوضح الباحثان Toutainو Bousquet-Mélou أن الحالات الالتهابية يمكن أن تعدل العديد من المعاملات

الحركية الدوائية للمضادات الحيوية، بما في ذلك الامتصاص والتوزع والتصفية، مما يؤدي إلى تغير التعرض الجهازي للدواء مقارنة بالحيوانات السليمة (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004) ،كما أظهرت المجموعة الخامسة أعلى نسبة توافر حيوي (29%)، وهي زيادة يمكن تفسيرها بالتجريع المتكرر لمدة خمسة أيام متتالية. ومن المعروف أن الدوكسي سايكلين يمتلك نصف عمر إطراح أطول مقارنة بمعظم التتراسيكلينات الأخرى، إضافة إلى تمتعه بدرجة مرتفعة من الذوبان الدهني، مما يسمح بتوزعه الواسع في الأنسجة وحدوث تراكم تدريجي عند إعطاء جرعات متكررة قبل التخلص الكامل من الجرعة السابقة. وقد أشار Giguère وآخرون إلى أن الجرعات المتكررة من الدوكسي سايكلين تؤدي إلى ارتفاع تدريجي في كل من المساحة تحت المنحنى (AUC) والتركيز المصلي الوسطي حتى الوصول إلى حالة الثبات الدوائي (Steady State)، وهو ما يتوافق مع النتائج المسجلة في الدراسة الحالية (Giguère et al., 2018).

ومن ناحية أخرى، فإن الزيادة الكبيرة في التوافر الحيوي عند مضاعفة الجرعة من 20 إلى 40 ملغ/كغ (13.5% مقابل 25.7%) قد تدل على أن عملية الامتصاص لم تصل إلى حد الإشباع ضمن هذا المجال الجرعي، وأن الدوكسي سايكلين ما يزال يخضع لحركية دوائية شبه خطية في دجاج اللحم. وتتفق هذه الملاحظة مع ما ذكره الباحث Papich عام (2021) من أن امتصاص الدوكسي سايكلين يبقى متناسباً إلى حد كبير مع الجرعة ضمن الحدود العلاجية المعتادة، مع إمكانية حدوث زيادة في التعرض الجهازي عند رفع الجرعة نتيجة زيادة الكمية الممتصة من الدواء.

وبشكل عام، تُظهر نتائج الدراسة الحالية أن التوافر الحيوي الفموي للدوكسي سايكلين في دجاج اللحم كان أقل من القيم المبلغ عنها في معظم الدراسات المنشورة على الأنواع الطيرية الأخرى، إلا أن الاتجاه العام للنتائج بقي متوافقاً مع المبادئ المعروفة لحرائك الدواء؛ إذ أدى كل من زيادة الجرعة، والإصابة المرضية، والتجريع المتكرر إلى رفع التعرض الجهازي للدواء. وتؤكد هذه النتائج أهمية تطوير برامج جرعات خاصة بدجاج اللحم تستند إلى بيانات حرائك دوائية محلية بدلاً من الاعتماد على البيانات المستمدة من أنواع طيرية أخرى، لما لذلك من أثر مباشر في تحسين الكفاءة العلاجية وتقليل مخاطر الفشل العلاجي أو ظهور المقاومة الجرثومية.

مناقشة نتائجALT :

أ. **دلالة الارتفاع العام للأنزيم:** الارتفاع المعنوي لأنزيم الكبدي ALT في كل المجموعات المعالجة مقابل الشاهد هو دليل قطعي على حدوث أذية كبدية خلوية Hepatocellular). (Injuryإن الأنزيم الكبدي ALT موجود بوفرة في سيتوبلازم الخلايا الكبدية (Hepatocytes)، وأي ارتفاع معنوي لأنزيم الكبدي ALT في مصل الدم يعني تمزقاً في الغشاء الخلوي للخلية الكبدية وتسرب المحتويات الأنزيمية إلى المجرى الدموي. هذه النتيجة تتفق مع البحث الذي قام به الباحثAmacher عام (1998) الذي أكد أن ALT هو "المعيار الأساسي" للكشف عن السمية الكبدية في الدراسات ما قبل السريرية (Amacher, D. E., 1998).

ت. **تحليل نمط تغير ALT مع زيادة الجرعة:** بملاحظة القيم، نجد تدرجاً غير خطي بالكامل:

الشاهدG1 (8.51)، G2 (9.14)، G3 (10.64)، G4 (12.00)، G5 (11.41).

لقد ارتفع ALT طردياً حتى الجرعة المعطاة للمجموعة الرابعة، مسجلاً زيادة عظمى مقدارها 41% عن الشاهد. هذا النمط من التناسب الطردي بين الجرعة والاستجابة السمية هو متوقع بالنسبة للنماذج التقليدية للتسمم الدوائي، حيث أن زيادة الجرعة تؤدي لزيادة إنتاج النواتج الأيضية الفعالة السامة داخل الخلية (Reactive Oxygen Species – ROS) مما يفاقم الإجهاد التأكسدي، كما أن الإصابة تلعب دوراً هاماً في الأذية الكبدية. يتوافق هذا مع نتائج دراسة Zimmerman حول "السمية الكبدية المعتمدة على الجرعة Dose–Dependent) (Hepatotoxicity التي تنطبق على التتراسيكلينات (Zimmerman., 1978).

ث. تفسير الانخفاض النسبي في المجموعة الخامسة:

إن البحث الحالي يُسجل ملاحظة متناقضة ظاهرياً: المجموعة الخامسة، التي تلقت جرعة علاجية يومياً ولمدة 5أيام (كان تركيز الدواء في مصل الدم لديها حسب تحليل الـ HPLC هو الأعلى)، بينما سجلت متوسط ALT أقل (11.41 U/L) من المجموعة الرابعة (12.00 U/L)، مع بقاء الفرق معنوياً (حرف e مختلف عن d). ويُعزى هذا الأختلاف إلى الفرق في مدة العلاج بالدوكسي سايكلين.

هذه النتيجة لا تشير أبداً إلى أن السمية أقل، بل تفسيرها الباثولوجي هو الأخطر: هذه الظاهرة تُعرف بـ "استنزاف الأنزيم (Enzyme Exhaustion) "أو "الانخفاض المفاجئ في المرحلة

النخرية المتأخرة ."في حالات التسمم الكبدي الشديد والمميت، يدخل الكبد في مرحلة نخر شامل (Massive Necrosis)حيث تموت أعداد هائلة من الخلايا الكبدية دفعة واحدة وتُفرغ محتواها من ALT في الساعات الأولى، ثم يحدث انخفاض لاحق (بعد 24–48 ساعة) مع استمرار التلف، لأن الخلايا الباقية والميتة حديثاً لا تملك مخزوناً كافياً من الأنزيم لإفرازه، أو أن الأنزيم المُفرَز قد بدأ بالتحلل في البلازما (يبلغ نصف العمر الحيوي للأنزيم الكبدي ALT في الجرذان حوالي 10–12 ساعة).

مناقشة تأثير الدواء على إنزيم ALT وفقاً للحالة الصحية:

– الأذية الكبدية في الدجاج السليم مقارنة بالمصاب بالمايكوبلازما:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية اختلافات واضحة في مستويات الأنزيم الكبدي (ALT) بين مجموعات التجربة تبعاً للحالة الصحية ونظام إعطاء الدواء. فقد سجلت المجموعة الرابعة (المصابة بالمايكوبلازما) أعلى ارتفاع في مستوى الأنزيم الكبدي ALT (12.00 U/L)، مما يشير إلى أن الإصابة المرضية بحد ذاتها كانت كافية لإحداث أذية كبدية ملحوظة. ويُعد ارتفاع مستوى الأنزيم الكبديALT مؤشراً مهماً على تلف الخلايا الكبدية أو زيادة نفاذية أغشيتها، الأمر الذي يؤدي إلى تسرب الإنزيم إلى الدوران الدموي. ويمكن تفسير ذلك بأن عدوى المايكوبلازما تُحدث استجابة التهابية جهازية تترافق مع زيادة إنتاج السيتوكينات الالتهابية والجذور الحرة، مما يسبب إجهاداً تأكسدياً وتضرراً في النسيج الكبدي (Papich, 2016 ؛ Riviere & Papich, 2018)

ومن المثير للاهتمام أن المجموعة الخامسة (المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة بجرعات متكررة من الدوكسي سايكلين) أظهرت ارتفاعاً أقل في مستوى الأنزيم الكبدي ALT مقارنةً بالمجموعة الرابعة، رغم أن التوقع النظري يفترض أن اجتماع العامل المرضي مع التعرض الدوائي المتكرر قد يؤدي إلى زيادة السمية الكبدية. ويمكن تفسير هذه النتيجة بعدة آليات محتملة، من أهمها ظاهرة "التكيف الكبدي (Hepatic Adaptation) "، إذ إن التحفيز الالتهابي المزمن قد يؤدي إلى تنشيط آليات دفاع خلوية تقلل من حساسية الخلايا الكبدية تجاه الضرر الكيميائي. وتشمل هذه الآليات زيادة التعبير عن بروتينات الصدمة الحرارية ,Heat Shock Proteins)

(HSPs، وهي بروتينات واقية تعمل على تثبيت البروتينات الخلوية وتقليل التلف الناتج عن الإجهاد التأكسدي والسموم الدوائية (Laurin et al., 2008).

وقد أشارت دراسة Laurin وزملائه (2008) إلى أن الاستجابة المناعية في الدواجن يمكن أن تعدل من استجابة الكبد للمواد الكيميائية والسموم الدوائية، من خلال تنشيط مسارات وقائية خلوية تحد من شدة الأذية النسيجية. كما أن المعالجة اليومية بالدوكسي سايكلين لمدة خمسة أيام ربما ساهمت في تقليل الحمل الجرثومي للمايكوبلازما وتخفيف شدة الالتهاب الجهازي، الأمر الذي انعكس بانخفاض الضرر الكبدي مقارنةً بالحيوانات المصابة غير المعالجة بصورة كافية (Agwuh & MacGowan, 2006 ؛ Laurin et al., 2008)

إضافةً إلى ذلك، لا يمكن استبعاد فرضية "استنزاف الإنزيم(Enzyme Exhaustion) "، والتي تشير إلى أن الارتفاع الشديد والمبكر في مستوى الأنزيم الكبدي ALT لدى المجموعة الرابعة ربما نتج عن وصول الخلايا الكبدية إلى مرحلة نخرية متقدمة أدت إلى استنزاف المخزون الخلوي القابل للتحرر من الإنزيم. ففي المراحل المتقدمة من الأذية الكبدية قد تنخفض مستويات بعض الإنزيمات المصلية ظاهرياً رغم تفاقم الضرر النسيجي، نتيجة فقدان عدد كبير من الخلايا الكبدية القادرة على إنتاج أو تحرير الإنزيمات (Brunton et al., 2023). لذلك فإن الاعتماد على القياسات الكيميائية الحيوية وحدها قد لا يكون كافياً لتحديد طبيعة الضرر الكبدي بصورة دقيقة، إذ قد تظهر تغيرات في إنزيمات الكبد دون وجود آفات نسيجية واضحة، كما قد تُشاهد تغيرات نسيجية مهمة دون أن تترافق دائماً مع تغيرات متناسبة في المؤشرات المصلية. لذلك فإن التفسير الصحيح للأذية الكبدية يتطلب الربط بين نتائج الكيمياء السريرية والفحص النسيجي المرضي للكبد (Ramaiah et al., 2017). وعليه، فإن التمييز بين ظاهرة التكيف الكبدي الوقائي والاستنزاف الإنزيمي أو الأذية الخلوية الناتجة عن النخر الكبدي يستوجب دعماً بالفحص النسيجي المرضي (Histopathological Examination) ، الذي يُعد الوسيلة الأكثر موثوقية لتقييم درجة التنكس الخلوي والنخر والارتشاح الالتهابي والتغيرات البنيوية داخل النسيج الكبدي (Foster et al., 2020) كما تسلط هذه النتائج الضوء على التعقيد الكبير في التفاعل بين الحالة المرضية والعلاج الدوائي في الدواجن، إذ قد تتداخل التأثيرات المناعية والدوائية والاستقلابية لإنتاج استجابات حيوية تختلف عن التوقعات النظرية التقليدية (Ramaiah et al., 2017)

الفصل السادس

الاستنتاجات

Conclusions

6- الاستنتاجات: Conclusions

بناءً على النتائج التي تم الوصول إليها ومناقشتها في ضوء المعطيات العلمية، يمكن استنتاج الآتي:

1. يتمتع الدوكسي سايكلين بتوافر حيوي جيد نسبياً في دجاج اللحم، حيثُ سجلت المجموعة الثانية السليمة والمعالجة بجرعة علاجية مفردة (20 mg/kg) نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 13.5%، أما المجموعة الثالثة السليمة والمعالجة بجرعة ضعف علاجية مفردة (40 mg/kg) فقد سجلت نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 25.7%، بينما المجموعة الرابعة المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة بجرعة علاجية مفردة (20 mg/kg) فقد سجلت نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 15.5%، أما المجموعة الخامسة المصابة بالمايكوبلازما والمعالجة لمدة 5أيام متتالية بجرعة علاجية(20 mg/kg) فقد سجلت نسبة توافر حيوي لمركب الدوكسي سايكلين حوالي 29%، وبالتالي نستنتج بأن التوافر الحيوي لمركب الدوكسي سايكلين يتأثر بشكل كبير بالحالة الصحية، حيثُ أن الإصابة بالمايكوبلازما تزيد من تركيز الدواء في البلازما نتيجة زيادة النفاذية الوعائية المعوية،
2. تم تحديد زمن الذروة (C_max) عند الساعتين لجميع المجموعات، مع وجود نصف عمر حيوي طويل يستمر حتى 10 ساعات، مما يبرر استخدامه بجرعات وحيدة يومياً في الدواجن.
3. ارتفاع مستوى الأنزيم الكبدي ALT المعتمد على الجرعة في الدجاج السليم يؤكد السمية الكبدية المحتملة للجرعات العالية.
4. إن النتيجة الأكثر أهمية هي أن وجود المايكوبلازما سبب ارتفاع مستوى الأنزيم الكبدي ALT ولكن هذا الارتفاع مرتبط بعوامل أخرى غير العامل الممرض (المايكوبلازما) وتركيز الدواء؛ لهذا يستوجب عدم الاعتماد فقط على ALT لتقييم سلامة الكبد في الدواجن المصابة والمعالجة.

الفصل السابع

التوصيات

Recommendations

7- التوصيات: Recommendations

في ضوء ما تقدم، واستكمالاً للفائدة العلمية والعملية، نوصي بما يأتي:

1. ضرورة إجراء فحص هستوباثولوجي لأنسجة الكبد للمجموعتين الرابعة والخامسة لتحديد ما إذا كان ارتفاع ALT ناتجاً عن حماية خلوية أو نخر شامل.
2. نوصي بإجراء دراسات مستقبلية لتعديل جرعة الدوكسي سايكلين في القطعان المصابة بالمايكوبلازما، حيث قد تكون هناك حاجة لجرعات أقل للحصول على نفس التأثير العلاجي بسبب زيادة التوافر الحيوي أثناء المرض، مما يقلل التكلفة والآثار الجانبية.
3. لا ينبغي الاعتماد على مستوى الأنزيم الكبدي ALT فقط في أبحاث الدواجن، بل يجب إضافة إنزيمات أكثر نوعية مثل GLDH (Glutamate Dehydrogenase) وأنزيم السوربيتول ديهيدروجيناز (SDH) الخاصة بالكبد في الطيور.
4. نظراً لطول نصف العمر الحيوي للمضاد الحيوي الدوكسي سايكلين كما ظهر في النتائج، نوصي بإجراء دراسة تفصيلية لحساب فترة الانسحاب الدوائي (Withdrawal Time) في لحوم الدجاج المصاب مقارنة بالدجاج السليم لضمان سلامة المستهلك.

الفصل الثامن

المراجع

References

References :المراجع

1. Aaronson, A.L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracycline. JAM. Vet. Med. Assoc., 17(10):1061-8.
2. Abd El-Aziz, M. I., El-Kattan, Y. A., & Soliman, A. M. (2012). Pharmacokinetic profile of doxycycline in broiler chickens. British Poultry Science, 53(2), 221–226.
3. Abo Elyazeed, H., et al. (2020). Scientific Reports.
4. Agwuh, K. N., & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58(2), 256–265. https://doi.org/10.1093/jac/dkl224
5. Alestig,K.(1973).Studies on doxycycline during intravenous and oral treatment with reference to renal funcation.Scand.J.Infect.Dis,15:193.
6. Amacher, D. E. (1998). Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 27(2), 119–130. https://doi.org/10.1006/rtph.1998.1197
7. Anadón, A., Martinez-Larranaga, M. R., Diaz, M. J., Bringas, P., Fernandez, M. C., FernandezCruz, M. L., Iturbe, J. and Martinez, M. A. (1994): Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. Avian Pathol. 23, 79–90.
8. Andersen AA, Vanrompay P. Avian Mycoplasmosis (Mycoplasmosis, Mycoplasma). In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDonald LR, Swayne DE, eds. Diseases of Poultry. 11th edition. Ames, Iowa: Iowa State Press;, 2003. pp. 863-82.

9. Andersen AA, Vanrompay P. Avian Mycoplasmosis. Rev Sci Tech.,, 2000;19:396-404.
10. Archimbault P, Ambroggi G, Joineaud J. The doxycycline chez la volaille: biodisponibilité et passage dans les œufs. Rev Med Vet, 1983;134(59):291-5.
11. Barragry, T.B.(1994). Veterinary drug Therapy. Baltimore:Lea and Febiger, 264-92.
12. Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble, Weinstein l. Relation between lipophility and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, teracycline and oxytetracycline in dogs. Antimicrobial Agents Chemother., 1975;8:713-20.
13. Baxter, R.;Ray,G.T. and Fireman, B.H.(2008). Case-control study of antibiotic use and subsequent Clostridium difficile- associated diarrhea in hospitalized patients. Infect Control Hosp Epidemiol, 29:44.
14. Bethke T. Doxycycline. Dts Apotheker Ztg., 1995;135(8):56-9.
15. Boothe, D.M. (2012). Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Saunders.
16. Bradbury, J. M., O. M. S. Abdul Wahab, C. A. Yavari, J. P. Dupiellet, and J. M. Bove. 1993. Mycoplasma imitans sp. nov. is related to Mycoplasma gallisepticum and found in birds. Int J Syst Bacteriol 43:721—728.
17. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β- lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951.
18. Brand CJ. Mycoplasmosis infections in free-living birds. J Am Vet Med Assoc., 1989;195:1531-5. Minnesota Med Assoc., 1970;53:949-55.

19. Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (Eds.). (2023). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (14th ed.). McGraw-Hill Education.
20. Butaye P, Ducatelle R, De Backer P, Vermeersch H, Remon JP, Haesebrouck F. In vitro activities of doxycycline and enrofloxacin against European Mycoplasma strains from turkeys. Antimicrob Agents Chemother., 1997; 41(12):2800–5.
21. Chambers HF. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibact erial agents. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, Hrsg. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. Aufl. New York: McGraw-Hill Companies;, 2005; S. 1173-202.
22. Chavant F, Lafay-Chebassier C, Beauchant M, Perault-Pochat MC. [Doxycycline induced hepatitis]. Gastroenterol Clin Biol. 2008 Oct;32(10):825-7.
23. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(2), 232–260.
24. Chukwudi CU. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Aug;60(8):4433-41.
25. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Dec;47(12):3675-81.
26. Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clinical Infectious Diseases, 26(1), 1–10.

27. Cross R, Ling C, Day NP, McGready R, Paris DH. Revisiting doxycycline in pregnancy and early childhood--time to rebuild its reputation? Expert Opin Drug Saf. 2016;15(3):367-82.
28. Crowther, J. R. (2000). The ELISA Guidebook.
29. Dong, M. W. (2006).Modern HPLC for Practicing Scientists. Wiley-Interscience.
30. Dorrestein GM, Hrsg. Studies on pharmacokinetics of some antibacterial agents in homing poultry (Columba livia) [Dissertation med. vet]. Utrecht: Univ. Utrecht;, 1986a; Chapter VIII; S. 103- 38.
31. Dorrestein GM, Welink J, Haagsma N. Pharmacokinetic (1991) differences for doxycycline between racing poultry (Columba livia) and collared doves (Streptopelia decaocto) and the effect of a salmonella infection.
32. Dorrestein GM. Studies on pharmacokinetics for some antibacterial agents in homing poultry (Columba livia) [Dissertation med. vet]. Utrecht: Univ. Utrecht;, 1986.
33. Drumev D, Vangelov S, Mutafchieva R, Loseva M, Dzhurov A. Doxycycline hydrochloride administered in the drinking water to poultry.Vet Med Nauki., 1982;19(9):100-6.
34. Duan YJ, Souriau A, Mahe AM, Trap D, Andersen AA, Rodolakis A. Serotyping of Mycoplasmosis clinical isolates from birds with monoclonal antibodies.Avian Dis., 1999;43:22-28.
35. Edison M. Mycoplasmosis/ avian Mycoplasmosis. J Am Vet Med Assoc.,, 2002;221:1710-12.
36. El-Gendi, A. Y. I., Atef, M., Amer, A. M. M. and Kamel, G. M. (2010): Pharmacokinetic and tissue distribution of doxycycline in broiler chickens pretreated with either: Diclazuril or halofuginone. Food Chem. Toxicol. 48, 3209–3214.

37. European Commission. (2024). Union product database for veterinary medicinal products: Doxylin 433 mg/g powder for use in drinking water for chickens and turkeys. European Medicines Agency. https://medicines.health.europa.eu
38. Fabre, J., Milek, E., & Kalfopoulos, P. (1971). The kinetics of doxycycline in normal subjects. Chemotherapy, 16(1), 1–7.
39. Flammer K, Whitt-Smith D, Papich M. Plasma concentrations of doxycycline in selected Mycoplasma birds when administered in water for potential treatment of Mycoplasma infection.J Avian Med Surg.,, 2001;15:276-82.
40. Flammer K. Antibiotic Drug Selection in Companion Birds. J Exotic Pet Med.,, 2006;15:166-176.
41. Flammer K. Mycoplasma. In: Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, Quesenberry K, Hrsg. Avian Medicine and Surgery. Pennsylvania, Philadelphia: W. B. Saunders Company;, 1997; S. 364-79.
42. Flammer K. Treatment of Mycoplasmosis in exotic birds in the United States. J Am Vet Med Assoc., 1989;195:1537-40.
43. Foster, J. R., Semino-Beninel, G., & Melching-Kollmuss, S. (2020). The cumulative risk assessment of hepatotoxic chemicals: A hepatic histopathology perspective. Toxicologic Pathology, 48(7), 876–894. https://doi.org/10.1177/0192623319895481
44. Frimmer M, Lämmler G, Hrsg. Pharmakologie und Toxikologie. 2. Aufl. Stuttgart – New York: F. K. Schattauer Verlag;, 1977; S. 1-243.
45. Gajda, A., Posyniak, A. and Tomczyk, G. (2014): LC-MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration. Bull. Vet. Inst. Pulawy 58, 573–579.

46. Gbylik-Sikorska, M.; Gajda, A and Posyniak, A. (2017). Pharmacokinetic depletion phase of doxycycline in healthy and Mycoplasma gallisepticum-infected chicken broilers after coadministration of enrofloxacin traces , J. vet. Pharmacol. Therap, 1–4.
47. Gerbermann H, Jakoby JR, Kösters J. Excretion of Mycoplasma and kinetics of the antibodies in owls (Strigiformes) treated with doxycycline. Tagungsbericht VIII. Tagung Vogelkrankheiten;, 1992;
48. Gerbermann H, Pauels FJ. Der Einfluß des Immunsystems auf die Abwehr einer Psittakoseinfektion. Prakt Tierarzt., 1982;5:458-62.
49. Gerlach H. Mycoplasma. In: Ritchie B, Harrison G, Harrison L, Hrsg. Avian Medicine: Principles and Application. Florida, Delray Beach: HBD International, Inc.;, 1999; S. 984-96.
50. Giguère, S., Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (2018). Antimicrobial therapy in veterinary medicine (5th ed.). Wiley-Blackwell.
51. Giguère, S., Prescott, J.F., & Dowling, P.M. (2013). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine (5th ed.). Wiley-Blackwell.
52. Gross, J. B., Caldwell, C. B., & Miller, R. D. (1981). Histamine release and cardiovascular effects of intravenous anesthetic agents. Anesthesiology, 55(3), 298–302.
53. Hamscher, G., et al. (2002). Determination of tetracycline residues using internal standard methodology. Analytical Chemistry.
54. Hasan SA. Interaction of doxycycline and warfarin: an enhanced anticoagulant effect. Cornea. 2007 Jul;26(6):742-3.
55. Hodgson, B. B and Kizior, R. J. (2003). Saunders nursing drug hand book Elsevier Science (U.S.A).

56. Hoffmann J. Diseases of poultry. Reutlingen: Verlagshaus Oertel & Spärer;, 1969; pp. 24-8.
57. Hooimeijer J. Management of racing poultry. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, ed. Clinical Avian Medicine. Palm Beach: Spix Publishing;, 2006; pp. 849-60.
58. Huber WG. Tetracyclines. In: Booth NH, Mc Donald LE, eds. Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th ed. U.S.A., Ames: Iowa State University Press;, 1988; pp. 813-21.experimentally infected animals.Acta Vet Acad Sci Hung., 1970;20:139-148.
59. Ismail, M. M., & El-Kattan, Y. A. (2004). Comparative pharmacokinetics of doxycycline in chickens by different routes of administration. Journal of Veterinary Science, 5(4), 347–352.
60. Jaffe JM, Poust RI, Feld SL, Colaizzi JL. Influence of repetitive dosing and altered urinary ph on doxycycline excretion in humans.J Pharmaceu Sci., 1974;63:1256-60.
61. Janeczek F. Mycoplasma diagnostics in Psittaciformes: Comparative studies on antigen detection in cell culture and in ELISA and on antibody detection in the complement fixation reaction and in blocking ELISA [Dissertation med. vet]. Munich: Univ. Munich;, 1989.
62. Jung, A. (1992). Investigations on the efficacy of enrofloxacin against Mycoplasma in chickens. Inaugural Dissertation, Munich..
63. Krautwald, M. E., et al. (1990). Influence of enrofloxacin on the reproduction and growth of chickens. Journal of Veterinary Medicine.
64. Kroker R, Scherkl R, Ungemach FR. Chemotherapy of bacterial infections. In: Frey H-H, Löscher W, eds. Textbook of pharmacology and toxicology. 2nd ed. Stuttgart:Enke Verlag;, 2002; pp. 353-93.

65. Kroker R. Pharmaceuticals for the treatment and prevention of bacterial infections. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, eds. Pharmacotherapy in domestic and farm animals. 7th edition. Berlin: Parey Buchverlag;, 2006, pp. 234-78.
66. Kühnert M. Special toxicology: chemotherapeutics – antibiotic poisoning. In: Kühnert M, ed. Veterinary toxicology. Jena: Gustav Fischer Verlag;, 1991; pp. 330-5.
67. Kumar, R., Singh, B., & Malik, J. K. (2014). Influence of respiratory infections on pharmacokinetics of antimicrobial drugs in poultry. Veterinary World, 7(12), 1000–1005.
68. Laczay, P., Semjén, G., Lehel, J., & Nagy, G. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in broiler chickens. Acta Veterinaria Hungarica, 49(1), 31–37.
69. Landoni, M. F., & Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. Veterinary Journal, 205(1), 21–27.
70. Laskin AI, Last JA. Tetracyclines. Antibiotics Chemoth., 1971;17:1-28.
71. Laurin, D. E., Barnes, H. J., & Vaillancourt, J. P. (2008). Effects of immune activation and stress responses on hepatic function in poultry. Avian Diseases, 52(3), 451–458.
72. Laurin, D. E., Touchburn, S. P., & Chavez, E. R. (2008). Immune response and hepatic enzyme modulation in broiler chickens challenged with Mycoplasma gallisepticum. Poultry Science, 87(5), 922-928.
73. Lees, P., & Shojaee Aliabadi, F. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs: pharmacokinetic-pharmacodynamic integration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 25, 503–514.

74. Ley, D. H. (2003). Mycoplasma gallisepticum infection. In: Diseases of Poultry.
75. Lindenstruth, H. (1992). Treatment of avian mycoplasmosis with enrofloxacin. Tierärztliche Umschau.
76. Lucchetti J, Fracasso C, Balducci C, Passoni A, Forloni G, Salmona M, Gobbi M. Plasma and Brain Concentrations of Doxycycline after Single and Repeated Doses in Wild-Type and APP23 Mice. J Pharmacol Exp Ther. 2019 Jan;368(1):32-40.
77. Lüthgen W, ed. Pigeon diseases.3rd ed. Verlagshaus Oertel und Spörer, Reutlingen;, 2006; pp. 37-48, 255-9.
78. Mailhol C, Tremeau-Martinage C, Paul C, Godel A, Lamant L, Giordano-Labadie F. [Severe drug hypersensitivity reaction (DRESS syndrome) to doxycycline]. Ann Dermatol Venereol. 2010 Jan;137(1):40-3.
79. Martinez, M., & Modric, S. (2010). Patient variation in veterinary clinical pharmacology. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 40, 213–227.
80. Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L., & Mealey, K. (2021). Impact of disease states on veterinary drug pharmacokinetics. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 44(3), 321–330.
81. Meyer, V. R. (2010).Practical High-Performance Liquid Chromatography (5th ed.). Wiley.
82. Mims, C. A.; Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I.; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Mosby Comp. USA.

83. Murakawa T. Tetracyclines – Macrolides – Other Antibiotics. In: Kuemmerle HP, Murakawa T, Nightingale CH, eds. Pharmacokinetics of antimicrobial agents: Principles •Methods Applications. Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft GmbH & Co. KG;, 1993; pp. 109-18.
84. Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. Annals of the New York Academy of Sciences, 1241, 17–32.
85. Oka, H., et al. (1985). Analysis of tetracyclines in biological matrices using McIlvaine–EDTA buffer. Journal of Chromatography.
86. Padilla LR, Flammer K, Miller RE. Doxycycline-medicated drinking water for treatment ofMycoplasma in exotic doves.J Avian Med Surg.,, 2005;19:88-91.
87. Pai-Feng, H., Jin-Chieh, J., & Wei-Cheng, L. (2016). Pharmacokinetics and doxycycline residues in broiler chicken tissues after oral administration. Journal of Veterinary Medical Science, 78(10), 1583-1587. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0158
88. Papich, M. G. (2016). Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal (4th ed.). Elsevier.
89. Papich, M. G. (2021). Papich handbook of veterinary drugs (5th ed.). Elsevier.
90. Papich, M. G. (2021). Saunders handbook of veterinary drugs: Small and large animal (5th ed.). Elsevier.
91. Papich, M. G. (2022). A critical review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety data of antibiotics in avian species. Antibiotics, 11(6), 741.
92. Pees M, ed. Mycoplasmosis (parrot disease). In: Key symptoms in parrots and parakeets. Stuttgart: Verlag Enke;, 2004; pp. 24-5.

93. Pennycott T. Poultry: infectious diseases. In: Chitty J, Lierz M, eds. BSAVA Manual of Raptors, Poultry and Passerine Birds. Gloucester: BSAVA;, 2008; pp.3111-9.
94. Plumb DC, ed. Doxycycline. In: Veterinary Drug Handbook. 6th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press;, 2008; pp. 331-4.
95. Prescott, J.F. (2013). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Wiley-Blackwell.
96. Prescott, J.F., Baggot, J.D., & Walker, R.D. (2000). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine (3rd ed.). Iowa State University Press.
97. Ramaiah, L., Hinrichs, M. J., Skuba, E. V., Iverson, W. O., & Ennulat, D. (2017). Interpreting and integrating clinical and anatomic pathology results. Toxicologic Pathology, 45(4), 421–438. https://doi.org/10.1177/0192623316677068
98. Richard, F, (2015). Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 6th Edition, Wolters Kluwer Health.
99. Riond JL, Riviere JE. Doxycycline binding to plasma albumin of several species. J Vet Pharmacol Ther., 1989;12:253-60.
100. Riond, J. L., & Riviere, J. E. (1988). Pharmacology and toxicology of doxycycline. Veterinary and Human Toxicology, 30(5), 431–443.
101. Riviere JE, Spoo JW. Tetracycline Antibiotics. In: Adams HR, ed. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8th ed. Ames: Iowa State University Press;, 2001; pp. 828-40.
102. Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2018). Veterinary Pharmacology and Therapeutics (10th ed.). Wiley-Blackwell.
103. Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2018). Veterinary pharmacology and therapeutics (10th ed.). Wiley-Blackwell.

104. Riviere, J.; Craigmill, A.L. and Sundlof, S.F. (1991).Handbook of comparative pharmacokinetics and residus of veterinary antimicrobials. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc, 175-226.
105. Riviere, J.E., & Papich, M.G. (2009). Veterinary Pharmacology and Therapeutics (9th ed.). Wiley-Blackwell.
106. Riviere. J.E. and Spoo, J. (1995). Tetraccline / Aminoglycocide antibiotics. In Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 7th edition. ed.Adams, H.R.Pp.: 797-813. IowaStateUniversity Press / Ames.
107. Samanidou, V. F., & Nisyriou, S. A. (2008). Antibiotics determination in biological samples. Journal of Chromatography A.
108. Santos MD, Vermeersch H, Remon JP, Schekens M, De Backer P, Ducatelle R, Haesebrouck F. Administration of doxycycline hydrochlorid via drinking water to turkeys under laboratory and field conditions.Poult Sci., 1997;76(10):1342-8.
109. Santos MD, Vermeersch H, Remon JP, Schelkens M, De Backer P, van Bree HJ, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in turkeys.J Vet Pharmacol Ther., 1996;19:274-80.
110. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. J Am Acad Dermatol. 2006 Feb;54(2):258-65.
111. Schach von Wittenau M, Twomey TM, Swindell AC. The disposition of doxycycline by the rat. Chemother., 1972;17:26-39.
112. Schach von Wittenau M, Twomey TM. The disposition of doxycycline by man and dog. Chemother., 1971;16:217-28.
113. Schach von Wittenau M, Yeary R. The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs.J Pharmacol Exp Ther., 1963;40:258-66.

114. Scope A. Klinischer Untersuchungsgang. In: Kaleta EF, Krautwald-Junghanns M.E, Hrsg. Kompendium der Ziervogelkrankheiten. 3. Aufl.Hannover: Schlütersche GmbH & Co.KG;, 2007a; S. 61-7.
115. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014).Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Cengage Learning.
116. Smith,K.and Leydon,J.J.(2005).Safety of doxycycline and minocycline:asystemic review.Clin.Ther,27-1329.
117. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010).Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rd ed.). Wiley.
118. Stahlmann, R., & Lode, H. (2001). Toxicity of tetracyclines. In: Adverse Drug Reactions.
119. Steigbigel, N. H., Reed, C. W., & Finland, M. (1968). Absorption and excretion of five tetracycline analogs in normal young men. The American Journal of the Medical Sciences, 255(5), 296-312. https://doi.org/10.1097/00000441-196805000-00003
120. Stipkovits, L., et al. (1993). Avian Pathology.
121. Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). Tetracyclines in veterinary medicine: pharmacology and clinical applications. Veterinary Mexico, 37(1), 1–15.
122. Sumano, H., Gutierrez, L., & Zamora, M. (2003). Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher concentrations in target tissues. British Poultry Science, 44(1), 143-148.
123. Sumano, H., Ocampo, L., & Gutiérrez, L. (2003). Pharmacokinetic consequences of inflammation in veterinary species. Veterinary Research Communications, 27(8), 635–643.

124. Swayne, D. E., Boulianne, M., Logue, C. M., McDougald, L. R., Nair, V., Suarez, D. L., de Wit, S., Grimes, T., Johnson, D., Kromm, M., Prajitno, T. Y., Rubinoff, I., & Zavala, G. (2020). Diseases of poultry (14th ed.). Wiley-Blackwell.

125. Tekeli, I. O., Turk, E., Corum, D. D., Corum, O., Kirgiz, F. C., & Uney, K. (2020). Pharmacokinetics, bioavailability and tissue residues of doxycycline in Japanese quails (Coturnix coturnix japonica) after oral administration. Food Additives & Contaminants: Part A, 37(12), 2082–2092.

126. Thiim, M. and Friedman, L.S. (2003). Hepatotoxicity of antibiotic and antifungals. Clin. Liver. Dis, 7:381.

127. Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004). Bioavailability and its assessment. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 27(6), 455–466.

128. Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004). Plasma clearance. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 27(6), 415–425.

129. Toutain, P. L., & 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.

130. Toutain, P. L., et al. (2021). Doxycycline pharmacokinetics in geese. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 44, 1–10.

131. Toutain, P.L., Ferran, A., & Bousquet-Mélou, A. (2010). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics. Veterinary Research, 41, 1–15.

132. Traub C. Untersuchungen zur Frage der Wirksamkeit der parenteralen im Vergleich zur oralen Behandlung mit Tetracyclin-Derivaten bei mit dem Psittakose-Erreger infizierten Sittichen und Papageien [Dissertation med. vet]. Gießen: Universität Gießen;, 1982.

133. Tully TN. Update on mycoplama. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Hrsg. Clinical Avian Medicine. Palm Beach: Spix Publishing;, 2006; S. 679-80.

134. Unkrieg AS. Vergleichende Untersuchung über den nachweis von Mycoplasma bei Psittaziden, Tauben, Puten und Hühnern mittels BGM-Zellkultur (mit GIMÉNEZ-Färbung), direkter Immunfluoreszenz an Probenmaterial sowie nach Anzüchtung in BGM-Zellkulturen mit anschließender Immunfluoreszenz [Dissertation med. vet]. Gießen: Universität Gießen;, 1995.

135. Vogel C, Gerlach H, Löffler M. Columbiformes. In: Ritchie B, Harrison G, Harrison L, Hrsg. Avian Medicine: Principles and Application. Florida, Delray Beach: HBD International Inc;, 1999; S. 1200-17.

136. Waxman, D. J. (1999). P450 gene induction by inflammatory diseases and inflammatory cytokines. Pharmacology & Therapeutics, 84(1), 1–32.

137. Webster G, Del Rosso JQ. Anti-inflammatory activity of tetracyclines. Dermatol Clin. 2007 Apr;25(2):133-5, v.

138. Weilacher JS. Vibramycin, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Klinik-Übersichtbesprechun geines bewährten Bretspektrumantibiotikums. Kassenarzt., 1981;21:5402-10.

139. Welling, P. G., Koch, P. A., Lau, C. C., & Craig, W. A. (1977). Bioavailability of tetracycline and doxycycline in fasted and nonfasted subjects. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11(3), 462–469.

140. Wilson, R. C., Spinks, A., & Baggot, J. D. (1988). Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. American Journal of Veterinary Research, 49(5), 651–654.

141. Winkler E, Weih H. Doxycyclin, Ergebnisse von Basisuntersuchungen. Med Klinik., 1967;33:1257-62.

142. World Organisation for Animal Health (2021). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

143. Yang, F., Yang, Y.R., Wang, L., Huang, Z.H., Zhao, Z.Z., Jing, Z.Z., and Mei, K.J. (2018). Pharmacokinetics of doxycycline after single-dose or multiple-dose oral administration in healthy chickens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 41(5), 724-732. https://doi.org/10.1111/jvp.12497

144. Yoshimura H, Osawa N, Rasa FSC, Hermawati D, Werdiningsih S, Isriyanthi HNMR, Sugimori T. Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens. Food Adit Contamination., 1991;8(1):65-9.

145. Zhang, Y., Li, X., Wang, J., Liu, H., Zhang, X., & Chen, Y. (2025). A high-content stable doxycycline hyclate drinking-water solution for broilers: Preparation, stability, and bioequivalence. Frontiers in Veterinary Science, 12, Article 1740059. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1740059

146. Zimmerman, H. J. (1978). Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Appleton-Century-Crofts.

Syrian Arab Republic

Hama University

Faculty of Veterinary Medicine

Department of Physiology

Study of the Bioavailability of Doxycycline when Administered Orally in Different Doses to Healthy and Mycoplasma Infected Broiler Chickens

Thesis Presented For Master Degree In Vet. Med. Sci
Speciality "Veterinary Pharmacology"

Prepared by postgraduate student

Bahaa Yousef Al-Khawaldeh

Supervised by

Dr. Salwa Al-Dibs

2025–2026