



Konzentrationsanalysen und pharmakokinetische Betrachtungen transdermaler Applikation von Carprofen mit Hilfe einer neuartigen Applikationstechnik

Fouché, Nathalie Elisa

Abstract: Zusammenfassung Zusammenfassung In der vorliegenden Studie wurden Plasma- und Synovialanalysen von Carprofen nach der transdermalen Behandlung mit einem neuartigen Applikationssystem (VetDrop®) bei Schafen durchgeführt. Von den insgesamt sechs Versuchstieren wurden vier Tiere transkutan mit einer carprofenhaltigen Mikroemulsion behandelt und vergleichend zwei Tiere intravenös mit 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®). Bei den Tieren der Applikationsgruppe wurden Plasma- und Synovialproben gewonnen, bei den Tieren der Injektionsgruppe lediglich Plasmaproben. Die Analyse der Proben geschah mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie. Sowohl in den Plasma- als auch in den Synovialproben der transkutan behandelten Tiere konnte Carprofen nachgewiesen werden. Die Werte der Plasmakonzentrationen lagen über den Werten der Synovialkonzentrationen und es kam im Verlauf der Behandlungsperiode zu einer leichten Akkumulation von Carprofen. Die in Woche 6 bei zwei Tieren gewonnenen Proben der kontralateralen Kniegelenke enthielten nur eine geringfügig niedrigere Carprofen-Konzentration als die Synovialproben der behandelten Gelenke. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des VetDrop® Applikationssystems Carprofen transkutan transportiert wird und wiederholbare Plasma- und Synovialkonzentrationen erreicht werden.

Summary Summary The aim of the study was to evaluate the percutaneous transport of carprofen into plasma and synovial fluid after treatment with a new device for regional transdermal application (Vet-Drop®) in sheep. For this purpose four animals of the six animals in the study were treated transdermally with a microemulsion containing carprofen and two animals were treated intravenously with 4 mg/kg carprofen (Rimadyl®) as a control group. Plasma and synovial samples were collected in the animals treated transcutaneously and plasma samples in the animals treated intravenously. Concentration analyses were performed using High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. Carprofen was found in plasma and synovial fluid samples of all transcutaneously treated animals. Plasma concentrations were higher than concentrations in synovial fluid and there was a slight accumulation of carprofen during the period of treatment. Samples from the contralateral non-treated joint, collected from two animals of the application group in week 6, contained slightly less carprofen than the samples from the treated joints. In conclusion this study demonstrated that carprofen could be transported transcutaneously with the new device and repeatable plasma- and synovial concentrations were produced.

2

Fouché, Nathalie Elisa. Konzentrationsanalysen und pharmakokinetische Betrachtungen transdermaler Applikation von Carprofen mit Hilfe einer neuartigen Applikationstechnik. 2012, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Konzentrationsanalysen und pharmakokinetische Betrachtungen
transdermaler Applikation von Carprofen mit Hilfe einer neuartigen
Applikationstechnik**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Nathalie Elisa Fouché
Tierärztin
aus Dudweiler (Saarbrücken), Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. med. vet. Claudia Spadavecchia, Korreferentin

Zürich 2012

Meiner Familie

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Thematische Einführung	3
1.2 Zielsetzung der Arbeit	4
1.3 Versuchsanordnung.....	4
1.4 VetDrop® 1500.....	6
2 Literaturübersicht.....	7
2.1 Pharmakokinetik	7
2.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika, speziell Carprofen	10
2.3 Transkutane Applikationen	18
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Vorversuch	22
3.2 Aufbau der Studie	23
3.3 Anwendung von VetDrop 1500	24
3.4 Versuchstiere	25
3.5 Operation	26
3.5.1 Vorbereitung	26
3.5.2 Präoperative Versorgung.....	26
3.5.3 Anästhesie.....	27
3.5.4 Lagerung und Desinfektion.....	28
3.5.5 Chirurgischer Eingriff	29
3.6 Postoperatives Management	30
3.7 Probengewinnung und Untersuchungsmethoden.....	31
3.7.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben	31
3.7.2 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung	32
4 Resultate	38
4.1 Tiere und Operationsverlauf	38
4.2 Probenentnahmen und –behandlung bis zur Analyse	39
4.3 Analysetechnik.....	39
4.4 Vorversuch.....	39
4.5 Ergebnisse Hauptversuch- Deskriptiver Teil.....	40
4.5.1 Gruppe 3 – Applikation mit Carprofen	40
4.5.2 Gruppe 4 – Applikation mit Carprofen und Chitooligosacchariden	42
4.5.3 Vergleich der Applikationsgruppen	44
4.5.4 Gruppe 6 – Injektion mit Carprofen (Rimadyl®)	45
4.5.5 Vergleich Applikations- und Injektionsgruppen.....	45
4.6 Ergebnisse Hauptversuch- Pharmakokinetische Betrachtungen	46
5 Diskussion	46
5.1 Einleitung	46
5.2 Wissenschaftlicher Hintergrund	47
5.3 Resultate.....	48
5.4 Studiendesign	57

Inhaltsverzeichnis

5.4.1	Versuchsmodell.....	57
5.4.2	Behandlungsprotokoll.....	58
5.4.3	Beprobungsprotokoll	59
5.5	Schlussfolgerung	59
5.6	Weiterführende Studien.....	60
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Abkürzungsverzeichnis.....	68
8	Anhang.....	69
8.1	Tabellen.....	69
8.1.1	Behandlung	69
8.1.2	Beprobung.....	70
8.1.3.	Ergebnisse der Carprofen-Konzentrationen.....	72
8.2	Diagramme	79
8.2.1	Vorversuch	79
8.2.2.	Gruppe 3	79
8.2.3.	Gruppe 4	81
8.2.4.	Gruppe 3 und 4	82
8.2.5.	Gruppe 6	83
8.3	Abbildungen.....	84
<hr/>		
9	Danksagung.....	86

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden Plasma- und Synovialanalysen von Carprofen nach der transdermalen Behandlung mit einem neuartigen Applikationssystem (VetDrop®) bei Schafen durchgeführt. Von den insgesamt sechs Versuchstieren wurden vier Tiere transkutan mit einer carprofenhaltigen Mikroemulsion behandelt und vergleichend zwei Tiere intravenös mit 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®). Bei den Tieren der Applikationsgruppe wurden Plasma- und Synovialproben gewonnen, bei den Tieren der Injektionsgruppe lediglich Plasmaproben. Die Analyse der Proben geschah mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie.

Sowohl in den Plasma- als auch in den Synovialproben der transkutan behandelten Tiere konnte Carprofen nachgewiesen werden. Die Werte der Plasmakonzentrationen lagen über den Werten der Synovialkonzentrationen und es kam im Verlauf der Behandlungsperiode zu einer leichten Akkumulation von Carprofen. Die in Woche 6 bei zwei Tieren gewonnenen Proben der kontralateralen Kniegelenke enthielten nur eine geringfügig niedrigere Carprofen-Konzentration als die Synovialproben der behandelten Gelenke.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des VetDrop® Applikationssystems Carprofen transkutan transportiert wird und wiederholbare Plasma- und Synovialkonzentrationen erreicht werden.

Summary

The aim of the study was to evaluate the percutaneous transport of carprofen into plasma and synovial fluid after treatment with a new device for regional transdermal application (VetDrop®) in sheep. For this purpose four animals of the six animals in the study were treated transdermally with a microemulsion containing carprofen and two animals were treated intravenously with 4 mg/kg carprofen (Rimadyl®) as a control group. Plasma and synovial samples were collected in the animals treated transcutaneously and plasma samples in the animals treated intravenously. Concentration analyses were performed using High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry.

Carprofen was found in plasma and synovial fluid samples of all transcutaneously treated animals. Plasma concentrations were higher than concentrations in synovial fluid and there was a slight accumulation of carprofen during the period of treatment. Samples from the contralateral non-treated joint, collected from two animals of the application group in week 6, contained slightly less carprofen than the samples from the treated joints.

In conclusion this study demonstrated that carprofen could be transported transcutaneously with the new device and repeatable plasma- and synovial concentrations were produced.

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

Nichtsteroidale Entzündungshemmer (NSAID's, Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs) finden in der Veterinärmedizin eine breite Anwendung in der Therapie entzündlicher Prozesse sowie der Behandlung respiratorischer Erkrankungen bei Wiederkäuern. Da ihre Wirkung auf einer Hemmung der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) beruht, werden neben den erwünschten therapeutischen Effekten auch systemische Nebenwirkungen hervorgerufen. Diese können eine Belastung für den Gesamtorganismus darstellen und es kann zu gastrointestinalen Blutungen, intestinalen Ulzera, aplastischer Anämie, Thrombozyteninhibition und veränderter Nierenfunktion kommen. Um die Plasmakonzentration des jeweiligen Wirkstoffes möglichst niedrig zu halten und dadurch die Nebenwirkungen zu reduzieren kann deshalb zur Behandlung lokal begrenzter Erkrankungen die gezielte topische Therapie in Betracht gezogen werden, zum Beispiel mittels transkutaner Arzneimitteltherapie. Eine Studie hat gezeigt, dass die Anwendung topischer NSAIDs zu einer geringeren Plasmakonzentration führt als systemisch verabreichte entzündungshemmende Medikamente (1). Zeitnah zur Applikation scheint es aber möglich zu sein, durch topisch applizierte Arzneimittel eine als schmerzlindernd angesehene Konzentration, die höher ist als die Plasmakonzentration, des Arzneimittels im lokalen Gewebe zu erreichen (2). Obwohl bereits versucht wurde festzustellen ob dies auch für Gelenke gilt, sind bis dato keine Studienergebnisse verfügbar.

Die Haut stellt aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften eine Barriere, nicht nur für nozive äussere Einflüsse, sondern auch für die meisten Arzneimittel dar. Aus diesem Grund sind eine Vielzahl von galenischen Darreichungsformen und Trägersubstanzen entwickelt worden, die den Transport von Arzneimitteln durch die Haut erleichtern sollen. Mikroemulsionen stellen solche Trägersubstanzen dar. Sie besitzen ein gutes

Solubilisierungsvermögen und gute Penetrationseigenschaften. Idee der topischen Anwendung der Mikroemulsion in Verbindung mit dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Carprofen in der vorliegenden Studie war es, lokal eine therapeutische Konzentration des Medikamentes zu erhalten, die mit möglichst niedriger systemischer Plasmakonzentration einhergeht um Nebenwirkungen zu vermeiden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob mit Hilfe eines von der Firma MedDrop Technology AG (Thundorf, Schweiz) entwickelten Gerätes (Abb. 1) zur transkutanen Applikation von Arzneistoffen in Verbindung mit einer proprietären Vehikelemulsion eine therapeutisch wirksame Konzentration von Carprofen in einem entzündeten Gewebe erreicht werden kann. Als Modell wurde hierbei ein Knorpel- und Knochendefekt des Kniegelenkes beim Schaf gewählt und der Carprofen-Gehalt in der Synovia und im Plasma an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Durch diesen Versuch sollten erste Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Arzneistoffkonzentration in Plasma und Synovia über die Behandlungsdauer gewonnen werden. Zusätzlich sollten diese Ergebnisse mit Plasmakonzentrationen nach intravenöser Gabe von Carprofen verglichen werden.

1.3 Versuchsanordnung

Es handelte sich bei diesem Versuch um einen Vergleichsversuch mit Konzentrationsanalysen von intravenös und transkutan verabreichtem Carprofen in Blutplasma und Synovia von Schafen. Die Studie konzentrierte sich darauf, bei den transkutan behandelten Tieren die lokale Absorption des Carprofens in das behandelte Gelenk, die Aufnahme in die Blutbahn und die Distribution zu beschreiben. Zur Beurteilung der weiteren Verteilung im Körper wurden sporadisch die Carprofen-Konzentrationen in Synovialproben

des kontralateralen Kniegelenks ermittelt. Vergleichend wurden Plasmaproben von intravenös behandelten Tieren analysiert.

Die sechs Schafe der Studie waren Teil eines Grossprojektes bei welchem insgesamt 28 Tiere operiert wurden. Zu diesem Grossprojekt wurden die Tiere in sechs Gruppen eingeteilt (Tab. A).

Tabelle A: Gruppeneinteilung

Gruppe	Vehikel	Chitooligosaccharide	Carprofen	nur Sauerstoff	Carprofen i.v. (Rimadyl®)
1	x				
2	x	x			
3	x		x		
4	x	x	x		
5				x	
6					x

Bei allen Tieren wurde initial ein osteochondraler Defekt auf dem medialen Kondylus des Femurs gesetzt und sie wurden mit Ausnahme von den zwei intravenös therapierten Tieren (Gruppe 6) anschliessend 6 Wochen lang dreimal wöchentlich transkutan behandelt. Bei einer Kontrollgruppe (Gruppe 5) fand die Applikation nur mit Sauerstoff statt. Bei den anderen Tieren wurden Mikroemulsionen verwendet. Je nach Gruppe enthielt die Mikroemulsion nur die Vehikelsubstanz (Gruppe 1) oder Vehikelsubstanz in Verbindung mit Chitooligosacchariden (Gruppen 2 und 4) und/oder Carprofen (Gruppen 3 und 4). Die Schafe lebten weitere 6 Wochen ohne Behandlungen ehe sie nach insgesamt 12 Wochen geschlachtet wurden. Alle 28 Tiere wurden regelmässig klinisch untersucht und es wurden zusätzlich analgesiometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde bei allen Tieren in der Woche nach der Operation zweimal täglich eine Schmerzbeurteilung durchgeführt. Ausserdem wurde vor und nach den Applikationen jeweils mittels einer Sonde der Firma Oxford Optronix Ltd. (OxyLite™, OxyFlo™, Oxford, United Kingdom) subkutan die lokale Sauerstoffversorgung in mmHg, die Perfusion in BPU (Blood Perfusion Units) und die Temperatur in °C gemessen.

Bei allen Tieren des Grossprojektes wurden wöchentliche Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Bei dieser Gelegenheit wurde durch eine Gelenkspunktion Synovialflüssigkeit aus der medialen Gelenksaussackung entnommen und in ein steriles Probengefäss übertragen. Die wöchentliche Gewinnung von Synovia bei 6 Tieren diente der Bestimmung der Carprofen-Konzentration im Rahmen dieser Dissertation. Bei den übrigen Tieren wurde in Woche 6 der Behandlungsphase einmalig Synovia zur Bestimmung von Entzündungsparametern entnommen.

Post mortem wurden der Knorpel und der Knochen makroskopisch beurteilt und es wurden Röntgenaufnahmen angefertigt. Ausserdem wurden/werden histologische, histomorphometrische und immunhistochemische Untersuchungen sowie Microarray-RNA-Analysen durchgeführt.

Gegenstand dieser Dissertation sind ausschliesslich die Carprofen-Daten. Alle anderen Resultate werden anderweitig publiziert bzw. sind Gegenstand anderer Dissertationen.

1.4 VetDrop® 1500

Das Gerät VetDrop® 1500 (Abb. 1) wurde von der Firma MedDrop Technology AG (Thundorf, Schweiz) für die transdermale Applikation von natürlichen und synthetischen Arzneistoffen entwickelt. Es besteht aus einem Sauerstoffkonzentrator und einem Applikationssystem und wird in Verbindung mit speziell entwickelten Vehikelsubstanzen verwendet. Der Sauerstoffkonzentrator extrahiert aus atmosphärischer Luft hochkonzentrierten und hochreinen Sauerstoff welcher als Treib- und Trägergas dient. Der Sauerstoff wird zunächst in einem Druckbehälter gespeichert und strömt dann während der Behandlung über einen Druckminderer und durch einen Behandlungsschlauch zum eigentlichen Applikationssystem.

Das Applikationssystem (Abb. 2) dient der Feinstdispersion von Arzneimitteln und Sauerstoff wodurch die Penetration der Arzneimittel durch die Haut optimiert werden soll.

Es besteht aus einem Arzneimittelreservoir, das sich innerhalb eines Gasbehälters befindet und über den Arzneimittelreservoireinlass zum Beispiel mit der Vehikelemulsion befüllt werden kann. Der Sauerstoff gelangt über einen Gasanschluss in den Gasbehälter. Das Arzneimittelreservoir wird von diesem Gasbehälter umgeben und mündet in einen Düsenkopf, in dem eine Zerstäubungsdüse enthalten ist. Der Sauerstoff dient als Treibgas, das die Mikroemulsion unter Druck durch die Düse transportiert und sich gleichzeitig auch mit dieser vermischt (Dispersion). Der Aufbau der Düse macht sich den sogenannten Venturi-Effekt zunutze um die Mikroemulsion in feinste Tröpfchen zu zerstäuben. Die Tröpfchengrösse liegt hierbei im Bereich von 120 (100-140) nm. Sie wird über eine Nadelspitze reguliert, die den Querschnitt der Düsenöffnung und dadurch die Tröpfchengrösse verändert.

Bei den verwendeten Vehikelemulsionen handelt es sich um proprietäre Rezepturen der Firma Arivine Pharma AG (MedVital Serum, Arivine Pharma AG, Thundorf, Schweiz). Die Vehikelsubstanzen basieren auf speziellen Öl-in-Wasser- und Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen, in deren Wasserphase die aktiven Wirkstoffe eingearbeitet werden. Hierfür werden die Wirkstoffe zunächst in Addukten mit eigens entwickelten penetrationsunterstützenden Hilfsstoffen verbunden und dann in ihrer Oberflächenspannung gebrochen. Die Wirkstoffe werden vollständig gelöst und es kommt zu keiner Partikelbildung, wodurch die risikolose Anwendung im Mikro- und Nanobereich möglich wird.

2 Literaturübersicht

2.1 Pharmakokinetik

Die **Pharmakokinetik** ist ein Teilgebiet der Pharmakologie. Sie befasst sich mit der zeitlichen Änderung der Konzentration eines Pharmakons im Organismus (während die Pharmakodynamik die Wirkungen eines Arzneistoffes auf den Körper beschreibt) (3). Hierbei spielen vier verschiedene Aspekte eine Rolle: Die Aufnahme des Arzneimittels in die Blutbahn (Absorption), die Verteilung

im Organismus (Distribution), die Verstoffwechslung (Metabolismus) und die Ausscheidung (Exkretion).

Um die Verteilung von Arzneimitteln im Organismus besser erklären zu können bedient man sich sogenannter **Kompartimentmodelle**. Diese teilen den Körper in hypothetische Verteilungsräume (Körperflüssigkeits- und Geweberäume) ein, in die das Arzneimittel aufgenommen, in denen es verteilt und aus denen es wieder ausgeschieden wird. Die Verteilung der meisten Arzneimittel kann mit dem sogenannten offenen Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Bei diesem Modell wird der Körper in zwei Kompartimente eingeteilt wobei das zentrale Kompartiment aus dem Blut und stark durchbluteten Geweben besteht und das periphere Kompartiment aus weniger gut durchbluteten Geweben (4). Man spricht von einem offenen System da die aufgenommenen Stoffe auch wieder aus dem Organismus eliminiert werden.

Das scheinbare **Verteilungsvolumen** ist eine hypothetische Grösse (4) und errechnet sich aus dem Quotienten aus der gegebenen Dosis eines Wirkstoffes und der Konzentration im Blutplasma. Es ist charakteristisch für jedes Arzneimittel und beschreibt die ideale Verteilung eines Arzneimittels im Gesamt-Körperwasser. Verbleibt ein Pharmakon zum grossen Teil im intravasalen Raum so ergibt dies für das Verteilungsvolumen eine sehr niedrige Grösse und umgekehrt. Im Regelfall verhält sich die nach der Verteilung erreichte Endkonzentration somit umgekehrt proportional zur Grösse des Verteilungsvolumens und proportional zur gegebenen Dosis (3). Viele Arzneimittel gehen eine reversible **Plasmaproteinbindung**, zumeist mit Albumin, ein. Diese sorgt dafür, dass die Konzentration des Arzneimittels im Plasma sehr hoch sein kann, da die gebundenen Stoffe den Intravasalraum nicht verlassen können. Gleichzeitig ist die pharmakologische Wirksamkeit im Bindungsfall herabgesetzt weil nur der freie Anteil des Arzneimittels zur Wirkung beiträgt. Sind alle Proteinbindungstellen besetzt, so kann es trotz einer

nur geringen Erhöhung der Dosis zu einer massiven Wirkungszunahme kommen (5). Man spricht in diesem Fall von einer nichtlinearen Pharmakokinetik (4). Im Gegensatz dazu handelt es sich um eine lineare Kinetik wenn die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve mit steigender Dosis linear zunimmt (6).

Die **Halbwertszeit** ist die Zeit, nach welcher die Konzentration des Pharmakons auf die Hälfte des ursprünglich gemessenen Wertes abgesunken ist. Die **Clearance** gibt dementsprechend an, wie viel Milliliter Blut pro Zeiteinheit von dem jeweiligen Stoff gereinigt werden (4). Sie beinhaltet sämtliche, an der Elimination eines Pharmakons beteiligten Prozesse: Ausscheidung, enzymatische Inaktivierung und Speicherung (3).

Ein weiteres rechnerisches Hilfsmittel der Pharmakokinetik ist die **Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve; AUC)**. Man misst den Konzentrationsverlauf eines Arzneimittels im Blut nach der einmaligen Gabe und trägt die Pharmakonkonzentration im Plasma gegen die Zeit auf. Die Fläche unter der Kurve entspricht der Dosis des Arzneimittels.

Ein wichtiger Aspekt, der generell bei pharmakokinetischen Überlegungen nicht vergessen werden sollte, ist die Tatsache, dass trotz weitestgehend gleicher physiologischer Voraussetzungen innerhalb einer Spezies oder Altersgruppe jeder Organismus ein eigenes System darstellt und somit einen individuellen Stoffwechsel aufweist. Sowohl das Alter, Gewicht und Geschlecht als auch der Gesundheitszustand eines Patienten können physiologische Vorgänge im Körper eines Individuums dahingehend verändern, dass auch die pharmakokinetischen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt von einem Individuum auf das Andere übertragen werden können (4).

Die **Pharmakokinetik transdermaler Arzneistoffe** unterscheidet sich von der Pharmakokinetik enteral oder parenteral verabreichter Arzneimittel vor allem im Hinblick auf die Absorption. Die Effektivität der Hautbarrieren variiert mit

Hautdicke, anatomischer Lokalisation, Feuchtigkeitszustand der Haut, Behaarung, Hauttemperatur und vielen weiteren Faktoren. Daher ist es nicht erstaunlich, wenn in Studien pharmakokinetischer Betrachtungen die Plasmaspiegel grosse Variabilitäten aufweisen. Es gibt Forscher im Bereich der Pharmakokinetik, die von derart grossen Variationen ausgehen, dass sie statistische Erhebungen für unzulässig halten und stattdessen die Rohdaten darstellen (PD Dr. Olivier Levionnois, Dipl. ECVAA, Universität Bern, Schweiz, persönliche Mitteilung).

Bei der Verteilung des Arzneimittels im Körper kann es nach lokaler Therapie initial zu höheren Wirkstoffspiegeln in Geweben als im Plasma kommen und auch die erhöhte Arzneimittelkonzentration in lokalen Blutgefässen ist eine Besonderheit der transkutanen Arzneimitteltherapie (7).

Verstoffwechslung und Ausscheidung verlaufen weitestgehend analog zu systemisch verabreichten Arzneimitteln.

2.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika, speziell Carprofen

Nichtsteroidale Antiphlogistika bewirken eine Hemmung bestimmter Enzyme die massgeblich an der Entstehung von Entzündungsprozessen beteiligt sind. Eine entscheidende Rolle spielen diese in der Hemmung der Enzyme Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und COX-2). Beide Enzyme werden im Organismus konstitutiv exprimiert und erfüllen physiologische Funktionen, unter anderem in Niere, Magen, Thrombozyten und Gefässendothel. COX-2 wird zusätzlich durch proinflammatorische Stoffe induziert und katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine und weitere Eicosanoide welche typische Entzündungssymptome hervorrufen (8).

Die chemischen Eigenschaften der Wirkstoffe erlauben eine Einteilung in folgende Gruppen: Salicylsäurederivate, Propionsäurederivate, Essigsäurederivate, Fenaminsäurederivate, Saure Enole, Oxicame, Anilinderivate und Anthranilsäurederivate (5).

Bei **Carprofen** handelt es sich um ein nichtsteroidales Antiphlogistikum aus der Gruppe der Aryl-Propriionsäure-Derivate. Die chemische Bezeichnung ist 6-Chloro-alpha-Methyl-Carbazole-2-Acetyl-Säure (9). Das Molekül kann sowohl als R- als auch als S-Enantiomer vorliegen (10, 11) wobei es sich bei den handelsüblichen Präparaten um ein Racemat handelt (12). Carprofen wird in der Veterinärmedizin eingesetzt und ist unter den Handelsnamen Canidryl, Norocarp® oder Rimadyl® erhältlich. Es kann bei einer Vielzahl von Spezies eingesetzt werden, sowohl in der oralen als auch in der parenteralen Darreichungsform. Die Dosierungsempfehlungen für unsere Haussäugetiere liegen je nach Spezies zwischen 0.7 mg/ml und 4 mg/ml (10, 13-15).

Verglichen mit anderen nichtsteroidalen Entzündungshemmern wird Carprofen hinsichtlich der Nebenwirkungen als gut verträglich eingestuft (16, 17). Aus diesen Gründen kommt in der Veterinärmedizin Carprofen häufig zum Einsatz. Verschiedene tierexperimentelle Studien untersuchten die Nebenwirkungen nach ein- oder mehrmaliger Gabe unterschiedlicher Dosierungen von Carprofen. In einer Studie mit Mäusen konnten lediglich bei der Verwendung sehr hoher Dosierungen intestinale Ulzera induziert werden (18). Bei Katzen konnte nach der einmaligen Injektion von 4 mg/kg Carprofen endoskopisch keine Blutung oder Ulzeration des Magens festgestellt werden. Zusätzlich durchgeführte hämatologische und blutchemische Untersuchungen zeigten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen der Parameter bei diesen Katzen (19). Hunde tolerierten die Gabe von 9 mg/kg Carprofen über eine Zeitspanne von 14 Tagen ohne klinische gastrointestinale Symptomatik oder signifikante Abweichungen der hämatologischen und blutchemischen Parameter zu zeigen (20).

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Studien zur Bestimmung der **pharmakokinetischen Eigenschaften von Carprofen** bei verschiedenen Spezies durchgeführt (10, 12, 14, 19-24). Im Rahmen dieser Studien wurden die Tiere

intravenös mit Carprofen behandelt und es wurden dann Konzentrationsanalysen durchgeführt wobei entweder die racemische Form oder die einzelnen Enantiomere von Carprofen analysiert wurden. Beim Pferd dominierte 24 Stunden nach der Injektion von racemischem Carprofen das R-Enantiomer im Blutplasma im Vergleich zum S-Enantiomer im Verhältnis 82:18 (25). Es war ausserdem das vorherrschende Enantiomer in Trans- und Exsudaten (10). Auch beim Hund (21), bei der Katze (14), beim Kalb (26) und beim Schaf (24) war das R-Enantiomer die vorherrschende Form im Plasma nach Injektion racemischen Carprofens. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlich schnellen Verstoffwechslung der beiden Enantiomere. In einer weiteren tierexperimentellen Studie beim Pferd wurden nach der Gabe von 0.7 mg/kg racemischen Carprofens die Plasmakonzentration der einzelnen Enantiomere und vergleichend die glucuronidierte Form der Enantiomere in Plasma und Gallenflüssigkeit gemessen. Im Plasma lag das R:S-Verhältnis nach 72 Stunden bei 90:10 wohingegen die glucuronidierte Form von S-Carprofen sowohl im Plasma als auch in der Gallenflüssigkeit überwog (27). Bei der Ratte verhält es sich genau umgekehrt als bei den vorher genannten Tierarten. Das R-Enantiomer wird bei diesen Tieren etwa doppelt so schnell eliminiert wie das S-Enantiomer und führt somit zu einer Akkumulation des pharmakologisch aktiveren S- Enantiomers im Blut (28, 29). Beim Menschen gibt es kein eindeutig vorherrschendes Enantiomer im Plasma (30).

Wird anstatt der racemischen Form nur eines der Enantiomere verabreicht, so ist lediglich dieses Enantiomer im Plasma nachweisbar. Es scheint demnach bei Carprofen im Gegensatz zu anderen nichtsteroidalen Antiphlogistika keine chirale Inversion stattzufinden, weder bei Tieren (21, 24, 29), noch beim Menschen (31).

Carprofen hat ein geringes Verteilungsvolumen (19) und eine niedrige Clearance-Rate (12, 20). Die publizierte Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) beträgt beim Schaf 26.1 ± 1.1 Stunden (nach der Gabe von 0.7 mg/kg Caprofen) bzw.

33.7 ± 3.1 Stunden (nach der Gabe von 4 mg/kg Carprofen) (12), beim Pferd 18.1 Stunden (nach der Gabe von 0.7 mg/kg Carprofen) (32) bzw. 14.5 – 31.4 Stunden (nach der Gabe von 3.5 mg/kg Carprofen) (33), beim Hund 3.22 - 11.77 Stunden (nach der Gabe von 0.7 mg/kg Carprofen) (20) und bei der Katze 9 - 49 Stunden (nach der Gabe von 4 mg/kg Carprofen) (19).

In den üblicherweise verwendeten Dosierungen (0.7 - 4 mg/kg Körpergewicht) ist die Area under the Curve (AUC) abhängig von der gegebenen Dosis. Dies bedeutet, dass die Plasmakonzentration von Carprofen direkt proportional zur gegebenen Dosis ist (12, 20, 34). Die Verteilung von Carprofen im Körper lässt sich mittels eines Zwei-Kompartiment-Modells beschreiben (19). Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Enantiomere separat so entspricht die Verteilung des S-Enantiomers der eines Zwei-Kompartiment-Modells und die des R-Enantiomers der eines Drei-Kompartiment-Modells (24).

Eine Studie beschreibt die Penetration von Carprofen in entzündlich und nicht-entzündlich bedingte Körperflüssigkeiten in einem sogenannten tissue-cage-Modell beim Hund (21). Die Penetration von Carprofen in entzündliches Exsudat erfolgte in dieser Studie schneller als in nicht-entzündliches Transsudat wobei die Maximalkonzentrationen in beiden Körperflüssigkeiten gleich hoch waren. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass es durch die Entzündung zu einer Vasodilatation und aufgrund einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität zu einem Proteinverlust in das Exsudat kommt. Dadurch kann sich Carprofen aufgrund seiner hohen Plasmaproteinbindung anreichern (11, 21). Initial waren in der Studie die Konzentrationen in Trans- und Exsudaten niedriger als die Plasmakonzentration, nach 24 Stunden hatte sich dieses Verhältnis jedoch umgekehrt. Carprofen hat demnach eine längere Eliminationszeit aus Trans- und Exsudaten als aus dem Plasma (21). Beim Menschen wurde die Peak-Konzentration in nicht-entzündlicher Synovia nach der oralen Gabe von 100 mg Carprofen nach ca. 4 Stunden gemessen wohingegen die Peak-Konzentration

bei Patienten mit Arthritis erst verzögert nach 9-12 Stunden nachgewiesen erreicht wurde (35).

In einer weiteren tierexperimentellen Studie von Armstrong et al. wurden nach der intravenösen Gabe von Carprofen beim Pferd niedrigere Wirkstoffkonzentrationen in der Synovia als im Plasma gefunden. Dies könnte ebenfalls mit der hohen Plasmaproteinbindung zusammenhängen, die einen Transport des Wirkstoffes durch die Synovialmembran erschwert (22).

Die Metabolisierung von Carprofen findet grösstenteils in der Leber mittels Konjugation und Oxidation statt (36). Carprofen zeigt ausserdem beim Menschen (37), sowie bei verschiedenen Tierspezies (12, 38) enterohepatisches Recycling. In einer Studie mit Schafen kam es 6-8 Stunden nach der Injektion mit 4 mg/kg Carprofen bei vier von fünf Tieren zu einem leichten Wiederanstieg der Plasmakonzentration (12). Bei Hunden konnte ebenfalls enterohepatisches Recycling nachgewiesen werden wobei in erster Linie das S-Enantiomer rezykliert wurde (38). Je nach Spezies variiert der Anteil der Metaboliten von Carprofen, welche über den Kot oder über den Urin ausgeschieden werden. Bei Hunden werden 70% über den Kot und 8-15% über den Urin ausgeschieden. Bei Ratten ist das Verhältnis 60-75% zu 20-30%. Umgekehrt verhält es sich beim Menschen wo 30-40% über den Kot ausgeschieden werden und 50-60% über den Urin. Nur ein kleiner Anteil (< 5%) des Pharmakons wird beim Menschen unverändert wieder ausgeschieden (34).

Weitere Studien befassten sich mit der Erforschung der **analgetischen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Carprofen** im Vergleich zu anderen Medikamenten. Die entzündungshemmende, schmerzlindernde und fiebersenkende Wirkung von Carprofen ist vergleichbar mit der von Indomethacin und stärker als die von Phenylbutazon und Acetylsalicylsäure in verschiedenen Entzündungsmodellen (9).

Der Wirkmechanismus von Carprofen ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Carprofen zeigt gute anti-inflammatorische Wirkung im Tiermodell (16, 25) und auch die analgetische Komponente dieses Wirkstoffes scheint zum grossen Teil auf entzündungsbedingten Schmerz beschränkt zu sein (18). Allerdings entfaltet Carprofen auch eine schmerzlindernde Wirkung wenn keine entzündlichen Veränderungen vorliegen (39). Eine experimentelle Studie bei Schafen zeigte, dass die Vorbehandlung mit Carprofen den durch akute chirurgische Reize ausgelösten Anstieg der mittleren Serotonin-Konzentration im Liquor cerebrospinalis hemmen kann. Carprofen besitzt demnach neben dem antiinflammatorischen Effekt wahrscheinlich - zumindest teilweise - auch eine zentrale analgetische Wirkung (39). In einer ebenfalls beim Schaf durchgeführten Studie konnte durch die Gabe von 0.7 mg/kg Carprofen die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie deutlich abgeschwächt werden (40). Beim Pferd scheint die zur Analgesie benötigte Dosis von Carprofen (0.7 mg/kg) geringer als die zur Entzündungshemmung benötigte Dosis (4 mg/kg) zu sein (10, 41). Bei dieser Tierart konnte in klinischen Studien eine bis zu 24 Stunden anhaltende analgetische Wirkung nach der Gabe von 0.7 mg/kg Carprofen nachgewiesen werden. Dies entsprach Plasmakonzentrationen von mindestens 1500 ng/ml Carprofen, die von den Autoren als Voraussetzung für eine Hemmung peripheren Schmerzes postuliert wurden (41). Bei Hunden (42) und Katzen (43) wurde die analgetische Wirkung von Carprofen nach Ovariohysterektomie untersucht. Bei beiden Tierarten konnte eine schmerzstillende Wirkung von Carprofen nach der subkutanen Injektion von 4 mg/kg Carprofen bestätigt werden. Im Gegensatz zu der von Schatzmann et al. durchgeführten Studie bei Pferden scheint die schmerzstillende Wirkung von Carprofen, zumindest bei Hunden, allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Plasmakonzentration zu stehen. Bei dieser Studie spielte der Zeitpunkt der Injektion (präoperativ/postoperativ) eine grössere Rolle als die Plasmakonzentration selbst. Tiere, die präoperativ mit Carprofen

behandelt wurden, zeigten deutlich weniger Schmerzen als Tiere, die nur postoperativ injiziert wurden (42).

Hinsichtlich der entzündungshemmenden Wirkung von Carprofen konnte gezeigt werden, dass Carprofen bei den meisten Tierarten, im Gegensatz zu anderen nichtsteroidalen Antiphlogistika, geringere Eigenschaften als COX-Inhibitor hat (18, 20, 26, 32). Das ist vermutlich der Grund für die relativ hohe therapeutische Sicherheit von Carprofen; andererseits legt es die Vermutung nahe, dass der antiinflammatorische Effekt von Carprofen zumindest teilweise auf einem anderen Mechanismus beruht (10). Bei in-vitro Versuchen mit caninen und equinen Chondrozyten zeigte Carprofen eine hemmende Wirkung auf die Prostaglandin-E₂-Synthese (44, 45). Die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase in-vivo scheint spezies- und dosisabhängig. Beim Schaf, bei der Katze und beim Pferd scheint der entzündungshemmende Effekt von Carprofen (4 mg/kg) zumindest teilweise auf einer Hemmung der Cyclooxygenase zu beruhen (10, 14, 24, 46). Die intravenöse Gabe von 4 mg/kg Carprofen führte bei Schafen zu einer signifikanten Reduzierung der Thromboxan B₂ (TxB₂)- und Prostaglandin E₂-Konzentration im Exsudat (46). Bei Katzen führte die intravenöse oder subkutane Injektion mit 0.7 mg/kg Carprofen zu keiner Hemmung des TxB₂ und lediglich eine Erhöhung der Dosis auf 4 mg/kg rief eine milde Hemmung des TxB₂ hervor (14).

Die beim Pferd empfohlene Dosis von 0.7 mg/kg Carprofen führte zu einer geringen Hemmung der COX-1 und COX-2-Aktivität. In höheren Dosen (4 mg/kg) führte Carprofen beim Pferd zu einer Senkung von Thromboxan B₂ (TxB₂) im Serum. Die Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Konzentration im Exudat wurde ebenfalls deutlich gesenkt und es kam zu einer milden Hemmung der Leukotriene (LTB₄) und der β -glucuronidase (10). Beim Hund führte oral verabreichtes Carprofen (0.7 mg/kg) zu keiner Verringerung des Serum-Thromboxans (20). In einer späteren Studie mit Hunden konnte gezeigt werden,

dass auch bei höher dosierter Anwendung racemischen Carprofens (4 mg/kg) oder der einzelnen Enantiomere (je 2 mg/kg) keine Konzentrationsreduktion von TxB_2 im Blut oder Prostaglandin E_2 und 12-Hydroxyeicosatetranoischer Säure (12-HETE), einem Metaboliten der Arachidonsäure, im Exudat erfolgte (21). Auch beim Kalb hatte die intravenöse Behandlung mit 0.7 mg/kg Carprofen keinen Effekt auf die Prostaglandin E_2 - oder die 12-HETE-Konzentration im Exsudat (26). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass Carprofen bei diesen Tierarten an einer noch unbekannt Stelle in das Entzündungsgeschehen eingreift (21, 23, 26).

Die publizierten Studienergebnisse weichen stark voneinander ab wenn es um die Frage nach einer preferentiellen COX-2-Hemmung von Carprofen geht. In einer in-vitro-Studie mit caninen Thrombozyten und Makrophagen zeigte Carprofen innerhalb einer Gruppe ausgewählter NSAIDs (u.a. Carprofen, Nimesulid, Tolfenaminsäure, Meclofenaminsäure) die stärkste COX-2-Selektivität (100 mal stärkere Hemmung als COX-1) (47), wohingegen die Ergebnisse einer anderen in-vitro-Studie mit caninen Makrophagen suggerieren, dass Carprofen eine gerade mal 1.75-fache Hemmung des COX-2- im Vergleich zum COX-1-Enzym aufweist (48). Dem S-Enantiomer wird hinsichtlich der COX-2-Hemmung eine stärkere relative Wirkung zugeschrieben (24, 46, 47, 49).

Desweiteren wird Carprofen in niedrigen Dosierungen ein direkter **positiver Effekt auf Gelenksknorpel** nachgesagt wobei auch hier der genaue Wirkmechanismus nicht bekannt ist (49). Eine in-vitro Studie mit caninen Chondrozyten konnte aufzeigen, dass Carprofen in einer Dosierung von 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ zu einer signifikanten Erhöhung der Glykosaminoglycan-Syntheserate und zu einer vermehrten Produktionsrate von Knorpelmatrix führte, während bei Dosierungen ab 20 $\mu\text{g/ml}$ ein hemmender Effekt nachgewiesen wurde (44). Equine Chondrozyten reagieren auf Carprofen indem sie das $^{35}\text{SO}_4$ -Isotop, ein

Assay für eine Proteoglycan-Untereinheit, inkorporieren. Dies gilt als Nachweis für eine Veränderung der Proteoglycan-Synthese durch die Chondrozyten. Die hierfür benötigte Dosis lag in einer von Fream et al. publizierten Studie zwischen 1.25 und 25 µg/ml Carprofen. Im Gegensatz dazu kam es bei einer Dosierung von 250 µg/ml Carprofen zu einer nahezu vollständigen Hemmung der ³⁵SO₄-Inkorporation. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das S-Enantiomer von Carprofen zu einer intensiveren Stimulation der Chondrozyten führte als das R-Enantiomer oder racemisches Carprofen (49).

2.3 Transkutane Applikationen

Transkutane Applikationen finden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin breite Anwendung und zwar sowohl zur systemischen als auch zur lokalen Therapie. Topisch verabreichte nichtsteroidale Antiphlogistika führen zu niedrigeren Wirkspiegeln im Blut als systemisch verabreichte entzündungshemmende Medikamente (1) und können dennoch mit einer analgetisch-therapeutisch ausreichenden Konzentration des Arzneimittels im Gewebe einhergehen (2, 50).

Die Ergebnisse einiger Studien deuten darauf hin, dass nur ein sehr kleiner Anteil eines Arzneistoffes direkt durch die Haut in das Gelenk gelangt und der grössere Anteil über systemische Redistribution verteilt wird (51, 52). In diesen Studien aus der Humanmedizin wurden Patienten entweder bilateral transkutan an den Kniegelenken therapiert wobei auf einer Seite ein NSAID-Gel und auf der anderen Seite ein Placebo verwendet wurde (51), oder unilateral an einem Kniegelenk behandelt (52). Die Wirkspiegel in den Synovialproben waren trotz lokaler Therapie nur etwa halb so hoch wie im Plasma und es zeigte sich, dass die Werte von den in kontralateralen Gelenken entnommenen Proben sich nicht signifikant von denen der behandelten Gelenke unterschieden. Die Autoren vermuten, dass dies unter anderem damit zusammenhängen könnte, dass das topisch applizierte Arzneimittel nicht tief genug eindringen konnte um direkt das Gelenk zu erreichen. Studien mit

transkutan applizierter Salicylsäure bei Ratten ergaben, dass der Wirkstoff nur bis zu 3-4 mm durch direkte Gewebspenetration in die Haut eindringt (53). Der in tieferen Hautschichten erreichte Wirkspiegel wurde als Folge der systemischen Redistribution des Wirkstoffes angesehen. Dies ergab sich aus der Tatsache, dass die Wirkstoffkonzentration in oberflächlichen Hautschichten immer höher war als im Plasma oder in vergleichbaren Gewebeschichten nichtbehandelter Areale. Die Konzentrationen in der Faszie waren vergleichbar mit denen im Plasma und die Konzentrationen in tieferen Gewebsschichten waren schliesslich niedriger als im Plasma und nur leicht erhöht im Vergleich zur kontralateralen Faszie (54). Ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie mit Miniaturschweinen: Die perkutane Applikation von Flutrimazol führte hier zu einer Akkumulation des Wirkstoffes insbesondere in den oberflächlichen Hautschichten wohingegen auf die Penetration in tiefere Schichten nur geringfügige Hinweise vorhanden waren (55).

Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass ein direkter Transport von Arzneimitteln durch die Haut in tiefere Gewebeschichten möglich ist (2, 7, 56-60). Bei Schweinen, Hunden und Menschen konnte der transkutane Transport von Triethanolamin-Salicylat nachgewiesen werden (2, 57): 120 Minuten nach der topischen Behandlung wurden in der Muskulatur unterhalb des behandelten Hautareals bei Miniaturschweinen 13-fache Konzentrationen im Vergleich zur Plasmakonzentration nachgewiesen und 49-fache Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelter Muskulatur (57). Bei Hunden und Menschen fand ein direkter Transport des Wirkstoffes in das Gelenk und umliegendes Gewebe statt (2). Bei Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen konnte Diclofenac nach der transkutanen Therapie in der Synovialflüssigkeit und im regionalen Gewebe nachgewiesen werden (58). Bei Ratten wurde nach der topischen Applikation mit Piroxicam ein zweigipfeliges Konzentrationspeak in der Muskulatur der behandelten Schulter nachgewiesen (nach 4 und 12 Stunden). Im Plasma und in der kontralateralen Muskulatur

erfolgte der Konzentrations-Peak lediglich nach 12 Stunden (56). Eine Studie aus der Humanmedizin beschreibt mit Hilfe von kutaner Mikrodialyse nach lokaler Therapie höhere Arzneimittel-Konzentrationen in tieferen Gewebeschichten als im Plasma (7). Die transkutane Penetration in tiefere Gewebeschichten konnte beim Meerschweinchen für Indomethacin (59) und Ibuprofen (60) bestätigt werden.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass zahlreiche Hinweise darauf existieren, dass nichtsteroidale Antiphlogistika durch transkutane Applikationen Gewebe und/oder Plasmakonzentrationen erreichen, die in den Bereich der therapeutischen Wirksamkeit gehören.

Des Weiteren werden transkutane Arzneistoffe zu systemischen Therapie eingesetzt. Ziel der Therapie ist dabei nicht, lokal einen Wirkstoffspiegel zu erhalten, sondern eine über einen bestimmten Zeitraum möglichst konstante Plasmakonzentration des Arzneimittels zu erreichen. Eine Studie bei Schafen verglich die Plasmakonzentrationen von Fentanyl nach der intravenösen und transdermalen Applikation (61). Die eine Gruppe wurde intravenös mit 2.5 µg/kg Fentanyl behandelt und die andere Gruppe erhielt durchschnittlich 2.05 µg/kg/Std (entsprechend 12.8 ± 1.8 mg) Fentanyl in Form eines Pflasters. Die maximale Plasmakonzentration nach der Injektion von Fentanyl wurde nach 2 Minuten gemessen und lag bei 1647.7 pg/ml. Nach der transdermalen Applikation wurde die höchste Plasmakonzentration nach durchschnittlich 12 Stunden (4-24 Stunden) gemessen und lag bei 1.30 ng/ml. In dieser Studie lag die transdermal applizierte Dosis Fentanyl (12800 ± 1800 µg) deutlich über der intravenös gegebenen Dosis (130.8 ± 18.9 µg) und ging dennoch mit einer niedrigeren maximalen Plasmakonzentration einher als nach der Injektion (61).

Mikroemulsionen

Bei der transkutanen Arzneimitteltherapie ist die Wirksamkeit des Arzneimittels ebenso wichtig wie die Fähigkeit des Stoffes durch die Haut an

den Wirkort zu gelangen (62). Da die Haut sowohl über hydro- als auch lipophile Anteile verfügt, sollte das Medikament möglichst beide Eigenschaften aufweisen um eine bestmögliche Penetration zu ermöglichen. Bei vielen Medikamenten handelt es sich um stark hydrophile Substanzen. Deshalb wurden verschiedene Methoden wie z.B. Iontophorese oder Microneedle (63, 64) sowie Trägersubstanzen entwickelt, die den Transport erleichtern sollen. Ein Beispiel für solche Trägersubstanzen sind Mikroemulsionen, die die transkutane Penetration nichtsteroidaler entzündungshemmender Medikamente verbessern (65, 66). Der Begriff Mikroemulsion wurde 1959 von Schulman et al. ins Leben gerufen (67). Es handelt sich hierbei um Emulsionen die in der Regel aus drei bis vier Grundeinheiten bestehen (Wasser, Öl, Tensid, evtl. zusätzlich Cotensid) und deren Partikeldurchmesser sich im Nanometerbereich befindet (68). Mikroemulsionen besitzen ein gutes Solubilisierungsvermögen sowie gute Penetrationseigenschaften und zeichnen sich durch thermodynamische Stabilität aus (69). Eine Reihe von Studien befasste sich mit Mikroemulsionen und deren Einsetzbarkeit in der Medizin (69-73). Mikroemulsionen dienen in der Medizin insbesondere als Arzneimittelträger für die orale, topische und parenterale Therapie (68, 69). Es konnte eine verbesserte Löslichkeit gegenüber herkömmlichen Trägerstoffen, wie phosphatgepufferter Salzlösung aufgezeigt werden (71). Anhand von in-vitro Versuchen konnten ausserdem die guten Penetrationseigenschaften von in Mikroemulsionen gelösten, transkutan applizierten nichtsteroidalen Entzündungshemmern (74-78) und anderen hydrophilen Lösungen (73) nachgewiesen werden. Zusätzlich durchgeführte in-vivo Versuche bestätigten ebenfalls die penetrationsfördernden Eigenschaften von Mikroemulsionen (77, 79). Bei Mäusen wurde die antiphlogistische und analgetische Wirksamkeit transkutan, in Verbindung mit einer Mikroemulsion verabreichten Piroxicams nachgewiesen (79). In einer weiteren Studie wurden bei Ratten Plasmakonzentrationsanalysen nach der transkutanen Verabreichung von

Diclofenac in einer Mikroemulsion mit subkutan verabreichtem Diclofenac verglichen: Es stellte sich dabei heraus, dass nach der subkutanen Injektion initial etwas höhere Plasmakonzentrationen ($0.94 \mu\text{g/ml}$) erreicht wurden als nach der transdermalen Applikation ($0.7\text{-}0.9 \mu\text{g/ml}$). Diese Werte fielen jedoch relativ schnell wieder ab ($0.19 \mu\text{g/ml}$ nach 6 Stunden) wohingegen die Plasmakonzentrationen nach der transdermalen Behandlung mindestens 8 Stunden lang konstant blieben (77).

3 Material und Methoden

3.1 Vorversuch

Dieser Vorversuch diente dazu, anhand von Plasma- und Synovialanalysen nach der intravenösen und transkutanen Gabe von Carprofen, erste Ergebnisse zu erhalten um eine Optimierung der weiteren Studienplanung zu ermöglichen. Hierfür wurden Plasma- und Synovialproben von fünf Schafen aus einem anderen Projektes genommen.

Zwei dieser Tiere erhielten am Tag vor der Operation intravenös 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz). Bei beiden Tieren wurden intraoperativ Plasmaproben (20.5 bzw. 24.5 Stunden nach der Injektion) gewonnen. Anschliessend wurden die Tiere euthanasiert. Postmortem wurden Synovialproben, wenn möglich beider Kniegelenke entnommen (23.5 bzw. 26 Stunden nach der Injektion).

Bei drei weiteren Tieren wurden vor der Plasma-/Synovialprobenentnahme eine, zwei und fünf Applikationen mit je 0.4 ml VetVital Serum (Carprofen 12%- es handelt sich hierbei um die doppelte Dosierung im Vergleich zum Hauptversuch) an beiden Kniegelenken durchgeführt. Bei den Tieren, die mehrere Applikationen erhielten, wurden diese an aufeinanderfolgenden Tagen gemacht und nicht wie im Hauptversuch jeden zweiten Tag. Die Plasmaproben wurden wiederum intraoperativ entnommen (13, 16.5 und 18 Stunden nach der letzten Applikation) und die Synovialproben post mortem

aus beiden Kniegelenken gewonnen (15, 18 und 19.5 Stunden nach der letzten Applikation).

3.2 Aufbau der Studie

Diese experimentelle Studie erhielt vom kantonalen Veterinäramt die Bewilligungsnummer 193/2009. Sie wurde unter Berücksichtigung der gesetzlichen Bestimmungen des schweizerischen Tierschutzes und der moralisch-ethischen Verantwortlichkeit der Versuchsdurchführenden realisiert.

Sechs Versuchstiere waren in drei Gruppen zu je zwei Tieren eingeteilt.

Tabelle B: Gruppeneinteilung der sechs Versuchstiere

Schaf Nr.	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 6
5203	x		
5204	x		
5211		x	
5212		x	
5202			x
5217			x

Die Tiere der Gruppen 3 und 4 wurden transkutan mit dem Sauerstoffapplikationsgerät VetDrop® 1500 behandelt während Tieren der Gruppe 6 nur Carprofen intravenös appliziert wurde. Bei den Tieren der Gruppe 3 enthielt die Mikroemulsion Vehikel und Carprofen. Die Tiere der Gruppe 4 wurden mit einer Mikroemulsion behandelt, die Vehikel, Carprofen und Chitooligosaccharide enthielt.

Die erste Behandlung fand am Tag vor der Operation statt (Tag 0). Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere operiert (Tag 1). Die weiteren Behandlungen fanden an den Tagen 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 24, 26, 29, 31, 33, 36, 38 und 40 statt (Tab. 1.1).

Am Tag der ersten (Tag 0) und der zweiten Behandlung (Tag 3) wurden die Plasmaproben zu den Zeitpunkten -5, 15, 20, 30, 60 Minuten, 2, 3, 6 und 18 Stunden relativ zur Applikation gezogen, ausserdem am Tag 5, 12, 19, 26, 33 und 40 jeweils 6 Stunden nach der Applikation. Zusätzliche Plasmaproben

wurden zeitgleich mit der Gewinnung von Synovia entnommen (Tab. 2.1, Tab. 2.2).

Synovialflüssigkeit wurde zuerst einmal intraoperativ und in der postoperativen Phase einmal wöchentlich unter Ultraschallkontrolle (Tab. 2.4, Tab. 2.5) gewonnen.

Die Tiere der Gruppe 6 erhielten 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer AG, Zürich, Schweiz) intravenös im Abstand von 24 Stunden über einen Zeitraum von 4 Tagen, beginnend am Tag der Operation (Tab. 1.2).

Die Plasmaproben wurden am Tag 1, 2, 3, 4 und 5 zu den Zeitpunkten -5, 10, 60, Minuten und 3, 6 und 12 Stunden im Verhältnis zur Injektion gezogen. Zusätzlich wurden 2 weitere Plasmaproben jeweils an Tag 8 und 12 zum gleichen Zeitpunkt wie in den vorhergehenden Tagen die 10 Minuten nach Injektion gezogenen Proben genommen (Tab. 2.3).

3.3 Anwendung von VetDrop 1500

Zur Anwendung von VetDrop[®] wurde das Fell der Schafe geschoren und die Haut mit Alkohol entfettet. Die Applikation wurde immer 15 Minuten lang durchgeführt. Der VetDrop[®]-Applikator wurde dabei mit einem Abstand von 1 cm zur Haut über die zu therapierende Region (Knie) geführt. Es wurde darauf geachtet, die Applikation mit einem Winkel von 90° zwischen Applikator und dem jeweiligen Hautabschnitt durchzuführen und alle Stellen gleichmässig zu behandeln. Appliziert wurde in den Bereichen medial, cranial und lateral vom Kniegelenk (Abb. 3 und Abb. 4).

Nach dem Einschalten des Gerätes füllte sich der Druckbehälter mit Sauerstoff bis der Abschaltdruck erreicht war. Der Schlauch wurde dann aus dem Gerät herausgezogen und mit dem Applikationsgerät verbunden. Das Letztere wurde zuvor mit dem Mikroemulsionsbehälter befüllt. Es handelte sich bei der Gruppe 3 um eine Mikroemulsion aus nur einer Komponente (Carprofen in Vehikel – Gehalt 5.74%). Bei der Gruppe 4 bestand die fertige Mischung aus 2 Komponenten welche zuvor zusammengeführt wurden (Carprofen in Vehikel

[Komponente A] mit Chitooligosacchariden [Komponente B] – Gehalt in Komponente A: 13.39%, bei optimaler Mischung (1:1) folgt daraus eine Konzentration von 6.695% in der Mischung Komponente A+B.) Aufgrund möglicher Abweichungen beim Mischen musste von einem Schwankungskorridor von +/- 15% ausgegangen werden. Der Konzentrationsbereich lag demnach je nach Mischung zwischen 5.7% und 7.7%.

3.4 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um adulte, weibliche Schafe der Rassen weisses Alpenschaf und schwarzbraunes Bergschaf. Sie waren durchschnittlich 59 ± 9 de kg schwer und am Tag der Operation durchschnittlich 27 Monate (24-32) alt.

Die Tiere waren in einem Alter von 6 Monaten angekauft worden und lebten bis zum Versuchsbeginn auf einem Hof mit täglichem Weidegang.

Beim Ankauf fand eine fachgerechte klinische Untersuchung zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitsstatus aller Schafe statt. Mittels einer Zahnaltersbestimmung wurde das Alter der Tiere bestimmt. Zusätzlich wurde das Geschlecht überprüft und es wurde bei der Untersuchung besonderer Wert auf vollständige Klauen- und Eutergesundheit gelegt. Mittels Ultraschallkontrolle wurde eine Trächtigkeit ausgeschlossen. Eine aus der Vena jugularis entnommene Blutprobe wurde zur Untersuchung auf Maedi/Visna-Antikörper in das virologische Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern geschickt. Tiere, für die das Ergebnis positiv war, wurden der zuständigen Behörde gemeldet und umgehend geschlachtet. Die als gesund befundenen Tiere erhielten eine bestandseigene Ohrmarke und wurden vor Aufnahme in die Versuchstierherde mit Doramectin (Dectomax®, 0.2 mg/ 7 kg Körpergewicht s.c., Pfizer AG, Zürich) gegen Endo- und Ektoparasiten behandelt sowie mit Ovilis®Heptavac P ad us.vet. (2 ml/Tier s.c., Veterinaria AG Zürich, Schweiz) gegen Pasteurellen und Clostridien geimpft.

Im weiteren Verlauf wurden die Tiere regelmässig alle 6 Wochen tierärztlich kontrolliert. Es fand zu diesem Zeitpunkt jeweils eine Klauenpflege statt. Zweimal jährlich wurden alle Schafe durch einen Schafscherer geschoren. Zusätzlich wurde die Herde alle drei Monate entwurmt und nach der Grundimmunisierung jährlich geimpft.

3.5 Operation

3.5.1 Vorbereitung

Die Schafe wurden 1-2 Wochen vor der Operation vom Hof zum Tierspital transportiert wo sie bis zum Tag der Operation in Laufboxen gehalten wurden. Dies ermöglichte den Tieren die Eingewöhnung in der neuen Umgebung.

Wenige Tage vor der Operation wurden den Tieren beide Hinterbeine im Bereich der Knie grossflächig geschoren, ebenso wie eine Halsseite für das Platzieren eines Katheters. Es wurde diejenige Halsseite geschoren, die sich auf der Seite des zu operierenden Beines befand. Die Tiere wurden gewogen und es wurden zwei Blutproben aus der Vena jugularis zur hämatologischen und blutchemischen Untersuchung gezogen.

24 Stunden vor der Operation wurden die Tiere gefastet, aber sie hatten freien Zugang zu Wasser.

3.5.2 Präoperative Versorgung

Eine halbe Stunde vor der Einleitung der Anästhesie erhielten die Tiere als Prämedikation 0.1 mg/kg Xylazin (Xylazin Streuli ad us. vet., Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) und 0.01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) intramuskulär (M. quadriceps).

Die geschorene Halsseite wurde mit Hibiscrub[®] (Globopharm AG, Küssnacht ZH, Schweiz) und Alkohol (Ethanolum ketonatum denaturiert 94% v/v) gereinigt und ein Venenverweilkatheter (BD Angiocath, 14 G, Becton Dickinson AG, Schweiz) in die Vena jugularis eingeführt. Dieser wurde mit einem IN-

Stopper (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen, mit steriler NaCl-Lösung gespült und schliesslich mit vier Einzelheften am Tier festgenäht.

Präoperativ erhielten die Tiere prophylaktisch 30000 I.U./kg Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli ad us. vet., Streuli Pharma AG) und 4 mg/kg Gentamicin (Vetagent®, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) in oben genannten Katheter in die Vena jugularis injiziert, sowie 3000 I.U. Tetanusserum (Tetanus-Serum Intervet®, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) subkutan im Bereich der lateralen Bauchwand.

Zwei Tiere erhielten zusätzlich 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) intravenös.

Die übrigen vier Tiere wurden ca. 20 Stunden vor der Operation mit dem VetDrop® System behandelt. Zwei der Tiere wurden mit 0.5 ml VetVital Serum behandelt welches mit Carprofen angereichert war. Zwei weitere Tiere erhielten die gleiche Menge VetVital Serum, welches zusätzlich zu Carprofen Chitooligosaccharide enthielt.

3.5.3 Anästhesie

Vor Einleitung der Anästhesie wurden die Tiere präanästhetisch untersucht. Es wurde eine komplette klinische Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurde neben der Beurteilung des Allgemeinzustandes besonderes Augenmerk auf das kardiovaskuläre und pulmonale System der Tiere gelegt. Die Untersuchung beinhaltete eine gründliche Herzauskultation wobei auf Frequenz, Intensität, Regelmässigkeit und Abgesetztheit der Herztöne sowie eventuelle Nebengeräusche geachtet wurde. Der Puls wurde anhand einer Palpation beider Arteriae femorales kontrolliert. Die Farbe der Schleimhäute sowie die kapilläre Füllungszeit wurden überprüft. Anschliessend wurde die Lunge auskultiert. Es wurde die Frequenz bestimmt und auf eventuelle Nebengeräusche geachtet. Des Weiteren wurde der Ernährungszustand

beurteilt, die Hautelastizität überprüft, Lymphknoten palpiert und die Körpertemperatur des Tieres rektal gemessen.

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte mit 0.1 mg/kg Diazepam (Valium®, Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz), 3-5 mg/kg Ketamin (Narketan®, Vetquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und 0.2-0.4 mg/kg Propofol (Propofol 1% MCT Fresenius, Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) intravenös durch den zuvor gelegten Katheter. Nachdem die Tiere eine genügende Anästhesietiefe erreicht hatten und in sternaler Position gelagert waren, wurde das Maul des Schafes durch eine helfende Person geöffnet. Nach Desensibilisierung des Larynx mittels Lidocainspray (Xylocain, 10% Spray, AstraZeneca AG, Zug, Schweiz) wurde die Trachea bei allen Schafen mit einem Tubus der Grösse 11 ID (Inner Diameter) intubiert.

Die Erhaltung der Anästhesie wurde mittels 1-1.5 Vol.-% Isofluran-Inhalation (Attane™ Isoflurane ad us vet., Provet AG, Lyssach, Schweiz) in Sauerstoff erreicht. Zusätzlich bekamen die Tiere 1 mg/kg/Std Propofol-Dauerinfusion welche zusammen mit einer Ringer-Laktat-Infusion (10 ml/kg/Std) in den Venenkatheter geleitet wurde.

3.5.4 Lagerung und Desinfektion

Die Operation des Tieres erfolgte in dorsolateraler Körperposition (Abb. 5). Der gesamte Tierkörper sowie der Kopf wurden von einer Vakuummatte in Position gehalten. Das zu operierende Bein wurde in maximaler Beugung und mit einem Winkel von 90° zum Operationstisch fixiert. Das andere Hinterbein wurde nach lateral gezogen und in leichter Beugung möglichst weit vom Operationsfeld entfernt am Operationstisch fixiert.

Das Operationsfeld wurde nochmals geschoren und aseptisch vorbereitet. Hierzu wurde der Bereich um das zu operierende Knie grosszügig mit Hibiscrub® (Globopharm AG) gewaschen, anschliessend mit Alkohol (Ethanol ketoniert 80%, Kantonsapotheke Zürich, Schweiz) entfettet und mit Hibitane® (Tinktur, SSL Healthcare, Neuss, Deutschland) desinfiziert.

Zur sterilen Abdeckung des Operationsfeldes wurde ein Extremitätentuch (Steri-Drape™, Extremity Drape, 3M Health Care, Neuss, Deutschland) verwendet, das mit Hilfe von Wundklammern am richtigen Ort gehalten wurde.

3.5.5 Chirurgicaler Eingriff

Die besondere Lagerung der Tiere gab dem Operateur eine gute Sicht auf die gewichtstragenden Flächen der Femurkondylen. Dies ermöglichte das Platzieren der Defekte ohne dass eine Patellaluxation oder ein Durchtrennen des lateralen Retinaculum nötig gewesen wäre.

Von den sechs Tieren wurde bei jeweils drei Tieren rechts und jeweils drei Tieren links eine Arthrotomie des Femoropatellargelenkes durchgeführt. Der Zugang erfolgte mittels eines 8-10 cm langen Hautschnittes, der auf Höhe des lateralen Kondylus begann und distal auf Höhe der Tuberositas tibiae endete. Er befand sich anteromedial am Kniegelenk, circa 0.5 cm medial des mittleren Patellarbandes. Nach Durchtrennung des subkutanen Gewebes und der oberflächlichen Faszie wurde durch eine Punktion der Synovialmembran Synovialflüssigkeit gewonnen (Abb. 6) und in ein steriles Probengefäss gefüllt. Die Eröffnung des Gelenkes erfolgte medial über der Tragfläche des medialen Femurkondylus durch einen parallel zum Patellarband verlaufenden Schnitt. Das Fettpolster wurde partiell entfernt. Die Wunde wurde mit Hilfe eines Wundspreizers nach Weitlaner gespreizt um eine gute Sicht auf den gewichtstragenden Anteil des medialen Kondylus zu ermöglichen. Mit Hilfe einer Biopsiestanze (6 mm, Biopsy Punch, Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Germany) wurde ein kreisrunder Knorpeldefekt in der Mitte der Gelenkfläche gesetzt. Anschliessend wurde der sich innerhalb der Biopsie befindliche Knorpel zunächst mosaikartig mit einer Skalpellklinge (Grösse 11, Swann Morton LTD., Sheffield, England) geschnitten und dann mit der flach zur Oberfläche gehaltenen Klinge vorsichtig entfernt. Die Knorpeloberfläche mit der kalzifizierten Knorpelzone wurde mit einer Mini-

Bohrmaschine (512.100, mit Kugelfräser, 513.210, Synthes) gleichmässig entfernt wobei die Grenze zum subchondralen Knochen unverletzt blieb. Mit einem Microfracture-Pick wurden vier standardisierte, ca. 2 mm grosse Löcher in gleichem Abstand in die subchondrale Knochenplatte gestossen. Diese sogenannte Microfracture Technik wurde ursprünglich von Steadman (80) und Frisbie (81, 82) beschrieben (Abb. 7).

Nach einer Gelenkspülung wurden zunächst die Gelenkkapsel und die Faszie mit einer fortlaufenden Naht (Saumnaht) nach Ford und die Subkutis mit einer einfachen fortlaufenden Naht genäht. Es wurde hierfür resorbierbares Nahtmaterial verwendet (Polyglactin; Vicryl 2-0; Johnson & Johnson Int., Brüssel, Belgien). Die Haut wurde mit Einzelheften verschlossen (Supramid® 2-0, B.Braun, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland).

3.6 Postoperatives Management

Die postoperative medikamentelle Versorgung beinhaltete zwei weitere Injektionen mit 0.01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Essex Chemie AG) im Abstand von je vier Stunden am Tag der Operation, sowie Antibiotikatherapie während weiterer drei Tage mit 30000 I.U./kg Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli ad us. vet., Streuli Pharma AG) zweimal täglich intravenös und 4 mg/kg Gentamicin (Vetagent®, Veterinaria AG) einmal täglich intravenös.

Am Tag 4 nach der Operation wurde der Venenkatheter aus der Vena jugularis entfernt.

Die Tiere der Applikationsgruppen (Gruppe 3 und 4) wurden insgesamt sechs Wochen lang mit dem Applikationssystem behandelt. (Tab. 1.1).

Die Tiere der Injektionsgruppe (Gruppe 6) erhielten alle 24 Stunden 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) intravenös während drei Tagen postoperativ (Tab. 1.2).

3.7 Probengewinnung und Untersuchungsmethoden

3.7.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Blutproben wurden von einem Tag vor- bis zu vier Tage nach der Operation durch den präoperativ gesetzten Venenkatheter entnommen. Der Katheter wurde hierfür zunächst mit steriler NaCl-Lösung (NaCl 0.9% Fresenius, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) gespült, es wurden dann ca. 4 ml Blut entnommen um eine Verdünnung der Carprofen-Konzentration mit NaCl auszuschliessen. Daraufhin wurden mit einer Einmalspritze (10 ml, BRAUN, Omnifix®, Braun Melsungen AG, Germany) 6 ml Blut gewonnen und der Katheter abschliessend wieder mit NaCl gespült.

Ab dem vierten Tag nach der Operation wurden die Plasmaproben direkt aus der Vena jugularis entnommen. Hierfür wurden die Tiere von einem Helfer fixiert. Gegebenenfalls wurde der Halsbereich nochmals geschoren und mit Hibiscrub® und Alkohol gereinigt. Die Vene wurde gestaut und mit einer Spritze (10 ml, BRAUN, Omnifix®) und einer Einmalkanüle (18 G x 1 ½“, TERUMO® NEOLUS®, Terumo Europe N.V., Belgium) wurden 6 ml Blut gewonnen.

Mit dem Blut wurden Probenröhrchen (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) befüllt, die LH Lithium Heparin enthielten und diese wurden anschliessend für 20 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das überständige Plasma wurde entnommen, in ein steriles Probenröhrchen pipettiert und bei -20°C bis zum Tag der Untersuchung aufbewahrt.

Die Beschriftung der Blutröhrchen erfolgte von Hand und beinhaltete die Nummer des Tieres, die Nummer der Probe sowie Entnahmedatum und -zeit. Die Kennzeichnung der Plasmaröhrchen sowie der Probengefässe für die Synovialproben erfolgte zweifach (auf dem Probengefäss und auf der Verpackung des Probenröhrchens) mithilfe von selbstklebenden Etiketten. Sie beinhalteten die Art der Probe, die Nummer des Tieres, die Nummer der Probe sowie Entnahmedatum- und zeitpunkt.

Die erste Synovialprobe wurde jeweils während der Operation nach Eröffnung der Gelenkkapsel entnommen (Abb. 6).

Die darauffolgenden Synovialproben wurden unter Ultraschallkontrolle aus der medialen Gelenksaussackung gewonnen. Hierfür wurde die Haut im Bereich des Kniegelenks steril vorbereitet und die Gelenkkapsel mit einer Kanüle (18 G x 1 ½", TERUMO® NEOLUS®) punktiert. Die Synovialflüssigkeit wurde mit Hilfe einer Spritze (5 ml, BRAUN, Omnifix®) entnommen, in ein steriles Probenröhrchen gefüllt und ohne weitere Aufbereitung bei -20°C gelagert bis zum Tage der Untersuchung durch das Labor. Sämtliche Proben wurden mit Alufolie eingewickelt um sie vor eventuellen Lichteinflüssen zu schützen. Für den Versand wurden die Proben mit Kühlaggregaten in eine Styroporbox gelegt und per Expresskurier zum Labor transportiert.

3.7.2 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung

Die Plasma- und Synovialproben wurden mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) auf ihren Carprofen-Gehalt untersucht. Die Flüssigkeitschromatographie (*Dionex UltiMate 300, Software Dionex Chromatography MS Link Vers. 2.7.0.2251*) diente in diesem Verfahren der Auftrennung der Proben und die Massenspektrometrie (*Triple Quadrupol Sciex API 4000, Software Analyst Vers. 1.5.1*) der Identifikation und Quantifizierung der gesuchten Substanz im Analysat.

3.7.2.1 High-performance Liquid Chromatography (HPLC)

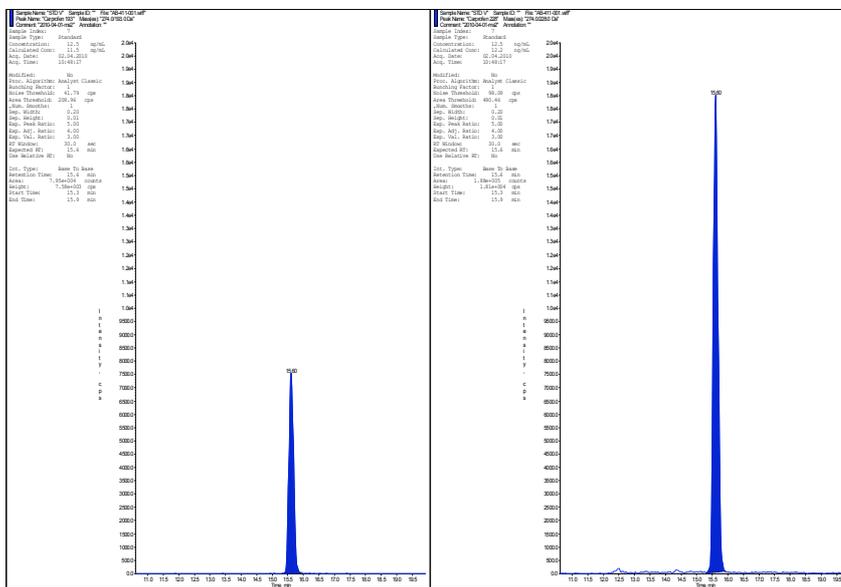
Generelles Prinzip

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, das in der analytischen Chemie zum Einsatz kommt. Hierbei wird unter hohem Druck (50 bis 150 bar) die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel (mobile Phase, Eluent) durch eine Trennsäule (stationäre Phase) transportiert. Die mobile Phase besteht aus einer wässrigen Pufferlösung und organischen

Lösungsmitteln, die stationäre Phase ist eine Oberfläche von sehr dicht in einer Stahlkartusche gepackten Partikeln mit definierter Oberfläche.

Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen der Substanz, der mobilen Phase und der stationären Phase. Je nach Intensität der Wechselwirkung werden die Moleküle dieser Substanz unterschiedlich lange gebunden und erscheinen somit zu verschiedenen Zeiten am Ende der Trennsäule (Retentionszeiten) wo sie von einem Detektor registriert werden. Retentionszeiten dienen später der Identifizierung der Substanzen indem die Retentionszeit einer unbekanntem Substanz mit der eines Standards verglichen wird. Die Darstellung der Retentionszeit erfolgt durch ein Chromatogramm (Abb. A) das das Detektionssignal auf der y-Achse gegen die Zeit auf der x-Achse abbildet. Zur Bestimmung der Konzentration einer Substanz wird die Peak-Fläche eines Standards mit bekannter Konzentration mit der Peak-Fläche der zu untersuchenden Substanz verglichen (83).

Abb. A



3.7.2.2 Massenspektrometrie (MS)

Generelles Prinzip

Bei der Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz in eine Gasphase überführt, ionisiert und die ionisierten Teilchen werden durch ein

elektrisches Feld beschleunigt. Ein Massenspektrometer ist aufgebaut aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor.

Die Ionisierung des Analyten erfolgt in der Ionenquelle. Hier gibt es verschiedene Methoden, wobei in dieser Studie Elektrospray-Ionisation (ESI) zur Anwendung kam. Hierbei werden Lösungen geladener und polarer Substanzen versprüht, ionisiert und die Tröpfchen dann getrocknet, so dass Ionen des Analyten zurückbleiben.

Im Analysator werden die Ionen nach ihrer Masse getrennt. Es gibt verschiedene Arten von Analysatoren wobei bei den hier vorliegenden Analysen ein Quadrupol-Massenspektrometer verwendet wurde. Hierbei werden die erzeugten Ionen durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und fliegen zentral zwischen vier parallel liegenden Stabelektroden durch, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden (Quadrupol). Im Wechselfeld zwischen den Quadrupol-Stäben findet eine Masse-Ladungs-Selektierung statt, sodass jeweils nur Teilchen mit einer definierten Masse das Feld durchlaufen können. Die Ionen treffen in einem Detektor mit Messverstärker auf, der den Ionenstrom misst und von der Software des angeschlossenen Computers zur Zählrate bzw. zum Partialdruck umgerechnet wird. In einem Detektor werden die zuvor separierten Ionen erfasst (83).

3.7.2.3 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Ein Tandem-Massenspektrometer stellt die Kopplung zweier Quadrupol-Massenfilter mit interponierter Kollisionszelle dar. Durch die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie konnte für die hier durchgeführten Analysen die Selektivität und Sensitivität dieser Quantifizierungsmethode enorm verbessert werden.

3.7.2.4 Versuchsdurchführung

Die Analytik der Plasma- und Synovialproben wurde bei der Interlabor Belp AG (Aemmenmattstr. 16, 3123 Belp, Schweiz) durchgeführt.

Vorversuch

Referenzmaterialien:

Die Carprofenreferenz wurde von der Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland) bezogen und das in dieser Versuchsreihe ebenfalls verwendete Phenylbutazon D10 von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, U.S.A).

Vorbereitung der Lösungen und Herstellung der Verdünnungen:

Zur Herstellung von $c(\text{Citratpuffer}) = 0.345 \text{ mol/l}$ wurden 36 g ($\pm 1 \text{ g}$) Citronensäure-Monohydrat mit Wasser für die Chromatographie gelöst, der pH-Wert mit $c(\text{Natronlauge}) = 4.0 \text{ mol/L}$ auf pH 3.4 eingestellt und mit Wasser für die Chromatographie auf 500 ml aufgefüllt. Die Extraktionslösung war eine 60 + 30 (v/v) Mischung aus φ Ethylacetat und φ iso-Hexan. Bei Fließmittel A handelt es sich um 38 mg ($\pm 1 \text{ mg}$) Ammoniumacetat die in 800 ml Wasser gelöst und anschliessend mit 200 ml Methanol versetzt wurden ($c(\text{Ammoniumacetat}) = 0.5 \text{ mmol/l}$). Fließmittel B war Methanol. Die Fließmittel wurden ca. 5 Minuten mit schwachem Heliumstrom entgast.

Stammlösungen und Verdünnungen:

10.0 mg ($\pm 1.0 \text{ mg}$) Carprofen (Stammlösung) bzw. D10-Phenylbutazon wurden in separate 100 ml Messkolben eingewogen, mit Methanol gelöst und zur Marke aufgefüllt. Dies entsprach je 100 $\mu\text{g/ml}$. Für Verdünnung I und ISTD (Interner Standard) -Verdünnung wurden 1.0 ml Stammlösung bzw. ISTD-Stammlösung in separate 20 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol zur Marke aufgefüllt. (Entsprach 5.0 $\mu\text{g/ml}$) Zur Herstellung von Verdünnung II und ISTD-Verdünnung wurden 5.0 ml Verdünnung I bzw. ISTD-Verdünnung I in separate 100 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol zur Marke aufgefüllt. (Entsprach 250 ng/ml) Verdünnung III und IV wurden mit jeweils

10.0 ml der vorherigen Verdünnung hergestellt. Diese wurde in einen 100 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Dies entsprach einer Verdünnung von 25 ng/ml bzw. 2.5 ng/ml.

Aufarbeitung:

2.0 ml homogenisierte Probe wurden in ein Reagenzglas pipettiert und nacheinander mit 400 µl ISTD-Verdünnung II (entsprechend einem Gehalt von 50 ng/ml), mit 2.5 ml Citratpuffer, einer Spatelspitze Ascorbinsäure versetzt und eine Minute geschüttelt. Die gepufferte Probe wurde mit 5.0 ml Extraktionslösung zwei Minuten geschüttelt und die Suspension bei 4500 U/min und 5°C, fünf Minuten zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in ein Reagenzglas überführt und am TurboVap® (Zymark®, Sotax, Allschwil, Schweiz) unter Stickstoff bei 45°C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde erst mit 250 µl Methanol gelöst und anschliessend mit 250 µl Fließmittel A versetzt. Der Extrakt wurde in ein MCT 1.5 ml (Capped Microfuge Tube, Axygen Inc., California, USA) überführt und während zehn Minuten bei 13000 U/min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Filtration in ein Vial transferiert und zur LC-MS-MS-Analyse eingesetzt.

Die Berechnung von Carprofen erfolgte über den internen Standard, welcher in allen Proben und Standards in der gleichen Konzentration enthalten war, nach folgender Formel:

$$G_{PB} = \frac{A(ISTD)_{Std} \cdot G(PB)_{Std} \cdot A(BP)_{Probe} \cdot G(ISTD)_{Probe}}{A(PB)_{Std} \cdot G(ISTD)_{Std} \cdot A(ISTD)_{Probe}}$$

G_{PB}	Gehalt Carprofen in der Probe (mg/ml)
$A(ISTD)_{Std}$	Fläche Interner Standard im Standard (counts)
$G(PB)_{Std}$	Gehalt Carprofen Standard (ng/ml)
$A(BP)_{Probe}$	Fläche Carprofen in der Probe (counts)
$G(ISTD)_{Probe}$	Gehalt Interner Standard im Standard (ng/ml)

A(PB) _{Std}	Fläche Carprofen im Standard (counts)
G(ISTD) _{Std}	Gehalt Interner Standard im Standard (ng/ml)
A(ISTD) _{Probe}	Fläche Interner Standard in der Probe (counts)

Die Berechnung erfolgte über die Software Analyst 1.5.1 Applied Biosystem.

Hauptversuch

Die Analyse wurde anhand der hausinternen Analysenmethode AB-411 durchgeführt.

Prinzip:

Nachweise über Glaswaren und Geräte liegen der Autorin vor. Es wurden handelsübliche Chemikalien verwendet.

Reagenzien:

Die Vorbereitung der Lösungen und die Herstellung der Verdünnungen wurde analog zu dem im Vorversuch beschriebenen Vorgehen durchgeführt.

Stammlösungen und Verdünnungen:

10.0 mg (\pm 1.0 mg) Carprofen (Stammlösung) bzw. D3-Carprofen (ISTD-Stammlösung) wurden in separate 100 ml Messkolben eingewogen, mit Methanol gelöst und zur Marke aufgefüllt. Dies entsprach je 100 μ g/ml. Zur Herstellung von Verdünnung I und ISTD (Interner Standard) -Verdünnung I, bzw. Verdünnung II und ISTD-Verdünnung II wurden je 1.0 ml der vorherigen Verdünnungsstufe in 10 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol zur Marke aufgefüllt. Dies entsprach im ersten Schritt einer Konzentration von je 10.0 μ g/ml und im letzten Schritt 1.0 μ g/ml. Alle Lösungen wurden dunkel im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert.

Die Analysen der Proben im Hauptversuch wurden in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt.

Zunächst wurde eine Flüssigphasen-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde 1.0 ml homogenisierte Probe in ein Reagenzglas pipettiert und nacheinander mit 400 μ l ISTD-Verdünnung II (entsprechend einem Gehalt von 400 ng/ml),

mit 2.5 ml Citratpuffer, einer Spatelspitze Ascorbinsäure versetzt und eine Minute geschüttelt. Die gepufferte Probe wurde mit 5.0 ml Extraktionslösung zwei Minuten geschüttelt und die Suspension bei 4500 U/min und 5°C, fünf Minuten zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in ein Reagenzglas überführt und am TurboVap® (Zymark®, Sotax) unter Stickstoff bei 45°C zur Trockenphase eingengt. Der Rückstand wurde erst mit 500 µl Methanol gelöst und anschliessend mit 500 µl Fließmittel A versetzt. Der Extrakt wurde in ein MCT 1.5 ml (Capped Microfuge Tube, Axygen Inc.) überführt und während zehn Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Filtration in ein Vial transferiert und zur LC-MS/MS-Analyse eingesetzt.

Carprofen D3 (dreifach deuteriert) diente als interner Standard (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, U.S.A).

Die Berechnung von Carprofen erfolgte über den internen Standard, welcher in allen Proben und Standards in der gleichen Konzentration enthalten war. Die Formel ist äquivalent der Formel, die im Vorversuch beschrieben wurde.

Bei der Analyse wurde in gewissen Proben eine Carprofen-Konzentration <2 ng/ml nachgewiesen. Dies wurde im Laborbericht als „Spur“ Carprofen angegeben. Um eine grafische Darstellung der Plasmakonzentration zu ermöglichen wurde für die Auswertung der Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation der Wert dieser Proben auf 2 ng/ml festgelegt.

4 Resultate

4.1 Tiere und Operationsverlauf

Alle Tiere aus allen Versuchsgruppen und dem Vorversuch wurden bei Eintritt in den Versuch untersucht und nach den Kriterien der klinischen Untersuchung (s. Material und Methoden) für gesund und versuchsfähig befunden. Bei allen Tieren verlief die Anästhesie komplikationslos speziell im Bezug auf die Stabilität der kardiovaskulären Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung. Bei allen Tieren aus allen Versuchsgruppen verlief die

Operation aus chirurgischen Gesichtspunkten ebenfalls komplikationslos. Nur bei einem der Tiere (5211) wurde der Hautschnitt medial des Kniegelenkes S-förmig durchgeführt und war dadurch ca. dreimal so lang wie bei den übrigen Tieren. Alle Tiere erholten sich von Anästhesie und Eingriff innerhalb eines Tages, welches den normalen klinischen Verläufen entspricht.

4.2 Probenentnahmen und –behandlung bis zur Analyse

Die Blutprobenentnahme verlief ohne besondere Zwischenfälle. Lediglich bei einem Tier (5203) wurde keine Nullprobe gezogen.

Das Gewinnen von Synovia war in allen Fällen möglich. Sowohl die intraoperative Entnahme von Synovia als auch die Punktion des Kniegelenkes unter Ultraschallkontrolle gestaltete sich jedoch bei manchen Tieren aufgrund geringgradiger Füllung der Gelenkkapsel mit Gelenksflüssigkeit schwierig. Aus diesem Grund entstand wegen der mehrmaligen Punktion des Gelenkes in einigen Fällen eine Hämorrhagie im Gelenk und im umliegenden Gewebe wodurch es zu einer Kontamination der Synovialflüssigkeit mit Blut kam.

4.3 Analysetechnik

Das Probenmaterial war in allen Fällen ausreichend für die Analyse mittels LC-MS/MS und es traten keinerlei technische Schwierigkeiten bei der Analyse der Proben auf.

4.4 Vorversuch

Es wurden fünf Tiere mit den Nummern 2221-2225 in den Vorversuch einbezogen.

In allen Plasma- und Synovialproben dieser fünf Tiere des Vorversuches konnte Carprofen nachgewiesen werden (Tab. 3.1). Bei einem der Tiere (2222) war nur eine einseitige Entnahme von Synovia möglich, da die Gelenksfüllung auf der anderen Seite zu gering war.

Bei den Tieren 2222 und 2223, die Carprofen intravenös erhalten hatten, waren die gemessenen Carprofen-Konzentrationen in Plasma- und Synovialproben höher als bei den Tieren, die transkutan behandelt wurden (2221, 2224, 2225).

Die in den Plasmaproben gemessenen Carprofen-Konzentrationen waren bei allen Tieren mit einer Ausnahme höher als in den Synovialproben.

Zum Vergleich der beiden intravenös behandelten Tiere lässt sich folgendes sagen: Die Carprofen-Konzentration der Plasmaprobe des Tieres 2222 20.5 Stunden nach Injektion war leicht erhöht im Vergleich zur Plasmaprobe des Tieres 2223 (24.5 Stunden nach Injektion). Der Carprofen-Gehalt der Synovialprobe des Tieres 2222 23.5 Stunden nach Injektion war etwas niedriger als der Carprofen-Gehalt in den Synovialproben des Tieres 2223 26 Stunden nach der Injektion (Diagramm 1.1).

Bei den transkutan applizierten Tieren waren die gemessenen Konzentrationen abhängig von der Anzahl der Applikationen, d.h. häufigere Applikationen führten zu höheren Konzentrationen in Plasma- und Synovialproben. Ein signifikanter Anstieg der Konzentration war nach der zweiten Applikation im Vergleich zur ersten Applikation zu verzeichnen (Diagramm 1.2).

4.5 Ergebnisse Hauptversuch- Deskriptiver Teil

4.5.1 Gruppe 3 – Applikation mit Carprofen

Bei den Tieren der Gruppe 3 handelte es sich um die Schafe mit den Nummern 5203 und 5204. Alle Ergebnisse sind im Anhang in den Tabellen 3.2 und 3.3 zu finden.

Plasmaproben

Bei Schaf 5203 wurde keine Nullprobe (*P1*) gezogen. In der Nullprobe des Tieres 5204 (*P1*) wurde Carprofen nachgewiesen. Die darauf folgenden Plasmaproben waren bei beiden Tieren frei von Carprofen. Eine Spur (<2 ng/ml) Carprofen konnte bei dem Tier 5203 30 Minuten (*P4*) bzw. bei dem Tier 5204 eine Stunde (*P5*) nach der ersten Applikation gemessen werden.

Im weiteren Verlauf stiegen die Werte an. Die höchsten Konzentrationen nach der ersten Applikation wurde nach 18 (5203, *P9*) bzw. 20 (5204, *P10*) Stunden gemessen (Diagramm 2.1).

Nach ca. 72 Stunden, also kurz vor der zweiten Applikation (*P11*) waren die Konzentrationen auf 49% (5203) bzw. 67% (5204) der zuvor gemessenen Peak-Konzentrationen abgefallen. Nach der zweiten Applikation blieben die Werte bei beiden Tieren bis zur ersten Stunde (*P15*) nach der Applikation unverändert. Ab der zweiten Stunde (*P16*) kam es erneut zu einem Anstieg der Carprofen-Konzentrationen bei beiden Tieren. Die höchsten Werte wurden bei beiden Tieren wieder 18 Stunden nach der Applikation (*P19*) gemessen.

Die Peak-Konzentration nach der zweiten Applikation war um das 2.6- (5203), bzw. das 5.7-fache (5204) höher als die Peak-Konzentration nach der ersten Applikation (Diagramm 2.2).

Im weiteren Verlauf wurden zweimal wöchentlich Plasmaproben entnommen (parallel zur unter Ultraschallkontrolle gezogenen Synovialprobe, ca. 24 Stunden nach Applikation und freitags, 6 Stunden nach Applikation) (*P20-P31*). Bei keinem der Tiere konnte in dieser Zeit ein linearer Konzentrationsverlauf beobachtet werden. Die höchste gemessene Konzentration wurde bei beiden Tieren in der 6. Behandlungswoche (*P30*) gemessen. Sie betrug bei Tier 5203 553 ng/ml und bei Tier 5204 695 ng/ml.

Bei beiden Tieren waren die gemessenen Konzentrationen in den in Woche 7 (6 Tage nach der letzten Applikation) gewonnenen Plasmaproben (*P32*) deutlich niedriger als die der vorherigen Proben. Die Konzentrationen der Plasmaproben (*P32*) lagen bei 18% (5203) bzw. 24% (5204) des Wertes der vorherigen Probe (*P31*) (Diagramm 2.3).

Synovialproben

In allen Synovialproben konnte Carprofen nachgewiesen werden. Der Konzentrationsverlauf war bei keinem der beiden Tiere linear. Die höchste

Konzentration wurde zeitgleich zur höchsten Konzentration in den Plasmaproben in der 6. Behandlungswoche (S7) gemessen und betrug bei Tier 5203 327 ng/ml und bei Tier 5204 281 ng/ml.

Die Konzentrationen der letzten, in Woche 7 gewonnenen Synovialproben (S9) betrugen 14% (5203) bzw. 12% (5204) des Mittelwertes der zuvor gemessenen Konzentrationen in Synovialproben (S2-S7).

Die in Woche 6 gewonnene Synovialprobe des kontralateralen Kniegelenkes (S8) fehlt in dieser Gruppe (Diagramm 2.4).

Vergleich der Plasma- und Synovialproben

Die Carprofen-Konzentrationen in den Synovialproben waren ausnahmslos niedriger als in den Plasmaproben.

Sie betrugen durchschnittlich 48% (5203) bzw. 49% (5204) der Carprofen-Konzentrationen in den zeitgleich entnommenen Plasmaproben, variierten allerdings zwischen 26% und 80% bei Tier 5203 und zwischen 23% und 78% bei Tier 5204 (Diagramm 2.5, Diagramm 2.6).

4.5.2 Gruppe 4 – Applikation mit Carprofen und Chitooligosacchariden

Bei den Tieren der Gruppe 4 handelte es sich um die Schafe mit den Nummern 5211 und 5212. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 zu finden.

Plasmaproben

In sämtlichen Proben konnte Carprofen nachgewiesen werden, inklusive der Nullproben (P1). Die Konzentrationskurve zeigte bei beiden Tieren nach der ersten Applikation keinen konstant ansteigenden Verlauf.

Die höchsten Konzentrationen nach der ersten Applikation wurden nach 18 (5211, P9) bzw. 20 (5212, P10) Stunden gemessen (Diagramm 3.1).

Nach ca. 72 Stunden, also kurz vor der zweiten Applikation (P11) waren die Werte auf 42% (5211) bzw. 67% (5212) der zuvor gemessenen Peak-Konzentrationen abgefallen. Nach der zweiten Applikation fand bei beiden

Tieren ein konstanterer Anstieg statt und es wurden die Höchstkonzentrationen 18 Stunden nach der Applikation (*P19*) gemessen.

Die höchste Konzentration nach der zweiten Applikation betrug das 1.7-fache (5211), bzw. das 4.0-fache (5212) der Peak-Konzentration nach der ersten Applikation (Diagramm 3.2).

Im weiteren Verlauf wurden zweimal wöchentlich Plasmaproben entnommen (parallel zur unter Ultraschallkontrolle gezogenen Synovialprobe, ca. 24 Stunden nach Applikation und freitags, 6 Stunden nach Applikation) (*P20-P31*). Bei keinem der Tiere konnte in dieser Zeit ein linearer Konzentrationsverlauf beobachtet werden. Der Konzentrations-Peak wurde bei Tier 5211 in der 6. Behandlungswoche (*B30*) gemessen und betrug 1620 ng/ml. Bei Tier 5212 wurde der Peak in der 3. Behandlungswoche gemessen (*P24*) und betrug 635 ng/ml.

Bei beiden Tieren waren die gemessenen Konzentrationen in den in Woche 7 (6 Tage nach der letzten Applikation) gewonnenen Plasmaproben (*P32*) deutlich niedriger als die der vorherigen Proben. Die Konzentrationen der Plasmaproben (*P32*) betrugen 36% (5211) bzw. 37% (5212) des Wertes der vorherigen Probe (*P31*) (Diagramm 3.3).

Synovialproben

In allen Synovialproben konnte Carprofen nachgewiesen werden. Der Konzentrationsverlauf war bei keinem der Tiere linear. Die höchste Konzentration wurde bei Tier 5211 zeitgleich zur höchsten Konzentration in der Plasmaprobe in der 6. Behandlungswoche (*S7*) gemessen und betrug 1350 ng/ml. Die höchste Konzentration bei Tier 5212 wurde in der 4. Behandlungswoche (*S5*) gemessen und betrug 418 ng/ml.

Die Konzentrationen der letzten, in Woche 7 gewonnenen Synovialproben (*S9*) betrugen 21% (5211) bzw. 3% (5212) des Mittelwertes der zuvor gemessenen Konzentrationen in den Synovialproben (*S2-S7*). Bei den Proben *S7* und *S8*

handelt es sich um zeitgleich gewonnene Synovialproben wobei *S7* aus dem behandelten Kniegelenk und *S8* aus dem kontralateralen Kniegelenk entnommen wurde. Die Carprofen-Konzentrationen der aus den kontralateralen Kniegelenken entnommenen Synovialproben (*S8*) betrug 76% (5211) bzw. 84% (5212) der Konzentrationen in zeitgleich aus den behandelten Gelenken gewonnenen Proben (*S7*) (Diagramm 3.4).

Vergleich der Plasma- und Synovialproben

Die Carprofen-Konzentrationen in den Synovialproben waren ausnahmslos niedriger als in den Plasmaproben.

Sie betrug durchschnittlich 59% (5211) bzw. 58% (5212) der Carprofen-Konzentrationen in den zeitgleich entnommenen Plasmaproben, variierten jedoch zwischen 34% und 83% bei Tier 5211 und zwischen 9% und 88% bei Tier 5212 (Diagramm 3.5, Diagramm 3.6).

4.5.3 Vergleich der Applikationsgruppen

Plasmaproben

Bei allen Tieren wurde die erste Peak-Konzentration von Carprofen im Plasma 18 bzw. 20 Stunden nach der ersten Applikation gemessen (*P9*, *P10*). Wurde der Peak schon nach 18 Stunden gemessen so war der darauffolgende gemessene Wert (5 Minuten vor 2. Applikation, *P11*) verhältnismässig niedriger (42%, bzw. 49%) als in den Proben, die nach 20 Stunden die höchste Konzentration aufwiesen (67%) (Diagramm 4.1).

Die kurz vor der zweiten Applikation gewonnenen Proben (*P11*) enthielten höhere Konzentrationen von Carprofen als die vor der ersten Applikation gewonnenen Proben (*P1*). Nach der zweiten Applikation wurde die Peak-Konzentration von Carprofen bei allen Tieren nach 18 Stunden (*P19*) gemessen (Diagramm 4.2).

Im weiteren Verlauf (*P20-P32*) wurden bei drei Tieren (5203, 5204, 5212) Carprofen-Konzentrationen in einem Bereich von 112-695 ng/ml gemessen

während ein Tier (5211) insgesamt höhere Werte erreichte (572-1620 ng/ml). Nach Beendigung der Behandlungsperiode fand bei allen Tieren ein deutlicher Konzentrationsabfall statt (Diagramm 4.3).

Synovialproben

Auch die in der Synovialflüssigkeit gemessenen Konzentrationen waren bei Tier 5211 insgesamt höher als bei den anderen drei Tieren (5203, 5204, 5212). Die höchsten Konzentrationen wurden bei den Tieren 5203, 5204 und 5211 in Woche 6 gemessen (S7) und bei Tier 5212 in Woche 4 (S5). Nach Beendigung der Behandlungsperiode fand bei allen Tieren ein deutlicher Konzentrationsabfall statt (Diagramm 4.4).

4.5.4 Gruppe 6 – Injektion mit Carprofen (Rimadyl®)

Bei den Tieren der Gruppe 6 handelte es sich um die Schafe mit der Nummer 5202 und 5217. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 zu finden. Bei Tier 5202 wurden die Proben P21 - P25 nicht analysiert.

Zu den Plasmaproben dieser Tiere lässt sich folgendes sagen: Die Nullproben (P1) beider Tiere enthielten kein Carprofen. Kurze Zeit nach der Injektion war die Konzentration am höchsten und unmittelbar vor der nächsten Injektion am niedrigsten. Die jeweils ca. 24 Stunden nach der Injektion gewonnenen Proben unterschieden sich nicht bedeutend voneinander. Nach Beendigung der Behandlung kam es zu einem deutlichen Konzentrationsabfall wobei an Tag 12 noch immer 500 ng/ml (Tier 5202), bzw. 2115 ng/ml (Tier 5217) Carprofen nachgewiesen wurden (Diagramm 5.1).

4.5.5 Vergleich Applikations- und Injektionsgruppen

Zum Vergleich der maximalen Plasmakonzentrationen zwischen Applikations- und Injektionstieren mussten unterschiedliche Zeitpunkte gewählt werden. Bei den Injektionstieren wurde die maximale Plasmakonzentration 10 Minuten nach der ersten Injektion gemessen (P2). Bei den Applikationstieren wurden die

maximalen Konzentrationen 18 bzw. 20 Stunden nach der ersten Applikation gemessen (*P9, P10*).

Die maximale Plasmakonzentration nach der ersten Gabe von Carprofen betrug bei den Injektionstieren durchschnittlich 38725 ng/ml und bei den Applikationstieren 139.95 ng/ml. Dies entspricht 0.36%. Nach der zweiten Gabe betrug die durchschnittliche Konzentration bei den Injektionstieren 41341.5 ng/ml und bei den Applikationstieren 359.25 ng/ml. Dies entspricht 0.86%.

Die gegebene Dosis Carprofen war bei den Injektionstieren um den Faktor 6.7 (5203, 5211, 5212) bzw. 8 (5204) höher als bei den Applikationstieren. Berücksichtigt man diesen Faktor beim Vergleich der Peak-Plasmakonzentrationen nach der ersten Applikation so ergeben sich folgende rein rechnerischen Werte: Das Verhältnis der Plasmakonzentrationen der Injektionstiere zu den Applikationstieren beträgt bei Tier 5203 1:80, bei Tier 5204 1:85, bei Tier 5211 1: 17 und bei Tier 5212 1:65.

4.6 Ergebnisse Hauptversuch- Pharmakokinetische Betrachtungen

Das Verteilungsvolumen bei den Injektionstieren war kurz nach der Injektion von Carprofen am niedrigsten (0.09-0.11 l/kg) und stieg im weiteren Verlauf bis zur nächsten Injektion an. Bei den Applikationstieren verhielt es sich genau umgekehrt. Hier wurden die höchsten Werte kurz nach der Applikation gemessen (16.86-125 l/kg). Sie fielen im weiteren Verlauf mit steigender Plasmakonzentrationen ab.

Es wurden die Halbwertszeiten der beiden intravenös behandelten Tiere nach jeder Injektion berechnet. Bei Tier 5202 waren sie kürzer (11.3 h, 24.9 h, 26.3 h) als bei Tier 5217 (41.5 h, 30.8 h, 41.9 h, 43.1 h).

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Bei dieser Studie handelte es sich um ein Projekt, das erste Erkenntnisse zur Effektivität des Gerätes VetDrop® 1500 liefern sollte um anhand dieser

Ergebnisse eine gute Basis für die Planung weiterer Studien zu schaffen. Aufgrund der bekannten grossen Variabilität der Plasmakonzentrationen nach transkutaner Applikation, der beschränkten Anzahl der Tiere, die für eine derart grosse Zahl an Einzelanalysen zur Verfügung standen und der bekannten individuellen Variation der NSAID-Absorption nach transkutaner Applikation ist diese Studie streng deskriptiv. Pharmakokinetische Berechnungen können streng genommen nur auf der Basis von Analysen gemacht werden, die Plasmakonzentrationen nach der intravenösen Gabe eines Stoffes bestimmen. Der Grund hierfür ist, dass bei Formeln der pharmakokinetischen Betrachtung von einem zentralen Kompartiment ausgegangen wird von welchem aus die Verteilung in weitere Kompartimente erfolgt. Bei transkutan verabreichten Arzneimitteln ist dies jedoch nicht der Fall, da die Stoffe erst periphere Kompartimente erreichen ehe sie in das zentrale Kompartiment gelangen. Pharmakokinetische Berechnungen transdermaler Arzneistoffe haben also zu einer verbesserten Veranschaulichung der Ergebnisse durchaus ihre Berechtigung, sie sollten jedoch stets unter Vorbehalt betrachtet werden.

5.2 Wissenschaftlicher Hintergrund

Bei der Behandlung von Gelenken durch transkutane Arzneistoffe ist bis heute nicht klar, ob der Wirkspiegel des Arzneimittels im Gelenk durch transkutanen Transport oder durch systemische Redistribution des Arzneimittels erreicht wird (62). Diesbezügliche bisherige Studien, ebenso wie die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Studie liefern keine eindeutigen Ergebnisse. Das liegt unter anderem daran, dass unterschiedliches Studiendesign eine Vergleichbarkeit der Daten sehr schwierig macht, da es zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen führt. Gerade bei der transkutanen Therapie gibt es eine Vielzahl von Faktoren welche die Penetrationseigenschaften und damit die Wirksamkeit von Arzneimitteln beeinflussen können (84). Zudem variiert die Beschaffenheit der Haut mit einer Vielzahl von Faktoren erheblich:

Speziesspezifische Unterschiede haben grossen Einfluss, wie wir sehr deutlich aus Studien mit Fentanylpflastern bei Hund, Katze, Schaf und Pferd ersehen können (61, 85-87). Desweiteren ist bekannt, dass sich Studienergebnisse transkutaner Applikationen vom Tier nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen lassen (54). Die anatomische Lokalisation spielt eine grosse Rolle, da nicht nur die Dicke der Epidermis sondern auch die subkutanen Strukturen insgesamt Unterschiede aufweisen. Auch die regionale Perfusion weist grosse anatomische und speziesspezifische Unterschiede auf. Ebenso kann der Einfluss von Wärmezufuhr und körperlicher Betätigung die perkutane Absorption eines Arzneimittels um ein Vielfaches steigern (88). Vergleiche von Ergebnissen einzelner Studien sind deshalb eingeschränkter sinnvoll als das für die anderen Applikationsarten zutrifft. Pharmakokinetische Daten von Carprofen wurden zwar bei einer Vielzahl von Spezies, inklusive des Schafes erhoben (10, 12, 14, 19-25, 32, 33, 37, 89), allerdings wurde Carprofen hierbei noch nie transdermal verabreicht. Studien transdermaler Applikationen anderer NSAIDs wurden beim Menschen und bei verschiedenen Tierspezies, aber nicht beim Schaf durchgeführt (1, 2, 7, 50-60, 63, 64, 84, 90, 91). Diese Studie ist somit sowohl im Hinblick auf das Applikationssystem als auch im Hinblick auf das Versuchsmodell als neuartig anzusehen.

5.3 Resultate

Bei allen Tieren des **Vorversuches** konnte Carprofen im Plasma und in der Synovia nachgewiesen werden, sowohl nach der intravenösen als auch nach der transkutanen Therapie. Wie zu erwarten, waren die Plasma- und Synovialkonzentrationen der intravenös behandelten Tiere höher als die der transkutan behandelten Tiere. Dies ist einerseits auf die höhere Dosis als auch auf die Art der Verabreichung zurückzuführen. Die Dosis der intravenös behandelten Tiere betrug 4 mg/kg Carprofen. Dies entspricht einer Gesamtdosis von 212 mg (Schaf 2222) bzw. 236 mg (Schaf 2223) Carprofen. Die transkutan behandelten Tiere wurden beidseitig jeweils mit 0.4 ml einer 12%-igen

Carprofen-Mikroemulsion behandelt. Dies entspricht einer Gesamtdosis von 96 mg pro Applikation und einer Dosierung von 1.6-1.7 mg/kg. Da es sich bei diesen Tieren um Schafe einer anderen Studie handelte, die an diesem Tag euthanasiert wurden, waren die Beprobungszeitpunkte abhängig vom Zeitpunkt der Euthanasie und somit nicht einheitlich. Bei den intravenös behandelten Tieren unterschieden sich die Konzentrationen nicht erheblich voneinander. Bei den Applikationstieren waren die Konzentrationen abhängig von der Anzahl der Applikationen wobei mehrfache Applikationen zu höheren Plasmakonzentrationen führten. Bei diesen Tieren wurden beide Kniegelenke behandelt und es konnte auch in beiden Kniegelenken Carprofen nachgewiesen werden. In der Synovialprobe eines Tieres (2225) konnte ein höherer Carprofen-Gehalt gemessen werden als im Plasma. Dies könnte auf einen direkten transkutanen Transport von Carprofen in das Gelenk hindeuten. Alle anderen Synovialproben enthielten weniger Carprofen als die jeweiligen Plasmaproben, was wiederum eher für eine systemische Redistribution des Arzneimittels spricht. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse des Vorversuchs mit den Ergebnissen des Hauptversuches ist aufgrund des unterschiedlichen Behandlungs- und Beprobungsprotokolls schwierig und war auch nicht das Ziel.

Bei den Applikationstieren des **Hauptversuches** konnte ebenfalls Carprofen nach der transkutanen Behandlung im Plasma und in der Synovia nachgewiesen werden. Die Plasma- und Synovialkonzentrationen waren bei drei Tieren in einem ähnlichen Konzentrationsbereich und bei einem Tier waren die Werte im gesamten Behandlungszeitraum höher. Um genauere Aussagen treffen zu können, ob es sich bei diesem Tier um eine Ausnahme handelt, müsste die Tierzahl in einem zukünftigen Versuch erhöht werden. Da das Tier konstant über den gesamten Behandlungszeitraum höhere Plasma- und Synovialkonzentrationen aufwies kann ein Messfehler ausgeschlossen werden

und es muss bei diesem Tier von einer verbesserten Absorption ausgegangen werden.

Plasmaproben der Gruppen 3 und 4

Nach der ersten Applikation kam es bei allen Tieren zu einem mehr oder weniger konstanten Anstieg der Plasmakonzentrationen. Bei den Tieren der Gruppe 3 wurde zunächst nur eine Spur Carprofen nachgewiesen. Im weiteren Verlauf wurden die höchsten Konzentrationen nach 18 bzw. 20 Stunden gemessen. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration nach transdermaler Applikation variiert je nach Studiendesign wobei die in unserer Studie gemessene Zeit durchaus vergleichbar ist mit in der Vergangenheit durchgeführten Studien. Bei Schafen wurden nach dem Auftragen eines Fentanyl Pflasters (2.05 µg/kg/Std.) maximale Plasmakonzentrationen von 0.62–2.73 ng/ml nach 4-24 Stunden (durchschnittlich 12 Stunden) gemessen (61). In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie mit transdermal mittels eines Pflasters verabreichten Flurbiprofens und Ketoprofens bei Ratten wurden maximale Plasmakonzentrationen nach der ersten Applikation nach 6.3 ± 2.1 Stunden (Flurbiprofen), bzw. nach 19.2 ± 3.4 Stunden (Ketoprofen) gemessen. Die gegebene Dosis lag hier bei 4.5 mg/kg Körpergewicht und die gemessene Höchstkonzentration im Plasma betrug bei Flurbiprofen 4.67 ± 0.71 µg/ml und bei Ketoprofen 1.53 µg/ml (90). In einer weiteren Studie wurden Ratten transkutan mit Flurbiprofen behandelt. Hierbei wurde zur Penetrationsverstärkung Iontophorese eingesetzt. Der Plasmakonzentrations-Peak wurde nach 30 Minuten gemessen und betrug 1.8 ± 0.1 µg/ml nach der Anwendung eines 40 mg Flurbiprofen Patches (64). Die in unserer Studie gemessenen Höchstkonzentrationen im Plasma lagen bei 72 ng/ml, 57.1 ng/ml, 342 ng/ml und 88.7 ng/ml bei einer gegebenen Dosis von 0.5-0.6 mg/kg Carprofen. In unserer Studie wurden zwischen 20 und circa 72 Stunden nach

der ersten Applikation keine weiteren Proben gewonnen da die Peak-Konzentration im Rahmen der ersten 20 Stunden vermutet wurde. Die Tatsache, dass bei zweien der Tiere die Höchstkonzentration nach 18 Stunden gemessen wurden und nach 20 Stunden ein leichter Abfall der Konzentration zu verzeichnen war deutet darauf hin, dass in diesem Zeitraum tatsächlich die höchsten Konzentrationen auftraten. Kurz vor der zweiten Applikation (durchschnittlich 72 Stunden nach der ersten Applikation) war noch immer Carprofen im Plasma nachweisbar (42-67 % der zuvor gemessenen Höchstkonzentration). Die Höchstkonzentrationen nach der zweiten Applikation wurden wiederum nach 18 Stunden gemessen und betrugen 187 ng/ml, 325 ng/ml, 572 ng/ml und 353 ng/ml. Es handelte sich hierbei um das bis zu 5.7- fache der zuvor gemessenen maximalen Konzentration. Es kam demnach zu einer leichten Akkumulation von Carprofen im Plasma. Möglicherweise wurde Carprofen in anderen Geweben gespeichert und erst verzögert freigesetzt. Da es sich jedoch um sehr niedrige Plasmakonzentrationen handelt, wird das Behandlungsprotokoll dennoch als sinnvoll angesehen. Im weiteren Behandlungsverlauf nahmen die Konzentrationen konstant leicht zu und es wurden - mit Ausnahme des Tieres 5212- die Höchstkonzentrationen in der 6. Behandlungswoche gemessen. Bei den Tieren 5203, 5204 und 5212 schwanken die Werte während dieser Behandlungsperiode, bleiben jedoch in einem Rahmen der als durchaus akzeptabel für eine längerfristige Behandlung angesehen werden kann. Bei Tier 5211 kommt es zum Ende der Behandlungsperiode hin zu einer deutlichen Konzentrationszunahme. In Woche 6 erreicht die Plasmakonzentration einen Wert von 1620 ng/ml. Beim Pferd geht man bei dieser Plasmakonzentration von einer analgetischen Wirksamkeit aus, da 1500 ng/ml Carprofen als minimale effektive Plasmakonzentration angesehen wird (41). Es ist davon auszugehen, dass im Falle einer längerfristigen Behandlung, die Plasmakonzentrationen weiter ansteigen würden. Dies muss bei der Planung eines

Behandlungsprotokolls bedacht werden. Nach Beendigung der Behandlungsperiode war in Woche 7 ein deutlicher Konzentrationsabfall bei allen Tieren zu verzeichnen.

Der Grund für das in allen gewonnenen Nullproben nachgewiesene Carprofen konnte nicht abschliessend geklärt werden. Bei den Tieren der Gruppe 4 konnte ebenfalls in den kurz nach dem Beginn der Applikation gewonnenen Proben Carprofen nachgewiesen werden wohingegen die ersten Proben der Tiere der Gruppe 3 kein Carprofen enthielten. Da eine Verunreinigung bei der Probenentnahme ausgeschlossen wurde, muss es sich um einen Messfehler oder eine Verunreinigung bei der Analyse der Proben handeln.

Synovialproben der Gruppen 3 und 4

In allen Synovialproben konnte Carprofen nachgewiesen werden. Die Carprofen-Konzentrationen waren in allen Synovialproben niedriger als in den zeitgleich gewonnenen Plasmaproben. Sie betragen im Durchschnitt 48-49% der Plasmakonzentrationen bei den Tieren der Gruppe 3 und 58-59% der Plasmakonzentrationen bei den Tieren der Gruppe 4. Bei der Gruppe 4 handelte es sich um die Tiere, die zusätzlich zu Carprofen mit Chitooligosacchariden behandelt wurden. Chitosan wird in der Medizin unter anderem aufgrund seiner absorptionsfördernden Eigenschaften als Drug Delivery System eingesetzt (92). Die geringe Tierzahl pro Gruppe erlaubt nur eine vorsichtige Aussage aber tendenziell scheint der Transport von Carprofen in die Synovia bei dieser Gruppe vermehrt stattgefunden zu haben oder das Carprofen wurde in reduziertem Masse aus der Synovia dieser Tiere eliminiert. Insgesamt erscheint das Verhältnis der Synovial- zur Plasmakonzentrationen eher niedrig. Da das von uns getestete Gerät in erster Linie transkutan den direkten Transport von Arzneistoffen in das Gelenk ermöglichen sollte, würde man höhere Synovialkonzentrationen im Verhältnis zur Plasmakonzentration wünschen als nach der intravenösen oder oralen Gabe von Medikamenten. In

einer Studie aus der Humanmedizin wurden Patienten mit Arthritis oral 100 mg Carprofen verabreicht. Die nach 4 Stunden gemessenen Serumkonzentrationen lagen durchschnittlich bei $9.8 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$ und die Synovialkonzentrationen bei durchschnittlich $6.2 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Synovial- zu Serumkonzentrationen lag im Durchschnitt bei $65.0 \pm 14.4 \%$ (35). Dies übersteigt den von uns errechneten Verhältniswert deutlich.

In beiden, aus den kontralateralen Kniegelenken gewonnenen, Synovialproben der Tiere 5211 und 5212, wurden ähnlich hohe Carprofen-Konzentrationen (76 bzw. 84%) nachgewiesen wie in den behandelten Kniegelenken. Diese Konzentrationen deuten eher auf eine systemische Redistribution des Arzneistoffes hin als auf den direkten transkutanen Transport. Allerdings könnte das Ergebnis auch damit zusammenhängen, dass der Zeitraum zwischen Applikation und der Gewinnung der Proben zu gross gewählt wurde und kurz nach der Applikation das Verhältnis Plasma/Synovia-Konzentration umgekehrt war.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Gewebekonzentration eines Wirkstoffes nach der transkutanen Applikation im Vergleich zur Synovialkonzentration. Es wäre durchaus möglich, dass die lokale Gewebekonzentration von Carprofen nach unserer Applikation die Synovialkonzentration und die Plasmakonzentration um ein Vielfaches überstieg. Dies würde die Therapie von Weichteilerkrankungen zu einem wichtigen Aspekt für den Einsatz von VetDrop® machen, wurde jedoch im Rahmen dieser Studie nicht erforscht.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse der Plasma- und Synovialkonzentrationen von Carprofen inter- und intraindividuelle Variabilitäten aufweisen kann eine Vielzahl von Gründen haben. Es kann mit der individuellen Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung des Medikaments durch das Einzeltier zusammenhängen oder auch mit äusseren Umständen, die sich täglich

veränderten (Aussentemperatur, Bewegung des Tieres, Grad der Entzündung etc.). Zudem hat die Handhabung des Applikationssystems Einfluss auf die Tröpfchengrösse der Mikroemulsion und führt somit zu einer veränderten Vernebelung die wiederum Einfluss auf die Penetration des Arzneimittels durch die Haut hat. Es könnte sich ausserdem um Ungenauigkeiten aufgrund der Probengewinnung, -aufbereitung oder -messung handeln, wobei durch einheitliches Management so weit wie möglich versucht wurde diese Faktoren auszuschliessen.

Plasmaproben der Gruppe 6

Bei den Tieren der Gruppe 6 konnte ab dem Zeitpunkt der ersten Injektion mit Rimadyl®, Carprofen im Plasma nachgewiesen werden. Die Nullproben enthielten bei beiden Tieren erwartungsgemäss kein Carprofen. Der Plasmakonzentrationsverlauf kann durch eine Eliminationskinetik erster Ordnung beschrieben werden. Es kam im Verlauf der Behandlungsperiode trotz wiederholter Injektionen zu keiner Akkumulation des Wirkstoffes. Bezüglich der minimalen effektiven Plasmakonzentration für Carprofen beim Schaf liegen keine Ergebnisse vor. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die im Rahmen dieser Studie niedrigste gemessene Konzentration kurz vor einer erneuten Injektion (14100 ng/ml) noch im Rahmen einer analgetisch wirksamen Plasmakonzentration liegt. Dies bedeutet, dass sowohl die Dosis als auch das Behandlungsintervall als klinisch sinnvoll angesehen werden können.

Die im Rahmen unserer Studie gemessenen Höchstkonzentrationen waren niedriger als in vorherigen Studien gemessene Konzentrationen. Nach der Gabe von 4 mg/kg Carprofen wurden in einer Studie bei Schafen etwa doppelt so hohe Konzentrationen gemessen wie in unserer Studie (12). Die Halbwertszeiten lagen in dieser Studie zwischen 24.6 und 43.5 Stunden und sind somit durchaus vergleichbar mit den anhand unserer Ergebnisse errechneten Halbwertszeiten (11.3 bis 43.1 Stunden). Eine weitere Studie

untersuchte die einzelnen Enantiomere von Carprofen nach der Injektion mit racemischem Carprofen, S(+)- oder R(-) Carprofen. Auch hier war die Summe der Konzentrationen und somit das Gesamt-Carprofen im Plasma mindestens doppelt so hoch wie in unserer Studie (24). Die Halbwertszeit wurde in dieser Studie für die einzelnen Enantiomere berechnet und war durchschnittlich länger (66.36 ± 21.81 Stunden) im Falle von R(-) Carprofen und kürzer (24.17 ± 5.98 Stunden) für S(+) Carprofen. Der Grund für die Abweichung der Ergebnisse dieser beiden Studien im Vergleich zu unserer Studie ist unklar. Jedes Labor arbeitet mit eigenen Standards und unterschiedlichen Referenzbereichen. Es ist durchaus möglich, dass diese Abweichung durch unterschiedliche Kalibrierung technischer Geräte zustande kam.

Nach Beendigung des Injektionsbehandlungsprotokolls kam es zu einem Absinken der Plasmakonzentrationen.

Die maximalen Plasmakonzentrationen nach der ersten (durchschnittlich 38725 ng/ml) sowie nach der zweiten Injektion (durchschnittlich 41341 ng/ml) bei den Tieren der Gruppe 6 wurden verglichen mit den maximalen Plasmakonzentrationen nach der ersten (durchschnittlich 139,95 ng/ml) und zweiten Applikation (durchschnittlich 359.25 ng/ml) bei den Tieren der Gruppen 3 und 4. Bei dieser Betrachtung muss beachtet werden, dass es sich hierbei um eine rein rechnerische Überlegung handelt. Zwischen der durchschnittlichen maximalen Plasmakonzentration nach der ersten Injektion und der durchschnittlichen maximalen Plasmakonzentration nach der zweiten Injektion der Gruppe 6 ist nur ein leichter Anstieg zu verzeichnen (38725 ng/ml zu 41341.5 ng/ml) obwohl die beiden Injektionen nur 24 Stunden auseinander lagen. Bei den Gruppen 3 und 4 ist der Anstieg der durchschnittlichen maximalen Konzentration nach der zweiten Applikation sehr viel deutlicher (139.95 ng/ml zu 359.25 ng/ml) obwohl zwischen beiden Applikationen durchschnittlich 72 Stunden lagen und die gegebene Dosis deutlich geringer

war als bei Gruppe 6. Es könnte sein, dass das transkutan verabreichte Carprofen in einem anderen Gewebe (Epidermis, Subkutis, Muskulatur, Bindegewebe, Faszien, Sehngewebe etc.) gespeichert und schrittweise freigesetzt wird wohingegen sich nach der Injektion die gesamte Menge Carprofen sofort im Blutkreislauf befindet. Ein weiterer Grund könnte eine verlangsamte Elimination des Wirkstoffes bei dieser niedrigen Konzentration sein da eine Korrelation zwischen der Konzentration eines Wirkstoffes im Plasma und der Eliminationsgeschwindigkeit besteht.

Zum Vergleich der maximalen Plasmakonzentrationen nach der ersten Applikation/ Injektion zwischen Gruppe 3/4 und Gruppe 6 wurde eine rein rechnerische Überlegung vorgenommen. Zunächst wurde das Verhältnis der gegebenen Dosis Carprofen bei den verschiedenen Gruppen bestimmt. Die Plasmakonzentrationen wurden erneut berechnet, davon ausgehend, dass alle Tiere 4 mg/kg Carprofen intravenös und transkutan erhalten hätten. Für Gruppe 6 wurde der Mittelwert der maximalen Plasmakonzentration nach der ersten Injektion berechnet. Das rechnerische Verhältnis der durchschnittlich maximalen Plasmakonzentration nach der ersten Applikation/ Injektion zwischen Gruppe 3/4 und Gruppe 6 unter Einbeziehung der gegebenen Dosis liegt für die Tiere 5203, 5204 und 5212 zwischen 1:65 und 1:85. Lediglich bei Tier 5211 liegt das Verhältnis zu den bei 1:17. Hätte man also bei diesen Tieren die gleiche Dosierung gegeben wie bei den Injektionstieren so würden die maximalen Plasmakonzentrationen aufgrund der Applikationsform 65 bis 85, beziehungsweise 17 mal niedriger sein als nach der intravenösen Injektion. Dies spricht einerseits für einen möglichen Verlust von Arzneistoff durch den auf der Haut verbleibenden Anteil des Arzneimittels. Ausserdem muss bedacht werden, dass bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration bei den Applikationstieren die Vorgänge der Resorption des Arzneistoffes in die Blutbahn und die Eliminationsprozesse 18 bis 20 Stunden lang parallel ablaufen

wohingegen die Peak-Konzentrationen bei den Injektionstieren direkt nach dem Zeitpunkt der Injektion nachgewiesen werden.

5.4 Studiendesign

5.4.1 Versuchsmodell

Das Schaf als Tiermodell wurde in dieser Studie aus mehreren Gründen gewählt; es handelt sich um ein etabliertes Modell in der orthopädischen Forschung da es dem Menschen vom Körpergewicht und der Knochenstruktur her ungefähr entspricht was eine Übertragbarkeit der gewonnen Erkenntnisse auf die Humanmedizin eher ermöglicht als bei anderen vielfach in der orthopädischen Forschung verwendeten Spezies (z.B. Maus) (93). Im Rahmen dieses Projektes wurde bei 28 Tieren ein osteochondraler Defekt auf dem medialen Kondylus des Femurs gesetzt um den Einfluss von VetDrop® in Verbindung mit der Verwendung verschiedener Substanzen auf die Knorpel- und Knochenheilung und auf die entstandene Entzündung zu erforschen und in unserer Gruppe wurde der hier verwendete Defekt bereits als Knorpeldefekt beschrieben und das Tiermodell standardisiert. Desweiteren arbeitet unsere Forschungsgruppe seit vielen Jahren mit Schafen und hat somit viel Erfahrung in der Beurteilung von Schmerzen beim Schaf was auch ein Aspekt dieses Projektes war. Das Schaf eignet sich ausserdem generell als Versuchstier weil es verhältnismässig einfach ist diese Tiere in grösserer Zahl artgerecht zu halten.

Hinsichtlich der Gewinnung von Synovia aus dem Kniegelenk stellte sich das Schaf jedoch als nicht ideales Versuchstier heraus. Da Schafe eine sehr geringe Menge an Synovia in Ihren Gelenken aufweisen, wurde die Punktion des Gelenkes nur unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Dies erforderte ein hohes Mass an Organisation und schränkte die mögliche Variabilität der Beprobungszeitpunkte deutlich ein. Zudem ist die Eignung des Schafes als Modell für Versuche, welche den transkutanen Stofftransport untersuchen im Hinblick auf eine Übertragbarkeit der Daten auf andere Spezies als fraglich

anzusehen (54) da sich die Haut von unterschiedlichen Tierarten hinsichtlich der Penetrationseigenschaften voneinander unterscheidet und das Gerät eher Anwendung in der Human- und Pferdeorthopädie finden wird als in der Schafmedizin. Desweiteren ist bis heute fraglich ob der transkutane Transport von Arzneimitteln durch die Haut direkt in die Gelenksflüssigkeit überhaupt möglich ist (62) wohingegen der Transport in kutane und subkutane Gewebeschichten als erwiesen gilt (84, 90). Es wäre demnach für den Funktionsnachweis des Gerätes von Vorteil, in einer Folgestudie zusätzliche Konzentrationsanalysen im kutanen und subkutanen Gewebe durchzuführen (Tissue cage modells).

Der Wirkstoff Carprofen wurde ausgewählt, da es sich um ein standardmässig in der Veterinär- und speziell in der Wiederkäuermedizin verwendetes Medikament mit bekannter analgetischer Wirkung aus der Reihe der nichtsteroidalen Antiphlogistika handelt.

5.4.2 Behandlungsprotokoll

Bei dem gewählten Behandlungsprotokoll für die systemisch behandelten Tiere wurde das für Carprofen (Rimadyl®) übliche Behandlungsintervall (alle 24 Stunden) eingehalten. Die Dosierung (4 mg/kg) und der Behandlungszeitraum (4 Tage) entsprachen dem klinisch üblichen postoperativen Management für vergleichbare Operationen an unserem Institut. Die Dosierung der verwendeten Substanzen (0.5 ml je Applikation) bei der Applikation sowie das Behandlungsprotokoll (6 Wochen lang, 3 mal wöchentlich) wurden gemäss den Angaben des Herstellers durchgeführt. Sie beruhen auf klinischen Erfahrungen aus dem Bereich der Pferdemedizin.

Es sollte durch die unbedingte Beibehaltung des jeweilig klinisch etablierten Behandlungsprotokolls der Vergleich des Heilungserfolgs zwischen herkömmlicher Behandlung und transkutaner Applikation deutlich werden. Dies führte zu einem unterschiedlichen Behandlungsintervall: Die Tiere der Gruppe 6 wurden täglich behandelt (4 Tage) wohingegen die Tiere der

Gruppen 3 und 4 alle 48-72 Stunden behandelt wurden (6 Wochen lang, insgesamt 18 Applikationen).

5.4.3 Beprobungsprotokoll

Sämtliche Proben wurden in einheitlichem Abstand zur Applikation gewonnen wobei versucht wurde, die Applikationen am Vormittag durchzuführen. Da jedoch die Applikationen nicht immer zur genau gleichen Tageszeit durchgeführt werden konnten, war die Tageszeit der Probenentnahme leicht variabel. Die donnerstags gewonnen Plasma- und Synovialproben fanden jeweils am Vormittag statt.

Hinsichtlich der Probenzahl wurde versucht ein Kompromiss zu finden um einerseits eine aussagekräftige Anzahl an Proben zu gewährleisten und andererseits die Tiere nicht durch eine übermässige Blutentnahme zu belasten oder die Ergebnisse zu verfälschen. Die Entnahme von Synovia wurde wöchentlich durchgeführt da die Gelenkpunktion zu einer entzündlichen Reaktion führen kann. Durch die Verstärkung der Entzündung wiederum könnte es zu einer schnelleren Akkumulation von Carprofen kommen da nichtsteroidale Antiphlogistika wie zuvor beschrieben rascher in entzündliches Gewebe penetrieren (11, 21).

5.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurde Carprofen mit Hilfe von VetDrop® transkutan transportiert und konnte im Plasma und in der Synovia der Versuchstiere nachgewiesen werden. Obwohl die Plasmawerte über den Behandlungszeitraum einer gewissen Schwankung unterlagen, blieben sie doch in einem Konzentrationsbereich der für eine längerfristige Therapie durchaus akzeptabel ist. Ob ein direkter Transport von Carprofen in das Gelenk stattfand oder ob das in den Gelenken nachgewiesene Carprofen durch systemische Redistribution verteilt wurde lässt nicht abschliessend beurteilen und es bedarf weiterer Studien.

Die transkutane Behandlung mit Arzneimitteln stellt eine gute Alternative zur systemischen Therapie dar. Insbesondere da es sich um eine schonende Methode der Arzneimittelverabreichung handelt, die mit weniger Schmerz und Infektionsgefahr einhergeht als zum Beispiel Injektionen. Meist wird die transkutane Therapie zur Gabe von analgetisch wirksamen Medikamenten verwendet und erspart so dem Patienten zusätzlichen Stress. Aufgrund der Vielzahl der zuvor besprochenen Faktoren, die Einfluss auf Plasma- und Gewebekonzentrationen haben, sollte sie jedoch mit Bedacht eingesetzt werden. Grund hierfür ist die hohe Variabilität der Plasma- und Gewebekonzentrationen trotz gleicher Voraussetzungen. Dies konnte anhand der in unserer Studie gewonnenen Ergebnisse nochmals bestätigt werden. Die klinische Einschätzung des Patienten wird dadurch deutlich erschwert und erfordert ein hohes Mass Aufmerksamkeit von Seiten des Tierarztes und des Besitzers.

5.6 Weiterführende Studien

Die Durchführung weiterführender Studien würde weitere wichtige Erkenntnisse bezüglich des pharmakokinetischen Verhaltens transkutan mittels VetDrop® verabreichter Arzneimittel liefern. Idealerweise sollte es sich hierbei um ein Projekt handeln, welches im Hinblick auf das Studiendesign genau auf die Gewinnung dieser Erkenntnisse ausgerichtet ist. Im Vergleich zu der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studie wäre eine Anpassung von Applikationen und Injektionen im Hinblick auf die gegebene Dosis des Arzneimittels und auf die Behandlungszeitpunkte und -intervalle von Vorteil, ebenso wie eine Angleichung der Beprobungszeitpunkte. Dies würde eine verbesserte Vergleichbarkeit der Daten ermöglichen. Anhand der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse wäre eine gezielte Auswahl an Beprobungszeitpunkten möglich, die eine insgesamt niedrigere Probenzahl pro Tier ermöglichen würde. Dadurch könnte eine grössere Anzahl an Tieren untersucht werden wodurch eine statistische Auswertung der Daten möglich

und eher sinnvoll würde. Zusätzlich wäre es sinnvoll, Plasma- und Synovialkonzentrationen eines Arzneimittels mit den Konzentrationen im Gewebe (Haut, Bindegewebe, Muskulatur) zu vergleichen. Zur Bestimmung der Konzentration eines Wirkstoffes im Gewebe bedient man sich verschiedener Methoden wobei es sich bei den traditionellen Methoden zumeist um relativ invasive und gewebeschädigende Techniken, wie zum Beispiel die Biopsie handelt. Nachteilig daran ist neben der Entstehung einer Entzündung und der einhergehenden Narbenbildung die Unmöglichkeit mehrere Proben der gleichen Lokalität zu gewinnen. Heute gibt es weniger invasive Methoden wie zum Beispiel die kutane Mikrodialyse. Diese erlaubt ein kontinuierliches Monitoring endo- und exogener Substanzen im Extrazellularraum der Haut und des subkutanen Gewebes mit einer minimalen Gewebsschädigung (7, 94). Die Verwendung dieser Methode könnte für eine weiterführende Studie in Betracht gezogen werden.

Eine zeitgleich zur Bestimmung der Arzneimittelkonzentration durchgeführte Schmerzbeurteilung könnte erste Erkenntnisse bezüglich einer minimalen therapeutischen Plasma- und Gewebekonzentration liefern, da diesbezüglich bisher leider wenige Informationen in der Literatur zu finden sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Taburet AM, Singlas E, Glass RC, Thomas F, Leutenegger E. Pharmacokinetic comparison of oral and local action transcutaneous flurbiprofen in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 1995;20(2):101-7.
2. Rabinowitz JL, Feldman ES, Weinberger A, Schumacher HR. Comparative tissue absorption of oral ¹⁴C-aspirin and topical triethanolamine ¹⁴C-salicylate in human and canine knee joints. *Journal of clinical pharmacology*. 1982;22(1):42-8.
3. Forth W, Henschler D, Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 1987.
4. Guggeler N, Klotz U. *Einführung in die Pharmakokinetik* 2000.
5. Frey HH, Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* 2009.
6. Rietbrock, Staib, Loew. *Klinische Pharmakologie* 2001.
7. Cross SE, Anderson C, Roberts MS. Topical penetration of commercial salicylate esters and salts using human isolated skin and clinical microdialysis studies. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46(1):29-35.
8. Hinz B, Brune K. Specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Basis and options of a pharmacotherapeutic concept. *Der Anaesthesist*. 2000;49(11):964-71.
9. Randall LO, Baruth H. Analgesic and anti-inflammatory activity of 6-chloro-alpha-methyl-carbazole-2-acetic acid (C-5720). *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 1976;220(1):94-114.
10. Lees P, Landoni MF. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of racemic carprofen in the horse. *J Vet Pharmacol Ther*. 2002;25(6):433-48.
11. Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004;27(6):479-90.
12. Welsh EM, Baxter P, Nolan AM. Pharmacokinetics of carprofen administered intravenously to sheep. *Research in veterinary science*. 1992;53(2):264-6.
13. Mathews KA. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne*. 1996;37(9):539-45.
14. Taylor PM, Delatour P, Landoni FM, Deal C, Pickett C, Shojaee Aliabadi F, et al. Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of carprofen in the cat. *Research in veterinary science*. 1996;60(2):144-51.
15. Balmer TV, Williams P, Selman IE. Comparison of carprofen and flunixin meglumine as adjunctive therapy in bovine respiratory disease. *Vet J*. 1997;154(3):233-41.
16. Maeda M, Tanaka Y, Suzuki T, Nakamura K. Pharmacological studies on carprofen, a new non-steroidal anti-inflammatory drug, in animals (author's transl). *Nippon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 1977;73(7):757-77.
17. Fox SM, Johnston SA. Use of carprofen for the treatment of pain and inflammation in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1997;210(10):1493-8.
18. Strub KM, Aeppli L, Muller RK. Pharmacological properties of carprofen. *European journal of rheumatology and inflammation*. 1982;5(4):478-87.

19. Parton K, Balmer TV, Boyle J, Whittam T, MacHon R. The pharmacokinetics and effects of intravenously administered carprofen and salicylate on gastrointestinal mucosa and selected biochemical measurements in healthy cats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2000;23(2):73-9.
20. McKellar Q, Pearson T, Bogan JA, Galbraith EA, Lees P, Ludwig B, et al. Pharmacokinetics, tolerance and serum thromboxane inhibition of carprofen in the dog. *Journal of small animal practice.* 1990;31:443-8.
21. McKellar QA, Delatour P, Lees P. Stereospecific pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the dog. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994;17(6):447-54.
22. Armstrong S, Tricklebank P, Lake A, Freat S, Lees P. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid - a comparison with ketoprofen. *J Vet Pharmacol Ther.* 1999;22(3):196-201.
23. Delatour P, Foot R, Foster AP, Baggot D, Lees P. Pharmacodynamics and chiral pharmacokinetics of carprofen in calves. *The British veterinary journal.* 1996;152(2):183-98.
24. Cheng Z, Nolan A, Monteiro A, McKellar Q. Enantioselective pharmacokinetics and cyclo-oxygenase inhibition of carprofen and carprofen enantiomers in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26(5):391-4.
25. Lees P, Delatour P, E. B, AP. F. Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in the horse. *Acta veterinaria scandinavica Supplementum.* 1991;87:249-51.
26. Lees P, Delatour P, Foster AP, Foot R, Baggot D. Evaluation of carprofen in calves using a tissue cage model of inflammation. *The british veterinary journal.* 1996;152(2):199-211.
27. Soraci A, Benoit E, Jaussaud P, Lees P, Delatour P. Enantioselective glucuronidation and subsequent biliary excretion of carprofen in horses. *Am J Vet Res.* 1995;56(3):358-61.
28. Kemmerer JM, Rubio FA, McClain RM, Koechlin BA. Stereospecific assay and stereospecific disposition of racemic carprofen in rats. *J Pharm Sci.* 1979;68(10):1274-80.
29. Iwakawa S, Spahn H, Benet LZ, Lin ET. Stereoselective disposition of carprofen, flunoxaprofen, and naproxen in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 1991;19(5):853-7.
30. Iwakawa S, Suganuma T, Lee SF, Spahn H, Benet LZ, Lin ET. Direct determination of diastereomeric carprofen glucuronides in human plasma and urine and preliminary measurements of stereoselective metabolic and renal elimination after oral administration of carprofen in man. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 1989;17(4):414-9.
31. Stoltenborg JK, Puglisi CV, Rubio F, Vane FM. High-performance liquid chromatographic determination of stereoselective disposition of carprofen in humans. *J Pharm Sci.* 1981;70(11):1207-12.
32. Lees P, McKellar Q, May SA, Ludwig B. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the horse. *Equine Vet J.* 1994;26(3):203-8.
33. McKellar QA, Bogan JA, von Fellenberg RL, Ludwig B, Cawley GD. Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Vet J.* 1991;23(4):280-4.
34. Rubio F, Seawall S, Pocelinko R, DeBarbieri B, Benz W, Berger L, et al. Metabolism of carprofen, a nonsteroid anti-inflammatory agent, in rats, dogs, and humans. *J Pharm Sci.* 1980;69(11):1245-53.

35. Jalava S, Heizmann P, Kylmamaa T. Concentration of carprofen in the serum and the synovial fluid in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1983;48:11-2.
36. Maire-Gauthier R, Buronfosse T, Magdalou J, Herber R, Besse S, Delatour P, et al. Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.* 1998;28(6):595-604.
37. Ray JE, Wade DN. The pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C-carprofen in man. *Biopharmaceutics & drug disposition.* 1982;3(1):29-38.
38. Priymenko N, Garnier F, Ferre JP, Delatour P, Toutain PL. Enantioselectivity of the enterohepatic recycling of carprofen in the dog. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 1998;26(2):170-6.
39. Otto K, Adams HA. Experimental studies on the central analgesic effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug carprofen in a sheep model -- preliminary results. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2005;40(1):25-31.
40. Welsh EM, Nolan AM. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the hyperalgesia to noxious mechanical stimulation induced by the application of a tourniquet to a forelimb of sheep. *Research in veterinary science.* 1994;57(3):285-91.
41. Schatzmann U, Gugelmann M, Von Cranach J, Ludwig BM, Rehm WF. Pharmacodynamic evaluation of the peripheral pain inhibition by carprofen and flunixin in the horse. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde.* 1990;132(9):497-504.
42. Lascelles BD, Cripps PJ, Jones A, Waterman-Pearson AE. Efficacy and kinetics of carprofen, administered preoperatively or postoperatively, for the prevention of pain in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Vet Surg.* 1998;27(6):568-82.
43. Balmer TV, Irvine D, Jones RS, Roberts MJ, Slingsby L, Taylor PM, et al. Comparison of carprofen and pethidine as postoperative analgesics in the cat. *The Journal of small animal practice.* 1998;39(4):158-64.
44. Benton HP, Vasseur PB, Broderick-Villa GA, Koolpe M. Effect of carprofen on sulfated glycosaminoglycan metabolism, protein synthesis, and prostaglandin release by cultured osteoarthritic canine chondrocytes. *Am J Vet Res.* 1997;58(3):286-92.
45. Armstrong S, Lees P. Effects of R and S enantiomers and a racemic mixture of carprofen on the production and release of proteoglycan and prostaglandin E₂ from equine chondrocytes and cartilage explants. *Am J Vet Res.* 1999;60(1):98-104.
46. Cheng Z, Nolan A, McKellar QA. Anti-inflammatory effects of carprofen, carprofen enantiomers, and N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in sheep. *Am J Vet Res.* 2002;63(6):782-8.
47. Ricketts AP, Lundy KM, Seibel SB. Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 and 2 by carprofen and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Vet Res.* 1998;59(11):1441-6.
48. Kay-Mugford P, Benn SJ, LaMarre J, Conlon P. In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs. *Am J Vet Res.* 2000;61(7):802-10.
49. Frean SP, Abraham LA, Lees P. In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Research in veterinary science.* 1999;67(2):183-90.
50. Mazieres B. Topical ketoprofen patch. *Drugs R D.* 2005;6(6):337-44.
51. Radermacher J, Jentsch D, Scholl MA, Lustinetz T, Frolich JC. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in

- inflammatory and degenerative joint disease. *British journal of clinical pharmacology*. 1991;31(5):537-41.
52. Dawson M, McGee CM, Vine JH, Nash P, Watson TR, Brooks PM. The disposition of biphenylacetic acid following topical application. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;33(6):639-42.
53. Singh P, Roberts MS. Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of salicylic acid after topical application. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1993;21(4):337-73.
54. Singh P, Roberts MS. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1993;268(1):144-51.
55. Conte L, Ramis J, Mis R, Forn J, Vilaro S, Reina M, et al. Percutaneous absorption and skin distribution of [¹⁴C]flutrimazole in mini-pigs. *Arzneimittel-Forschung*. 1992;42(6):847-53.
56. McNeill SC, Potts RO, Francoeur ML. Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? *Pharmaceutical research*. 1992;9(11):1422-7.
57. Baldwin JR, Carrano RA, Imondi AR. Penetration of trolamine salicylate into the skeletal muscle of the pig. *J Pharm Sci*. 1984;73(7):1002-4.
58. Riess W, Schmid K, Botta L, Kobayashi K, Moppert J, Schneider W, et al. The percutaneous absorption of diclofenac. *Arzneimittel-Forschung*. 1986;36(7):1092-6.
59. Ishihama H, Kimata H, Mizushima Y. Percutaneous penetration of indomethacin. *Experientia*. 1979;35(6):798-9.
60. Giese U. Absorption and distribution of ibuprofen from a cream formulation after dermal administration to guinea pigs. *Arzneimittel-Forschung*. 1990;40(1):84-8.
61. Ahern BJ, Soma LR, Rudy JA, Uboh CE, Schaer TE. Pharmacokinetics of fentanyl administered transdermally and intravenously in sheep. *Am J Vet Res*. 2010;71(10):1127-32.
62. Vaile JH, Davis P. Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature. *Drugs*. 1998;56(5):783-99.
63. So JW, Park HH, Lee SS, Kim DC, Shin SC, Cho CW. Effect of microneedle on the pharmacokinetics of ketoprofen from its transdermal formulations. *Drug Deliv*. 2009;16(1):52-6.
64. Mathy FX, Lombry C, Verbeeck RK, Preat V. Study of the percutaneous penetration of flurbiprofen by cutaneous and subcutaneous microdialysis after iontophoretic delivery in rat. *J Pharm Sci*. 2005;94(1):144-52.
65. Friedman DI, Schwarz JS, Weisspapir M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pharm Sci*. 1995;84(3):324-9.
66. Chen H, Chang X, Du D, Li J, Xu H, Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int J Pharm*. 2006;315(1-2):52-8.
67. Schulman JH, Stoeckenius W, Prince LM. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *Journal of chemical physics*. 1959:1677-80.
68. Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 1999;16(5):461-521.
69. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 2000;45(1):89-121.

70. Attwood D, Currie LRJ, Elworthy PH. Studies of solubilized micellar solutions. I. Phase studies and particle size analysis of solutions with nonionic surfactants. *J Colloid Interface Sci.* 1974;46(2):149-56.
71. Park KM, Kim CK. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *International journal of pharmaceutics.* 1999;181(2):173-9.
72. von Corswant C, Thoren P, Engstrom S. Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. *J Pharm Sci.* 1998;87(2):200-8.
73. Delgado-Charro MB, Iglesias-Vilas G, Blanco-Mendez J, Lopez-Quintela MA, Marty J-P, Guy RH. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European journal of pharmaceutics and piopharmaceutics.* 1997;43(1):37-42.
74. Rhee YS, Choi JG, Park ES, Chi SC. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *International journal of pharmaceutics.* 2001;228(1-2):161-70.
75. Yuan Y, Li SM, Mo FK, Zhong DF. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *International journal of pharmaceutics.* 2006;321(1-2):117-23.
76. Subramanian N, Ghosal SK, Moulik SP. Enhanced in vitro percutaneous absorption and in vivo anti-inflammatory effect of a selective cyclooxygenase inhibitor using microemulsion. *Drug development and industrial pharmacy.* 2005;31(4-5):405-16.
77. Sintov AC, Botner S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *International journal of pharmaceutics.* 2006;311(1-2):55-62.
78. Lee J, Lee Y, Kim J, Yoon M, Choi YW. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aceclofenac. *Archives of pharmacal research.* 2005;28(9):1097-102.
79. Fathy IA, Hamdy MD, Ahmed MS. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic effects of piroxicam-loaded microemulsion in topical formulations. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.* 2011;3(2).
80. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clinical orthopaedics and related research.* 2001(391 Suppl):362-9.
81. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg.* 1999;28(4):242-55.
82. Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *The american journal of sports medicine.* 2006;34(11):1824-31.
83. Thomas L. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik 2008.
84. Singh P, Roberts MS. Local deep tissue penetration of compounds after dermal application: structure-tissue penetration relationships. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 1996;279(2):908-17.

85. Kyles AE, Papich M, Hardie EM. Disposition of transdermally administered fentanyl in dogs. *Am J Vet Res.* 1996;57(5):715-9.
86. Lee DD, Papich MG, Hardie EM. Comparison of pharmacokinetics of fentanyl after intravenous and transdermal administration in cats. *Am J Vet Res.* 2000;61(6):672-7.
87. Maxwell LK, Thomasy SM, Slovis N, Kollias-Baker C. Pharmacokinetics of fentanyl following intravenous and transdermal administration in horses. *Equine Vet J.* 2003;35(5):484-90.
88. Danon A, Ben-Shimon S, Ben-Zvi Z. Effect of exercise and heat exposure on percutaneous absorption of methyl salicylate. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;31(1):49-52.
89. Clark TP, Chieffo C, Huhn JC, Nimz EL, Wang C, Boy MG. The steady-state pharmacokinetics and bioequivalence of carprofen administered orally and subcutaneously in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26(3):187-92.
90. Goi N, Morishita K, Taniguchi A, Ishii T, Saitoh K. Evaluation of percutaneous permeation of flurbiprofen and ketoprofen after application of transdermal patches using a lateral sectioning approach in hairless rats. *Pharm Dev Technol.* 2010;15(6):658-65.
91. Mills PC, Magnusson BM, Cross SE. Penetration of a topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug into local tissues and synovial fluid of dogs. *Am J Vet Res.* 2005;66(7):1128-32.
92. Park BK, Kim MM. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci.* 2010;11(12):5152-64.
93. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative medicine.* 2001;51(4):292-9.
94. Groth L. Cutaneous microdialysis. Methodology and validation. *Acta dermatovenereologica Supplementum.* 1996;197:1-61.

7 Abkürzungsverzeichnis

ISTD	Interner Standard
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol.-%	Volumenprozent

8 Anhang

8.1 Tabellen

8.1.1 Behandlung

Tabelle 1.1: Behandlung Applikation Gr. 3 und 4

	Woche 0 Applikation 1 Tag 0 Sonntag präoperativ	Woche 1 Applikation 2 Tag 3 Mittwoch	Woche 1 Applikation 3 Tag 5 Freitag	Woche 2 Applikation 4 Tag 8 Montag	Woche 2 Applikation 5 Tag 10 Mittwoch	Woche 2 Applikation 6 Tag 12 Freitag
Schafe						
5203 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5204 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5211 Gr.4	x	x	x	x	x	x
5212 Gr.4	x	x	x	x	x	x
	Woche 3 Applikation 7 Tag 15 Montag	Woche 3 Applikation 8 Tag 17 Mittwoch	Woche 3 Applikation 9 Tag 19 Freitag	Woche 4 Applikation 10 Tag 22 Montag	Woche 4 Applikation 11 Tag 24 Mittwoch	Woche 4 Applikation 12 Tag 26 Freitag
Schafe						
5203 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5204 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5211 Gr.4	x	x	x	x	x	x
5212 Gr.4	x	x	x	x	x	x
	Woche 5 Applikation 13 Tag 29 Montag	Woche 5 Applikation 14 Tag 31 Mittwoch	Woche 5 Applikation 15 Tag 33 Freitag	Woche 6 Applikation 16 Tag 36 Montag	Woche 6 Applikation 17 Tag 38 Mittwoch	Woche 6 Applikation 18 Tag 40 Freitag
Schafe						
5203 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5204 Gr.3	x	x	x	x	x	x
5211 Gr.4	x	x	x	x	x	x
5212 Gr.4	x	x	x	x	x	x

Tabelle 1.2: Behandlung Injektion Gr. 6

	Woche 1 Injektion 1 Tag 1 Montag	Woche 1 Injektion 2 Tag 2 Dienstag	Woche 1 Injektion 3 Tag 3 Mittwoch	Woche 1 Injektion 4 Tag 4 Donnerstag
Schafe				
5202 Gr.6	x	x	x	x
5217 Gr.6	x	x	x	x

8.1.2 Beprobung

8.1.2.1 Plasmaproben

Tabelle 2.1: Gruppe 3

Schafe	Woche 0														Woche 1														Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6	Woche 7
	Tag 0/1														Tag 3/4														Tag 5	Tag 11/12	Tag 18/19	Tag 25/26	Tag 30/33	Tag 39/40	Tag 46
	Appl 1 So/Mo														Appl 2 Mi/Do														Appl 3 Fr	Appl 6 Do/Fr	Appl 9 Do/Fr	Appl 12 Do/Fr	Appl 15 Di/Fr	Appl 18 Do/Fr	
	Nullprobe	15 min	20 min	30 min	60 min	2 Std	3 Std	6 Std	18 Std (Mo)	parallel zu Synovia (Mo)	Nullprobe	15 min	20 min	30 min	60 min	2 Std	3 Std	6 Std	18 Std (Do)	parallel zu Synovia (Fr)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)			
5203 Gr.3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
5204 Gr.3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			

Tabelle 2.2: Gruppe 4

Schafe	Woche 0														Woche 1														Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6	Woche 7
	Tag 0/1														Tag 3/4														Tag 5	Tag 11/12	Tag 18/19	Tag 25/26	Tag 30/33	Tag 39/40	Tag 46
	Appl 1 So/Mo														Appl 2 Mi/Do														Appl 3 Fr	Appl 6 Do/Fr	Appl 9 Do/Fr	Appl 12 Do/Fr	Appl 15 oi/Fr	Appl 18 Do/Fr	
	Nullprobe	15 min	20 min	30 min	60 min	2 Std	3 Std	6 Std	18 Std (Mo)	parallel zu Synovia (Mo)	Nullprobe	15 min	20 min	30 min	60 min	2 Std	3 Std	6 Std	18 Std (Do)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)	6 Std nach Appl (Fr)	parallel zu Synovia (Do)			
5211 Gr.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
5212 Gr.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			

Tabelle 2.3: Gruppe 6

Schafe	Woche 1				Woche 1				Woche 1				Woche 1				Woche 1				Woche 2		Woche 2												
	Tag 1 Injektion 1				Tag 2 Injektion 2				Tag 3 Injektion 3				Tag 4 Injektion 4				Tag 5				Tag 8		Tag 12												
	Mo				Di				Mi				Do				Fr				Mo		Fr												
	5 min vor Injektion	10 min nach Injektion	60 min	180 min	360 min	12 Std	5 min vor Injektion	10 min nach Injektion	60 min	180 min	360 min	12 Std	5 min vor Injektion	10 min nach Injektion	60 min	180 min	360 min	12 Std	5 min vor Injektion	10 min nach Injektion	60 min	180 min	360 min	12 Std	einmalige Blutprobe (Zeitpkt wie 10 min)										
5202 Gr.6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
5217 Gr.6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		

8.1.2.2 Synovialproben

Tabelle 2.4: Gruppe 3

Schafe	Woche 1 Tag 1 (Mo) OP	Woche 1 Tag 5 (Fr)	Woche 2 Do	Woche 3 Do	Woche 4 Do	Woche 5 Di	Woche 6 Do	Woche 6 Do	Woche 7 Do
	intra OP	unter Ultraschallkontrolle	contralaterales Knie unter Ultraschallkontrolle	unter Ultraschallkontrolle					
5203 Gr.3	x	x	x	x	x	x	x		x
5204 Gr.3	x	x	x	x	x	x	x		x

Tabelle 2.5: Gruppe 4

Schafe	Woche 1 Tag 1 (Mo) OP	Woche 1 Do	Woche 2 Do	Woche 3 Do	Woche 4 Do	Woche 5 Do	Woche 6 Do	Woche 6 Do	Woche 7 Do
	intra OP	unter Ultraschallkontrolle	contralaterales Knie unter Ultraschallkontrolle	unter Ultraschallkontrolle					
5211 Gr.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5212 Gr.4	x	x	x	x	x	x	x	x	x

8.1.3. Ergebnisse der Carprofen-Konzentrationen

Tabelle 3.1: Vorversuch

Schaf	Probe	c (ng/ml)	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
2222	P1	14760.0		Plasmaprobe	20.5 Std nach 1. Injektion
2222	S1		6100.0	Synovialprobe re	23.5 Std nach 1. Injektion
2222	S2		-	Synovialprobe li	-
2223	P1	13860.0		Plasmaprobe	24.5 Std nach 1. Injektion
2223	S1		9900.0	Synovialprobe re	26 Std nach 1. Injektion
2223	S2		8100.0	Synovialprobe li	26 Std nach 1. Injektion
2225	P1	91.0		Plasmaprobe	16.5 Std nach 1. Applikation
2225	S1		167.0	Synovialprobe re	18 Std nach 1. Applikation
2225	S2		34.0	Synovialprobe li	18 Std nach 1. Applikation
2224	P1	705.0		Plasmaprobe	13 Std nach 2. Applikation
2224	S1		369.0	Synovialprobe re	15 Std nach 2. Applikation
2224	S2		412.0	Synovialprobe li	15 Std nach 2. Applikation
2221	P1	747.0		Plasmaprobe	18 Std nach 5. Applikation
2221	S1		337.0	Synovialprobe re	19.5 Std nach 5. Applikation
2221	S2		526.0	Synovialprobe li	19.5 Std nach 5. Applikation

8.1.3.1 Applikationsgruppe 3 - Carprofen

Tabelle 3.2: Schaf 5203

Schaf	Probe	c (ng/ml)	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5203	P1				Nullprobe (Tag 0, Sonntag, 1 Tag vor Operation)
5203	P2			Plasmaprobe	15 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P3			Plasmaprobe	20 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P4	< 2.0		Plasmaprobe	30 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P5	2.6		Plasmaprobe	1 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P6	5.5		Plasmaprobe	2 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P7	7.2		Plasmaprobe	3 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P8	19.1		Plasmaprobe	6 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5203	P9	72.0		Plasmaprobe	18 Std nach 1. Applikation (Tag 1)
5203	P10	61.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe, intra OP (Tag 1)
5203	S1		25.3	Synovialprobe	intraoperativ entnommen (Tag 1)
5203	P11	35.4		Plasmaprobe	5 Min vor 2. Applikation (Tag 3)
5203	P12	34.3		Plasmaprobe	15 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P13	33.8		Plasmaprobe	20 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P14	34.8		Plasmaprobe	30 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P15	33.8		Plasmaprobe	1 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P16	41.2		Plasmaprobe	2 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P17	46.8		Plasmaprobe	3 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P18	104.0		Plasmaprobe	6 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5203	P19	187.0		Plasmaprobe	18 Std nach 2. Applikation (Tag 4)
5203	P20	112.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 1)
5203	S2		77.8	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 1)
5203	P21	416.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 1)
5203	P22	365.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 2)
5203	S3		293.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 2)
5203	P23	419.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 2)
5203	P24	256.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 3)
5203	S4		65.6	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 3)
5203	P25	402.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 3)
5203	P26	420.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 4)
5203	S5		195.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 4)
5203	P27	301.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 4)
5203	P28	220.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 5)
5203	S6		61.3	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 5)
5203	P29	203.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 5)
5203	P30	553.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 6)
5203	S7		327.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 6)
5203	P31	343.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 6)
5203	P32	63.4		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 7)
5203	S9		23.6	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 7)

Tabelle 3.3: Schaf 5204

Schaf	Probe	c (ng/ml)	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5204	P1	4.5		Plasmaprobe	Nullprobe (Tag 0, Sonntag, 1 Tag vor Operation)
5204	P2			Plasmaprobe	15 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P3			Plasmaprobe	20 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P4			Plasmaprobe	30 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P5	< 2.0		Plasmaprobe	1 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P6	4.1		Plasmaprobe	2 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P7	7.7		Plasmaprobe	3 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P8	16.8		Plasmaprobe	6 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5204	P9	54.1		Plasmaprobe	18 Std nach 1. Applikation (Tag 1)
5204	P10	57.1		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe, intra OP (Tag 1)
5204	S1		13.4	Synovialprobe	intraoperativ entnommen (Tag 1)
5204	P11	38.0		Plasmaprobe	5 Min vor 2. Applikation (Tag 3)
5204	P12	34.6		Plasmaprobe	15 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P13	35.4		Plasmaprobe	20 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P14	35.5		Plasmaprobe	30 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P15	36.2		Plasmaprobe	1 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P16	42.1		Plasmaprobe	2 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P17	46.4		Plasmaprobe	3 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P18	105.0		Plasmaprobe	6 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5204	P19	325.0		Plasmaprobe	18 Std nach 2. Applikation (Tag 4)
5204	P20	326.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 1)
5204	S2		209.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 1)
5204	P21	456.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 1)
5204	P22	353.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 2)
5204	S3		274.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 2)
5204	P23	347.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 2)
5204	P24	396.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 3)
5204	S4		239.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 3)
5204	P25	479.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 3)
5204	P26	403.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 4)
5204	S5		178.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 4)
5204	P27	376.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 4)
5204	P28	307.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 5)
5204	S6		194.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 5)
5204	P29	412.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 5)
5204	P30	695.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 6)
5204	S7		281.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 6)
5204	P31	675.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 6)
5204	P32	163.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 7)
5204	S9		26.4	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 7)

8.1.3.2 Applikationsgruppe 4 – *Carprofen und Chitooligosaccharide*

Tabelle 3.4: Schaf 5211

Schaf	Probe	c (ng/ml)	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5211	P1	33.1		Plasmaprobe	Nullprobe (Tag 0, Sonntag, 1 Tag vor Operation)
5211	P2	33.0		Plasmaprobe	15 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P3	69.2		Plasmaprobe	20 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P4	35.7		Plasmaprobe	30 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P5	40.5		Plasmaprobe	1 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P6	76.4		Plasmaprobe	2 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P7	120.0		Plasmaprobe	3 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P8	178.0		Plasmaprobe	6 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5211	P9	342.0		Plasmaprobe	18 Std nach 1. Applikation (Tag 1)
5211	P10	297.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe, intra OP (Tag 1)
5211	S1		134.0	Synovialprobe	intraoperativ entnommen (Tag 1)
5211	P11	145.0		Plasmaprobe	5 Min vor 2. Applikation (Tag 3)
5211	P12	114.0		Plasmaprobe	15 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P13	108.0		Plasmaprobe	20 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P14	134.0		Plasmaprobe	30 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P15	135.0		Plasmaprobe	1 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P16	188.0		Plasmaprobe	2 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P17	269.0		Plasmaprobe	3 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P18	360.0		Plasmaprobe	6 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5211	P19	572.0		Plasmaprobe	18 Std nach 2. Applikation (Tag 4)
5211	P20	572.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 1)
5211	S2		394.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 1)
5211	P21	849.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 1)
5211	P22	1050.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 2)
5211	S3		845.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 2)
5211	P23	882.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 2)
5211	P24	784.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 3)
5211	S4		461.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 3)
5211	P25	959.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 3)
5211	P26	949.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 4)
5211	S5		398.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 4)
5211	P27	949.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 4)
5211	P28	1457.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 5)
5211	S6		501.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 5)
5211	P29	1327.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 5)
5211	P30	1620.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 6)
5211	S7		1350.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 6)
5211	S8		1030.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen, kontralateral
5211	P31	1347.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 6)
5211	P32	486.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 7)
5211	S9		165.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 7)

Tabelle 3.5: Schaf 5212

Schaf	Probe	c (ng/ml)	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5212	P1	17.4		Plasmaprobe	Nullprobe (Tag 0, Sonntag, 1 Tag vor Operation)
5212	P2	18.0		Plasmaprobe	15 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P3	16.6		Plasmaprobe	20 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P4	12.1		Plasmaprobe	30 Min nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P5	13.7		Plasmaprobe	1 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P6	14.9		Plasmaprobe	2 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P7	20.0		Plasmaprobe	3 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P8	28.4		Plasmaprobe	6 Std nach 1. Applikation (Tag 0)
5212	P9	81.9		Plasmaprobe	18 Std nach 1. Applikation (Tag 1)
5212	P10	88.7		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe, intra OP (Tag 1)
5212	S1		78.0	Synovialprobe	intraoperativ entnommen (Tag 1)
5212	P11	59.6		Plasmaprobe	5 Min vor 2. Applikation (Tag 3)
5212	P12	52.3		Plasmaprobe	15 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P13	53.1		Plasmaprobe	20 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P14	57.8		Plasmaprobe	30 Min nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P15	58.9		Plasmaprobe	1 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P16	65.4		Plasmaprobe	2 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P17	85.8		Plasmaprobe	3 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P18	176.0		Plasmaprobe	6 Std nach 2. Applikation (Tag 3)
5212	P19	353.0		Plasmaprobe	18 Std nach 2. Applikation (Tag 4)
5212	P20	353.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 1)
5212	S2		229.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 1)
5212	P21	448.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 1)
5212	P22	461.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 2)
5212	S3		352.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 2)
5212	P23	365.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 2)
5212	P24	637.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 3)
5212	S4		417.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 3)
5212	P25	490.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 3)
5212	P26	550.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 4)
5212	S5		418.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 4)
5212	P27	525.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 4)
5212	P28	506.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 5)
5212	S6		288.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 5)
5212	P29	580.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 5)
5212	P30	449.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 6)
5212	S7		213.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 6)
5212	S8		179.0	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen, kontralateral
5212	P31	391.0		Plasmaprobe	6 Std nach Applikation (Freitag, Wo 6)
5212	P32	146.0		Plasmaprobe	parallel zu Synovialprobe (Wo 7)
5212	S9		13.4	Synovialprobe	unter Ultraschallkontrolle entnommen (Wo 7)

8.1.3.3 Injektionsgruppe 6 – Carprofen (Rimadyl®)

Tabelle 3.6: Schaf 5202

Schaf	Probe	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5202	P1	0.0	Plasmaprobe	Nullprobe (Tag 1, Montag, Tag der Operation)
5202	P2	37500.0	Plasmaprobe	10 Min nach 1. Injektion (Tag 1)
5202	P3	29400.0	Plasmaprobe	1 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5202	P4	24400.0	Plasmaprobe	2 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5202	P5	23000.0	Plasmaprobe	3 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5202	P6	18200.0	Plasmaprobe	12 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5202	P7	14100.0	Plasmaprobe	5 Min vor 2. Injektion (Tag 2)
5202	P8	39100.0	Plasmaprobe	10 Min nach 2. Injektion (Tag 2)
5202	P9	16000.0	Plasmaprobe	1 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5202	P10	31400.0	Plasmaprobe	2 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5202	P11	29200.0	Plasmaprobe	3 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5202	P12	25900.0	Plasmaprobe	12 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5202	P13	20000.0	Plasmaprobe	5 Min vor 3. Injektion (Tag 3)
5202	P14	39700.0	Plasmaprobe	10 Min nach 3. Injektion (Tag 3)
5202	P15	36100.0	Plasmaprobe	1 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5202	P16	31900.0	Plasmaprobe	2 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5202	P17	30100.0	Plasmaprobe	3 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5202	P18	26200.0	Plasmaprobe	12 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5202	P19	20900.0	Plasmaprobe	5 Min vor 4. Injektion (Tag 4)
5202	P20	22633.0	Plasmaprobe	10 Min nach 4. Injektion (Tag 4)
5202	P21		Plasmaprobe	1 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5202	P22		Plasmaprobe	2 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5202	P23		Plasmaprobe	3 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5202	P24		Plasmaprobe	12 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5202	P25		Plasmaprobe	23.55 Std nach 4. Injektion (Tag 5)
5202	P26	21800.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 5)
5202	P27	20700.0	Plasmaprobe	1 Std (Tag 5)
5202	P28	19200.0	Plasmaprobe	2 Std (Tag 5)
5202	P29	19100.0	Plasmaprobe	6 Std (Tag 5)
5202	P30	16200.0	Plasmaprobe	12 Std (Tag 5)
5202	P31	5200.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 8)
5202	P32	500.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 12)

Tabelle 3.7: Schaf 5217

Schaf	Probe	c (ng/ml)	Probenart	Zeitpunkt
5217	P1	0.0	Plasmaprobe	Nullprobe (Tag 1, Montag, Tag der Operation)
5217	P2	39950.0	Plasmaprobe	10 Min nach 1. Injektion (Tag 1)
5217	P3	34217.0	Plasmaprobe	1 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5217	P4	27300.0	Plasmaprobe	2 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5217	P5	25917.0	Plasmaprobe	3 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5217	P6	23317.0	Plasmaprobe	12 Std nach 1. Injektion (Tag 1)
5217	P7	21965.0	Plasmaprobe	5 Min vor 2. Injektion (Tag 2)
5217	P8	43583.0	Plasmaprobe	10 Min nach 2. Injektion (Tag 2)
5217	P9	38217.0	Plasmaprobe	1 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5217	P10	37068.0	Plasmaprobe	2 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5217	P11	35967.0	Plasmaprobe	3 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5217	P12	31900.0	Plasmaprobe	12 Std nach 2. Injektion (Tag 2)
5217	P13	25550.0	Plasmaprobe	5 Min vor 3. Injektion (Tag 3)
5217	P14	42083.0	Plasmaprobe	10 Min nach 3. Injektion (Tag 3)
5217	P15	40150.0	Plasmaprobe	1 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5217	P16	36400.0	Plasmaprobe	2 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5217	P17	34317.0	Plasmaprobe	3 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5217	P18	31650.0	Plasmaprobe	12 Std nach 3. Injektion (Tag 3)
5217	P19	27417.0	Plasmaprobe	5 Min vor 4. Injektion (Tag 4)
5217	P20	41300.0	Plasmaprobe	10 Min nach 4. Injektion (Tag 4)
5217	P21	39267.0	Plasmaprobe	1 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5217	P22	37433.0	Plasmaprobe	2 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5217	P23	36917.0	Plasmaprobe	3 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5217	P24	32950.0	Plasmaprobe	12 Std nach 4. Injektion (Tag 4)
5217	P25	28233.0	Plasmaprobe	23.55 Std nach 4. Injektion (Tag 5)
5217	P26	29850.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 5)
5217	P27	28617.0	Plasmaprobe	1 Std (Tag 5)
5217	P28	25883.0	Plasmaprobe	2 Std (Tag 5)
5217	P29	25717.0	Plasmaprobe	6 Std (Tag 5)
5217	P30	23150.0	Plasmaprobe	12 Std (Tag 5)
5217	P31	6917.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 8)
5217	P32	2115.0	Plasmaprobe	10 Min (Tag 12)

8.2 Diagramme

8.2.1 Vorversuch

Diagramm 1.1

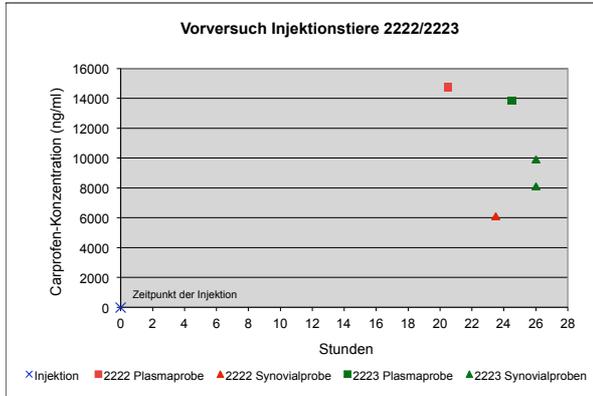
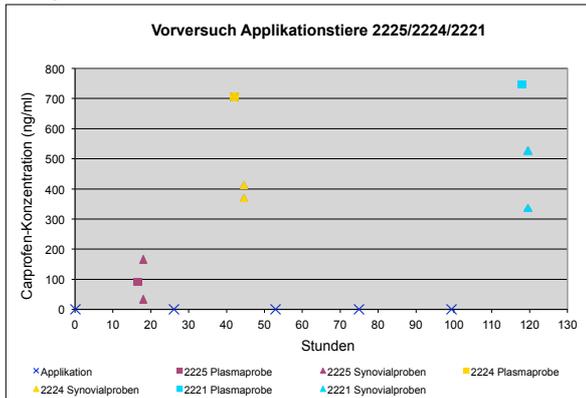


Diagramm 1.2



8.2.2. Gruppe 3

Diagramm 2.1

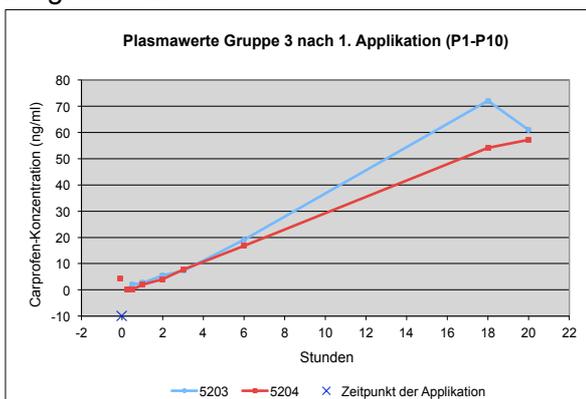


Diagramm 2.2

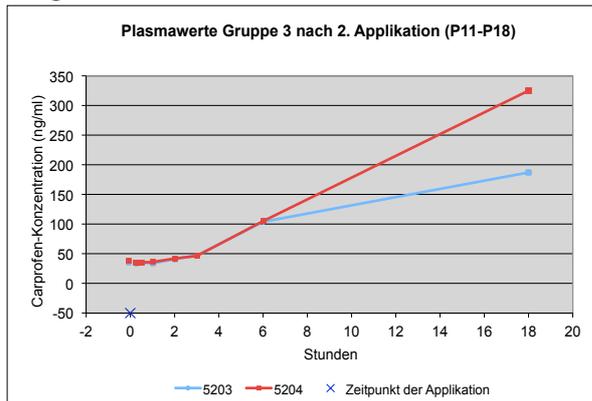


Diagramm 2.3

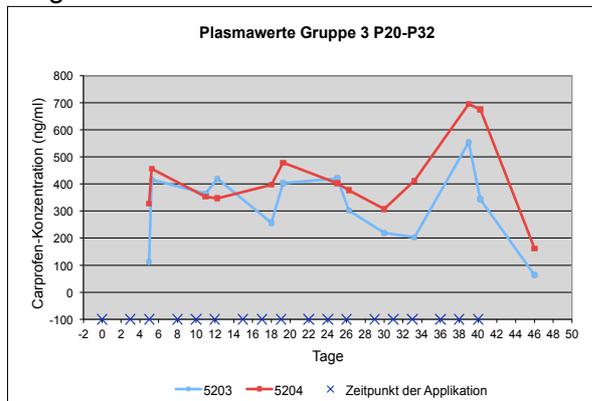


Diagramm 2.4

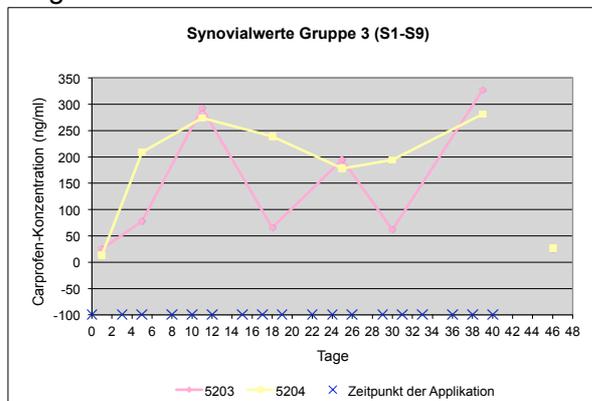


Diagramm 2.5

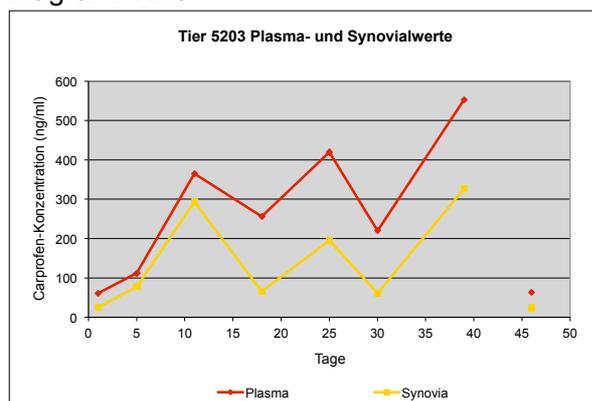
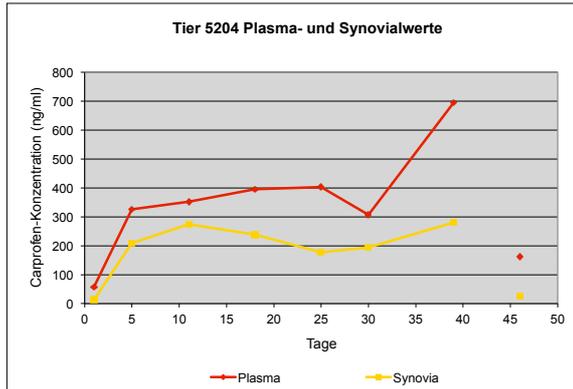


Diagramm 2.6



8.2.3. Gruppe 4

Diagramm 3.1

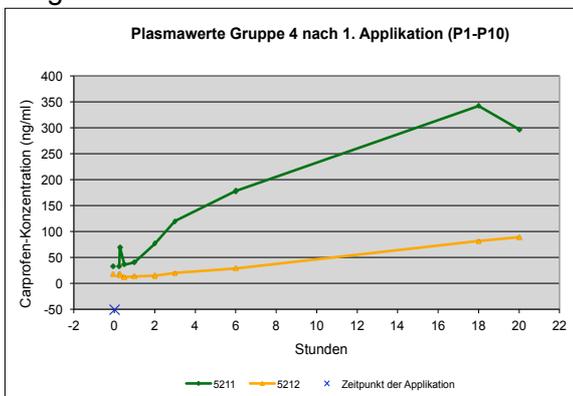


Diagramm 3.2

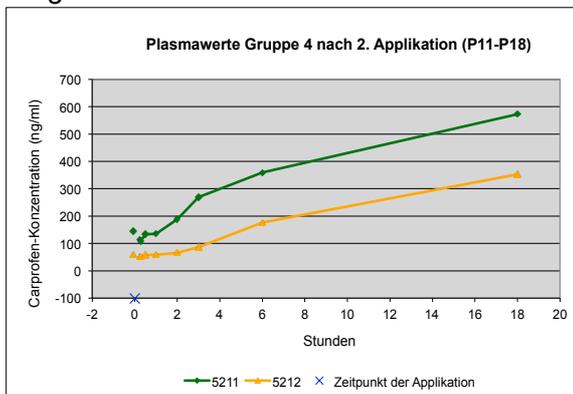


Diagramm 3.3

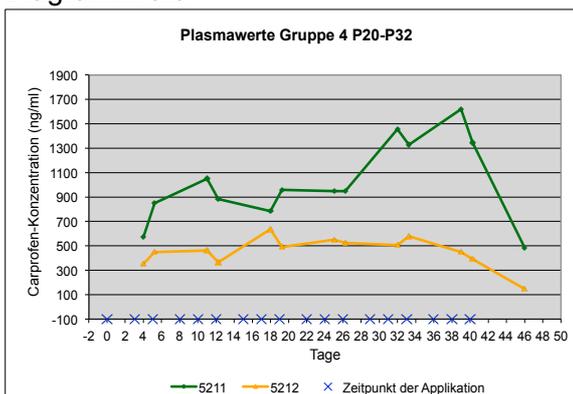


Diagramm 3.4

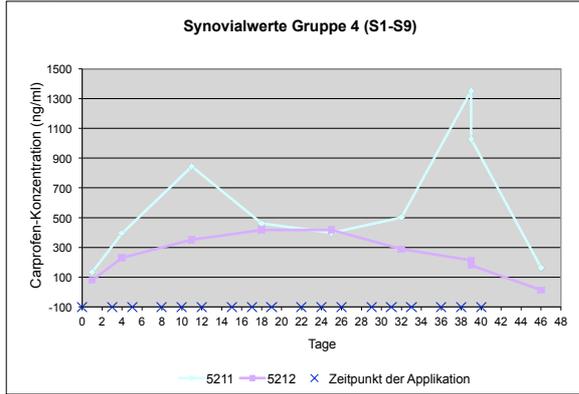


Diagramm 3.5

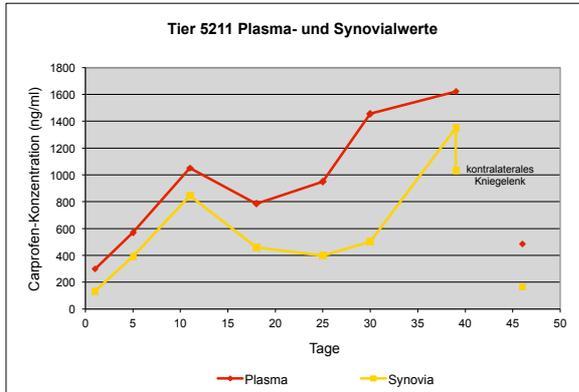
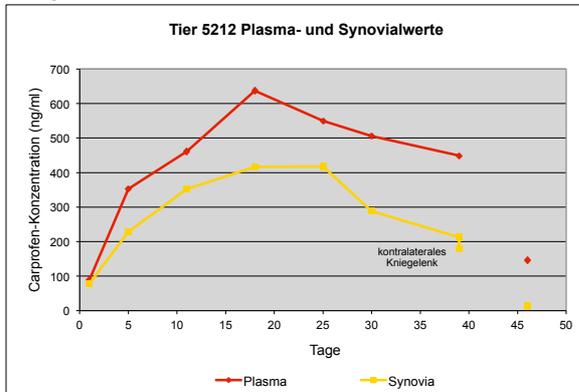


Diagramm 3.6



8.2.4. Gruppe 3 und 4

Diagramm 4.1

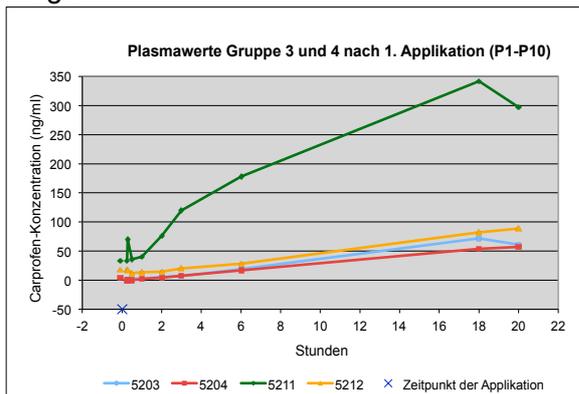


Diagramm 4.2

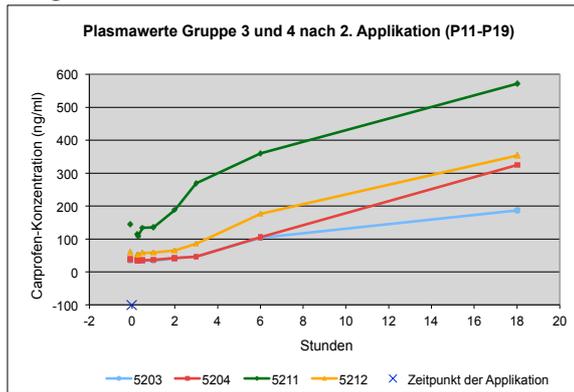


Diagramm 4.3

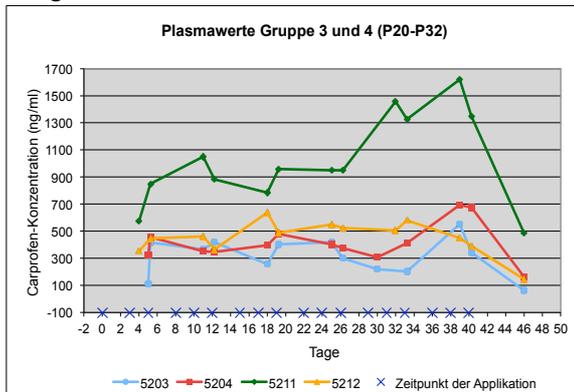
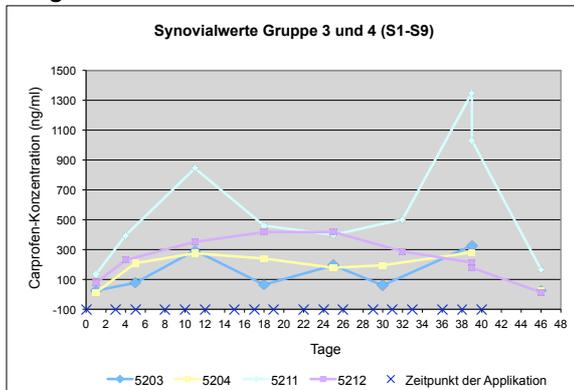
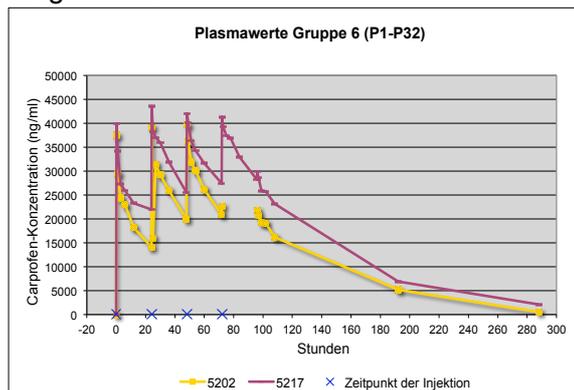


Diagramm 4.4



8.2.5. Gruppe 6

Diagramm 5.1



8.3 Abbildungen



Abb.1 VetDrop® 1500



Abb.2 Applikationssystem

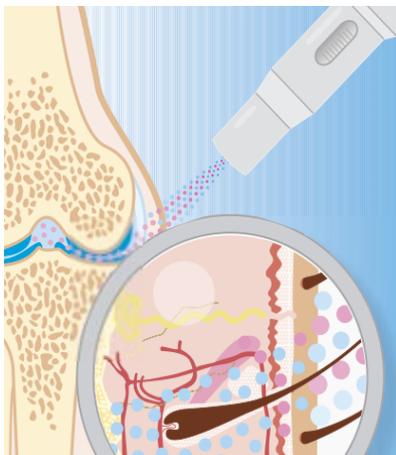


Abb.3 Applikation (schematisch)



Abb.4 Applikation



Abb.5 Lagerung



Abb.6 Intraoperative Gewinnung von Synovia

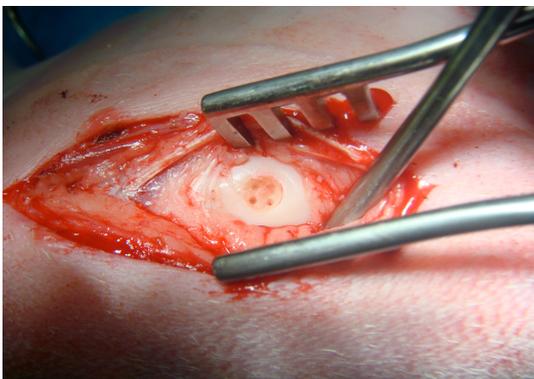


Abb.7 Osteochondraler Defekt mit Mikrofrakturen

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau **Prof. Brigitte von Rechenberg**, Leiterin der Musculoskeletal Research Unit für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in das Team der MSRU, für die fachliche Beratung in dieser Zeit sowie die Unterstützung bei der Planung meines weiteren beruflichen Weges.

Ich danke besonders **Dr. Peter Kronen** für die gute Zusammenarbeit während der Anästhesien und für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich möchte mich ausserdem für die vielen Ratschläge und die unterstützenden Gespräche bei der Planung meiner Zukunft bedanken und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau **Prof. Claudia Spadavecchia** danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn **Prof. Jörg Auer** und Herrn **Prof. Anton Fürst**, Direktoren der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Zürich danke ich für die freundliche Unterstützung der MSRU.

Meinen Projektpartnern der Firma MedDrop Technology AG, insbesondere **Herrn Friedrich von Hahn** danke ich für die stets freundliche und gute Zusammenarbeit im Verlaufe des Projekts. Ich danke ausserdem der Interlabor Belp AG für die Untersuchung der Proben und die gute Betreuung während dieser Zeit.

Herzlichen Dank an **Dr. Michèle Sidler** und **Ingmar Meth** für unsere nette und gute Zusammenarbeit bei der Organisation unseres Projektes und die oft langen aber auch lustigen Stunden im Strickhof.

Danke auch an **Dr. Isabelle Iff** die mit ihrer freundlichen Art ihr Wissen mit mir geteilt hat und der nie eine Frage zu viel war.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen bei der MSRU für die vielen schönen Stunden die wir im Stall, im OP, auf der Staffelegg oder im Büro zusammen verbracht haben: **Philipp Conze, Isabel Mosch, Francis Pusch, Henning Richter, Käthi Kämpf, Michèle Sidler, Karina Klein, Henriette Lapczynya, Katja Nuss, Sabrina Ernst, Anke Schulze-Grothoff, Tetyda Dobak, Oliver Gehrig, Stefan Stübinger, Marcella von Salis, Andrea Wolk, Flurina Clement, Sabine Koch, Ansgar Solecki, Nico Lagerpusch, Maren Lesser, Christine Sievert, Ingmar Meth, Silvana Manzanell und Sven Nielsen.**

Ich danke **Rainer Egle** für jegliche Hilfe bei computer-technischen Fragen aber auch für sehr nette und interessante Gespräche.

Herzlichen Dank an **Gabriele Schmid** für die Hilfe bei allen anfallenden administrativen Aufgaben.

Herzlichen Dank an **Familie Knüsel** für die gute Versorgung der Tiere und dafür, dass wir haben uns auf der Staffelegg stets willkommen gefühlt haben.

Ich danke dem ganzen **Team des Tierspitals** für die gute und nette Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an meine **Freunde** und **Familie**.

Meinen Freunden möchte ich herzlich dafür danken, dass sie mich nie vergessen, egal ob ich in den Norden oder in den Süden ziehe und stets an meinem Leben teilhaben.

Herzlichen Dank meiner Oma für jegliche Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit. Je vous remerci, Omi et Opi, pour m'avoir soutenu ces dernières années.

Danke an meine Schwester Mélanie dafür, dass sie in jeder Lebenslage eine meiner engsten Vertrauten ist und immer zu mir hält.

Der grösste Dank geht an meine Eltern ohne deren Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre, die immer hinter mir standen und an mich glaubten, die alles möglich gemacht haben und die mit Ihrer herzlichen und liebevollen Art meine grössten Vorbilder sind.

Lebenslauf

Name	Nathalie Elisa Fouché
Geburtsdatum	26.11.1981
Geburtsort	Dudweiler (Saarbrücken)
Nationalität	Deutsch/ Französisch
1994-2001 2001	Deutsch-Französisches Gymnasium Saarbrücken Abitur
2001-2002	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Deutschland
2002-2008	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig Universität Giessen, Deutschland
2004-2005	Auslandsjahr im Rahmen des Erasmus- Programms an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, Schweiz
2008	Approbation
2008-2009 2009-2011	Internship „Cotts Farm Equine Hospital“, Wales Promotion an der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), Departement für Pferde, Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich, Schweiz
