

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Nachweis- und Karenzzeiten
sowie *In-vitro*-Untersuchung zur Wirkung
Nicht-steroidaler Antiphlogistika beim Pferd**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Nicole Tabbert
Ludwigsfelde

Hannover 2015

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Kietzmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Stadler

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2015

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V. gefördert.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| I EINLEITUNG | 1 |
| II LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)..... | 3 |
| 1.2 Indikation | 4 |
| 1.3 Pharmakokinetik | 4 |
| 1.3.1 Absorption | 4 |
| 1.3.2 Distribution | 5 |
| 1.3.3 Metabolisierung und Exkretion | 5 |
| 1.4 Pharmakodynamik..... | 7 |
| 1.4.1 Arachidonsäurekaskade | 8 |
| 1.4.2 Cyclooxygenasen (COX) | 8 |
| 1.5 Wirkstoffe..... | 10 |
| 2 Doping und verbotene Medikation im Pferdesport..... | 11 |
| 2.1 Anti-Doping und Medikamentenkontrollregeln im Vergleich | 12 |
| 2.1.1 Internationale Reiterliche Vereinigung (FEI)..... | 12 |
| 2.1.2 <i>International Federation of Horseracing Authorities</i> (IFHA) | 13 |
| 2.1.3 <i>European Horserace Scientific Liaison Committee</i> (EHSLC) | 13 |
| 2.1.4 <i>Association of Racing Commissioners International</i> (ARCI)..... | 14 |
| 2.1.5 Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN) | 16 |
| 2.1.6 Hauptverband für Traberzucht (HVT) | 17 |
| 2.1.7 Direktorium für Vollblutzucht und Rennen (DVR) | 18 |
| 2.1.8 <i>Canadian Pari-Mutuel Agency</i> und <i>Australian Equine Veterinary</i> | |
| <i>Association</i> | 18 |
| 2.2 Risikoanalyse: Der Weg bis zur Karenzzeit | 19 |
| 2.2.1 Risikobeurteilung: Bestimmung der nicht wirksamen Konzentration ... | 20 |
| 2.2.2 Risikomanagement: Festlegung des HSL | 22 |
| 2.2.3 Risikokommunikation..... | 22 |
| 3 Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten..... | 27 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| III MATERIAL UND METHODEN | 31 |
| 1 Literaturanalyse | 31 |
| 1.1 Zielsetzung | 31 |
| 1.2 Literatur | 31 |
| 1.3 Primärstudien..... | 31 |
| 1.4 Datenextraktion..... | 32 |
| 1.5 Bewertungsmethodik | 33 |
| 1.6 Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten | 34 |
| 1.6.1 Auswahl der Pferde | 34 |
| 1.6.2 Versuchsdurchführung | 35 |
| 1.6.3. Analytik..... | 37 |
| 1.6.4 Auswertung | 38 |
| 2 <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 40 |
| 2.1 Zielsetzung | 40 |
| 2.2 Verwendete Materialien | 40 |
| 2.3 Versuchsdurchführung..... | 42 |
| 2.3.1 Herstellung der NSAID Lösungen..... | 42 |
| 2.3.2 Aufbereitung der Blutproben..... | 43 |
| 2.3.3 Prinzip des EIA..... | 44 |
| 2.3.4 Durchführung des EIA | 45 |
| 2.4 Auswertung..... | 46 |
| IV ERGEBNISSE | 47 |
| 1 Literaturanalyse | 47 |
| 1.1 Flunixin-Meglumin..... | 47 |
| 1.1.1 Ausgewertete Publikationen | 47 |
| 1.1.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)..... | 49 |
| 1.1.3 Ausscheidungszeit..... | 51 |
| 1.1.4 Ausscheidungsversuche..... | 53 |
| 1.1.5 Nachweiszeit für Flunixin-Meglumin | 55 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------|---|----|
| 1.2 | Firocoxib | 55 |
| 1.2.1 | Ausgewertete Publikationen | 55 |
| 1.2.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 56 |
| 1.2.3 | Ausscheidungszeit..... | 57 |
| 1.2.4 | Ausscheidungsversuche..... | 59 |
| 1.2.5 | Nachweiszeit für Firocoxib..... | 60 |
| 1.3 | Phenylbutazon und Suxibuzon | 61 |
| 1.3.1 | Ausgewertete Publikationen | 61 |
| 1.3.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 64 |
| 1.3.3 | Ausscheidungszeit..... | 67 |
| 1.3.4 | Ausscheidungsversuche..... | 68 |
| 1.3.5 | Nachweiszeit für Phenylbutazon..... | 69 |
| 1.4 | Meloxicam..... | 70 |
| 1.4.1 | Ausgewertete Publikationen | 70 |
| 1.4.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 71 |
| 1.4.3 | Ausscheidungszeit..... | 73 |
| 1.4.4 | Ausscheidungsversuche..... | 74 |
| 1.4.5 | Nachweiszeit für Meloxicam | 75 |
| 1.5 | Ketoprofen | 75 |
| 1.5.1 | Ausgewertete Publikationen | 76 |
| 1.5.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 77 |
| 1.5.3 | Ausscheidungszeit..... | 79 |
| 1.5.4 | Ausscheidungsversuche..... | 80 |
| 1.5.5 | Nachweiszeit für Ketoprofen..... | 81 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------|---|----|
| 1.6 | Vedaprofen | 81 |
| 1.6.1 | Ausgewertete Publikationen | 81 |
| 1.6.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 82 |
| 1.6.3 | Ausscheidungszeit..... | 82 |
| 1.6.4 | Nachweiszeit für Vedaprofen..... | 83 |
| 1.7 | Carprofen..... | 84 |
| 1.7.1 | Ausgewertete Publikationen | 84 |
| 1.7.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 85 |
| 1.7.3 | Ausscheidungszeit..... | 87 |
| 1.7.4 | Ausscheidungsversuche..... | 88 |
| 1.7.5 | Nachweiszeit für Carprofen | 89 |
| 1.8 | Metamizol | 89 |
| 1.8.1 | Ausgewertete Publikationen | 89 |
| 1.8.2 | IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) | 90 |
| 1.8.3 | Ausscheidungszeit..... | 91 |
| 1.8.4 | Ausscheidungsversuche..... | 92 |
| 1.8.5 | Nachweiszeit für Metamizol | 92 |
| 2 | <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 93 |
| 2.1 | COX I- und COX II-Hemmung durch Carprofen..... | 93 |
| 2.2 | COX I- und COX II-Hemmung durch Firocoxib | 94 |
| 2.3 | COX I- und COX II-Hemmung durch Flunixin-Meglumin | 95 |
| 2.4 | COX I- und COX II-Hemmung durch Ketoprofen | 96 |
| 2.5 | COX I- und COX II-Hemmung durch Meloxicam | 97 |
| 2.6 | COX I- und COX II-Hemmung durch Diclofenac..... | 98 |
| 2.7 | Gesamtübersicht zur COX I- und COX II-Hemmung | 99 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----|
| V DISKUSSION | 100 |
| 1 Literaturanalyse | 100 |
| 1.1 Methodik | 100 |
| 1.2 Bewertung der Ergebnisse der Literaturanalyse | 103 |
| 1.3 Vergleich der berechneten Ausscheidungszeiten mit den Nachweiszeiten aus Ausscheidungsversuchen | 108 |
| 1.4 Anwendbarkeit des PK/PD Modells nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) für NSAID | 109 |
| 1.5 Von der Nachweiszeit zur Karenzzeit | 110 |
| 2 <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 112 |
| 2.1 Methodik | 112 |
| 2.2 Vergleich der Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Untersuchung mit Ergebnissen anderer Studien | 114 |
| 3 Vergleich der berechneten EPC mit der IC ₅₀ bzw. EC ₅₀ | 118 |
| VI ZUSAMMENFASSUNG | 121 |
| VII SUMMARY | 123 |
| VIII LITERATURVERZEICHNIS | 125 |
| IX TABELLENVERZEICHNIS | 152 |
| X ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 154 |
| XI DANKSAGUNG | 155 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| μg | Mikrogramm |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| ADMR | Anti-Doping und Medikamentenkontrollregeln |
| AK | Antikörper |
| ARCI | <i>Association of Racing Commissioners International</i> |
| AUC | <i>Area under the plasma concentration vs. time curve</i> |
| B_0 | <i>Maximum Binding</i> |
| c(t) | Plasma- oder Urinkonzentration nach einer bestimmten Zeit t nach der Verabreichung des Wirkstoffes |
| COX | Cyclooxygenase |
| CPMA | <i>Canadian Pari-Mutuel Agency</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DVR | Direktorium für Vollblutzucht und Rennen |
| EC_{50} | Mittlere effektive Konzentration |
| EHSLC | <i>European Horserace Scientific Liaison Committee</i> |
| EIA | <i>Enzym Immunoassay</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| EPC | <i>Effective Plasma Concentration</i> (Effektive Plasmakonzentration) |
| FEI | <i>Fédération Equestre Internationale</i> (Internationale Reiterliche Vereinigung) |
| FN | <i>Fédération National</i> (Deutsche Reiterliche Vereinigung) |
| h | Stunde |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|--|
| HNED | <i>Highest No Effect Dose</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HSL | <i>Harmonized Screening Limit</i> |
| HVT | Hauptverband für Traberzucht |
| HWZ | Halbwertszeit |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| IFHA | <i>International Federation of Horseracing Authorities</i> |
| IHRC | <i>Indiana Horse Racing Commission</i> |
| IPC | <i>Irrelevant Plasma Concentration</i> (Ineffektive Plasmakonzentration) |
| IUC | <i>Irrelevant Urine Concentration</i> (Ineffektive Urinkonzentration) |
| Kat | Kategorie |
| kg | Kilogramm |
| KGW | Körpergewicht |
| ln | Natürlicher Logarithmus |
| LOD | <i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze) |
| LOQ | <i>Limit of quantification</i> (Quantifizierungsgrenze) |
| LPO | Leistungsprüfungsordnung |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mg | Milligramm |
| NADA | Nationale Anti-Doping Agentur |
| NET | <i>No Effect Trace</i> |
| NSAID | Nicht-steroidales Antiphlogistikum |
| NSB | <i>Non-Specific Binding</i> |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|--|
| NWZ | Nachweiszeit |
| PBS | Phosphatpuffer Salzlösung |
| PD | Pharmakodynamik |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PK | Pharmakokinetik |
| RIRDC | <i>Rural Industries Research and Development Cooperation</i> |
| RMTC | <i>Racing Medication and Testing Consortium</i> |
| R _{ss} | Urin-Plasmakonzentrationsverhältnis im <i>Steady-state</i> (<i>Ratio steady-state</i>) |
| SL | <i>Screening Limit</i> |
| TA | <i>Total Activity</i> |
| t _A | Ausscheidungszeit |
| TXB ₂ | Thromboxan B ₂ |
| t _y | Zeit bis zum Erreichen der Konzentration |
| USEF | <i>United States Equestrian Federation</i> |
| y | Konzentration |
| y _z | Konzentration in der Eliminationsphase |
| λ _z | Eliminationskonstante |
| C _{max} | Peakkonzentration |
| t _{max} | Zeit bis zum Erreichen der Peakkonzentration |
| iv | Intravenös |
| im | intramuskulär |
| po | per Os |

I EINLEITUNG

I EINLEITUNG

Gemäß §3 Absatz 1a des TIERSCHUTZGESETZ (2013) ist es verboten „einem Tier an dem Eingriffe und Behandlungen vorgenommen worden sind, die einen leistungsmindernden körperlichen Zustand verdecken, Leistungen abzuverlangen, denen es wegen seines körperlichen Zustandes nicht gewachsen ist“. Neben dem Tierschutz, welcher an erster Stelle steht, verfolgen die Anti-Doping und Medikationsregeln der Pferdesportverbände weitere Ziele, z.B. Berücksichtigung der Interessen der Pferdezüchter und Zuschauer (Manipulation), Unfallverhütung und Chancengleichheit. Nach jeder therapeutisch-medikamentösen Behandlung eines Sportpferdes ist ein Wettbewerbseinsatz frühestens mit dem Erreichen einer nicht wirksamen Konzentration der verwendeten Substanz im Blutplasma und Urin wieder zulässig (IFHA 2014).

Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) sind häufig eingesetzte Wirkstoffe zur Therapie von entzündlichen Erkrankungen. Sie gehören zu den am häufigsten nachgewiesenen Wirkstoffen bei Medikationsproben von Pferden. Von 183 positiv getesteten Medikationsproben der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN) gehörten im Zeitraum von 2000-2009 ca. 40% zur Wirkstoffgruppe der NSAID (WITZMANN 2010). Im Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln wurden von 2008-2012 in 38% aller positiv getesteten Medikationsproben NSAID nachgewiesen (MACHNIK 2014).

Basierend auf wissenschaftlichen Untersuchungen veröffentlichen die Pferdesportverbände Nachweis- oder Karenzzeiten. Ziel der vorliegenden Dissertation war die Betrachtung dieser derzeit empfohlenen Nachweis- und Karenzzeiten im Sinne einer Metaanalyse.

I EINLEITUNG

Hierzu wurden pharmakokinetische Informationen über die wichtigen bei der Behandlung von Pferden eingesetzten NSAID zusammengestellt und in einer systematischen Literaturanalyse ausgewertet. Ergänzend wurde eine *In-vitro*-Untersuchung durchgeführt, bei der in einem Vollblut-Assay die Hemmung der COX I und COX II durch Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam in den Konzentrationen 0,001 bis 10 µmol/l zur Ermittlung einer IC₅₀ analysiert wurde.

II LITERATURÜBERSICHT

II LITERATURÜBERSICHT

1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)

NSAID sind zumeist schwache organische Säuren, die anti-inflammatorische, analgetische und antipyretische Wirkqualitäten aufweisen (UNGEMACH 2006). Es gibt eine Vielzahl von Wirkstoffen und Wirkstoffgruppen (Tabelle 1), die bedeutende tierartspezifische Unterschiede, bezogen auf Enzymspezifität, Pharmakokinetik, Metabolismus und Nebenwirkungen, aufweisen (HANSON u. MADDISON 2008).

Tabelle 1: NSAID, Wirkstoffgruppen mit Beispielen (modifiziert nach UNGEMACH 2006)

| Gruppe | Wirkstoff |
|--------------------------|--|
| Pyrazolidine | Phenylbutazon, Oxyphenylbutazon, Suxibuzon |
| Pyrazole | Metamizol |
| Arylessigsäurederivate | Diclofenac |
| Arylpropionsäurederivate | Naproxen, Ibuprofen, Ketoprofen, Carprofen, Vedaprofen |
| Anthranilsäurederivate | Mefenaminsäure, Flunixin-Meglumin, Meclofenaminsäure |
| Oxicame | Meloxicam |
| Coxibe | Firocoxib |

Einige NSAID wie die Arylpropionsäurederivate bestehen aus chiralen Molekülen und sind somit als *Racemate* verfügbar. S- und R-Enantiomere besitzen oft unterschiedliche pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften, so dass die Effektivität eines Wirkstoffes vom Verhältnis und der Ausscheidung der einzelnen Enantiomere beeinflusst wird (HANSON u. MADDISON 2008).

II LITERATURÜBERSICHT

1.2 Indikation

NSAID werden bei entzündlichen Veränderungen und Schmerzen verschiedener Art und Ursache, insbesondere des Bewegungsapparates, eingesetzt. Zudem besitzen sie eine Bedeutung bei der Behandlung von Endotoxämien (MOORE et al. 1981), Kolikschmerzen (VERNIMB u. HENNESSEY 1977) und postoperativen Schmerzen (JOHNSON et al. 1993). Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Ophthalmologie dar (GIULIANO 2004).

1.3 Pharmakokinetik

1.3.1 Absorption

Grundsätzlich verfügen NSAID über eine gute Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation (LEES 2009). Abhängig vom Fütterungsmanagement kann es jedoch zu einer verzögerten, unregelmäßigen und unvollständigen Absorption nach oraler Gabe beim Pferd kommen (ROSE et al. 1982; SULLIVAN u. SNOW 1982; LEES et al. 1988; WELSH et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass Phenylbutazon, Meclofenaminsäure und Flunixin-Meglumin in unterschiedlichem Ausmaß an Heu und Ingesta gebunden werden und dadurch die Absorption beeinflusst wird (LEES et al. 1988). Formulierungen für die parenterale Applikation stehen zur Verfügung. Nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion werden diese Wirkstoffe gut absorbiert (HANSON u. MADDISON 2008).

II LITERATURÜBERSICHT

1.3.2 Distribution

Alle NSAID, mit Ausnahme der Salicylate, weisen eine ausgesprochen hohe Proteinbindung (>90 %) auf (HANSON u. MADDISON 2008). Diese Eigenschaft scheint dafür mitverantwortlich zu sein, dass es trotz eines geringen Verteilungsvolumens zu einer schnellen Penetration und intensiven Wirkstoffanreicherung am Entzündungsort kommt (UNGEMACH 2006). Während der Wirkstoffspiegel im Plasma schnell abnimmt, erfolgt die Ausscheidung aus dem entzündlichen Kompartiment langsamer (LEES et al. 2004b). Aus diesem Grund verfügen viele NSAID über eine verhältnismäßig lange Wirkungsdauer. Die Plasma-Wirkstoffkonzentration spiegelt nicht zu jedem Zeitpunkt die therapeutische Aktivität wider (HIGGINS et al. 1986; LEES et al. 2004b; UNGEMACH 2006; HANSON u. MADDISON 2008).

1.3.3 Metabolisierung und Exkretion

Viele NSAID werden in der Leber zu inaktiven oder weniger aktiven Metaboliten transformiert. Ausnahmen stellen beispielsweise Acetylsalicylsäure und Phenylbutazon dar, die eine hepatische Biotransformation in noch aktive Metaboliten erfahren (HANSON u. MADDISON 2008).

Die Ausscheidung von NSAID erfolgt hauptsächlich durch renale Filtration und Exkretion und ist abhängig vom Urin-pH-Wert (MOSS u. HAYWOOD 1973; HOUSTON et al. 1985). Pferde als Herbivore verfügen über einen alkalischen Urin, der die Ausscheidung von NSAID im Vergleich zum sauren Urin der Karnivoren begünstigt (LEES 2009). MOSS u. HAYWOOD (1973) zeigten, dass die

II LITERATURÜBERSICHT

Ausscheidung von Phenylbutazon beim Pferd bei einem niedrigen Urin-pH-Wert (4,6-5,5) dreimal langsamer erfolgte als bei einem hohen Urin-pH-Wert (7,5-8,9).

Theoretische Ansätze lassen vermuten, dass Trainingsintensitäten durch die Beeinflussung des Urin-pH-Wertes die Exkretion von NSAID beeinflussen können. Während den Ruhephasen ist der Urin gegenüber dem Blut stärker alkalisiert, der Wirkstoff ist stärker ionisiert, daher ist die Reabsorption geringer und die Ausscheidung erfolgt schneller (SCHOTT et al. 1991; GERKEN u. SAMS 1993). Die von SCHOTT et al. (1991) untersuchten trainingsbedingten Veränderungen zur glomerulären Filtrationsrate aufgrund eines veränderten renalen Blutflusses lassen ebenfalls eine schnellere Ausscheidung in Ruhe vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass die Filtrationsrate während eines intensiven Trainings 27% geringer ist als in Ruhe, nach einer kurzen Zeit jedoch wieder ansteigt (SAMS 1996). Im Gegensatz dazu kamen COLAHAN et al. (2002) zu dem Ergebnis, dass Training die Eliminationskinetik von Flunixin-Meglumin nicht signifikant beeinflusst.

Es gibt weitere bedeutende Faktoren, die die Ausscheidungszeit der NSAID beeinflussen können, zum Beispiel:

- OWENS et al. (1995) und MILLS et al. (1996) zeigten, dass die Ausscheidungszeit von Phenylbutazon und Ketoprofen durch induzierte Entzündung verringert wird.
- Nach LEES u. HIGGINS (1985a) und LEES et al. (2004b) weisen Neonaten und ältere Pferde eine verminderte *Clearance* und längere Halbwertszeit von NSAID auf.

II LITERATURÜBERSICHT

- Nach PIPERNO et al. (1968) zeigt Phenylbutazon beim Pferd dosisabhängige pharmakokinetische Eigenschaften. Eine zunehmende Dosierung erhöht neben der Plasmakonzentration auch die Plasma-Halbwertszeit.
- Nach LEHMANN et al. (1981) erfolgte die Elimination von Phenylbutazon aus der Synovia mit einer Halbwertszeit von bis zu 35 h deutlich langsamer als im Serum.
- Nach AUTHIE et al. (2010) wurde die *Plasmaclearance* von Phenylbutazon durch drei Stunden Training um 37 % reduziert. Zudem dezimierte sich proportional dazu das Verteilungsvolumen, sodass sich die Plasmahalbwertszeit von trainierten und untrainierten Pferde wiederum nicht signifikant unterschied.

1.4 Pharmakodynamik

Die Wirkung der NSAID wird in erster Linie durch die Inhibition der Cyclooxygenasen (COX) erklärt, wodurch es zu einer Hemmung der Arachidonsäurekaskade kommt (KOLLIAS-BAKER 2004).

Einige NSAID verfügen über weitere molekulare Wirkungsmechanismen, wie:

- Reduktion der Freisetzung freier Radikale (TWOMEY u. DALE 1992)
- Hemmung Bradikinin-induzierter Gefäßpermeabilitätserhöhung (LANDONI u. LEES 1995b)
- Hemmung der Zytokin- (z.B. Interleukin-6) Freisetzung (ARMSTRONG u. LEES 2002)
- Hemmung von Enzymen (z.B. β -Glucuronidase) (LANDONI u. LEES 1995b)
- Hemmung von Transkriptionsfaktoren (TEGEDER et al. 2001).

II LITERATURÜBERSICHT

1.4.1 Arachidonsäurekaskade

Bei einer Beschädigung der Zellmembran durch mechanische, chemische, physikalische oder immunvermittelte Reize kommt es durch die Phospholipase A₂ zur Freisetzung von Arachidonsäure. Durch COX und Lipoxygenasen entstehen aus der Arachidonsäure Entzündungsmediatoren, die sogenannten Eicosanoide. Die einzelnen Vertreter dieser Signalstoffe können den Prostaglandinen und Thromboxanen sowie den Leukotrienen zugeordnet werden. Im Rahmen von entzündlichen Prozessen bewirken sie unter anderem die Auslösung von Vasodilatation, erhöhte Kapillarpermeabilität, Chemotaxis und Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren gegenüber Kininen und Histamin (KOLLIAS-BAKER 2004).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) bedingt als endogenes Pyrogen durch eine Temperatursollwerterhöhung im hypothalamischen Wärmeregulationszentrum die Entstehung von Fieber (CAO et al. 1998). Durch eine NSAID-induzierte Synthesehemmung der Eicosanoide werden somit die Kardinalsymptome einer Entzündung unterdrückt.

1.4.2 Cyclooxygenasen (COX)

Nach der Aufklärung des anti-inflammatorischen, analgetischen und antipyretischen Wirkungsmechanismus von Acetylsalicylsäure über eine Hemmung der COX (VANE 1971), wurde etwa 20 Jahre später eine Isoform der COX, die COX II entdeckt (FU et al. 1990; KUJUBU et al. 1991; XIE et al. 1991).

Zudem konnte im Gehirn von Hunden eine Variante der COX I, welche als COX III bezeichnet wird, identifiziert werden. Die Hemmung der COX III ist vermutlich für eine

II LITERATURÜBERSICHT

zentral ausgelöste Analgesie und Fiebersenkung verantwortlich. Insbesondere NSAID wie Paracetamol und Metamizol demonstrieren eine selektive Hemmung dieses Enzyms (CHANDRASEKHARAN et al. 2002).

1.4.2.1 COX I

Die COX I ist ein konstitutives membrangebundenes Enzym, das von nahezu allen Zelltypen exprimiert wird. Es ist in sogenannte *Housekeeping*-Funktionen, wie zum Beispiel Blutgerinnung, Regulation der Gefäß-Homöostase, Schutz von Nieren und Magen involviert. Aus diesem Grund verursacht eine durch NSAID hervorgerufene Hemmung der COX I unerwünschte Wirkungen, wie gastrointestinale Irritationen, Nierentoxizität und Gerinnungshemmung (VANE u. BOTTING 2003).

1.4.2.2 COX II

Die Synthese der COX II wird hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Lipopolysaccharide und Mitogene induziert. Nur in wenigen Geweben wird sie konstitutiv gebildet (LEES 2009).

Aus diesem Grund wird der COX II-Hemmung eine größere therapeutische Bedeutung und nur ein geringer Anteil an unerwünschten Wirkungen zugeschrieben. Es wurden NSAID mit hoher COX II-Selektivität entwickelt, mit dem Ziel, COX I-vermittelte Nebenwirkungen zu vermeiden.

II LITERATURÜBERSICHT

1.5 Wirkstoffe

Nach VETIDATA (2014) sind derzeit acht Wirkstoffe der Wirkstoffgruppe NSAID in Deutschland für Pferde zugelassen.

Tabelle 2: Derzeit in Deutschland für Pferde zugelassene NSAID unter Angabe der Formulierung, Applikationsart, Dosierung und maximalen Behandlungsdauer

| Wirkstoff | Formulierung | Applikationsart | Dosierung | max. Behandlungszeit |
|-------------------|--------------------------|-----------------|---|-----------------------------------|
| Flunixin-Meglumin | Gel | oral | 1,1 mg/kg/24h | 5 Tage |
| | Granulat | oral | 1,1 mg/kg/24h | 5 Tage |
| | Injektionslösung | intravenös | 1,1 mg/kg/24h | 5 Tage |
| | Paste | oral | 1,1 mg/kg/24h | 5 Tage |
| Firocoxib | Injektionslösung | intravenös | 0,09 mg/kg/24h | 14 Tage |
| | Paste | oral | 0,1 mg/kg/24h | 14 Tage |
| Ketoprofen | Injektionslösung | intravenös | 2,2 mg/kg/24h | 5 Tage |
| Meloxicam | Injektionslösung | intravenös | einmalig 0,6 mg/kg | |
| | Paste | oral | 0,6 mg/kg/24h | 14 Tage |
| | Suspension | oral | 0,6 mg/kg/24h | 14 Tage |
| Metamizol | Injektionslösung | intravenös | bis 20-50 mg/kg/8h | |
| Phenylbutazon | Gel | oral | 1. Tag 4,5 mg/kg/12h ab 2. Tag 2,5 mg/kg/12h (Pferd) 2.-8. Tag 3,5 mg/kg/24h (Pony) 10.+12. Tag 3,5 mg/kg (Pony) | 8 Tage (Pferd) 12 Tage (Pony) |
| | | | 4,5 mg/kg/12h oder 9 mg/kg/24h (Pferd) 1. Tag 4,5 mg/kg/12h (Pony) 2.-3. Tag 3,5 mg/kg/24h (Pony) | 3 Tage |
| | mikroverkapseltes Pulver | | 1. Tag 4 mg/kg/12h 2.-5. Tag 2mg/kg/12h (Pferd) ab 6. Tag 2 mg/kg/24h (Pferd) 2.-8. Tag 3,5 mg/kg/24h (Pony) 10.+12. Tag 3,5 mg/kg (Pony) | 19 Tage (Pferd) 12 Tage (Pony) |
| | | | 1. Tag 4,4 mg/kg/12h 2.-4. Tag 2,2 mg/kg/12h ab 4. Tag 2,2 mg/kg/24h oder 48h | |
| | Suspension | oral | 1. Tag 4,5 mg/kg/12h ab 2. Tag 2,5 mg/kg/12h (Pferd) 2.-8. Tag 3,5 mg/kg/24h (Pony) 10.+12. Tag 3,5 mg/kg (Pony) | 8 Tage (Pferd) 12 Tage (Pony) |
| Suxibuzon | Granulat | oral | 1.-2. Tag 12,5 mg/kg/24h 3.-5. Tag 6,25 mg/kg/24h ab 5. Tag 3,1 mg/kg/24h oder 48h | |
| Vedaprofen | Gel | oral | 1. Tag 2mg/kg/12h + 1mg/kg/12h ab 2. Tag 1 mg/kg/12h | 14 Tage |

II LITERATURÜBERSICHT

Im Schrifttum finden sich Untersuchungen über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Carprofen und Diclofenac beim Pferd. Carprofen ist in Deutschland als oral zu verabreichende Tablette für den Hund und als subkutan oder intravenös anzuwendende Injektionslösung bei Hund, Katze und Rind zugelassen (VETIDATA 2014). Diclofenac ist in Deutschland nur in zugelassenen Präparaten für die Humanmedizin enthalten.

2 Doping und verbotene Medikation im Pferdesport

Doping wird definiert als die Anwendung von Substanzen oder Methoden mit dem Ziel einer Beeinflussung der natürlichen und aktuellen Leistungsfähigkeit bei Wettkämpfen sowie für deren Vorbereitung und Training (KLUGE u. UNGEMACH 1999).

Die genauere Eingrenzung der Substanzen und Methoden, die beim Pferd als Doping anzusehen sind, wird von den zuständigen Pferdesport- und Zuchtverbänden vorgenommen. Im Gegensatz zum Humansport wird im Pferdesport zwischen „Doping“ und „verbotener Medikation“ unterschieden.

Während beim Doping die Beeinflussung der Leistungsfähigkeit eines gesunden Pferdes im Vordergrund steht, wird bei der Anwendung einer „verbotenen Medikation“ davon ausgegangen, dass dies mit dem Ziel der Wiederherstellung der ursprünglichen Leistungsfähigkeit beispielweise bei einem kranken oder verletzten Pferd erfolgt (KLUGE u. UNGEMACH 1999). Das bedeutet, dass „verbotene Medikation“ die Anwendung von therapeutischen Wirkstoffen im zeitlichen Zusammenhang mit dem Wettkampf darstellt.

II LITERATURÜBERSICHT

Für Stoffe, die endogen produziert werden oder natürlicherweise beziehungsweise als Kontaminanten mit dem Futter aufgenommen werden können, gelten bestimmte Grenzwerte.

2.1 Anti-Doping und Medikamentenkontrollregeln im Vergleich

Die Anti-Doping und Medikationskontrollregeln der einzelnen Pferdesportverbände und -organisationen sind unterschiedlich gestaltet. Nachfolgend werden kurz einige Verbände und Organisationen mit ihren verschiedenen Klassifizierungsmodellen von verbotenen Substanzen dargestellt.

2.1.1 Internationale Reiterliche Vereinigung (FEI)

Der Verantwortungsbereich der FEI erstreckt sich auf die Disziplinen Dressur, Springen, Vielseitigkeit, *Para-Equestrian*, Fahren, *Reining*, Voltigieren und Distanzreiten. Im *FEI-Veterinärreglement* wird zwischen *Banned Substances* und *Controlled Substances* unterschieden. Die Anwendung der sogenannten *Controlled Substances*, zu denen auch die hier abgehandelten NSAID zählen, ist in Notfällen nach schriftlicher Genehmigung durch die Richterkommission und den Veterinärdelegierten sowie unter Verwendung eines entsprechenden Formblattes in Grenzen möglich (FEI 2014a).

II LITERATURÜBERSICHT

2.1.2 *International Federation of Horseracing Authorities (IFHA)*

Der Weltverband des Pferderennsportes verbietet in Artikel 6 des *International Agreement on Breeding, Racing and Wagering*, die Anwesenheit von jedem Wirkstoff im Pferd während eines Rennens, der dem Pferd im Rennen Vor- oder Nachteile verschaffen kann. Verbotene Stoffe werden als Substanzen definiert, die auf ein oder mehrere Organsysteme eine Funktion und/oder Wirkung ausüben. Für endogene Substanzen oder Substanzen, die natürlicherweise oder als Kontaminanten über das Futter aufgenommen werden können, gibt es Grenzwerte. Therapeutische Wirkstoffe sollen mithilfe von *Harmonisierten Screening-Limits (HSL)* kontrolliert werden. Vom Beirat für verbotene Substanzen und Methoden der IFHA gibt es Empfehlungen für diese HSL (IFHA 2014).

2.1.3 *European Horserace Scientific Liaison Committee (EHSLC)*

Das EHSLC ist eine Vereinigung von Vertretern einiger europäischer Pferdesportverbände und wurde 1992 von Irland, Großbritannien und Frankreich zur Harmonisierung, Problemerkennung und -lösung der Doping und Medikationsbestimmungen im Galopp- und Trabrennsport gegründet. Derzeit werden die Ansätze des EHSLCs auch von Pferdesportverbänden aus Deutschland, Italien, Finnland, Norwegen, Dänemark und Schweden unterstützt und berücksichtigt (EHSLC 2014a).

II LITERATURÜBERSICHT

Durch die Anwendung einer strukturierten und formalisierten Risikoanalyse werden Anforderungen und regulatorische Entscheidungen unter Berücksichtigung der verschiedenen Interessengruppen festgelegt und harmonisiert. Im Rahmen der Risikobewertung erfolgt mithilfe eines Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD)-Modells die Berechnung einer irrelevanten Plasma- und Urinkonzentrationen für therapeutische Substanzen (siehe II 2.2.1.1.). Diese dient im Risikomanagement der Festlegung eines *European Screening Limits* (ESL) (siehe II 2.2.2.). Die anschließende Ermittlung von Nachweiszeiten ermöglicht die Bereitstellung von Informationen für Trainer, Tierärzte und Aktive und ist unerlässlich für eine gute Risikokommunikation (TOUTAIN 2010b).

2.1.4 Association of Racing Commissioners International (ARCI)

Die ARCI ist die Dachorganisation aller Rennkommissionen in den USA sowie Canada, Mexiko, Jamaika und Trinidad-Tobago. Sie hat keine Befugnis Regeln festzulegen, sondern bietet Empfehlungen für Regelmodelle unter anderem mit dem Ziel, die Antidoping- und Medikamentenkontrollregeln sowie die Analytik zu vereinheitlichen und zu verbessern (ARCI 2014a). So wurde 1991 ein Modell für die Klassifizierung und Maßregelung von Wirkstoffen erarbeitet. Danach findet eine Einteilung der verbotenen Substanzen unter Berücksichtigung des missbrauchs- und leistungsbeeinflussenden Potentials statt. Die *Uniform Classification Guidelines of Foreign Substances* nehmen eine Einteilung in fünf Kategorien vor (ARCI 2014b).

II LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 3: ARCI Klassifizierung der verbotenen Substanzen (modifiziert nach ARCI (2014b))

| Kat. | Kriterien | Beispiele |
|-------------|--|---|
| I | grundsätzlich keine zugelassenen Therapeutika mit sehr hohem Potenzial die Leistung zu beeinflussen | Stimulantien, Depressiva |
| II | grundsätzlich keine zugelassene Therapeutika mit hohem Potenzial die Leistung zu beeinflussen oder Therapeutika mit hohem Missbrauchspotential | Psychotrope Substanzen, bestimmte nervöse oder herz-kreislauf-stimulierende Stoffe, Depressiva, Lokalanästhetika |
| III | anerkannte oder nicht anerkannte Therapeutika mit mäßigem Potenzial die Leistung zu beeinflussen | Bronchodilatoren, anabole Steroide, Procain, Antihistaminika mit sedativen Eigenschaften |
| IV | zugelassene Therapeutika mit geringem Potential die Leistung zu beeinflussen | Diuretika, Kortikosteroide, Antihistaminika, periphere Muskelrelaxantien, Hämostatika, Herzglykoside, Anti-Arrhythmika, topische Anästhetika, Antidiarrhoika, milde Analgetika, NSAID |
| V | zugelassene Therapeutika mit lokaler Wirkung oder Stoffe mit Grenzkonzentrationen oder bestimmte sonstige Mittel | Antikoagulantien |

II LITERATURÜBERSICHT

2.1.5 Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN)

Nationale Wettkämpfe in Deutschland in den Disziplinen Dressur, Springen, Vielseitigkeit, Fahren, *Reining*, Voltigieren und therapeutisches Reiten unterliegen den Anti-Doping und Medikamentenkontrollregeln (ADMR) der Leistungsprüfungsordnung (LPO).

In ihren Anhängen sind die Listen der verbotenen Substanzen und Methoden aufgeführt. Die Dopingsubstanzen, wie zum Beispiel Stimulantien, Sedativa, Narkotika, anabole Substanzen und Diuretika sowie die verbotenen Methoden befinden sich in Liste I. In Liste II sind alle Substanzen, die unter die sogenannte „verbotene Medikation“ fallen, aufgeführt. Hierzu zählen Substanzen, die auf das Nerven-, das Herz-Kreislauf-, das Atmungs-, das Verdauungs-, das Harn-, das Muskel- und Skelettsystem, die Geschlechtsorgane, die Haut oder gegen Infektionserreger wirken, wirken können oder wirken sollen, inklusive der NSAID. Liste III enthält Substanzen und Methoden, die nicht nur im Wettkampf, sondern darüber hinaus auch im Training verboten sind (FN 2014b).

Im Rahmen von Trainingskontrollen, die seit November 2012 von der Nationalen Anti-Doping Agentur (NADA) bei den Pferden des A-, B-, C- Bundeskaders der Disziplinen Springen, Dressur und Vielseitigkeit durchgeführt werden, findet die Überprüfung auf Substanzen der Liste III statt. Darüber hinaus wird die Einhaltung der Forderung, jeglichen Einsatz von Wirkstoffen in einem Behandlungsbuch zu dokumentieren, kontrolliert.

II LITERATURÜBERSICHT

2.1.6 Hauptverband für Traberzucht (HVT)

In den Durchführungsbestimmungen zur Feststellung und Verhinderung von Doping gemäß §93 der Trabrennordnung des HVT werden Substanzen in fünf Listen aufgeführt:

- I. Erlaubte Substanzen (z.B. Impfstoffe)
- II. Substanzen mit Grenzwerten
- III. Kontrollierte-erlaubte Substanzen (anti-infektiöse Substanzen)
- IV. Doping-Substanzen (Stimulantien, Sedativa, Opioide, Anabolika, β_2 -Agonisten, Diuretika)
- V. Sonstige nicht erlaubte Substanzen (alle Mittel, die nicht in den Listen I, III und IV enthalten sind, sowie die in Liste II enthaltenen Mittel oberhalb der festgelegten Grenzwerte)

Pferde, die mit Wirkstoffen der Liste II, IV oder V behandelt wurden, dürfen nur am Rennen teilnehmen, wenn zweifelsfrei feststeht, dass alle nicht erlaubten Substanzen nicht mehr im Tier vorhanden sind.

Die Anwendung der in Liste IV enthaltenen Stoffe ist grundsätzlich verboten, sofern sie nicht im Einzelfall aus medizinischen Gründen indiziert ist. Die Anwendung muss gemäß den Durchführungsbestimmungen über die Führung des Medikamentenbuches nach §22 Trabrennordnung dokumentiert werden. NSAID sind der Liste V zuzuordnen (HVT 2014).

II LITERATURÜBERSICHT

2.1.7 Direktorium für Vollblutzucht und Rennen (DVR)

Das DVR verfolgt im Artikel 539 (Erlaubte Mittel) und 540 (Unerlaubte Mittel) ihrer Rennordnung die gleichen Grundsätze sowie die gleichen Substanzeinteilung wie der HVT (DVR 2014).

2.1.8 *Canadian Pari-Mutuel Agency* und *Australian Equine Veterinary Association*

Der kanadische Ansatz bei der Überwachung von verbotener Medikation basiert auf der Verhinderung der stetigen Weiterentwicklung der Analytik, indem geeignete Analyseverfahren „eingefroren“ oder „fixiert“ werden. Sobald eine zweckmäßige Analytik vorliegt, wird eine Nachweis- und Karenzzeit mithilfe einer gezielten Untersuchung an wenigen Pferden festgelegt. Diese werden von der *Canadian Pari-Mutuel Agency* für mehr als 70 Substanzen veröffentlicht. Sobald eine Verbesserung der analytischen Methode vorgenommen wird, findet eine Informationsweitergabe an alle Beteiligten (z.B. Reiter und Trainer) statt (SPENCER et al. 2008). Ausgehend von der *Australian Equine Veterinary Association* wird in Australien der gleiche Ansatz verfolgt (TOBIN et al. 1999). Dieser Ansatz berücksichtigt keinen Zusammenhang zwischen Nachweisgrenze bzw. die Nachweiszeit und der pharmakologischen Wirkung einer Substanz.

II LITERATURÜBERSICHT

2.2 Risikoanalyse: Der Weg bis zur Karenzzeit

Durch die dynamische Entwicklung der analytischen Möglichkeiten wird die Nachweisgrenze für Wirkstoffe zunehmend niedriger. Nach TOBIN et al. (2013) können im Urin oder Blut theoretisch Konzentrationen von bis zu etwa 25 Femtogramm pro ml (5×10^7 Moleküle pro ml) nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Möglichkeit besteht, nicht wirksame Konzentrationen von einigen Stoffen nachzuweisen (TOUTAIN 2010b).

In der Analytik existieren derzeit nach TOUTAIN (2010b) drei Konzepte zur Überwachung der verschiedenen Substanzen im Pferdesport:

- die Nulllösung, d.h. die Analyse von Konzentrationen bis zur Nachweisgrenze (*Limit of detection, LOD*) des entsprechenden Analyseverfahrens (für Dopingsubstanzen),
- die Anwendung von Grenzwerten mit exakter Quantifizierung von Substanzen, die entweder natürlich im Organismus vorkommen oder von Substanzen, die natürlicherweise oder als Kontaminanten in bestimmten Konzentrationen mit dem Futter aufgenommen werden können und
- die Anwendung von *Screening Limits* (SL) für therapeutisch eingesetzte Substanzen.

Für therapeutische Substanzen muss die Frage beantwortet werden, wie viel Zeit zwischen der letzten Wirkstoffapplikation und dem Wettkampfeinsatz liegen muss, damit die Analyse einer Wettkampfprobe unter Berücksichtigung des SL sicher negativ ist. Dieser Zeitraum wird als Karenzzeit oder *Withdrawal Time* bezeichnet (TOUTAIN 2010a).

II LITERATURÜBERSICHT

2.2.1 Risikobeurteilung: Bestimmung der nicht wirksamen Konzentration

Zur Bestimmung einer nicht wirksamen oder irrelevanten Konzentration existieren derzeit zwei verschiedene Modelle.

2.2.1.1 PK/PD Modell von TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

TOUTAIN u. LASSOURD (2002) entwickelten ein Modell zur Bestimmung irrelevanter Plasma- und Urinkonzentrationen.

Die Anwendung des Modells setzt voraus, dass der pharmakologische Effekt systemisch und reversibel ist sowie mit der Plasmakonzentration proportional korreliert. Bei gleichzeitigem Einsatz mehrerer Substanzen oder der zusätzlichen Verwendung eines Diuretikums ist die Anwendung des Modells nicht möglich (TOUTAIN u. LASSOURD 2002).

TOUTAIN u. LASSOURD (2002) definieren eine irrelevante Plasma- und Urinkonzentration als die Konzentration, von der kein Effekt, d.h. keine Veränderung einer physiologischen Funktion ausgeht. Diese Konzentration wird ausgehend von einer effektiven Plasmakonzentration (EPC) berechnet. Die EPC basiert auf pharmakokinetischen Daten zur jeweiligen Substanz und berechnet sich aus dem Quotienten von Standarddosierung (intravenös) und totaler *Clearance*. Sie kann bei einem extravaskulären Applikationsweg annäherungsweise auch durch Dividieren der *Area under the plasma concentration vs. time curve (AUC)* durch das empfohlene Dosisintervall kalkuliert werden. Durch die Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors wird anschließend eine ineffektive Plasmakonzentration (IPC) ermittelt (TOUTAIN u. LASSOURD 2002). Die Festlegung eines angemessenen Sicherheitsfaktors stellt sowohl eine wissenschaftlich basierte, als auch eine politische Entscheidung dar.

II LITERATURÜBERSICHT

Die wissenschaftliche Komponente orientiert sich an der Bewertung der Qualität und dem Umfang der verfügbaren Daten, der Zuverlässigkeit der Daten, der individuellen Schwankungen innerhalb der Population, der Ausprägung der Dosis-Wirkungsbeziehung, der Wirkstoffgruppe und an dem Vorhandensein von verschiedenen Wirkqualitäten. TOUTAIN u. LASSOURD (2002) unterbreiteten den Vorschlag, einen Sicherheitsfaktor von 500 (50×10) zu berücksichtigen. Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Faktor 50 die effektive Konzentration, für die grundsätzlich angenommen werden kann, dass sie ungefähr der EC_{50} entspricht, in eine ineffektive Konzentration transformiert. Die interindividuelle Variabilität wird mit dem Faktor 10 kalkuliert (TOUTAIN u. LASSOURD 2002).

Durch die Multiplikation der IPC mit einem Faktor (R_{ss} , *Ratio steady-state*), der das Verhältnis von Urin- zu Plasmakonzentration im *Steady-state* beschreibt, kann eine ineffektive Urinkonzentration (IUC) berechnet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnis kein konstanter Faktor ist und stark vom Urinvolumen und Urin-pH-Wert beeinflusst wird.

2.2.1.2 Experimentelles Modell von TOBIN et al. (1999)

TOBIN et al. (1999) definierten „*Highest No Effect Dose*“ (HNED) als die höchste Wirkstoffdosis, bei der das Pferd unter keiner pharmakologischen Wirkung steht. Sie wird in klinischen Studien durch die Anwendung verschiedener Dosierungen unter Betrachtung des Wirkstoffpotenzials bestimmt. Anschließend wird der „*No Effect Trace*“ (NET) etabliert, der die höchste Plasma- oder Urinkonzentration eines Wirkstoffes oder seines spezifischen Metaboliten darstellt, die nach der Applikation einer HNED gemessen werden kann.

II LITERATURÜBERSICHT

Der Ansatz wird nach TOBIN et al. (1999) dadurch limitiert, dass nur eine Aussage zum untersuchten Applikationsweg und der verwendeten Formulierung und ohne Anwendung weiterer Wirkstoffe möglich ist und keine Übertragung auf andere Gegebenheiten erfolgen kann. Publierte Untersuchungen zu diesem experimentellen Ansatz für NSAID konnten nicht auffindig gemacht werden.

2.2.2 Risikomanagement: Festlegung des HSL

Im Rahmen einer verbandspolitischen Entscheidung kommt es unter Berücksichtigung der irrelevanten Wirkstoffkonzentration zur Festlegung eines SL (TOUTAIN 2010b).

ESL bzw. HSL sind Anweisungen von Pferdesportverbänden oder -organisationen an die Untersuchungslabore, um den Nachweis von Therapeutika so zu kontrollieren, dass das Wohlbefinden der Pferde nicht bedroht, die Leistung der Pferde nicht beeinflusst und der Integrität des Pferdesports nicht geschadet wird (TOUTAIN 2010b).

2.2.3 Risikokommunikation

Die Risikokommunikation beinhaltet die Veröffentlichung von Nachweis- oder Karenzzeiten durch die Pferdesportverbände und -organisationen (TOUTAIN 2010b) (siehe II 3.).

II LITERATURÜBERSICHT

2.2.3.1 Nachweiszeit

Die Nachweiszeit oder „*Detection Time*“ ist definiert als Intervall zwischen der letzten Wirkstoffapplikation und dem Zeitpunkt, zu dem die Substanz nicht mehr bei allen untersuchten Pferden unter Anwendung eines routinemäßig eingesetzten und international standardisierten Analyseverfahren nachgewiesen werden konnte (TOUTAIN 2010b). Die Nachweiszeit wird im Rahmen einer Untersuchung an wenigen (ungefähr 6) gesunden Pferden für ein exakt spezifiziertes Medikament unter bestimmten Bedingungen ermittelt (TOUTAIN 2010a). Von den Verbänden und Organisationen wird weltweit eine Vielzahl von verschiedenen Nachweiszeiten veröffentlicht, die analysemethoden- und wirkstoffanwendungsspezifisch sind (siehe II 3.).

Die Ermittlung einer Nachweiszeit für Urin sollte nach Vorgabe des EHSLC ausschließlich über standardisierte Ausscheidungsversuche erfolgen, da Urin eine für pharmakokinetische Berechnungen nur schwer zu erfassende Untersuchungsmatrix darstellt. Die Urinkonzentration wird durch viele variable Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel durch das Urinvolumen und den Urin-pH-Wert und steht somit in keinem konstanten Verhältnis zur Plasmakonzentration (TOUTAIN u. LASSOURD 2002; TOBIN et al. 2013). Eine Nachweiszeit im Plasma kann über eine Berechnung der Ausscheidungszeit annäherungsweise geschätzt werden.

2.2.3.1.1 Berechnung der Ausscheidungszeit

Betrachtet man die Elimination eines Wirkstoffes als exponentiellen Konzentrationsabfall, kann davon ausgegangen werden, dass nach sieben Halbwertszeiten nur noch 0,01% der Anfangskonzentration vorhanden ist, das heißt

II LITERATURÜBERSICHT

99,99% sind ausgeschieden. Zur vollständigen Ausscheidung aller Wirkstoffmoleküle werden etwa 60-80 Halbwertszeiten benötigt (TOBIN et al. 2013).

Dieser exponentielle Konzentrationsabfall kann mit folgender Funktion beschrieben werden:

$$c(t) = y_z e^{-\lambda_z \cdot \text{time}}$$

- $c(t)$ = Plasma- oder Urinkonzentration nach einer bestimmten Zeit t nach der Verabreichung des Wirkstoffes
- y_z = Konzentration in der Eliminationsphase
- λ_z = Eliminationskonstante

$$(\ln 2 / \text{Halbwertszeit}) = (\text{Clearance}_{\text{Plasma}} / \text{Verteilungsvolumen})$$

Durch Verwendung der Funktion kann berechnet werden, zu welchem Zeitpunkt eine bestimmte Konzentration, z.B. eine EC_{50} oder IPC erreicht wird (TOUTAIN 2010a).

$$t_A = 1,44 \times \text{HWZ} \times \ln(y_z / \text{IPC})$$

- HWZ = Halbwertszeit

Voraussetzung für die Anwendung der Berechnung ist eine valide Halbwertszeit. Mithilfe von Konfidenzintervallen kann eine experimentell bestimmte Halbwertszeit statistisch abgesichert werden. So beträgt bei einer Halbwertszeit von $5,4 \pm 2,4$ h, die bei der Anwendung von 8,8 mg/kg Phenylbutazon an sechs Pferden ermittelt wurde, die maximale Halbwertszeit 10 h, 11,6 h und 13,3 h unter Berücksichtigung des 95%, 99% resp. 99,9% Vertrauensintervalls (AUER 1992). Alternativ wäre auch eine statistische Absicherung der final berechneten Ausscheidungszeit über die Anwendung von Konfidenzintervallen denkbar.

II LITERATURÜBERSICHT

2.2.3.2 Ausscheidungsversuche

Die Ermittlung von pharmakokinetischen Daten und Nachweiszeiten muss auf wissenschaftlichen Prinzipien beruhen. Das EHSLC hat hierfür entsprechende Standards entwickelt (EHSLC 2014a). Diese beruhen auf Grundlagen zur Durchführung von pharmakokinetischen Untersuchungen und stellen die Bewertungsgrundlage für die Literaturanalyse der vorliegenden Arbeit dar (siehe III 1.6.).

2.2.3.2 Karenzzeit

Die Karenzzeit oder *Withdrawal Time* wird von der Nachweiszeit unter Berücksichtigung von Variabilität abgeleitet. Sie ist eine Empfehlung über die Zeit, die zwischen der letzten Gabe eines Wirkstoffes und dem risikoarmen Einsatz (Restrisiko) im Wettkampf liegen sollte. Dabei ist die Karenzzeit immer länger als die Nachweiszeit (TOUTAIN 2010b).

Derzeit existieren zwei Modelle zur statistischen Absicherung einer Nachweiszeit und damit zur Formulierung einer Karenzzeit.

2.2.3.2.1 Monte Carlo Stimulation

TOUTAIN (2010a) schlussfolgerte, dass bei pharmakokinetischen Parametern, die in einer Untersuchung mit 6 Pferden ermittelt werden, eine relative Standardabweichung von durchschnittlich 40 % vorliegt. Die Durchführung einer Monte-Carlo-Stimulation ergab in diesem Fall, dass eine Multiplikation der Nachweiszeit mit dem Faktor 2,1 bis 2,2 notwendig ist, um die Karenzzeit zu

II LITERATURÜBERSICHT

berechnen, die 90% der Population erfasst. Bei Untersuchungen mit 8 Pferden beträgt die relative Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nur noch etwa 20% und die Berücksichtigung des Faktors 1,4 wäre ausreichend um eine Karenzzeit mit gleicher statistischer Sicherheit zu formulieren.

Im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse konnte gezeigt werden, dass Parameter, die die Halbwertszeit beeinflussen, wie *Plasmaclearance* und Verteilungsvolumen, die größten Auswirkungen auf die Karenzzeit haben. Im Gegensatz dazu haben Parameter, die die Urin- oder Plasmakonzentration bestimmen, wie zum Beispiel Dosis, Urin-Plasmakonzentrationsverhältnis und Bioverfügbarkeit einen geringeren Einfluss auf die Karenzzeit (TOUTAIN 2010a).

2.2.3.2.2 Konfidenzintervallberechnung

Der statistische Ansatz von KIETZMANN et al. (2006) basiert auf der Hypothese, dass die Ergebnisse pharmakokinetischer Untersuchungen den Durchschnitt der Gesamtpopulation widerspiegeln. Durch die Ermittlung von Konfidenzintervallen kann die bei der Angabe einer Karenzzeit notwendige Sicherheit statistisch verteidigt werden. Geht man beispielsweise davon aus, dass in einer Studie die Ausscheidungszeit von 100 Zeiteinheiten bei einer Standardabweichung von 50 ermittelt wurde, so kann errechnet werden, dass die Ausscheidungszeit bei 95 % der Pferde unter 200, bei 99 % der Pferde unter 230 und bei 99,9 % der Pferde unter 265 Zeiteinheiten liegt (KIETZMANN et al. 2006). KIETZMANN u. DÜE (2009) folgern aus bisher durchgeführten pharmakokinetischen Untersuchungen, dass die Annahme einer Standardabweichung von 50 % des Mittelwertes ein ausreichend hohes Maß an Sicherheit gewährleistet.

II LITERATURÜBERSICHT

3 Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten

Die einzelnen Pferdesportverbände und -organisationen veröffentlichen entsprechend ihrer Anti-Doping und Medikamentenkontrollregeln unterschiedliche Nachweis- und Karenzzeiten. Angaben zu den Untersuchungsbedingungen, die zur Festlegung der Nachweiszeiten betragen, werden in unterschiedlicher Qualität und Quantität von den Verbänden und Organisationen kommuniziert.

Tabelle 4: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Carprofen (Stand Juli 2014)

| Carprofen | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|---|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 120 | 5 | 4 Pferde, 1 g zweimal tgl. über 5 Tage oral |
| EHSLC (2014b) | 264 | 11 | 6 Pferde, 0,7 mg/kg einmalig intravenös |
| FN (2014c) | 720* | 30* | |

*Karenzzeit

Tabelle 5: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Firocoxib (Stand Juli 2014)

| Firocoxib | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|--|
| | in h | in Tage | |
| EHSLC (2014b) | 360 | 15 | 20 Pferde, 0,1 mg/kg einmal tgl. über 7 Tage oral |
| FN (2014c) | 720* | 30* | |
| IHRC (2014a) | 168 (Blut) | 7 | SL im Blut 40 ng/ml |
| RMTC (2014a) | 336 | 14 | 0,1 mg einmal tgl. über 4 Tage oral, SL im Blut 20 ng/ml |
| USEF (2014) | 12 | 0,5 | 0,1 mg/kg einmal tgl. über 14 Tage oral, SL im Blut 240 ng/ml |

*Karenzzeit

II LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 6: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Flunixin-Meglumin (Stand Juli 2014)

| Flunixin-Meglumin | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 48 | 2 | 6 Pferde, 500 mg einmalig intravenös |
| | 48 | 2 | 4 Pferde, 500 mg einmalig oral |
| | 72 | 3 | 6 Pferde, 500 mg einmal tgl. über 5 Tage intramuskulär |
| EHSLC (2014b) | 144 | 6 | 4 Pferde, 1 mg/kg einmalig intravenös |
| FEI (2014b) | 144 | 6 | 4 Pferde, 1 mg/kg einmalig intravenös |
| FN (2014c) | 432* | 18* | |
| IHRC (2014a) °IHRC (2014b) | 48 (Blut), 96 (Urin) 24° | 2 (Blut) 4 (Urin) 1° | SL im Blut 20 ng/ml° |
| RIRDC (2014) | 72 | 3 | 12 Pferde, 1,1 mg/kg einmalig intravenös, SL im Urin 100 ng/ml |
| RMTC (2014b) | 32 | 1,3 | 1,1 mg/kg einmalig intravenös, SL 20 ng/ml |
| USEF (2014) | 12 | 0,5 | 1,1 mg/kg einmal tgl. über 5 Tage intravenös und oral, SL im Blut 1000 ng/ml |

*Karenzzeit

Tabelle 7: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Ketoprofen (Stand Juli 2014)

| Ketoprofen | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|--|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | >120 | >5 | 4 Pferde, 1 g zweimal tgl. über 5 Tage oral |
| EHSLC (2014b) | 96 | 4 | 6 Pferde, 2,2 mg/kg einmal tgl. über 5 Tage |
| FEI (2014b) | 96 | 4 | 6 Pferde, 2,2 mg/kg einmal tgl. über 5 Tage intravenös |
| FN (2014c) | 288* | 12* | |
| IHRC (2014b) | 24 | 1 | SL im Blut 10 ng/ml |
| RIRDC (2014) | 72 | 3 | 12 Pferde, 1,76 - 2,29 mg/kg einmalig intravenös, SL im Urin 100 ng/ml |
| RMTC (2014b) | 24 | 1 | 2,2 mg/kg einmalig intravenös, SL im Blut 10 ng/ml |
| USEF (2014) | 12 | 0,5 | 2,2 mg/kg einmalig intravenös |

*Karenzzeit

II LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 8: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Meloxicam (Stand Juli 2014)

| Meloxicam | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|--|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 54 | 2,25 | 4 Pferde, 270 mg einmalig intravenös |
| | 48 | 2 | 4 Pferde, 90 mg einmalig oral |
| EHSLC (2014b) | 72 | 3 | 8 Pferde, 0,6 mg/kg einmal tgl. über 14 Tage |
| FEI (2014b) | 72 | 3 | 8 Pferde, 0,6 mg/kg einmal tgl. 14 Tage oral |
| FN (2014c) | 216* | 9* | |

*Karenzzeit

Tabelle 9: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Metamizol (Stand Juli 2014)

| Metamizol | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|---|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 120 | 5 | 4 Pferde, 10 g zweimal tgl. über 5 Tage intramuskulär |
| | 36 | 1,5 | 4 Pferde, 7,5 g einmalig intravenös |
| | 36 | 1,5 | 8 Pferde, 7,5 g einmalig intramuskulär |
| EHSLC (2014b) | 72 | 3 | 10 Pferde, 30 mg/kg einmalig intravenös |
| FEI (2014b) | 72 | 3 | 10 Pferde, 30 mg/kg einmalig intravenös |
| FN (2014c) | 216* | 9* | |
| IHRC (2014a) | 120 | 5 | |

*Karenzzeit

II LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 10: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Phenylbutazon (Stand Juli 2014)

| Phenylbutazon | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|---|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 96 | 4 | 4 Pferde, 3 g einmal tgl. 3 Tage intravenös und oral |
| EHSLC (2014b) | 168 | 7 | 6 Pferde, 8,8 mg/kg einmalig intravenös |
| | | | 6 Pferde, 8,8 mg/kg BID 1 Tag + 4,4 mg/kg zweimal tgl. über 10 Tage oral |
| | | | 2 Pferde, 4,7 mg/kg zweimal tgl. über 5 Tage |
| FEI (2014b) | 168 | 7 | 6 Pferde, 8,8 mg/kg einmalig intravenös |
| | | | 6 Pferde, 8,8 mg/kg BID 1 Tag + 4,4 mg/kg zweimal tgl. über 10 Tage oral |
| | | | 2 Pferde, 4,7 mg/kg zweimal tgl. 5 Tage oral |
| FN (2014c) | 336 | 14* | |
| IHRC (2014b) | 24 | 1 | SL im Blut 2000 ng/ml |
| RIRDC (2014) | 120 | 5 | 12 Pferde, 3,1 -3,9 mg/kg einmal tgl. über 1 Tag + 1,5 - 2,0 mg/kg zweimal tgl. über 4 Tage + 1,5 - 2,0 mg/kg einmal tgl. über 1 Tag oral, SL im Urin 100 ng/ml |
| RMTC (2014b) | 24 | 1 | 2,2 mg/kg einmalig intravenös, SL im Blut 2000 ng/ml |
| USEF (2014) | 12 | 0,5 | 4,4 mg/kg einmalig oral, SL im Blut 15000 ng/ml |

*Karenzzeit

Tabelle 11: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten der Pferdesportverbände für Vedaprofen (Stand Juli 2014)

| Vedaprofen | Nachweis- und Karenzzeit | | Voraussetzungen |
|---------------|--------------------------|---------|--|
| | in h | in Tage | |
| CPMA (2014) | 48 | 2 | 4 Pferde, 1 g einmalig intravenös |
| | 48 | 2 | 4 Pferde, 1 g einmal tgl. oral am 1. und 5. Tag, 0,5 g zweimal tgl. am 2-4 Tag |
| EHSLC (2014b) | 96 | 4 | 6 Pferde, 2 mg/kg einmalig intravenös |
| FN (2014c) | 288* | 12* | |

*Karenzzeit

III MATERIAL UND METHODEN

1 Literaturanalyse

1.1 Zielsetzung

Zur Gewinnung und Beurteilung von pharmakokinetischen Informationen über die bei der Behandlung von Pferden eingesetzten NSAID wurde eine Literaturanalyse durchgeführt. Ziel war die Validierung der derzeit empfohlenen Nachweis- und Karenzzeiten.

1.2 Literatur

Die Literaturrecherche wurde überwiegend mithilfe von elektronischen Literaturdatenbanken durchgeführt. Es wurden die Datenbanken „PubMed“, „*Google Scholar*“, „*Web of Science*“ und „CABI“ verwendet. Zudem wurden alle in CRAIGMILL et al. (2006) zitierten Referenzen herangezogen.

1.3 Primärstudien

Bei der Auswertung wurden ausschließlich Publikationen berücksichtigt, die mindestens zu drei Zeitpunkten nach der Wirkstoffanwendung Analysen von Wirkstoffkonzentrationen im Plasma- und/oder Urin je Pferd beinhalteten. Jedes Applikations- und Dosierungsschema musste dabei an mindestens zwei Pferden untersucht worden sein. Zusätzlich zu Publikationen aus Zeitschriften wurden auch *Proceedings* und durch Pferdesportverbände veröffentlichte Untersuchungen mit einbezogen, unter anderem Untersuchungen der *Canadian-Pari-Mutual Agency*.

III MATERIAL UND METHODEN

Es erfolgte auch eine Berücksichtigung von klinischen Arbeiten, bei denen der Verlauf der Wirkstoffkonzentration im Blut und/oder Urin erhoben wurde. Es wurden deutsch-, englisch- und französischsprachige Veröffentlichungen ausgewertet.

1.4 Datenextraktion

Die Daten, die den Publikationen entnommen werden konnten, wurden in Tabellenform unter den vier Aspekten: „Pferde“, „Versuchsdurchführung“, „Analytik“ und „Auswertung“ zusammengefasst und verglichen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Kriterien zur Gegenüberstellung von Untersuchungen

| Pferde | Versuch | Analytik | Auswertung |
|---------------|------------------------------------|-------------|----------------------------------|
| Gruppe | Präparat | Verfahren | Nachweiszeit (h) |
| Anzahl | Applikationsart | LOD (ng/ml) | <i>Plasmaclearance</i> (ml/kg/h) |
| Rasse | Applikationsmodalität | LOQ (ng/ml) | Verteilungsvolumen (ml/kg) |
| Geschlecht | Dosierung (mg/kg) | | Y _z (µg/ml) |
| Alter (Jahre) | Dosierungsintervall | | λ _z (1/h) |
| Gewicht (kg) | Behandlungsdauer (d) | | Halbwertszeit (h) |
| Gesundheit | Probenmaterial | | C _{max} (µg/ml) |
| Haltung | Probenentnahmemodalitäten | | T _{max} (h) |
| Bewegung | Probenanzahl | | Urin-Plasma <i>Ratio</i> |
| Futter | Probenentnahmezeitraum (d) | | |
| Wasser | Probenlagerung (°C) | | |
| | max. Entnahmezweischenzeitraum (h) | | |

III MATERIAL UND METHODEN

1.5 Bewertungsmethodik

Die Qualität einer Studie ist abhängig von der Fragestellung, dem methodischen Aufbau, der Durchführung, der Analyse der Studienergebnisse sowie der Art und Ausführlichkeit der Berichterstattung. Neben der üblichen Qualitätsbewertung, der sogenannten internen Validität, ist auch die externe Validität ein entscheidendes Qualitätsmerkmal. Die externe Validität beschreibt das Ausmaß, mit dem die Studienergebnisse für die Praxis verallgemeinert und auf die Gesamtpopulation übertragen werden können (ARLT 2013). Jede Bewertung unterliegt einem fachlichen Ermessen und stützt sich auf pharmakologische und biologische Informationen (WINDELER 2008).

Zur Bestimmung der Validität der einzelnen Untersuchungen wurde ein Bewertungsschema entwickelt. Die vier zu überprüfenden und die Gesamtqualität der die Untersuchungen beeinflussenden Faktoren „Pferde“, „Versuchsdurchführung“, „Analytik“ und die „Auswertung“ wurden gleichrangig mit jeweils maximal 3 zu erreichenden Punkten bewertet. Zur Qualitätsbeurteilung der ausgewählten Untersuchungen diente eine „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“ (siehe III 1.6.). Anhand der maximal zu erreichenden Gesamtpunktzahl von zwölf erfolgte eine Kategorisierung von A bis D (Tabelle 13).

Tabelle 13: Punktvergabeschema und prozentuale Verteilung der einzelnen Kriterien

| Kriterium | Punkte | Prozent |
|-------------------|--------|---------|
| Pferde | 3 | 25 |
| Versuch | 3 | 25 |
| Analytik | 3 | 25 |
| Auswertung | 3 | 25 |
| Gesamt | 12 | 100 |

III MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 14: Bedeutung der Kategorien A-D

| Punkte | Kategorie | Bewertung |
|---------------|------------------|--|
| 12-10 | A | Diese Publikation ermöglicht eine Aussage mit hoher Validität zur Ausscheidungszeit der untersuchten Substanz. |
| 9-7 | B | Diese Publikation ermöglicht eine Aussage mit eingeschränkter Validität zur Ausscheidungszeit der untersuchten Substanz. |
| 6-4 | C | Diese Publikation ermöglicht eine Aussage ohne ausreichende Validität zur Ausscheidungszeit der untersuchten Substanz. |
| 3-1 | D | Diese Publikation ermöglicht keine Aussage zur Ausscheidungszeit der untersuchten Substanz. |

1.6 Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten

Als Bewertungsgrundlage wurden die Anforderungen an pharmakokinetische Untersuchungen nach CHITTENDEN (2011) und DERENDORF et al. (2011) berücksichtigt. Die Anpassung dieser grundsätzlichen Voraussetzungen an die hier zu untersuchende Fragestellung nach der Nachweiszeit von NSAID beim Pferd im Sport erfolgte im Sinne des EHSLC (2014c).

1.6.1 Auswahl der Pferde

In die Untersuchung sind mindestens sechs Vollblüter, Warmblüter oder andere Sportpferderassen einzubeziehen. Eine Nutzung von Wallachen, Stuten und Hengsten ist möglich. Das Alter der Tier sollte dem eines durchschnittlich aktiven Sportpferdes entsprechen (etwa zwischen drei und zwölf Jahre). Die Pferde sind vor der eigentlichen Untersuchung an die Bedingungen zu akklimatisieren und täglich mit einer einfachen Ration Futter ohne die Zugabe von Supplementen zu versorgen.

III MATERIAL UND METHODEN

Zu den folgenden Kriterien haben für jedes Pferd Informationen vorzulegen:

- Name/Nummer
- Alter
- Gewicht (Ermittlung durch Wiegen der Pferde)
- vergangene Medikation
- Fütterungsplan und -management
- Haltungsbedingungen und -management
- Maßnahmen zur Kontaminationsprävention
- Trainingsstatus
- klinischer Gesundheitszustand
- Futteraufnahme
- normale Wasseraufnahme

1.6.2 Versuchsdurchführung

1.6.2.1 Wirkstoffapplikation

Der Wirkstoff ist in einem für die Veterinärmedizin verfügbaren Präparat sowie in einer für Pferde empfohlenen Dosierung anzuwenden. Wenn mehrere Dosierungsvorgaben existieren, soll zur Ermittlung einer Nachweiszeit die höchste Dosierung mit der längsten Behandlungsdauer untersucht werden.

Die folgenden Informationen müssen bekannt sein und beachtet werden:

- Name des Präparates
- Name und Adresse des Herstellers
- Chargennummer

III MATERIAL UND METHODEN

- Herstellungs- und Verfallsdatum
- Lagerungsbedingungen
- Dosierung/Dosierungsregime
- Administrationsart, Art der Verabreichung
- Datum und Uhrzeit der Applikation
- Besonderheiten, wie zum Beispiel lokale oder systemische Reaktionen nach Wirkstoffadministration
- Bedingungen und Modalitäten der Applikation (Tabelle 15)

Tabelle 15: Bedingungen und Modalitäten der Applikation

| Applikationsart | Bedingungen |
|-------------------------|--|
| Intravenös | <ul style="list-style-type: none"> • Punktionsstelle • Dauer der Bolusinjektion (<2 Minuten) • Katheterpflege (Spülung, Entfernung) |
| Intramuskulär, Subkutan | <ul style="list-style-type: none"> • Punktionsstelle |
| Intraartikulär | <ul style="list-style-type: none"> • punktiertes Gelenk • Punktionsstelle • Ablauf des gesamten Eingriffes |
| Oral | <ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkt in Bezug zur Fütterung • Vorgehen (z.B. direkte Eingabe ins Maul, Verabreichung mithilfe einer Nasen-Schlund-Sonde, Vermengung mit dem Kraftfutter) |
| Inhalation | <ul style="list-style-type: none"> • verwendetes Gerät • verwendete Technik • Aerosolgröße |

III MATERIAL UND METHODEN

1.6.2.2 Probenentnahme

Es erfolgt eine regelmäßige Probenentnahme. Während der Probenentnahmen und der Wirkstoffapplikation ist das Tragen von sauberen Handschuhen erwünscht.

Zur Blutentnahme kann durch das Scheren der Punktionsstelle die Kontaminationsgefahr minimiert werden. Es sind Röhrchen mit Anti-Koagulanz, vorzugsweise mit Heparin zu verwenden.

Idealerweise sollte jeder ausgeschiedene Urin nach der Wirkstoffapplikation gesammelt werden, mindestens jedoch zwei Proben pro Tag, wobei eine frühestmöglich am Morgen und eine spät am Abend genommen werden sollten. Der Beprobungszeitraum muss so lang sein, dass gewährleistet wird, dass die Wirkstoffkonzentration von allen Pferden unterhalb des SL liegt. Die Proben sind unmittelbar nach der Entnahme bis zur Analyse tiefgefroren zu lagern, sofern nicht jede Probe direkt nach der Entnahme analysiert wird.

1.6.3. Analytik

Es muss eine validierte Analysemethode verwendet werden, das heißt es muss eine qualitative und quantitative Charakterisierung und Überprüfung der Methode in mehreren Laboren stattfinden, so dass eine zuverlässige Durchführung nach einer offiziellen Standardanleitung vorgenommen werden kann. Folgende Parameter sind für die Validierung der Analysemethode zu wählen (KROMIDAS 2011):

- Die **Präzision** stellt ein Maß für die Streuung von unabhängigen Analyseergebnissen dar und wird durch die Standardabweichung dargestellt. Es wird zwischen Wiederholpräzision (*intraday precision*) und Zwischenpräzision (*interday precision*) unterschieden.

III MATERIAL UND METHODEN

- Die **Stabilität** beschreibt den Verlust des Analyten im Probenmaterial über einen bestimmten Zeitraum.
- Die **Linearität** ist die Fähigkeit einer analytischen Methode innerhalb eines Konzentrationsbereiches Messwerte zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind.
- Die **Richtigkeit** definiert die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und dem Referenzwert, der als fehlerfrei und richtig gilt.
- Die **Quantifizierungsgrenze (LOQ)** ist die niedrigste Konzentration, die mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit mengenmäßig bestimmt werden kann.
- Die **Nachweisgrenze (LOD)** ist die niedrigste messbare Konzentration. Sie ist die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein des Analyten in einer Probe.
- Die **Selektivität** definiert das Vermögen einer analytischen Methode verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Substanzen ohne gegenseitige Beeinträchtigung zu erfassen und eindeutig zu identifizieren.
- Die **Wiederfindungsrate** beschreibt das Verhältnis zwischen einem unter Wiederholungsbedingungen gemessenen Mittelwert und dem tatsächlichen Wert des Analyten in einer Probe.

1.6.4 Auswertung

Die Datenanalyse und statistische Auswertung sollte mit geeigneten Computerprogrammen erfolgen. Die Ergebnisse sind vollständig und ausführlich zu publizieren und entsprechend zu diskutieren.

III MATERIAL UND METHODEN

1.6.4.1 Berechnung der IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) wurden mithilfe der vorhandenen und ausgewerteten pharmakokinetischen Daten die IPC und IUC berechnet (siehe II 2.2.1.1.).

1.6.4.2 Berechnung der Ausscheidungszeit

Es wurden zwei verschiedene Modelle angewendet und verglichen.

Nach TOUTAIN (2010a) wurde die Zeit bis zum Erreichen der niedrigsten berechneten IPC unter Anwendung folgender Funktion kalkuliert:

$$t_A = 1,44 \times \text{HWZ} \times \ln(y_z / \text{IPC})$$

- t_A = Ausscheidungszeit bis zum Erreichen einer Grenzkonzentration
- HWZ = Halbwertszeit
- y_z = Konzentration in der Eliminationsphase

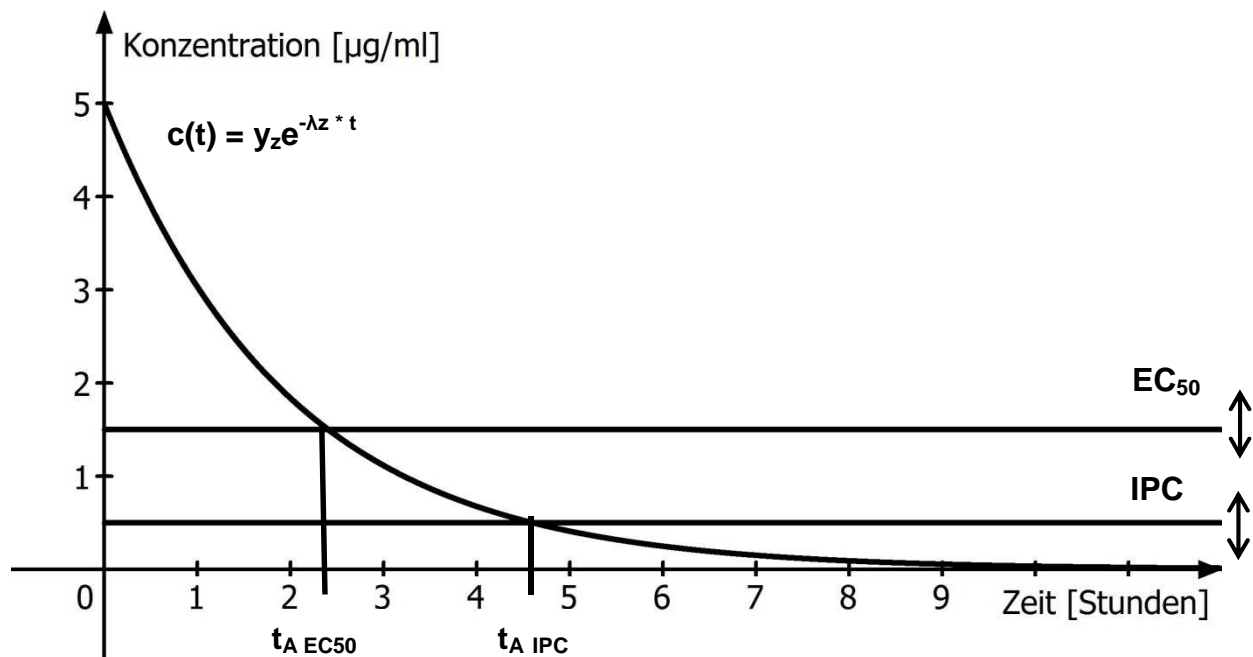


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausscheidungszeit

III MATERIAL UND METHODEN

Nach KIETZMANN (1983) erfolgte die Berechnung der Zeit bis zum Erreichen der niedrigsten kalkulierten IPC nach folgender Funktion.

$$t_A = [(\ln y - \ln IPC) / \lambda_Z] + t_y$$

t_A = Ausscheidungszeit bis zum Erreichen einer Grenzkonzentration

y = Wirkstoffkonzentration

λ_Z = Eliminationskonstante

t_y = Zeit bis zum Erreichen der Wirkstoffkonzentration y

Es wurde die Wirkstoffkonzentration y zum Rechnen verwendet, die zum spät möglichsten Zeitpunkt t_y nach der Wirkstoffapplikation analysiert und angegeben wurde.

2 *In-vitro*-Untersuchung

2.1 Zielsetzung

Um vergleichbare Daten zur Wirkungspotenz der wichtigsten NSAID beim Pferd zu erhalten, wurde eine *In-vitro*-Untersuchung durchgeführt. In einem Vollblut-Assay wurde die Hemmung der COX I und II durch Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam in den Konzentrationen 0,001 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ analysiert. Es folgte eine Berechnung der IC_{50} .

2.2 Verwendete Materialien

Die *In-vitro*-Studie wurde im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Die verwendeten Materialien sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 16-18).

III MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Carprofen | Sigma-Aldrich, München |
| Diclofenac | Sigma-Aldrich, München |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| Firocoxib | Sigma-Aldrich, München |
| Flunixin-Meglumin | Sigma-Aldrich, München |
| Ketoprofen | Sigma-Aldrich, München |
| Lipopolysaccharid (LPS) <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) O111:B4 (γ -irradiated) L4391 | Sigma-Aldrich, München |
| Meloxicam | Boehringer, Ingelheim |
| phosphatgepufferte Salzlösung | Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Hannover; Salze : Fa. Merck, Darmstadt |
| <i>UltraPure H₂O</i> | Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA |

Tabelle 17: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|---|----------------------------------|
| Halter für Kanüle | BD, Heidelberg |
| Kanüle (20 Gauge x 1½“, 0,9 mm x 38 mm) | greiner-bio-one, Frickenhausen |
| Lithium-Heparinvacuümrohrchen mit Trenngel | BD, Heidelberg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen für Transferpette | VWR International, Hannover |
| <i>Prostaglandin E₂ Express EIA Kit Monoclonal</i> (Item No. 500141) | Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA |
| <i>Reaction Tubes</i> , 2 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| <i>Thromboxane B₂ Express, EIA Kit Monoclonal</i> (Item No.10004023) | Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA |
| Vacuetten (9 ml Z No Additive) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

III MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 18: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Brutschrank Hera Cell 150 | Thermo, Braunschweig |
| Eppendorf Reference Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg |
| Feinwaage, ALS 120-4 | Kern, Balingen |
| Kühlzentrifuge "Heraeus Megafuge 16R" | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts |
| Mikroliterpipetten Transferpette® S -8/-12 | Brand, Wertheim |
| <i>Orbital Shaker</i> | Stuart Scientific |
| Photometer Microplatereader MRX | Dynatech, Denkendorf |
| Pipettierhilfe, Accu-jet® pro | Brand, Wertheim |
| Test <i>Tube Shaker</i> "Reax top" | Heidolph, Schwabach |

2.3 Versuchsdurchführung

Das Protokoll der Versuchsdurchführung basierte auf der von McCann et al. (2004) beschriebenen Methode.

2.3.1 Herstellung der NSAID Lösungen

Es wurden folgende Wirkstoffe getestet: Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam. Die Substanzen der NSAID lagen in Pulverform vor und wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) entsprechend ihres Molekulargewichtes in Konzentrationen von 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 mmol/l gelöst. Jede Stammlösung wurde anschließend 1:100 mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnt.

III MATERIAL UND METHODEN

2.3.2 Aufbereitung der Blutproben

Für die Untersuchung wurden sechs unbehandelte und klinisch gesunde Warmblutstuten im Alter von 9-17 Jahren (der reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken der Tierärztlichen Hochschule Hannover) verwendet.

Die COX I-Aktivität wurde über die Ermittlung der TXB₂-Konzentration bestimmt. Hierfür wurde von jedem Pferd Blut aus der *Vena jugularis* in Vacuetten ohne Additiv gewonnen und sofort 500 µl Vollblut in Polypropylenröhrchen pipettiert, die mit je 5 µl NSAID Lösung versehen waren. Im Vollblut lagen somit Wirkstoffkonzentrationen von 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 µmol/l vor. Die Vehikelkontrolle enthielt DMSO und PBS in einem Verhältnis von 1:100. Nach der Durchmischung durch vorsichtiges Schwenken der Proben folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Das so gewonnene TXB₂ enthaltende Serum wurde durch Zentrifugation bei 2000 x g bei 4 °C für 10 Minuten separiert und anschließend in Polypropylenröhrchen überführt. Die Lagerung bis zur Analyse mittels EIA erfolgte bei -80 °C. Vor der Durchführung des EIA fand eine Verdünnung der Proben nach dem Schema der Tabelle 19 mit EIA-Puffer statt, um zu gewährleisten, dass die TXB₂-Konzentration im Messbereich des verwendeten Assays liegt. Die Verdünnung der Vehikelkontrolle entsprach 1:30 und 1:40.

Tabelle 19: Verdünnung der Proben vor der Durchführung des TXB₂ EIA

| | Carprofen | Diclofenac | Firocoxib | Flunixin-Meglumin | Ketoprofen | Meloxicam |
|---------------------|-----------|------------|-----------|-------------------|------------|-----------|
| 0,001 µmol/l | 1:30 | 1:20 | 1:30 | 1:20 | 1:25 | 1:25 |
| 0,01 µmol/l | 1:30 | 1:20 | 1:30 | 1:20 | 1:25 | 1:25 |
| 0,1 µmol/l | 1:30 | 1:20 | 1:30 | 1:10 | 1:10 | 1:20 |
| 1 µmol/l | 1:30 | 1:5 | 1:30 | 1:5 | 1:5 | 1:20 |
| 10 µmol/l | 1:30 | 1:5 | 1:30 | 1:5 | 1:5 | 1:5 |

III MATERIAL UND METHODEN

Die COX II-Aktivität wurde über die Ermittlung PGE₂-Konzentration bestimmt, welche durch Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurde.

Die Blutentnahme aus der *Vena jugularis* erfolgte hierfür in Lithium-Heparinvacuümröhrchen mit Trenngel. 500 µl Vollblut wurden mit 10 µl LPS (100 µg/ml) 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Je ein Aliquot vom Vollblut wurde nicht mit LPS inkubiert und diente als Kontrollprobe. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 5,1 µl der NSAID in den unterschiedlichen Konzentrationen. Im Vollblut lagen somit Wirkstoffkonzentrationen von 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 µmol/l vor. Die Vehikelkontrolle enthielt DMSO und PBS in einem Verhältnis von 1:100. Nach dem Durchmischen der Proben durch vorsichtiges Schwenken erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C. Das so gewonnene PGE₂ enthaltende Plasma wurde durch Zentrifugation bei 2000 x g bei 4 °C für 10 Minuten separiert und anschließend in Polypropylenröhrchen überführt. Die Lagerung bis zur Analyse mittels EIA erfolgte bei -80 °C. Vor der Durchführung des EIA fand eine 1:10 Verdünnung der Proben mit EIA-Puffer statt, um zu gewährleisten, dass die PGE₂-Konzentration im Messbereich des verwendeten Assays lag.

2.3.3 Prinzip des EIA

Bei den verwendeten EIA handelt es sich um kompetitive EIA. Das bedeutet, TXB₂ bzw. PGE₂ und ein TXB₂- bzw. PGE₂-Acetylcholinesterase Konjugat, der sogenannte *Tracer*, konkurrieren um limitierte Bindungsstellen von TXB₂- bzw. PGE₂-monoklonalen Antikörpern.

III MATERIAL UND METHODEN

Im Gegensatz zur konstanten *Tracer* Konzentration variiert die TXB₂- bzw. PGE₂-Konzentration der Standards und Proben. Der Anteil des gebundenen Tracers verhält sich umgekehrt proportional zur TXB₂- bzw. PGE₂-Konzentration. Das Ellman's Reagenz, das nach dem Waschvorgang aufgetragen wird, löst eine Farbreaktion aus. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 405-420 nm. Die Intensität der Farbe bzw. der Absorption ist proportional zur gebundenen *Tracer*-Konzentration und umgekehrt proportional zur freien TXB₂- bzw. PGE₂-Konzentration.

2.3.4 Durchführung des EIA

EIA Puffer, Waschpuffer, AChE-*Tracer* und der monoklonale Antikörper (AK) wurden entsprechend der Herstellervorgaben angesetzt. Für jeden Versuchstag wurde eine neue Standardreihe, wie vom Hersteller vorgeschrieben, angefertigt. Die Ausgangskonzentration von 20 ng/ml wurde durch Verdünnung des Standards (200 ng/ml) mit *Ultra Pure Water* rekonstituiert. Die Konzentrationen der 8 Standards betragen 15,6-2000 pg/ml. Der weitere Versuchsablauf ist der Tabelle 20 zu entnehmen.

III MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 20: Protokoll zum TXB₂ und PGE₂ EIA: Total Activity (TA), Non-Specific Binding (NSB), Maximum Binding (B₀) (CAYMAN-CHEMICAL-COMPANY 2013a, 2013b)

| Schritt | Reagenz | Blank | TA | NSB | B ₀ | Standard/ Probe |
|------------------------------|--|--------|--------|--------|----------------|--------------------|
| 1. Hinzufügen von Reagenzien | EIA-Puffer | - | - | 100 µl | 50 µl | - |
| | Standard/ Probe | - | - | - | - | 50 µl |
| | Tracer | - | - | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| | AK | - | - | - | 50 µl | 50 µl |
| 2. Inkubation | Die Wells wurden mit einem Plastikfilm verschlossen und 120 Minuten (TXB ₂ EIA) bzw. 60 Minuten (PGE ₂ EIA) bei Raumtemperatur auf dem Orbital Shaker inkubiert. | | | | | |
| 3. Waschung | Alle Wells wurden fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. | | | | | |
| 4. Hinzufügen von Reagenzien | Tracer | - | 5 µl | - | - | - |
| | Ellman's | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |
| 5. Inkubation | Die Wells wurden mit einem Plastikfilm verschlossen und 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz auf dem Orbital Shaker inkubiert. | | | | | |
| 6. Auslesen | Die Platte wurde bei einer Wellenlänge von 405-420 nm ausgelesen. | | | | | |

2.4 Auswertung

Die Hemmung der COX I bzw. COX II durch die entsprechenden Konzentrationen der NSAID wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{\bar{x}(\text{Probe})}{\bar{x}(\text{Kontrolle})} * 100 \right)$$

\bar{x} = Mittelwert

Die pharmakokinetische Berechnung der IC₅₀ wurde mit dem Programm WinNonlin® Professional Edition Version 5.3 (Pharsight, Mountain View, USA) durchgeführt.

IV ERGEBNISSE

1 Literaturanalyse

1.1 Flunixin-Meglumin

Flunixin-Meglumin wird weitgehend unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Es konnte kein aktiver Metabolit nachgewiesen werden, so dass die Analyse der Muttersubstanz im Urin und Plasma für den Nachweis einer Anwendung herangezogen wird (JAUSSAUD et al. 1987).

1.1.1 Ausgewertete Publikationen

Von den 29 ausgewählten Studien entsprach letztlich keine Untersuchung in vollem Umfang der in dieser Arbeit verwendeten „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Mithilfe von zehn Untersuchungen war es jedoch möglich, eine Aussage mit eingeschränkter Validität zur Ausscheidungszeit von Flunixin-Meglumin zu treffen. Die übrigen Studien ließen lediglich Aussagen ohne ausreichende Validität zu; eine Untersuchung ermöglichte gar keine Aussage (Tabelle 21). Die häufigsten Abstriche bei der Bewertung der Studienqualitäten mussten bei der Beschreibung der verwendeten Pferde sowie deren Haltungsumfeld und Gesundheitszustand erfolgen. 14 Untersuchungen berücksichtigten eine Pferdeanzahl von ≥ 6 .

IV ERGEBNISSE

Tabelle 21: Punktbewertung der Publikationen zu Flunixin-Meglumin

| Studie | Pferde | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|---------------------------------|--------|---------|----------|------------|--------|-----|
| SEMRAD et al. (1985) | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | C |
| SAMS et al. (1999) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| CHAY et al. (1982) | 1 | 2 | 1 | 2 | 6 | C |
| COLAHAN et al. (2002) | 2 | 3 | 2 | 2 | 9 | B |
| SOMA et al. (1988) | 1 | 2 | 2 | 2 | 7 | B |
| JENSEN et al. (1990) | 2 | 1 | 2 | 2 | 7 | B |
| SOMA et al. (1992) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| HOUDESHHELL (1977) | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | D |
| CPMA (1997) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | C |
| CPMA (1997) | 1 | 1 | 2 | 2 | 6 | C |
| CPMA (1997) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | C |
| CPMA (1997) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | C |
| PELLEGRINI-MASINI et al. (2004) | 1 | 2 | 3 | 3 | 9 | B |
| ZERTUCHE et al. (1992) | 2 | 1 | 0 | 2 | 5 | C |
| COAKLEY et al. (1999) | 1 | 1 | 3 | 1 | 6 | C |
| SEMRAD et al. (1993) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| LANDONI u. LEES (1995b) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| LEES et al. (1987a) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| HIGGINS et al. (1986) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | C |
| STEVENSON et al. (1990) | 1 | 2 | 1 | 1 | 5 | C |
| TOUTAIN et al. (1994) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| RUDY (1988) | 1 | 2 | 1 | 1 | 5 | C |
| DYKE et al. (1997) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| MOHAMMED (1991) | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | C |
| WELSH et al. (1992) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| ARAUJO et al. (1990) | 0 | 1 | 2 | 2 | 5 | C |
| SEMRAD et al. (1987) | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 | C |
| POPOT et al. (2011) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| FOREMAN et al. (2012) | 2 | 2 | 1 | 1 | 6 | C |
| Gesamt | 37 | 45 | 41 | 53 | 176 | |
| Ø | 1,3 | 1,6 | 1,4 | 1,8 | 6,1 | |

IV ERGEBNISSE

Tabelle 22: Literaturlauswertung von Flunixin-Meglumin

| Punkte | Kategorie | Anzahl | Bewertung |
|--------|-----------|--------|---|
| 12-10 | A | 0 | Aussage mit hoher Validität zur t_A |
| 9-7 | B | 10 | Aussage mit eingeschränkter Validität zur t_A |
| 6-4 | C | 18 | Aussage ohne ausreichende Validität zur t_A |
| 3-1 | D | 1 | keine Aussage zur t_A |

1.1.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Flunixin-Meglumin ist derzeit in Deutschland für Pferde als Gel, Granulat und Paste zur oralen Anwendung sowie als Injektionslösung zur intravenösen Verabreichung zugelassen. Die Dosierung wird mit 1,1 mg/kg KGW einmal täglich angegeben. Die Behandlungsdauer sollte je nach Krankheitszustand fünf Tage nicht überschreiten (VETIDATA 2014). Die *Plasmaclearance* bei intravenöser Behandlung mit der empfohlenen Dosierung von 1,1 mg/kg KGW rangierte in den ausgewerteten Untersuchungen zwischen 45 bis 92 ml/kg/h bzw. 1080-2208 ml/kg/24h (SOMA et al. 1988; SEMRAD et al. 1993). Nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ergab sich eine EPC von 0,5-1 µg/ml. Die von TOUTAIN et al. (1994) ermittelte EC_{50} von $0,93 \pm 0,35$ µg/ml, die auf die Wirkung von Flunixin-Meglumin auf die Schrittlänge bei induzierter Karpalgelenksarthrititis beruhte, entsprach der errechneten EPC von 0,5-1 µg/ml. Die EC_{50} von $0,24 \pm 0,13$ µg/ml bezogen auf den Gliedmaßenbeugungswinkel in Ruhe (TOUTAIN et al. 1994) sowie die EC_{50} der COX I-Hemmung mit 0,035-0,08 µg/ml (SEMRAD et al. 1985; LANDONI u. LEES 1995b) lagen deutlich unter der errechneten EPC. Die größte Wirkungseffektivität besaß Flunixin-Meglumin bei der COX II-Hemmung im Exsudat. Hier betrug die EC_{50} 19 ng/ml (LANDONI u. LEES 1995b) (Tabelle 23). Aus diesem Grund sollte eine IPC weniger als 19 ng/ml betragen.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 23: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Flunixin-Meglumin aus *In-vivo*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| TXB ₂ Konzentration im Serum | SEMRAD et al. (1985) | 0,08 | 0,16 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , TXB ₂ Konzentration im Serum | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,035 ± 0,01 | 0,07 ± 0,02 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , PGE ₂ Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,019 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , β-Glucuronidase Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,62 ± 0,157 | 1,26 ± 0,32 |
| Intradermale Bradykinin-induzierte Schwellung | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,117 ± 0,046 | 0,24 ± 0,09 |
| Schrittlänge bei induzierter Karpalgelenksarthritis | TOUTAIN et al. (1994) | 0,93 ± 0,35 | 1,89 ± 0,71 |
| Gliedmaßenbeugungswinkel bei induzierter Karpalgelenksarthritis | TOUTAIN et al. (1994) | 0,24 ± 0,13 | 0,49 ± 0,26 |

Vergleicht man die errechnete EPC von 0,5-1 µg/ml mit Ergebnissen aus *In-vitro*-Untersuchungen, waren alle ermittelten Konzentrationen deutlich niedriger.

Tabelle 24: Vergleichende Angaben zur IC₅₀ von Flunixin-Meglumin aus *In-vitro*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | IC ₅₀ [µg/ml] | IC ₅₀ [µmol/l] |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| COX-I Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,03 | 0,07 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 0,03 | 0,06 |
| | BUNTENKÖTTER (2012) | 0,05 | 0,1 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 0,03 | 0,06 |
| COX-II Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,01 | 0,02 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 0,09 | 0,18 |
| | BUNTENKÖTTER (2012) | 0,05 | 0,1 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 0,1 | 0,21 |

IV ERGEBNISSE

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) empfohlenen Sicherheitsfaktors von 500 betrug die IPC 1-2 ng/ml. Untersuchungen der CPMA (1997) und JENSEN et al. (1990) ließen vermuten, dass das Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnis von Flunixin-Meglumin ungefähr mit 100 berücksichtigt werden könnte. In Untersuchungen divergierten die Konzentrationsverhältnisse mitunter stark und unterlagen großen Schwankungen (CHAY et al. 1982; ARAUJO et al. 1990; STEVENSON et al. 1990; COLAHAN et al. 2002). Es errechnete sich eine IUC von 100-200 ng/ml.

1.1.3 Ausscheidungszeit

Vier Untersuchungen erlaubten anhand der publizierten Daten die Ableitung einer PK-Modellfunktion. Die mithilfe dieser Funktion errechnete t_A bis zum Erreichen der IPC von 1 ng/ml betrug 20-39 h.

IV ERGEBNISSE

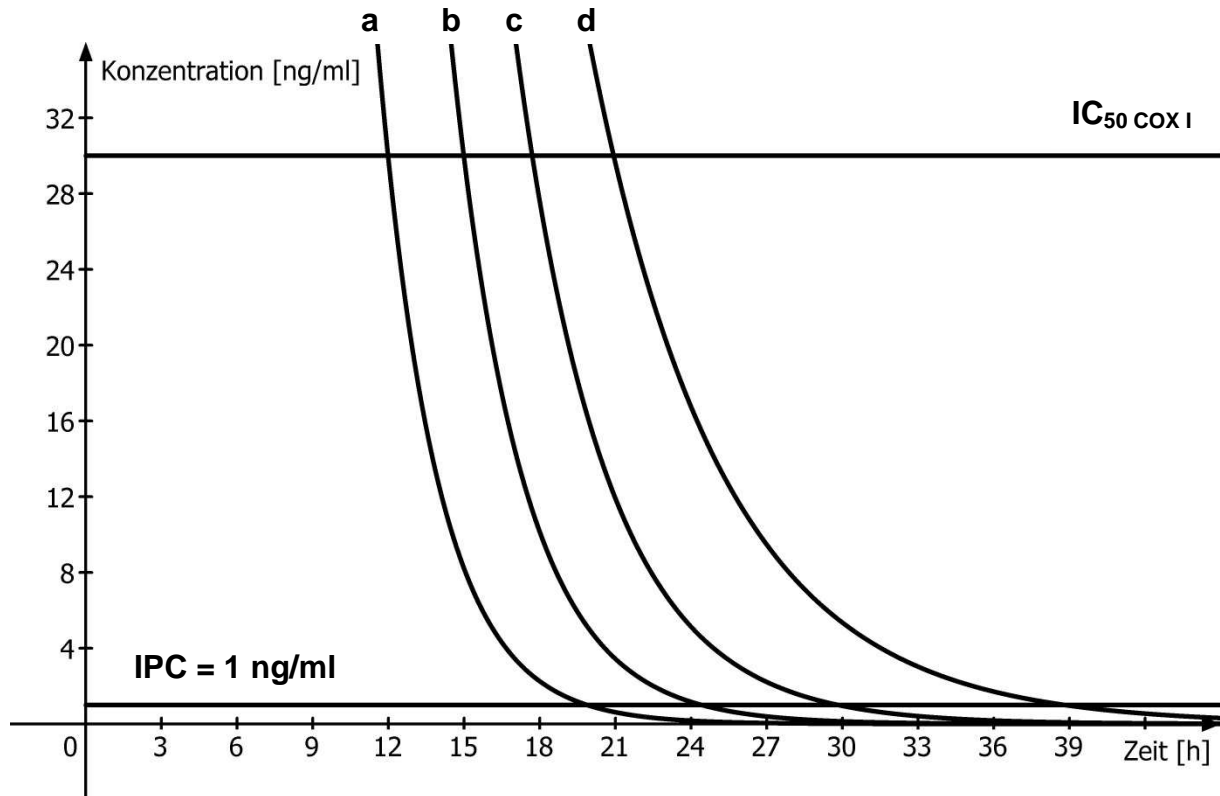


Abbildung 2: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von Flunixin-Meglumin nach intravenöser Anwendung [Zeit in h] von 1 bis 1,1 mg/kg

- a) CHAY et al. 1982 $c(t) = 5180e^{-0,43(t)}$
b) LEES et al. 1987 $c(t) = 6610e^{-0,36(t)}$
c) SEMRAD et al. 1985 $c(t) = 4260e^{-0,28(t)}$
d) SEMRAD et al 1993 $c(t) = 1600e^{-0,19(t)}$

Die nach KIETZMANN (1983) berechnete Zeit bis zum Erreichen der IPC von 1 ng/ml betrug 21-69 h nach intravenöser Injektion und 22-30 h nach oraler Applikation (Tabelle 25). Die Daten der Untersuchung von SOMA et al. (1988) ermöglichten eine Berechnung der Zeit bis zum Erreichen der IUC. Diese betrug nach intravenöser Behandlung 44 h und nach oraler Wirkstoffgabe 49 h.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 25: Ausscheidungszeitberechnung nach KIETZMANN (1983) für Flunixin-Meglumin

| Untersuchung | IPC [ng/ml] | IUC [ng/ml] | Matrix | Applikationsart | t _A [h]* | t _A [d]* |
|-----------------------------------|-------------|-------------|--------|-----------------|---------------------|---------------------|
| CHAY et al. (1982) | 1 | | Blut | intravenös | 23 | 1 |
| CHAY et al. (1982) | 1 | | Blut | oral | 31 | 2 |
| DYKE et al. (1997) | 1 | | Blut | intramuskulär | 45 | 2 |
| HOUESHELL (1977) | 1 | | Blut | intravenös | 21 | 1 |
| JENSEN et al. (1990) ¹ | 1 | | Blut | intravenös | 27 | 2 |
| JENSEN et al. (1990) ² | 1 | | Blut | intravenös | 31 | 2 |
| JENSEN et al. (1990) ³ | 1 | | Blut | intravenös | 70 | 3 |
| LEES et al. (1987a) | 1 | | Blut | intravenös | 26 | 2 |
| PELLEGRINI-MASINI et al. (2004) | 1 | | Blut | oral | 28 | 2 |
| SOMA et al. (1988) | | 100 | Urin | intravenös | 45 | 2 |
| SOMA et al. (1988) | | 100 | Urin | oral | 49 | 3 |
| SOMA et al. (1988) | 1 | | Blut | oral | 22 | 1 |

* aufgerundet auf ganze Stunden bzw. Tage, ¹ < 5 Jahre alt mit Training, ² < 5 Jahre alt ohne Training, ³ > 9 Jahre alt ohne Training

1.1.4 Ausscheidungsversuche

Von den 29 Studien, die einen Konzentrationsverlauf im Blut untersucht haben, gab es keine Untersuchung, die bis zu der nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ermittelten IPC von 1-2 ng/ml analysierte. Nur drei der bewerteten Untersuchungen berücksichtigten Konzentrationen im Blut bis 10 ng/ml. Bezogen auf die Plasmakonzentration kann somit nur eine Aussage über die Nachweiszeit von Flunixin-Meglumin mithilfe von Extrapolation auf Grundlage der vorhandenen Untersuchungen vorgenommen werden (siehe IV 1.1.3.).

In 16 Studien wurde die Flunixin-Meglumin-Konzentration im Urin analysiert. In sieben dieser Untersuchungen entsprach das LOD der IPC von ≤ 100 ng/ml.

IV ERGEBNISSE

Im Rahmen von drei Studien wurde solange untersucht, bis die Proben eine Wirkstoffkonzentration von ≤ 100 ng/ml aufwiesen. Insbesondere bezogen auf die Nachweiszeit mussten jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse zur Kenntnis genommen werden. Von CHAY et al. (1982) konnte Flunixin-Meglumin bei allen vier untersuchten Pferden 48 h nach einer einmaligen intravenösen oder oralen Applikation von 1 mg/kg Flunixin-Meglumin im Urin nicht mehr nachgewiesen werden. Aus der grafischen Darstellung der Flunixin-Meglumin Konzentration im Urin konnte abgeleitet werden, dass die Nachweisgrenze bei unter 100 ng/ml gelegen haben müsste. Von POPOT et al. (2011) wurden die Urinkonzentrationsverläufe von drei Pferden nach oraler Wirkstoffapplikation und von sechs Pferden nach intravenöser Behandlung grafisch dargestellt. Den Grafiken konnte entnommen werden, dass nach einer einmaligen intravenösen Applikation von 1 mg/kg die Urinkonzentration ab dem sechsten Tag bei allen Pferden weniger als 100 ng/ml betrug. Nach der oralen Applikation wurde die IUC von ≤ 100 ng/ml aufgrund von möglicher Rekontamination erst am zehnten Tag unterschritten. SAMS et al. (1999) untersuchten die Flunixin-Meglumin Urinkonzentrationen von je vier Pferden nach einer einmal täglichen intramuskulären oder intravenösen Behandlung mit 1,1 mg/kg KGW an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit je vier verschiedenen Analyseverfahren. Die ermittelten Flunixin-Meglumin Konzentrationen mittels ELISA waren größer als die erfassten Konzentrationen mittels HPLC. 15 Tage nach der letzten intravenösen Behandlung wurden mithilfe von beiden Analyseverfahren bei je zwei Pferden noch Urinkonzentrationen über 100 ng/ml nachgewiesen. Nach der letzten intramuskulären Behandlung wurde am 15. Tag bei einem Pferd mittels ELISA eine Konzentration von 105 ng/ml bestätigt.

IV ERGEBNISSE

1.1.5 Nachweiszeit für Flunixin-Meglumin

Die Festlegung einer validen Nachweis- und Karenzzeit erscheint allein hinsichtlich der veröffentlichten Untersuchungen nicht möglich. Keine der 29 ausgewerteten Untersuchungen erfüllte vollständig die „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Die vergleichende Betrachtung der Berechnungen mit den experimentell ermittelten Nachweiszeiten ließen vermuten, dass die tatsächliche Halbwertszeit von Flunixin-Meglumin höher kalkuliert werden müsste, als sie in pharmakokinetischen Untersuchungen bei Messungen über einen relativ kurzen Zeitraum bisher angegeben wurde. Es könnte davon ausgegangen werden, dass es eine Ausscheidungsphase gibt, die aufgrund eines zu hohen LOQ in bisherigen Untersuchungen im Plasmakonzentrationsverlauf nicht akkurat erfasst wurde.

1.2 Firocoxib

Die unveränderte Ausgangssubstanz stellte die Hauptverbindung in den Ausscheidungsprodukten und Geweben nach der Anwendung von Firocoxib dar (EMA 2010).

1.2.1 Ausgewertete Publikationen

Von den fünf ausgewählten Studien entsprach eine Untersuchung in vollem Umfang der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Die übrigen vier Untersuchungen ermöglichten eine Aussage mit eingeschränkter Validität zur Ausscheidungszeit von Firocoxib. In allen Untersuchungen wurden mindestens sechs Pferde berücksichtigt.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 26: Punktbewertung der Publikationen zu Firocoxib

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|--------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| LETENDRE et al. (2008) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| KVATERNICK et al. (2007) | 2 | 2 | 2 | 1 | 7 | B |
| KNYCH et al. (2014) | 2 | 2 | 3 | 3 | 10 | A |
| COX et al. (2012) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| COX et al. (2013) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| Gesamt | 10 | 10 | 11 | 12 | 43 | |

1.2.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Firocoxib ist derzeit in Deutschland für Pferde als oral zu verabreichende Paste sowie als Injektionslösung zur intravenösen Anwendung zugelassen. Die therapeutische Dosierung wird bei oraler Anwendung mit 0,1 mg/kg KGW und bei intravenöser Verabreichung mit 0,09 mg/kg KGW einmal täglich über maximal 14 Tagen angegeben (VETIDATA 2014). Die *Plasmaclearance* betrug bei 14-tägiger oraler Behandlung mit der empfohlenen Dosierung von 0,1 mg/kg KGW 29 ml/kg/h bzw. 689 ml /kg/24h (EMA 2010). In Untersuchungen mit abweichender Dosierung und Applikationsart wurden Werte zwischen 37 und 44 ml/kg/h ermittelt. Daraus errechnete sich eine EPC von 0,09-0,15 µg/ml. Während die *In-vitro* ermittelte IC₅₀ für die COX-I mit 7 bis 11 µg/ml deutlich über der ermittelten EPC lag, rangierte die IC₅₀ für die COX-II mit 0,01-0,04 µg/ml deutlich darunter.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 27: Vergleichende Angaben zur IC₅₀ von Firocoxib aus *In-vitro*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | IC ₅₀ [µg/ml] | IC ₅₀ [µmol/l] |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| COX-I Inhibition | MCCANN et al. (2002) | 8,18 | 23,90* |
| | EMA (2010) | 8,12 | 23,7 |
| | EMA (2014) | 6,9 – 11,33 | 20,14 - 33,1 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 9,44 | 27,58 |
| COX-II Inhibition | MCCANN et al. (2002) | 0,03 | 0,09* |
| | EMA (2010) | 0,01 | 0,04 |
| | EMA (2014) | 0,01 - 0,04 | 0,04 - 0,12 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 0,03 | 0,1 |

*McCann gibt die IC₅₀ in mol/l an. Ausgehend von anderen Daten ist davon auszugehen, dass µM, also µmol/l gemeint ist

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) empfohlenen Sicherheitsfaktors von 500 betrug die IPC 0,18-0,3 ng/ml.

LETENDRE et al. (2008) schlussfolgerten, dass Firocoxib vorrangig hepatisch eliminiert wird, da die renale *Clearance* verglichen mit der *Gesamtkörperclearance* gering war. Die Urinkonzentration von Firocoxib lag zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Plasmakonzentration und das Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnis betrug nahezu konstant etwa 0,35. Entsprechend errechnete sich eine IUC von 0,51-0,86 ng/ml.

1.2.3 Ausscheidungszeit

Mithilfe der Untersuchungsergebnisse von KVATERNICK et al. (2007) konnte unter der Annahme, dass bei intravenöser Wirkstoffanwendung die fiktive C_{max} von 210 ng/ml im Plasma zum Zeitpunkt Null vorlag, eine PK-Modellfunktion abgeleitet

IV ERGEBNISSE

werden. Die mithilfe dieser Funktion errechnete t_A bis zum Erreichen der IPC von 0,18 ng/ml betrug 336 h bzw. 14 Tage.

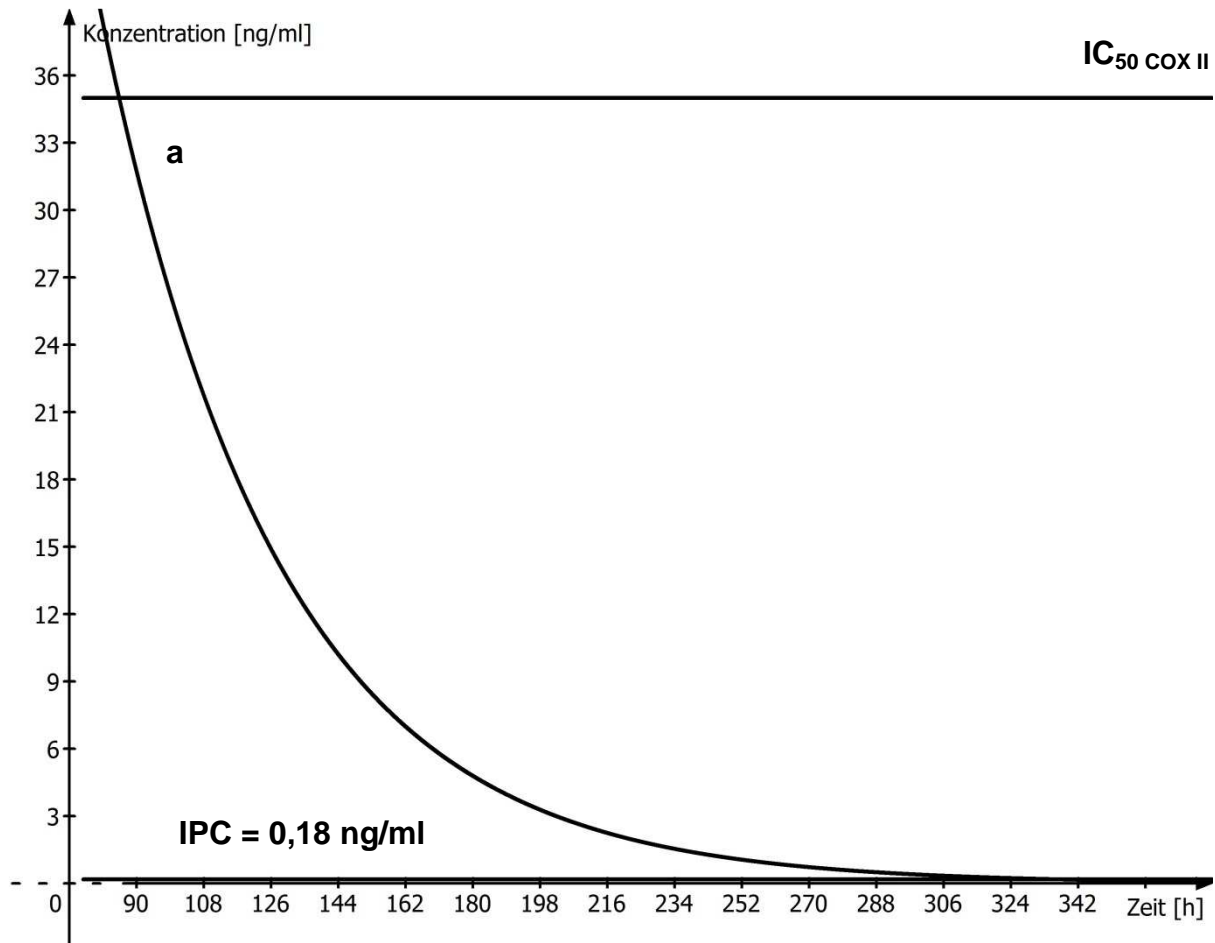


Abbildung 3: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von Firocoxib nach der Anwendung [Zeit in h] von 0,1 mg/kg

a) KVATERNICK et al. (2007) $c(t) = 210e^{-0,021(t)}$

Unter Verwendung der Daten von LETENDRE et al. (2008), KVATERNICK et al. (2007) und COX et al. (2012) errechnete sich nach KIETZMANN (1983) eine Ausscheidungszeit von 12 bis 13 Tagen bis zum Erreichen der IPC von 0,18 ng/ml. Vier Tage nach der zwölften oralen Anwendung von Firocoxib in der empfohlenen Dosierung von 0,1 mg/kg/24h wurde eine ungefähre Urinkonzentration von 10 ng/ml

IV ERGEBNISSE

ermittelt (LETENDRE et al. 2008). Unter Berücksichtigung der angegebenen Urinhalbwertszeit von 35,3 h ergab sich eine Ausscheidungszeit von elf Tagen bis zum Erreichen der IUC von 0,51 ng/ml.

Tabelle 28: Ausscheidungszeitberechnung nach KIETZMANN (1983) für Firocoxib

| Untersuchung | IPC [ng/ml] | Matrix | Applikationsart | t _A [h]* | t _A [d]* |
|--------------------------|-------------|--------|-----------------|---------------------|---------------------|
| LETENDRE et al. (2008) | 0,18 | Blut | oral | 298 | 13 |
| LETENDRE et al. (2008) | 0,51 | Urin | oral | 245 | 11 |
| KNYCH et al. (2014) | 0,18 | Blut | oral | 447 | 19 |
| KNYCH et al. (2014) | 0,18 | Blut | Intravenös | 436 | 19 |
| KVATERNICK et al. (2007) | 0,18 | Blut | oral | 266 | 12 |
| COX et al. (2012) | 0,18 | Blut | oral | 284 | 12 |

* aufgerundet auf ganze Stunden und Tage

1.2.4 Ausscheidungsversuche

Von den fünf ausgewählten Studien, die einen Konzentrationsverlauf im Blut untersuchten, gab es zwei Untersuchungen, die eine Analyseempfindlichkeit nachwiesen, die der nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ermittelten IPC von 0,18-0,3 ng/ml entsprach. LETENDRE et al. (2008) untersuchten den Plasmakonzentrationsverlauf jedoch nur bis zum vierten Tag nach der letzten oralen Anwendung von 0,1 mg/kg Firocoxib. Zu diesem Zeitpunkt lag die Plasmakonzentration mit mehr als 10ng/ml noch deutlich über dem LOD von 0,25 ng/ml. Die Untersuchung von KNYCH et al. (2014) entsprach in vollem Umfang der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Die Firocoxib-Konzentration fiel 21 Tage (0,09 mg/kg intravenös über 5 d), 29 Tage (0,1 mg/kg Paste oral über 14 d) und 30 Tage (57 mg Tablette oral über 14 d) nach der letzten

IV ERGEBNISSE

Anwendung unter das LOD von 0,05 ng/ml. Die Nachweiszeit der neun untersuchten Pferde war durch eine deutliche Streuung gekennzeichnet (i.v. 17-25 d, Paste oral 22-41 d, Tablette oral 22-40 d). In einer Studie wurde der Urinkonzentrationsverlauf von Firocoxib untersucht. Das LOD betrug dabei 1 ng/ml (LETENDRE et al. 2008) und lag damit über der berechneten IUC von 0,51-0,86 ng/ml. Eine Aussage zur Nachweiszeit von Firocoxib im Urin konnte somit nur über die Berechnung der Ausscheidungszeit nach KIETZMANN (1983) erfolgen (siehe IV 1.2.3.).

1.2.5 Nachweiszeit für Firocoxib

Die Festlegung einer validen Nachweis- und Karenzzeit konnte aus den veröffentlichten Untersuchungen erfolgen. KNYCH et al. (2014) erfüllte in vollem Umfang die „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Nach LETENDRE et al. (2008) konnte geschlussfolgert werden, dass dem Plasmakonzentrationsverlauf von Firocoxib eine bedeutendere Rolle bei der Festlegung einer validen Nachweiszeit zukommen sollte, da die Plasmakonzentration zu jedem Zeitpunkt höher war als die Urinkonzentration. Unter Berücksichtigung einer IPC von 0,18 ng/ml sollte bei einer mehrtägigen Anwendung von Firocoxib in der empfohlenen Dosierung von einer Nachweiszeit von 19 Tagen ausgegangen werden. Da es bei einer multiplen Anwendung zur Akkumulation des Wirkstoffes kommt (Akkumulationsindex 4,1) (KNYCH et al. 2014) und ein Steady-State erst nach der achten Dosis erreicht wird (EMA 2010), kann vermutet werden, dass bei einer einmaligen Anwendung von einer kürzeren Nachweiszeit ausgegangen werden könnte.

IV ERGEBNISSE

1.3 Phenylbutazon und Suxibuzon

Phenylbutazon wird in der Leber zu pharmakologisch aktivem Oxyphenbutazon transformiert. Die Metaboliten γ -Hydroxyphenylbutazon und γ -Hydroxyoxyphenbutazon sind pharmakologisch inaktiv (GERRING et al. 1981).

Weniger als zwei Prozent der Wirkstoffmenge werden unverändert als Phenylbutazon mit dem Urin ausgeschieden, etwa 17 % als Oxyphenbutazon, ungefähr 19 % als γ -Hydroxyphenylbutazon und weniger als 4 % als γ -Hydroxyoxyphenbutazon (LEES et al. 1987b).

Suxibuzon ist eine *Prodrug* (*Precursor-Substanz*) von Phenylbutazon. Es erfolgt eine sehr schnelle Transformation in die aktiven Metaboliten Phenylbutazon und Oxyphenbutazon (JARAIZ et al. 1999a; JARAIZ et al. 1999b), sodass nach der intravenösen oder oralen Anwendung von 6 mg/kg der Ausgangswirkstoff im Plasma oder Urin nicht nachgewiesen werden konnte (DELBEKE et al. 1993).

1.3.1 Ausgewertete Publikationen

Von den 49 ausgewerteten Studien entsprachen letztlich zwei Untersuchungen in vollem Umfang der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Mithilfe von 18 Untersuchungen war es möglich eine Aussage mit eingeschränkter Validität zur Ausscheidungszeit von Phenylbutazon zu treffen. Die übrigen Studien ließen lediglich Aussagen ohne ausreichende Validität zu. Neun Untersuchungen ermöglichten gar keine Aussage. Die größten Abstriche bei der Bewertung der Studienqualität mussten bei der Analytik erfolgen.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 29: Punktbewertung der Publikationen zu Phenylbutazon

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|-------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| AUTHIE et al. (2010) | 3 | 3 | 3 | 2 | 11 | A |
| BOGAN et al. (1984) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| BRUCE et al. (1974) | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | C |
| CHAY et al. (1984) | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 | C |
| FOREMAN et al. (2008) | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | C |
| PIPERNO et al. (1968) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| DELBEKE et al. (1993) | 1 | 2 | 2 | 2 | 7 | B |
| GERKEN u. SAMS (1988) | 2 | 1 | 1 | 2 | 6 | C |
| GERRING et al. (1981) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| FINOCCHIO et al. (1970) | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 | D |
| HIGGINS et al. (1984) | 2 | 1 | 2 | 2 | 7 | B |
| ORSZAG (2008) | 3 | 3 | 3 | 3 | 12 | A |
| JARAIZ et al. (1999a) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| JENNY et al. (1979) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| LANDUYT et al. (1993) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| LEES et al. (1986b) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| LEES et al. (1985b) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| LEES u. HIGGINS (1986a) | 2 | 1 | 1 | 2 | 6 | C |
| LEES et al. (1986c) | 2 | 2 | 1 | 1 | 6 | C |
| LEES et al. (1987b) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| SMITH et al. (1987) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| LEHMANN et al. (1981) | 1 | 2 | 0 | 1 | 4 | C |
| MAITHO et al. (1986) | 2 | 2 | 1 | 3 | 8 | B |
| MAYLIN (1974) | 1 | 2 | 0 | 2 | 5 | C |
| KL MEALEY et al. (1997) | 1 | 1 | 1 | 3 | 6 | C |
| MILLS et al. (1996) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| ROSE et al. (1982) | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | D |
| SAMS et al. (1997) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| JAUSSAUD et al. (1985) | 1 | 2 | 0 | 1 | 4 | C |
| SOMA et al. (1983) | 1 | 2 | 1 | 2 | 6 | C |
| TOBIN et al. (1977) | 1 | 2 | 0 | 1 | 4 | C |

IV ERGEBNISSE

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|---------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| WHITTEM et al. (1996) | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | C |
| JARAIZ et al. (1999b) | 3 | 2 | 2 | 2 | 9 | B |
| NORHEIM et al. (1978) | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | D |
| SNOW u. DOUGLAS (1983) | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | D |
| ZERTUCHE et al. (1992) | 2 | 1 | 0 | 2 | 5 | C |
| TOUTAIN et al. (1994) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| SEMRAD et al. (1993) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| MOHAMMED (1991) | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | C |
| LEES et al. (1987a) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| SULLIVAN u. SNOW (1982) | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | C |
| GERKEN u. SAMS (1985) | 3 | 2 | 2 | 2 | 9 | B |
| CHRISTENSEN et al. (1985) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| NOBLE et al. (2012) | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | C |
| CPMA (1997) | 1 | 2 | 2 | 2 | 7 | B |
| CPMA (1997) | 1 | 2 | 2 | 2 | 7 | B |
| CPMA (1997) | 1 | 1 | 2 | 2 | 6 | C |
| CPMA (1997) | 1 | 2 | 3 | 2 | 8 | B |
| CPMA (1997) | 1 | 2 | 3 | 2 | 8 | B |
| Gesamt | 57 | 58 | 46 | 67 | 228 | |
| Ø | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 1,4 | 4,6 | |

Tabelle 30: Literaturlauswertung von Phenylbutazon

| Punkte | Kategorie | Anzahl | Bewertung |
|--------|-----------|--------|---|
| 12-10 | A | 2 | Aussage mit hoher Validität zur t_A |
| 9-7 | B | 18 | Aussage mit eingeschränkter Validität zur t_A |
| 6-4 | C | 20 | Aussage ohne ausreichende Validität zur t_A |
| 3-1 | D | 9 | keine Aussage zur t_A |

IV ERGEBNISSE

1.3.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Phenylbutazon ist derzeit in Deutschland für Pferde als Gel, (mikroverkapseltes) Pulver und Suspension zur oralen Verabreichung sowie als intravenös zu verabreichende Injektionslösung zugelassen. Es werden verschiedene Dosierungsschemata angegeben (Tabelle 2).

Die höchste empfohlene Dosierung beträgt 9 mg/kg/24h KGW und sollte nicht länger als drei aufeinanderfolgende Tage angewendet werden. (VETIDATA 2014).

Suxibuzon, eine *Precursor*-Substanz von Phenylbutazon, ist als Granulat zur oralen Anwendung derzeit in Deutschland zugelassen. Es wird folgendes Dosierungsschema angegeben: 1.-2. Tag 12,5 mg/kg/24h, 3.-5. Tag 6,25 mg/kg/24h und ab dem 5. Tag 3,1 mg/kg/24h oder 48h. Gesetzt den Fall, dass Suxibuzon vollständig in Phenylbutazon transformiert wird, ist die orale Verabreichung von 6 mg/kg Suxibuzon äquivalent zu 4,2 mg/kg Phenylbutazon. Die Phenylbutazon-Plasmakonzentration und AUC waren nach der oralen Verabreichung von 4,4 mg/kg Phenylbutazon (GERRING et al. 1981) jedoch geringer, als nach der oralen Anwendung von 6 mg/kg Suxibuzon. DELBEKE et al. (1993) vermuteten eine höhere Bioverfügbarkeit von Suxibuzon.

Die *Plasmaclearance* von Phenylbutazon rangierte zwischen 7,99 ml/kg/h (AUTHIE et al. 2010) beim Pferd im Training bis 43,85 ml/kg/h (MILLS et al. 1996) beim kranken Pferd. Nach AUTHIE et al. (2010) wurde die *Plasmaclearance* von Phenylbutazon durch drei Stunden Training um 37 % reduziert, wohingegen die *Plasmaclearance* bei Pferden mit induzierter Weichteilentzündung sowie bei jüngeren Pferden (drei Jahre) vergleichsweise größer war (LEES et al. 1985b; MILLS et al. 1996).

IV ERGEBNISSE

Oxyphenbutazon wies mit 67-133 ml/kg/h eine deutlich höhere *Plasmaclearance* auf als Phenylbutazon (LEHMANN et al. 1981; GERKEN u. SAMS 1988).

Mithilfe der pharmakokinetischen Werte für Phenylbutazon beim kranken Pferd (MILLS et al. 1996) errechnete sich eine EPC von 4-9 µg/ml.

Die *in vivo* ermittelten EC₅₀ lagen unterhalb und die *in vitro* ermittelten EC₅₀ entsprachen der hier errechneten EPC (Tabelle 31 und 33).

Tabelle 31: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Phenylbutazon aus *In-vivo*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Schrittlänge bei induzierter Karpalgelenksarthritis | TOUTAIN et al. (1994) | 3,6 ± 2,2 | 11,7 ± 7,1 |
| Gliedmaßenbeugungswinkel bei induzierter Karpalgelenksarthritis | TOUTAIN et al. (1994) | 1,5 ± 1,2 | 4,9 ± 3,9 |
| <i>Tissue-Cage</i> -Modell, TXB ₂ Konzentration im Exsudat | CHENG et al. (1996) | 1,06* | 3,44 |
| <i>Tissue-Cage</i> -Modell, PGE ₂ Konzentration im Exsudat | CHENG et al. (1996) | 0,32* | 1,04 |

* beim Esel

Tabelle 32: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Oxyphenbutazon beim Esel aus *In-vivo*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Tissue-Cage</i> -Modell, TXB ₂ Konzentration im Exsudat | CHENG et al. (1996) | 1,86 | 5,73 |
| <i>Tissue-Cage</i> -Modell, PGE ₂ Konzentration im Exsudat | CHENG et al. (1996) | 0,33 | 1,02 |

IV ERGEBNISSE

Tabelle 33: Vergleichende Angaben zur IC₅₀ von Phenylbutazon aus *In-vitro*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | IC ₅₀ [µg/ml] | IC ₅₀ [µmol/l] |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| COX-I Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,34 | 1,12 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 1,9 | 6,15 |
| | BUNTENKÖTTER (2012) | 0,31 | 1 |
| | MCCANN et al. (2002) | 1,91 | 6,2* |
| COX-II Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 1,14 | 3,71 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 1,17 | 3,79 |
| | BUNTENKÖTTER (2012) | 3,7 | 12 |
| | MCCANN et al. (2002) | 1,17 | 3,79* |

*McCann gibt die IC₅₀ in mol/l an. Ausgehend von anderen Daten ist davon auszugehen, dass µM, also µmol/l gemeint ist

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) empfohlenen Sicherheitsfaktors von 500 betrug die IPC 8-18 ng/ml.

Das Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnis von Phenylbutazon wurde mit ungefähr 0,2-3 (GERRING et al. 1981; LEES et al. 1987b) angegeben. Daraus errechnete sich eine IUC von 2-50 ng/ml.

Nach CHENG et al. (1996) verfügte der aktive Hauptmetabolit Oxyphenbutazon über ähnliche EC₅₀ wie Phenylbutazon selbst (Tabelle 32).

Der aktive Hauptmetabolit Oxyphenbutazon konnte bei der Kalkulation der EPC jedoch vernachlässigt werden, weil davon ausgegangen wurde, dass die Phenylbutazon-Plasmakonzentration alleine für den zu erwartenden Effekt verantwortlich ist und nicht die aktuelle Phenylbutazon-Konzentration an den entsprechenden Rezeptoren. Phenylbutazon selbst stellt den „*Marker Analyten*“ für die Wirkung und die EPC dar (TOUTAIN u. LASSOURD 2002).

IV ERGEBNISSE

1.3.3 Ausscheidungszeit

Die mithilfe von PK-Funktionen errechnete t_A bis zum Erreichen der IPC von 8 ng/ml betrug ungefähr 45-72 h.

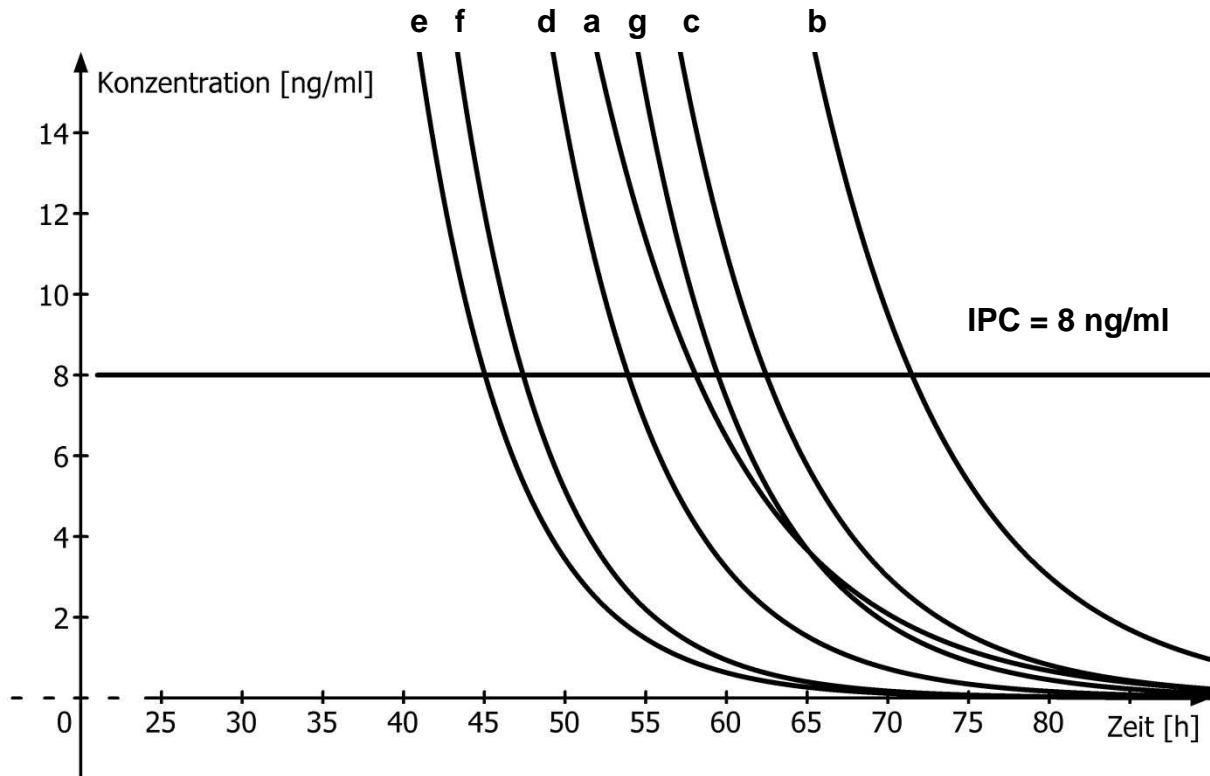


Abbildung 4: terminaler Plasmakonzentrationsverläufe [ng/ml] von Phenylbutazon nach der Anwendung [Zeit in h] von 2,2 bis 8,8 mg/kg

| | |
|---|-----------------------------|
| a) SEMRAD et al. (1993) (2,2mg/kg) | $c(t) = 5680e^{-0,113(t)}$ |
| b) LEES et al. (1987a) (4,4 mg/kg) | $c(t) = 29760e^{-0,115(t)}$ |
| c) LEES et al. (1987b) (4,4 mg/kg) | $c(t) = 26900e^{-0,13(t)}$ |
| d) MAITHO et al. (1986) (4,4mg/kg) | $c(t) = 24600e^{-0,149(t)}$ |
| e) MILLS et al. (1996) (4,4 mg/kg krank) | $c(t) = 16920e^{-0,17(t)}$ |
| f) MILLS et al. (1996) (4,4 mg/kg gesund) | $c(t) = 25300e^{-0,17(t)}$ |
| g) MILLS et al. (1996) (8,8 mg/kg gesund) | $c(t) = 33000e^{-0,14(t)}$ |

Die nach KIETZMANN (1983) berechnete Zeit bis zum Erreichen der IPC von 8 ng/ml betrug 3-7 Tage nach intravenöser Injektion, 2-5 Tage nach oraler Anwendung und 4 Tage nach intramuskulärer Verabreichung.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 34: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung (IPC = 8 ng/ml) nach KIETZMANN (1983) für Phenylbutazon

| Untersuchung | Applikationsart | t _A [h]* | t _A [d]* |
|---------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| AUTHIE et al. (2010) | intravenös | 102 | 5 |
| BRUCE et al. (1974) | oral | 42 | 2 |
| JENNY et al. (1979) | intravenös | 91 | 4 |
| LANDUYT et al. (1993) | intravenös | 162 | 7 |
| LANDUYT et al. (1993) | intramuskulär | 95 | 4 |
| LEES et al. (1985b) | intravenös | 50-72 | 3 |
| LEES et al. (1986c) | intravenös | 55 | 3 |
| SMITH et al. (1987) | intravenös | 129 | 6 |
| SMITH et al. (1987) | oral | 118 | 5 |
| MAITHO et al. (1986) | intravenös | 58-78 | 3-4 |
| MAITHO et al. (1986) | oral | 59-96 | 3-4 |
| MAYLIN (1974) | intravenös | 74 | 4 |
| TOBIN et al. (1977) | intravenös | 99 | 5 |
| GERKEN u. SAMS (1985) | intravenös | 48 | 2 |
| CHRISTENSEN et al. (1985) | oral | 87 | 7 |

* aufgerundet auf ganze Stunden bzw. Tage

1.3.4 Ausscheidungsversuche

Von den 46 Studien, die einen Konzentrationsverlauf im Blut untersucht haben, verwendeten zehn Studien eine Analytik, die mit einem LOD von 1-10 ng/ml die Berücksichtigung des nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ermittelten IPC von 8-18 ng/ml ermöglichte. In 17 Studien wurde die Phenylbutazon Konzentration im Urin analysiert, wobei in sechs Untersuchungen das LOD der IPC von ≤ 50 ng/ml entsprach.

Die Untersuchungen von AUTHIE et al. (2010) und ORSZAG (2008) entsprachen der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“ und verfügen damit über die größte Aussagekraft.

IV ERGEBNISSE

Nach AUTHIE et al. (2010) betrug die Plasmakonzentration 48 h nach der intravenösen Anwendung etwa 1 µg/ml. Unter Berücksichtigung der angegebenen Halbwertszeit von 7,4 h errechnete sich eine ungefähre Ausscheidungszeit von fünf Tagen (Tabelle 34) bis zum Erreichen der IPC von 8 ng/ml.

Sieben Tage (derzeit empfohlene Nachweiszeit vom EHSLC und FEI) nach der intravenösen Anwendung von 8 mg/kg betrug die durchschnittlich Urinkonzentration von Phenylbutazon 40 ng/ml und 24 Tage nach der Behandlung konnten bei zwei von acht Pferden noch mehr als 1 ng/ml im Urin nachgewiesen werden.

Nach ORSZAG (2008) wurden 11 Tage und 16 Tage nach der intravenösen Injektion von 8,8 mg/kg im Plasma vs. Urin bei keinem der sechs Sportpferde Konzentrationen ≥ 10 ng/ml gemessen. Nach der oralen Anwendung von zweimal täglich 4,4 mg/kg am 1. Tag und zweimal täglich 2,2 mg/kg am 2.-11. Tag konnten am 7. und 15. Tag nach der letzten Applikation im Plasma vs. Urin bei keinem Pferd mehr Konzentrationen von ≥ 10 ng/ml nachgewiesen werden.

ORSZAG (2008) kam zu dem Ergebnis, dass ein LOD zwischen 50 und 100 ng/ml die Nachweiszeit von Phenylbutazon nicht signifikant beeinflusste, insbesondere nicht im Urin. Wohingegen ein LOD kleiner 25 ng/ml die Nachweiszeit signifikant verlängerte.

1.3.5 Nachweiszeit für Phenylbutazon

Es konnte geschlussfolgert werden, dass die Nachweiszeit für Phenylbutazon mit mindestens 16 Tagen angegeben werden sollte.

IV ERGEBNISSE

1.4 Meloxicam

Nach TEVELL ÅBERG et al. (2009) konnten neben den zwei inaktiven Hauptmetaboliten 5'-Hydroxymethylmeloxicam und 5'-Carboxymeloxicam, zusätzlich ein weiteres Hydroxymeloxicam-Isomer sowie Dihydroxymeloxicam im Urin beim Pferd nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von TEVELL ÅBERG et al. (2009) und DUMASIA et al. (2002) unterschieden sich in zwei wesentlichen Punkten voneinander. Nach DUMASIA et al. (2002) war der Hauptmetabolit 5'-Carboxymeloxicam, statt 5'-Hydroxymethylmeloxicam. Zudem kamen DUMASIA et al. (2002) zu dem Ergebnis, dass Meloxicam hauptsächlich unverändert mit dem Urin ausgeschieden wurde, wohingegen nach TEVELL ÅBERG et al. (2009) die Urinkonzentration von 5'-Hydroxymethylmeloxicam deutlich über der Konzentration der Ursprungssubstanz sowie der anderen Metaboliten lag.

1.4.1 Ausgewertete Publikationen

Von den neun ausgewählten Studien entsprach letztlich lediglich eine Untersuchung den Anforderungen der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. In fünf Untersuchungen wurden mindestens sechs Pferde verwendet.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 35: Punktbewertung der Publikationen zu Meloxicam

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|----------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| DUMASIA et al. (2002) | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | C |
| LEES et al. (1991a) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| MAHMOOD u. ASHRAF (2010) | 1 | 2 | 2 | 3 | 8 | B |
| NOBLE et al. (2012) | 2 | 1 | 2 | 1 | 6 | C |
| SINCLAIR et al. (2006) | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | C |
| TEVELL ÅBERG et al. (2009) | 1 | 1 | 2 | 1 | 5 | C |
| TOUTAIN u. CESTER (2004a) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| TOUTAIN et al. (2004b) | 2 | 3 | 3 | 3 | 11 | A |
| VANDER WERF et al. (2013) | 3 | 1 | 2 | 2 | 8 | B |
| Gesamt | 15 | 14 | 18 | 17 | 64 | |
| Ø | 1,7 | 1,6 | 2 | 1,9 | 7,1 | |

Tabelle 36: Literaturlauswertung von Meloxicam

| Punkte | Kategorie | Anzahl | Bewertung |
|--------|-----------|--------|--|
| 12-10 | A | 1 | Aussage mit hoher Validität zur t _A |
| 9-7 | B | 4 | Aussage mit eingeschränkter Validität zur t _A |
| 6-4 | C | 4 | Aussage ohne ausreichende Validität zur t _A |
| 3-1 | D | 0 | keine Aussage zur t _A |

1.4.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Meloxicam ist derzeit in Deutschland für Pferde als oral zu verabreichende Suspension und Paste sowie als intravenöse Injektionslösung zugelassen. Die Dosierung wird mit 0,6 mg/kg KGW einmal täglich angegeben. Die Behandlungsdauer sollte je nach Krankheitszustand 14 Tage nicht überschreiten (VETIDATA 2014).

IV ERGEBNISSE

Die *Plasmaclearance* bei intravenöser Anwendung rangierte in den ausgewerteten Untersuchungen zwischen 23 bis 91 ml/kg/h bzw. 552 bis 2184 ml/kg/24h (TOUTAIN u. CESTER 2004a; MAHMOOD u. ASHRAF 2010). Nach TOUTAIN u. CESTER (2004a) hatte die Dosierung keinen signifikanten Effekt auf die *Plasmaclearance* von Meloxicam. Die *Plasmaclearance* bei Pferden mit lokaler akuter Entzündungsreaktion (induzierte Arthritis, *Carrageenan-Spong Model*) war mit 42-91 ml/kg/h (LEES et al. 1991a; TOUTAIN u. CESTER 2004a) deutlich größer als bei gesunden Pferden mit 25-35 ml/kg/h (SINCLAIR et al. 2006; MAHMOOD u. ASHRAF 2010).

Es errechnete sich eine EPC von 0,3-1,1 µg/ml (0,08-0,31 µmol/l).

Die von TOUTAIN u. CESTER (2004a) ermittelten EC₅₀ von 0,13 und 0,195 µg/ml (Tabelle 37) lag unter der berechneten EPC, wohingegen die *in vitro* bestimmten IC₅₀ (Tabelle 38) deutlich darüber lagen.

Tabelle 37: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Meloxicam aus *In-vivo*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Schrittlänge bei induzierter Karpalgelenksarthritis | TOUTAIN u. CESTER (2004a) | 0,13 | 0,37 |
| Lahmheitsscore | TOUTAIN u. CESTER (2004a) | 0,195 | 0,55 |

Tabelle 38: Vergleichende Angaben zur IC₅₀ von Meloxicam aus *In-vitro*-Versuchen

| Effektgröße | Untersuchung | IC ₅₀ [µg/ml] | IC ₅₀ [µmol/l] |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| COX-I Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,15 | 0,43 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 0,35 | 1 |
| COX-II Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,04 | 0,11 |
| | Eigene <i>In-vitro</i> -Untersuchung | 0,74 | 2,1 |

IV ERGEBNISSE

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) empfohlenen Sicherheitsfaktors von 500 betrug die IPC 0,6-2,2 ng/ml.

Nach TOUTAIN et al. (2004b) rangierte das Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnis von Meloxicam zwischen 13 und 18. Daraus errechnete sich eine IUC von 0,78-39,6 ng/ml.

1.4.3 Ausscheidungszeit

Mithilfe der vereinfachten PK-Modellfunktion $c(t) = 3500e^{-0,25(t)}$ für Meloxicam (LEES et al. 1991a) errechnete sich eine t_A 35 h bis zum Erreichen der IPC von 0,6 ng/ml.

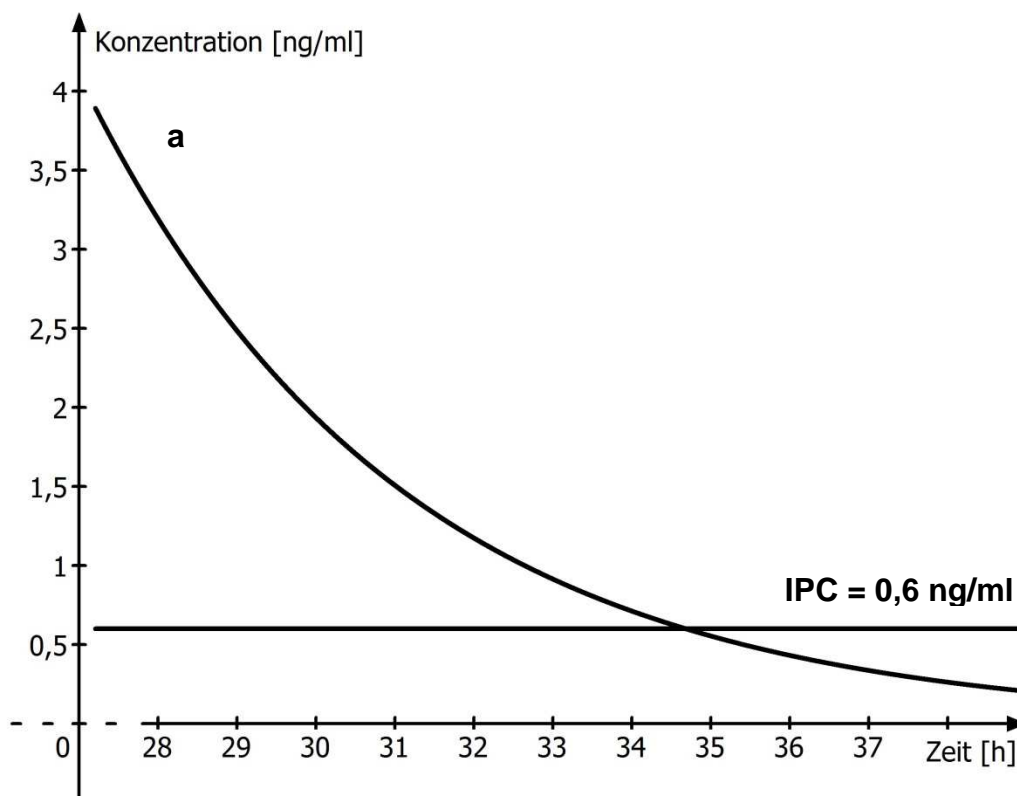


Abbildung 5: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von Meloxicam nach der intravenösen Anwendung [Zeit in h] von 0,6 mg/kg

a) LEES et al. (1991a) $c(t) = 3500e^{-0,25(t)}$

IV ERGEBNISSE

Die nach KIETZMANN (1983) berechnete Zeit bis zum Erreichen der IPC von 0,6 ng/ml betrug 2-5 Tage (Tabelle 39).

Tabelle 39: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung (IPC = 0,6 ng/ml) nach KIETZMANN (1983) für Meloxicam

| Untersuchung | Applikationsart | t _A [h]* | t _A [d]* |
|--------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| LEES et al. (1991a) | intravenös | 34 | 2 |
| MAHMOOD u. ASHRAF (2010) | intravenös | 102 | 5 |
| NOBLE et al. (2012) | oral | 111 | 5 |

* aufgerundet auf ganze Stunden bzw. Tage

1.4.4 Ausscheidungsversuche

In den sieben Studien, die einen Plasmakonzentrationsverlauf von Meloxicam untersucht haben, wurde kein Analyseverfahren mit einem LOD von ≤ 1 ng/ml verwendet. Bezogen auf die Plasmakonzentration könnte somit nur eine Aussage über die Nachweiszeit von Meloxicam mithilfe von Extrapolation auf Grundlage der vorhandenen Untersuchungen vorgenommen werden (siehe IV 1.4.3.).

In zwei Studien wurde der Urinkonzentrationsverlauf nach der mehrmaligen oralen Anwendung der empfohlenen Dosierung von 0,6 mg/kg Meloxicam analysiert. In nur einer Untersuchung wurde ein LOD angegeben (20 ng/ml) (TOUTAIN et al. 2004b). Nach TEVELL ÅBERG et al. (2009) und TOUTAIN et al. (2004b) konnte drei Tage nach der letzten Verabreichung die Muttersubstanz Meloxicam im Urin nicht mehr nachgewiesen werden. Der 5'-Hydroxymethyl-Metabolit war mindestens 14 Tage nach der letzten Anwendung von Meloxicam im Urin nachweisbar (TEVELL ÅBERG et al. 2009), wobei jedoch keine Information über die Sensibilität der verwendeten Analysetechnik vorliegt.

IV ERGEBNISSE

1.4.5 Nachweiszeit für Meloxicam

Da keine Wirkstoffakkumulation von Meloxicam bei mehrmaliger Anwendung nachgewiesen werden konnte (TOUTAIN et al. 2004b; NOBLE et al. 2012; VANDER WERF et al. 2013), kann die Behandlungsdauer bei der Ermittlung der Nachweiszeit vernachlässigt werden. Auf Grundlage der ausgewerteten Publikationen kann eine Nachweiszeit von fünf Tagen für Meloxicam angenommen werden.

1.5 Ketoprofen

Ketoprofen ist ein chirales Molekül und zugelassene Präparate beinhalten eine Mischung (50:50) aus R(-)- und S(+)-Enantiomeren (JAUSSAUD et al. 1993). Ketoprofen zeigt eine enantioselektive Pharmakokinetik, wobei das S(+)-Enantiomer im Plasma, Exsudat und Transudat vorherrschend ist (LANDONI u. LEES 1995b). LANDONI u. LEES (1996) begründeten dies mit einer unidirektionalen Inversion von R(-)- zu S(+)-Ketoprofen, da bei separater Applikation der Enantiomere keine signifikanten Unterschiede der wichtigsten pharmakokinetischen Parameter nachgewiesen werden konnten. Nach VERDE et al. (2001) fand beim Vorliegen einer akuten Synovitis eine vergleichsweise weniger ausgeprägte Inversion statt. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Enantiomere pharmakodynamisch aktiv sind (LANDONI u. LEES 1996). Die Ausscheidung von Ketoprofen aus dem Exsudat erfolgte deutlich langsamer als aus dem Plasma. Die Halbwertszeit war im Exsudat 14-18 mal langsamer als im Plasma (LANDONI u. LEES 1995b). Die Bioverfügbarkeit von Ketoprofen war stark abhängig von der verwendeten Galenik und der Applikationsart.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 40: Bioverfügbarkeit von Ketoprofen in Abhängigkeit zur Formulierung und Applikationsart

| Formulierung | Applikationsart | Bioverfügbarkeit | Untersuchung |
|---------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| Ölige Paste | oral | 3-6 % | LANDONI u. LEES (1995a) |
| Pulver in Gelatine-Kapsel | oral | 51-54 % | LANDONI u. LEES (1995a) |
| Lysinsalz | intramuskulär | 92% | ANFOSSI et al. (1997) |
| Ketofen® Injektionslösung | intramuskulär | 60-78 % | BRINK et al. (1998) |
| Zäpfchen | Rektal | 25-29 % | CORVELEYN et al. (1996) |
| Suspension | Rektal | 31 % | CORVELEYN et al. (1996) |

Die Ausscheidung mit dem Urin erfolgte als nicht konjugiertes und basisch-labil konjugiertes Ketoprofen (SAMS et al. 1995).

1.5.1 Ausgewertete Publikationen

Von den 14 ausgewählten Studien entsprach keine Untersuchung in vollem Umfang der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeit“. Neun Untersuchungen ermöglichten die Ableitung einer Ausscheidungszeit mit eingeschränkter Validität. In zehn Studien wurde eine Pferdezahl von ≥ 6 berücksichtigt.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 41: Punktbewertung der Publikationen zu Ketoprofen

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|-------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| BRINK et al. (1998) | 2 | 2 | 2 | 1 | 7 | B |
| CORVELEYN et al. (1996) | 2 | 1 | 2 | 1 | 6 | C |
| JAUSSAUD et al. (1993) | 1 | 1 | 2 | 2 | 6 | C |
| KIM et al. (2001) | 1 | 2 | 3 | 0 | 6 | C |
| LANDONI u. LEES (1995b) | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 | C |
| LANDONI u. LEES (1995a) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| LANDONI u. LEES (1996) | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 | B |
| OWENS et al. (1995) | 2 | 2 | 2 | 3 | 9 | B |
| SAMS et al. (1995) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| SHORT et al. (1996) | 2 | 2 | 1 | 1 | 6 | C |
| VERDE et al. (2001) | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 | B |
| ARMSTRONG et al. (1999) | 3 | 2 | 1 | 2 | 8 | B |
| ANFOSSI et al. (1997) | 2 | 1 | 2 | 3 | 8 | B |
| CPMA (1997) | 1 | 2 | 2 | 2 | 7 | B |
| Gesamt | 26 | 25 | 24 | 25 | 100 | |
| Ø | 1,9 | 1,8 | 1,7 | 1,8 | 7,1 | |

1.5.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Ketoprofen ist derzeit in Deutschland für Pferde als intravenös zu verabreichende Injektionslösung zugelassen. Die Dosierung wird mit 2,2 mg/kg KGW einmal täglich angegeben. Die maximale Behandlungsdauer sollte fünf Tage nicht überschreiten (VETIDATA 2014). Die *Plasmaclearance* von Rac-Ketoprofen bei ein- und fünfmaliger intravenöser Behandlung der empfohlen Dosierung von 2,2 mg/kg rangierte zwischen 132 bis 289 mg/kg/h (OWENS et al. 1995; SAMS et al. 1995; CORVELEYN et al. 1996).

Es berechnete sich eine EPC von 8-17 µg/ml. Die EC₅₀ lagen deutlich unter der EPC (Tabelle 42).

IV ERGEBNISSE

Tabelle 42: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Rac-Ketoprofen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , TXB ₂ Konzentration im Serum | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,061 ± 0,016 | 0,24 ± 0,06 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , PGE ₂ Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,057 ± 0,009 | 0,22 ± 0,03 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , β-Glucuro- nidase Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,347 ± 0,099 | 1,36 ± 0,39 |
| Intradermale Bradykinin- induzierte Schwellung | LANDONI u. LEES (1995b) | 0,072 ± 0,008 | 0,28 ± 0,03 |

Tabelle 43: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von S(+)-Ketoprofen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , TXB ₂ Konzentration im Serum | LANDONI u. LEES (1996) | 0,016 | 0,06 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , PGE ₂ Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1996) | 0,033 | 0,13 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , β-Glucuro- nidase Konzentration im Exsudat | LANDONI u. LEES (1996) | 0,060 | 0,23 |
| Intradermale Bradykinin- induzierte Schwellung | LANDONI u. LEES (1996) | 0,065 | 0,25 |

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) empfohlenen Sicherheitsfaktors von 500 betrug die IPC 16-34 ng/ml.

Mithilfe der vorhandenen Veröffentlichungen konnte keine sichere Angabe zum Urin-Plasma Konzentrationsverhältnis von Ketoprofen in der Eliminationsphase gemacht werden. Die Berechnung einer IUC war somit derzeit auf Grundlage der veröffentlichten Untersuchungen nicht möglich. Die Ergebnisse von CPMA (1997) ließen lediglich den Schluss zu, dass die Urinkonzentrationen deutlich über den Plasmakonzentrationen liegen. Wenngleich das LOD im Urin mit 200 ng/ml über dem LOD im Plasma lag (100 ng/ml), so konnte doch im Urin ein bis zu zehnmal längerer Nachweis erfolgen (CPMA 1997).

IV ERGEBNISSE

1.5.3 Ausscheidungszeit

Mithilfe der abgeleiteten PK-Modellfunktionen (Abbildung 6) errechnete sich eine t_A von 5-8 h bis zum Erreichen der IPC von 16 ng/ml. Die Plasmaausscheidungszeit beim Pferd mit induzierter Synovitis war mit 5 h kürzer als beim gesunden Pferd (8 h).

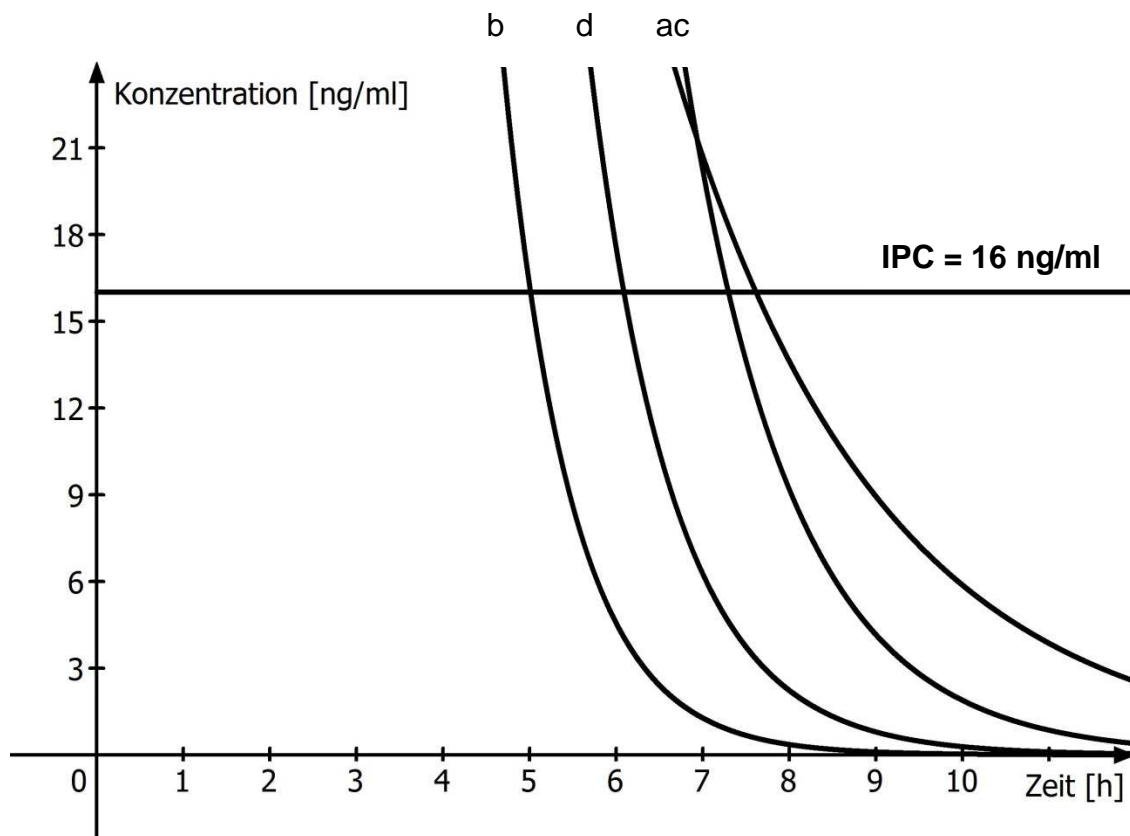


Abbildung 6: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von Rac-Ketoprofen nach der intravenösen Anwendung [Zeit in h] von 2,2 mg/kg

a) OWENS et al. (1995) $c(t) = 5100e^{-0,78(t)}$ (gesunde Pferde)

b) OWENS et al. (1995) $c(t) = 9290e^{-1,27(t)}$ (akute Synovitis)

c) SAMS et al. (1995) $c(t) = 392e^{-0,42(t)}$

d) ANFOSSI et al. (1997) $c(t) = 8470e^{-1,03(t)}$ (Lysinsalz)

Die nach KIETZMANN (1983) berechnete Zeit bis zum Erreichen der IPC von 16 ng/ml betrug 6-16 h nach der intravenösen Anwendung von 2,2 mg/kg.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 44: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung (IPC = 16 ng/ml) nach KIETZMANN (1983) für Rac-Ketoprofen

| Untersuchung | Applikationsart | t _A [h]* | t _A [d]* |
|-------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| CORVELEYN et al. (1996) | intravenös | 8 | 1 |
| OWENS et al. (1995) | intravenös | 10 | 1 |
| OWENS et al. (1995) | Intravenös | 6 [^] | 1 [^] |
| SAMS et al. (1995) | intravenös | 16 | 1 |
| ANFOSSI et al. (1997) | intravenös | 8 | 1 |
| ANFOSSI et al. (1997) | intramuskulär | 10 | 1 |

[^]beim Pferd mit akuter Synovitis, * aufgerundet auf ganze Stunden bzw. Tage

1.5.4 Ausscheidungsversuche

Von den 14 Studien, die einen Konzentrationsverlauf von Ketoprofen im Blut untersucht haben, wurde letztlich bei zwei Publikationen ein LOD angegeben der \leq der IPC von 16 ng/ml war. ANFOSSI et al. (1997) untersuchten lediglich die Pharmakokinetik von Lysinsalz Ketoprofen, welches derzeit nicht zur therapeutischen Anwendung eingesetzt wird, sodass die Untersuchung für die Festlegung einer validen Nachweiszeit für Ketoprofen vernachlässigt werden kann. Der grafischen Darstellung zum Plasmakonzentrationsverlauf von Rac-Ketoprofen von CORVELEYN et al. (1996) kann entnommen werden, dass 12 h nach der intravenösen Anwendung von 2,2 mg/kg im Mittel eine Plasmakonzentration von weniger als 10 ng/ml vorlag.

In vier Untersuchungen wurde die Ketoprofen-Konzentration im Urin analysiert. In lediglich einer Untersuchung erfolgte die Auswertung und Versuchsdurchführung so, dass eine ungefähre Einschätzung zur Nachweiszeit im Urin getroffen werden kann. Nach CPMA (1997) konnte bei Verwendung einer Analysetechnik mit einem LOD von 200 ng/ml 54 h nach der einmaligen intravenösen Anwendung und 72 h nach der einmaligen intramuskulären Anwendung von 2,2 mg/kg kein Ketoprofen mehr im Urin

IV ERGEBNISSE

nachgewiesen werden. Nach einer fünftägigen intravenösen oder intramuskulären Anwendung war ein Nachweis in der letzten entnommenen Probe 120 h nach der letzten Anwendung, noch möglich.

1.5.5 Nachweiszeit für Ketoprofen

Nach der Literaturanalyse zu Ketoprofen wurde geschlussfolgert, dass keine valide Aussage zur Nachweiszeit von Ketoprofen auf Grundlage der vorhandenen veröffentlichten Daten erfolgen kann. Insbesondere die Daten zum Konzentrationsverlauf von Ketoprofen im Urin waren unzureichend.

1.6 Vedaprofen

Vedaprofen weist eine enantioselektive Pharmakokinetik auf, wobei die Plasma- und Exsudatkonzentration von R(-)-Vedaprofen die von S(+)-Vedaprofen übersteigt (LEES et al. 1999).

1.6.1 Ausgewertete Publikationen

Derzeit existiert nur eine Veröffentlichung zum Plasmakonzentrationsverlauf von Vedaprofen beim Pferd. LEES et al. (1999) untersuchten die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von Vedaprofen, nach der einmaligen intravenösen Anwendung von 1 mg/kg bei Ponys mit induzierter akuter Entzündung. Die pharmakokinetischen Parameter wurden in dieser Untersuchung für jedes Enantiomer separat bestimmt. Aufgrund der Dominanz von R(-)-Vedaprofen im Plasma und Exsudat, erfolgten die nachfolgenden Berechnung mithilfe der veröffentlichten Daten vom R(-)-Enantiomer.

IV ERGEBNISSE

1.6.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Vedaprofen ist derzeit in Deutschland als oral zu verabreichendes Gel mit einer Initialdosis von 2 mg/kg und einer Erhaltungsdosis von 1 mg/kg zweimal täglich zugelassen. Die maximale Behandlungsdauer beträgt 14 Tage (VETIDATA 2014).

Nach LEES et al. (1999) war die *Plasmaclearance* nach der einmaligen intravenösen Anwendung von 1 mg/kg von R(-)-Vedaprofen mit 69 ml/h/kg deutlich geringer als von S(+)-Vedaprofen mit 396 ml/h/kg. Demnach errechnete sich für R(-)-Vedaprofen unter Berücksichtigung eines Dosierungsintervalls von 12 h eine EPC von 1,2 µg/ml. Unter Anwendung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) eingesetzten Sicherheitsfaktors berechnete sich eine IPC von 2,4 ng/ml.

Tabelle 45: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Vedaprofen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|--|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , TXB ₂ Konzentration im Serum | LEES et al. (1999) | 0,009 | 0,03 |
| <i>Tissue-Cage-Modell</i> , PGE ₂ Konzentration im Exsudat | LEES et al. (1999) | 0,630 | 2,23 |

1.6.3 Ausscheidungszeit

Unter Anwendung der PK-Modellfunktion berechnete sich eine t_A für R(-)-Vedaprofen von 22 h bis zum Erreichen der IPC von 2,4 ng/ml.

IV ERGEBNISSE

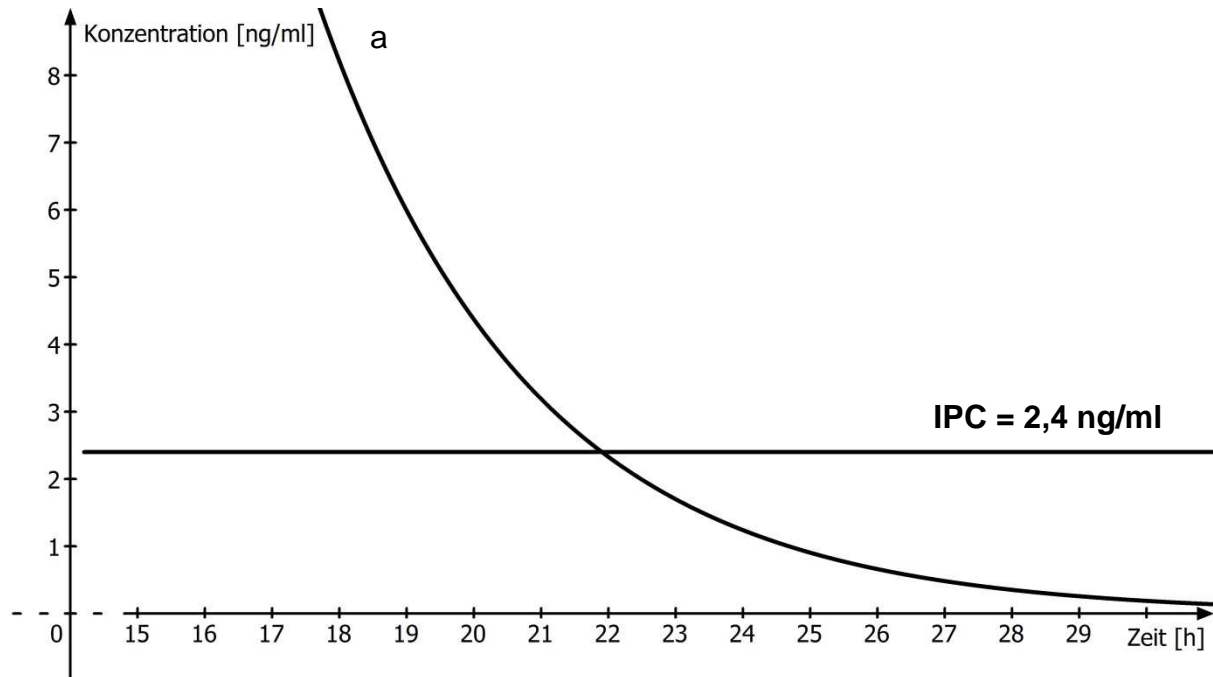


Abbildung 7: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von R(-)-Vedapropfen nach der intravenösen Anwendung [Zeit in h] von 1 mg/kg

a) LEES et al. (1999) $c(t) = 2381e^{-0,315t}$

Die nach KIETZMANN (1983) berechnete Zeit bis zum Erreichen der IPC von 2,4 ng/ml betrug 19 h.

1.6.4 Nachweiszeit für Vedapropfen

Eine valide Aussage über die Nachweiszeit von Vedapropfen nach oraler Anwendung in der derzeit in Deutschland zugelassenen Formulierung und Dosierung war mithilfe der ausgewerteten Untersuchung nicht möglich. Derzeit existieren keine veröffentlichten Daten zum Urinkonzentrationsverlauf von Vedapropfen beim Pferd.

Nach LEES et al. (1999) konnte R(-)-Vedapropfen nach 12h und S(+)-Vedapropfen bereits nach 4h nicht mehr im Plasma nachwiesen werden (LOQ von 19,5 ng/ml). Im Exsudat gelang ein Nachweis von R(-)-Vedapropfen bis zu 24 h. Ausgehend von der

IV ERGEBNISSE

Halbwertszeit von 2,22 h für R(-)-Vedaprofen, konnte berechnet werden, dass nach spätestens 17 h die Vedaprofen-Plasmakonzentration unter der EC_{50} für die COX I-Hemmung liegt. Die Vedaprofen-Konzentration im Exsudat lag nach 8 h unter der EC_{50} für die COX II-Hemmung im Exsudat (LEES et al. 1999).

1.7 Carprofen

Carprofen verfügt über ein chirales Center am C2 Atom, sodass zwei stereoisometrische Formen, das S(+)- und das R(-)-Enantiomer existieren. In der Veterinärmedizin verfügbare Präparate beinhalten ein racemisches Gemisch mit einem 50:50 Verhältnis beider Antipoden. Die Carprofen Enantiomere verfügen über eine enantiospezifische Pharmakokinetik. Aufgrund einer vermehrten Glucuronidierung von S(+)-Carprofen in der Leber und anschließender biliären Exkretion, verfügt das S(+)-Enantiomer über eine höhere *Körperclearance*, sodass im Plasma eine Dominanz von R(-)-Carprofen vorliegt (SORACI et al. 1995).

1.7.1 Ausgewertete Publikationen

Von den neun ausgewerteten Publikationen entsprach letztlich keine Untersuchung in vollem Umfang der in dieser Arbeit verwendeten „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Mithilfe von vier Untersuchungen war es möglich, eine Aussage zur Ausscheidungszeit mit eingeschränkter Validität zu treffen. In sechs Untersuchungen wurden mindestens sechs Pferde berücksichtigt.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 46: Punktbewertung der Publikationen zu Carprofen

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|----------------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| ARMSTRONG et al. (1999) | 3 | 2 | 1 | 2 | 8 | B |
| DELATOUR et al. (1996) | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | D |
| LEES et al. (2002) | 3 | 2 | 1 | 3 | 9 | B |
| LEES et al. (1994) | 2 | 2 | 1 | 3 | 8 | B |
| MCKELLAR et al. (1991) | 1 | 2 | 1 | 1 | 5 | C |
| K. L. MEALEY et al. (2004) | 1 | 2 | 2 | 3 | 8 | B |
| SCHATZMANN et al. (1989) | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | D |
| SORACI et al. (1995) | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | C |
| LEES et al. (1991b) | 1 | 1 | 0 | 2 | 4 | C |
| Gesamt | 14 | 14 | 8 | 15 | 51 | |
| Ø | 1,55 | 1,55 | 0,89 | 1,67 | 5,67 | |

1.7.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Derzeit gibt es in Deutschland kein für Pferde zugelassenes Präparat mit dem Wirkstoff Carprofen. Eine Anwendung beim Pferd kann im Therapienotstand nur nach Umwidmung von anderen in Deutschland zugelassenen Tierarzneimittelpräparaten erfolgen. In Deutschland ist Carprofen als oral zu verabreichende Tablette für den Hund und als subkutan oder intravenös anzuwendende Injektionslösung bei Hund, Katze und Rind zugelassen. Die empfohlene Dosierung wird mit 0,7 mg/kg/24h für eine Behandlungsdauer von bis zu 10 Tagen für das Pferd angegeben (SCHATZMANN et al. 1989; EMA 2015).

In allen ausgewerteten Untersuchungen wurde die Berechnung der *Plasmaclearance* für jedes Enantiomer separat durchgeführt. Aufgrund der Dominanz von R(-)-Carprofen im Plasma (SORACI et al. 1995), erfolgte die Berechnung der EPC unter Berücksichtigung der angegebenen *Plasmaclearance* von R(-)-Carprofen. Diese

IV ERGEBNISSE

rangierte in den analysierten Untersuchungen zwischen 2,69-8,4 ml/kg/kg bzw. 64,56-201,6 ml/kg/24h.

Nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechnete sich eine EPC von 3,5-10,8 µg/ml.

Nach LEES et al. (2000) lag die EC₅₀ von R(-)-Carprofen deutlich höher als die berechnete EPC (Tabelle 47).

Tabelle 47: Vergleichende Angaben zur EC₅₀ von Carprofen

| Effektgröße | Untersuchung | EC ₅₀ [µg/ml] | EC ₅₀ [µmol/l] |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| COX I-Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,13 | 0,48 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 2,52 | 9,20 |
| | LEES et al. (2000) | 13,93 | 50,89 |
| | Eigene Untersuchung | >> 2,74 | >> 10 |
| | LEES et al. (2000) | 6,87 ^S | 25 ^S |
| | LEES et al. (2000) | 102,09 ^R | 373 ^R |
| COX II-Inhibition | BERETTA et al. (2005) | 0,06 | 0,24 |
| | BRIDEAU et al. (2001) | 1,61 | 5,87 |
| | LEES et al. (2000) | 4,27 | 15,6 |
| | Eigene Untersuchung | >> 2,74 | >> 10 |
| | LEES et al. (2000) | 3,94 ^S | 14,39 ^S |
| | LEES et al. (2000) | 37,5 ^R | 137 ^R |

^S S(+)-Carprofen, ^R R(-)-Carprofen

Unter Berücksichtigung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) angegebenen Sicherheitsfaktors von 500 berechnete sich eine IPC von 7-22 ng/ml.

In keine der ausgewerteten Veröffentlichungen erfolgte die Bestimmung des Urin-Plasmakonzentrationsverhältnisses in der Eliminationsphase. Eine Berechnung der IUC war somit nicht möglich.

IV ERGEBNISSE

1.7.3 Ausscheidungszeit

Drei Untersuchungen erlaubten anhand der publizierten Daten die Ableitung einer PK-Modellfunktion. Mithilfe der Funktionen, die den terminalen Plasmakonzentrationsverlauf beschreiben, errechnete sich eine t_A von 153-199 h, d.h. 7-9 Tage bis zum Erreichen der IPC nach der intravenösen Anwendung von 0,7 mg/kg. Bei Erhöhung der Dosis um den Faktor 5,7 verlängerte sich die Ausscheidungszeit auf 244 h bzw. 11 Tage.

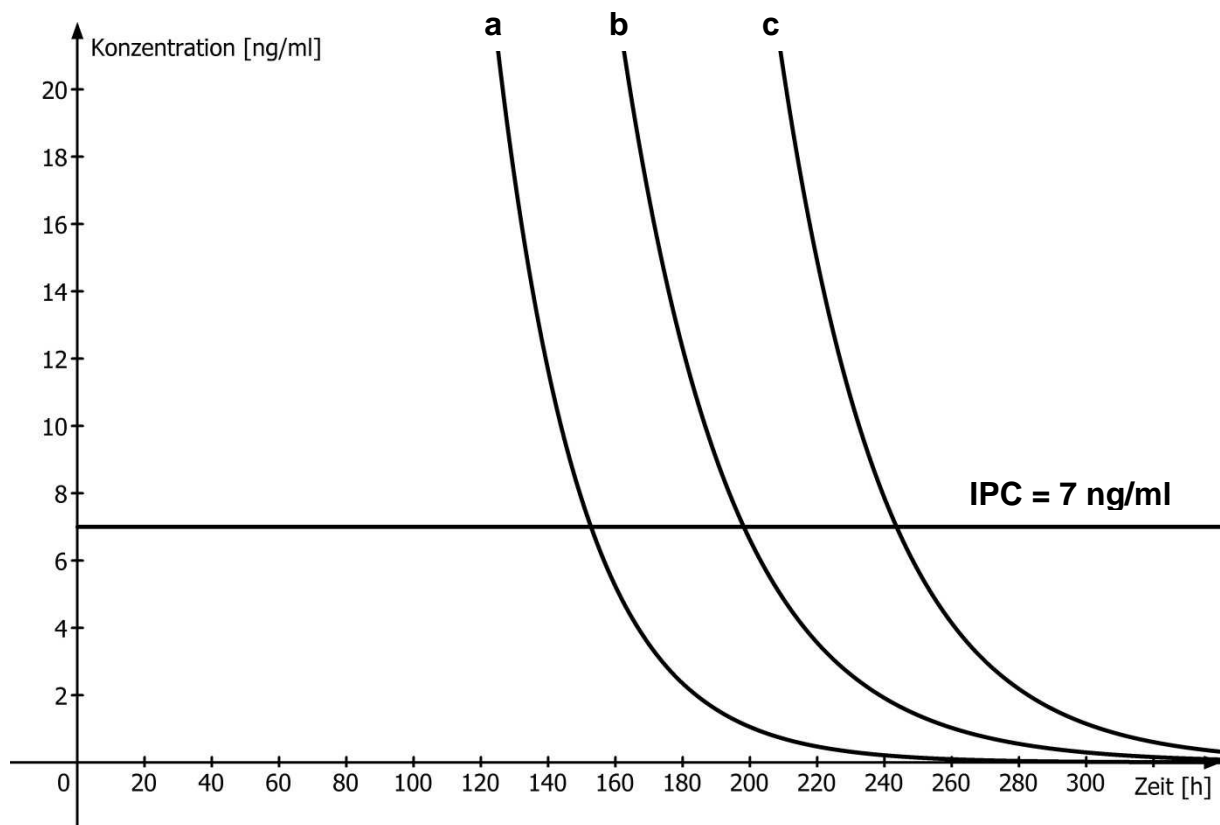


Abbildung 8: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf [ng/ml] von R(-)-Carprofen nach der intravenösen Anwendung [Zeit in h] von 0,7 mg/kg (a und b) bzw. 4 mg/kg (c) Rac-Carprofen

- a) ARMSTRONG et al. (1999) $c(t) = 3150e^{-0,04(t)}$
b) LEES et al. (2002) $c(t) = 3260e^{-0,031(t)}$
c) LEES et al. (2002) $c(t) = 17000e^{-0,032(t)}$

IV ERGEBNISSE

Nach KIETZMANN (1983) berechnete sich für die intravenöse Anwendung von 0,7 mg/kg eine t_A von 143-211 h bzw. 6-9 Tage bis zum Erreichen der IPC von 7 ng/ml. Bei der intramuskulären Verabreichung von 0,7 mg/kg sowie bei der intravenösen Anwendung von 4 mg/kg betrug die t_A bis zu 11 Tage.

Tabelle 48: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung (IPC = 7 ng/ml) nach KIETZMANN (1983) für die Anwendung von 0,7 mg/kg und 4 mg/kg Carprofen

| Untersuchung | Applikationsart | t_A [h]* | t_A [d]* |
|----------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| LEES et al. (2002) | intravenös | 211 ^R | 9 ^R |
| LEES et al. (2002) | intravenös | 250 ^{oR} | 11 ^{oR} |
| LEES et al. (1994) | intravenös | 154 | 7 |
| MCKELLAR et al. (1991) | intramuskulär | 261 | 11 |
| K. L. MEALEY et al. (2004) | intravenös | 200 ^R | 9 ^R |
| SORACI et al. (1995) | intravenös | 143 ^R | 6 ^R |

* aufgerundet auf ganze Stunden bzw. Tage, ^R Berechnung anhand der pharmakokinetischen Daten von R(-)-Carprofen

1.7.4 Ausscheidungsversuche

Von den neun Studien, die einen Plasmakonzentrationsverlauf analysierten, gab es keine Untersuchung, die eine Analytik mit einem LOD von ≤ 7 ng/ml verwendete. Das kleinste angegebene LOD betrug 20 ng/ml (MCKELLAR et al. 1991; LEES et al. 1994). Bezogen auf die Plasmakonzentration könnte somit nur eine Aussage über die Nachweiszeit von Carprofen mithilfe von Extrapolation auf Grundlage der vorhandenen Untersuchungen vorgenommen werden (siehe IV 1.8.3.).

In einer der hier ausgewerteten Untersuchungen erfolgte die Analyse von Urinkonzentrationen von Carprofen. Die Daten dieser Untersuchung sind jedoch völlig unzureichend um eine Aussage zur Nachweiszeit von Carprofen im Urin treffen zu können.

IV ERGEBNISSE

1.7.5 Nachweiszeit für Carprofen

Eine valide Aussage zur Nachweiszeit von Carprofen war mithilfe der vorhandenen veröffentlichten Untersuchungen nicht möglich.

1.8 Metamizol

Nach der Verabreichung von Metamizol erfolgt im Körper eine schnelle Metabolisierung. Das pharmakologisch aktive 4-Methyl-Aminoantipyrin stellt den Hauptmetaboliten im Plasma und Urin dar. Die Metaboliten 4-Acetyl-Aminoantipyrin , 4-Formyl-Aminoantipyrin und Aminoantipyrin werden in deutlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen (VETIDATA 2014). Der Nachweis der Anwendung von Metamizol sowie pharmakokinetische Untersuchungen beruhen vor allem auf dem Nachweis von 4-Methyl-Aminoantipyrin.

1.8.1 Ausgewertete Publikationen

Derzeit existieren zwei Veröffentlichungen zu pharmakokinetischen Untersuchungen von Metamizol beim Pferd. Beide Untersuchungen erfüllten die in dieser Arbeit verwendeten „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeit“. KLAUS et al. (1997) untersuchten die Wirkstoffkonzentrationen von 4-Methyl-Aminoantipyrin im Serum nach der Anwendung eines Kombinationspräparates mit Butylscopolamin. Die nachfolgenden Berechnungen erfolgten somit unter der Annahme, dass die Serumkonzentration der Plasmakonzentration entsprach und pharmakokinetische Parameter durch die zeitgleiche Verabreichung von Butylscopolamin nicht beeinflusst wurden.

IV ERGEBNISSE

Tabelle 49: Punktbewertung der Publikationen zu Metamizol

| Studie | Tiere | Versuch | Analytik | Auswertung | Gesamt | Kat |
|---------------------|-------|---------|----------|------------|--------|-----|
| KLAUS et al. (1997) | 2 | 2 | 3 | 3 | 10 | A |
| LEVENS (2005) | 3 | 3 | 2 | 3 | 11 | A |

1.8.2 IPC und IUC nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002)

Metamizol ist derzeit in Deutschland als Monopräparat sowie als Kombinationspräparat mit Butylscopolamin zur intravenösen Anwendung beim Pferd zugelassen. Die empfohlene Dosierung beträgt 20-50 mg/kg/8h.

KLAUS et al. (1997) bestimmten eine totale *Clearance* für 4-Methyl-Aminoantipyrin nach der intravenösen Anwendung von 25 mg/kg Metamizol (Kombinationspräparat) im Serum von 240,6 ml/kg/h. Unter Berücksichtigung eines achtstündigen Dosierungsintervalls berechnete sich damit eine EPC von 13 µg/ml. Nach Anwendung des von TOUTAIN u. LASSOURD (2002) vorgeschlagenen Sicherheitsfaktors von 500, wurde eine IPC von 26 ng/ml kalkuliert.

Nach LEVENS (2005) rangierte die nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechnete EPC für 4-Methyl-Aminoantipyrin zwischen 28 und 86 µg/ml und lag im Mittel bei 59,41 µg/ml. Die daraus abzuleitende IPC, nach Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 500, betrug im Mittel 120 ng/ml (60-170 ng/ml). LEVENS (2005) gab eine mittlere IUC von 2,19 µg/ml (0,79-4,94 µg/ml) an.

IV ERGEBNISSE

1.8.3 Ausscheidungszeit

Unter Berücksichtigung des terminalen Serumkonzentrationsverlaufs nach KLAUS et al. (1997) ließ sich eine t_A von 41 h bis zum Erreichen der berechneten IPC von 26 ng/ml berechnen.

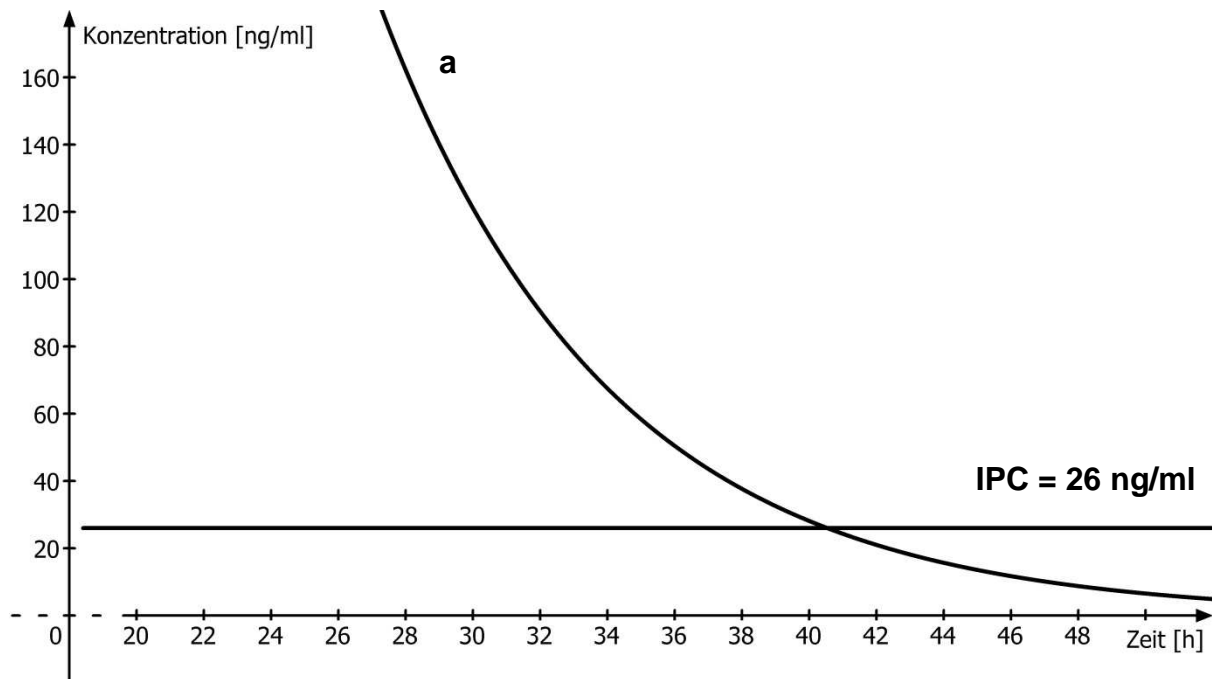


Abbildung 9: terminaler Serumkonzentrationsverlauf [ng/ml] von 4-Methyl-Aminoantipyrin nach der intravenösen Anwendung von 25 mg/kg Metamizol (Kombinationspräparat)

a) KLAUS et al. (1997) $c(t) = 9670e^{-0,146(t)}$

Nach KIETZMANN (1983) berechnete sich eine t_A von 49 h bis zum Erreichen der IPC von 26 ng/ml.

Nach LEVENS (2005) betrug die nach KIETZMANN (1983) berechnete t_A bis zum Erreichen der IPC zwischen 6,45 und 33,72 h und lag im Durchschnitt bei 18,93 h.

IV ERGEBNISSE

1.8.4 Ausscheidungsversuche

Die in der Untersuchung von KLAUS et al. (1997) verwendete Analytik (LOD 3,9 ng/ml) erlaubte einen Nachweis bis zur berechneten IPC von 26 ng/ml im Serum. 48 h nach der intravenösen Anwendung von 25 mg/kg Metamizol (Kombinationspräparat) lag die durchschnittliche Serumkonzentration mit 30 ng/ml ungefähr im Bereich der IPC. Nach 72 h wurde von allen Pferden die IPC unterschritten.

Die von Levens verwendete Analytik erlaubte mit einem LOD von 250 ng/ml im Plasma keinen Nachweis bis zur IPC. Hingegen gelang im Urin mit einem LOD von 500 ng/ml der Nachweis bis zur von Levens berechneten IUC, die von 790 bis 4940 ng/ml rangierte. Nach Levens wurde die IUC nach 94,18 h von allen Pferden unterschritten.

1.8.5 Nachweiszeit für Metamizol

Nach Analyse der Veröffentlichungen könnte für die Anwendung von bis zu 30 mg/kg Metamizol eine valide Nachweiszeit von vier Tagen angenommen werden. Eine valide Aussage zur Nachweiszeit für die Anwendung der Höchstkonzentration von 50 mg/kg konnte nicht getroffen werden.

IV ERGEBNISSE

2 *In-vitro*-Untersuchung

Es werden die Ergebnisse der durchgeführten Vollblut-Assays aufgezeigt. Es wurde die Inhibition [%] der COX I und II durch Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam in den Konzentrationen 0,001 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ analysiert. Es folgte eine Berechnung der IC_{50} . Die Ergebnisse wurden jeweils ins Verhältnis zur Kontrolle (Probe ohne NSAID) im TXB_2 - und PGE_2 EIA gesetzt.

Die TXB_2 -Bildung erfolgte durch den Ablauf der natürlichen Gerinnung, bei der es durch die Thrombozyten zur Aktivierung der COX I kommt. Im Mittel betrug die TXB_2 -Konzentration der Positivkontrolle 27 ng/ml.

Durch Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS wurde die PGE_2 -Bildung zur Untersuchung der COX II-Aktivität im Plasma stimuliert. Infolgedessen erhöhte sich die PGE_2 -Konzentration im Mittel von 0,2 ng/ml in der Probe ohne LPS auf 4,5 ng/ml in der stimulieren Positivkontrolle.

2.1 COX I- und COX II-Hemmung durch Carprofen

Für alle untersuchten Konzentrationen konnten moderate COX-Hemmungen durch Carprofen gemessen werden. Die IC_{50} für die COX I- und COX II-Hemmung durch Carprofen waren größer als die untersuchten Konzentrationen und wurden mit mehr als 10 $\mu\text{mol/l}$ berechnet. Es konnte eine geringgradig höhere Spezifität für die Isoform COX II gezeigt werden.

IV ERGEBNISSE

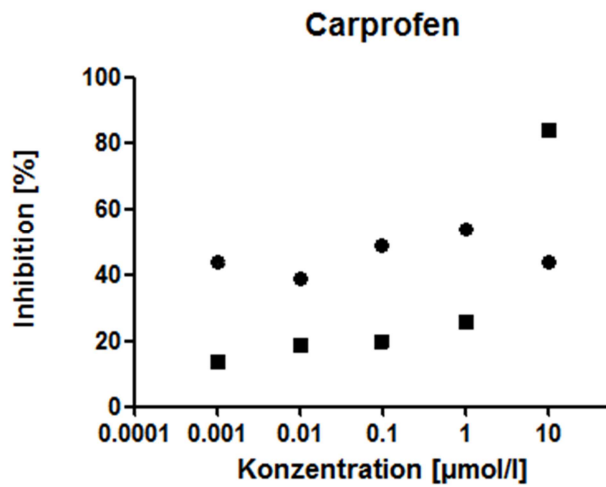


Abbildung 10: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Carprofen [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

2.2 COX I- und COX II-Hemmung durch Firocoxib

Für alle untersuchten Konzentrationen lag die COX I-Hemmung bei unter 50 % und es berechnete sich eine IC_{50} von 28 $\mu\text{mol/l}$. Die mittlere Inhibition der COX II durch Firocoxib betrug für die höchste untersuchte Konzentration 93 %. Mit der berechneten IC_{50} für die COX II-Hemmung von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine deutliche COX II-Spezifität aufgezeigt werden.

IV ERGEBNISSE

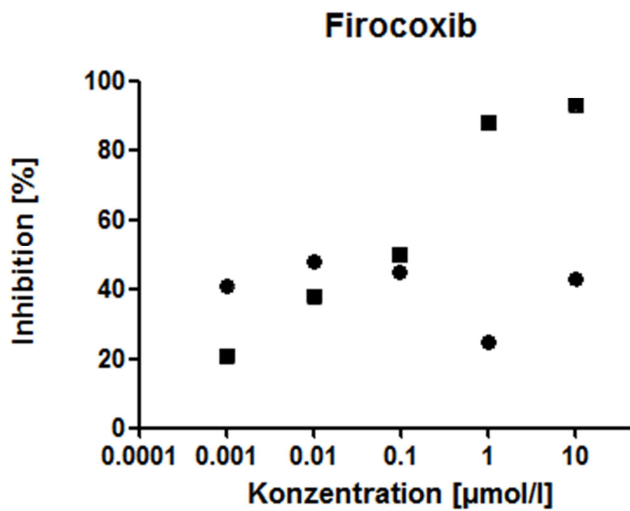


Abbildung 11: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Firocoxib [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

2.3 COX I- und COX II-Hemmung durch Flunixin-Meglumin

Für die untersuchten Konzentrationen konnten COX-Hemmungen von 13 bis 99 % durch Flunixin-Meglumin gemessen werden. Die IC_{50} für die COX I- und COX II-Inhibition durch Flunixin-Meglumin lagen im getesteten Konzentrationsbereich und können mit 0,06 vs. 0,2 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden. Es zeigte sich eine geringgradige COX I- Spezifität.

IV ERGEBNISSE

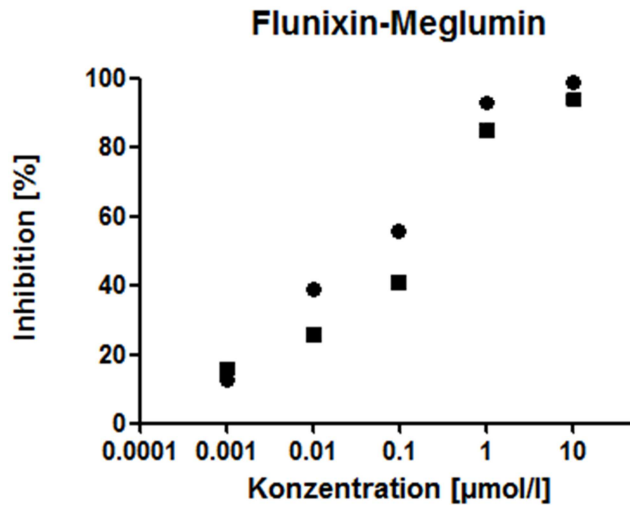


Abbildung 12: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Flunixin-Meglumin [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

2.4 COX I- und COX II-Hemmung durch Ketoprofen

Im Mittel war im Blut für die COX I eine Inhibition von mehr als 90 % in den Konzentrationen 0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ zu verzeichnen. Die berechnete IC_{50} für die COX I-Hemmung liegt mit 0,005 $\mu\text{mol/l}$ im unteren Bereich der getesteten Konzentrationen. Im Vergleich dazu erzielte erst eine Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ eine COX II-Hemmung von mehr als 90 %. Die IC_{50} war mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ vergleichbar mit dem Wert der auch für Flunixin-Meglumin bei der COX II-Hemmung untersucht werden konnte. Für Ketoprofen konnte eine COX I-Spezifität aufgezeigt werden.

IV ERGEBNISSE

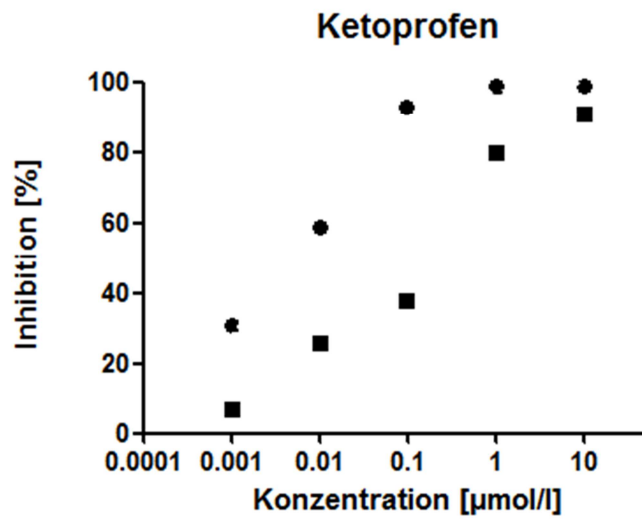


Abbildung 13: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Ketoprofen [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

2.5 COX I- und COX II-Hemmung durch Meloxicam

Die mittlere COX I-Hemmung für Meloxicam in den Konzentrationen 0,001 und 0,1 $\mu\text{mol/l}$ konnte nicht bestimmt werden. Die IC_{50} für die Hemmung der COX I-Aktivität durch Meloxicam lag bei 1 $\mu\text{mol/l}$. Die eingesetzte Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zeigte eine 90 %ige Hemmung der COX II. Für die IC_{50} berechnete sich der Wert 2,1 $\mu\text{mol/l}$.

IV ERGEBNISSE

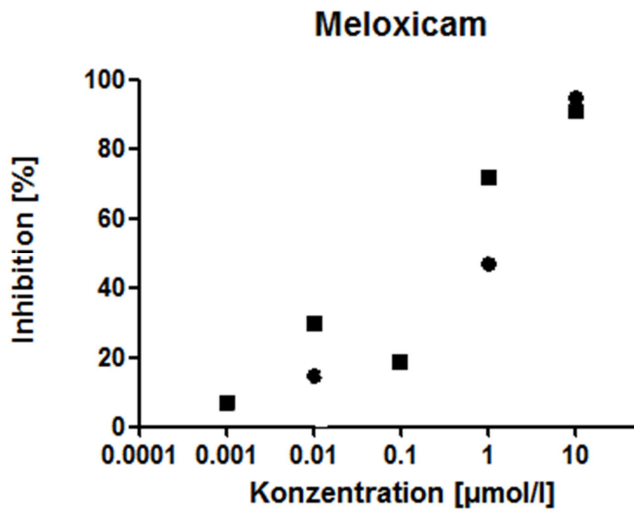


Abbildung 14: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Meloxicam [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

2.6 COX I- und COX II-Hemmung durch Diclofenac

Alle getesteten Konzentrationen zeigten eine hemmende Wirkung der COX I- und COX II. Die IC_{50} für die COX I-Hemmung lag mit $0,2 \mu\text{mol/l}$ etwas über der IC_{50} für die COX II-Hemmung mit $0,01 \mu\text{mol/l}$.

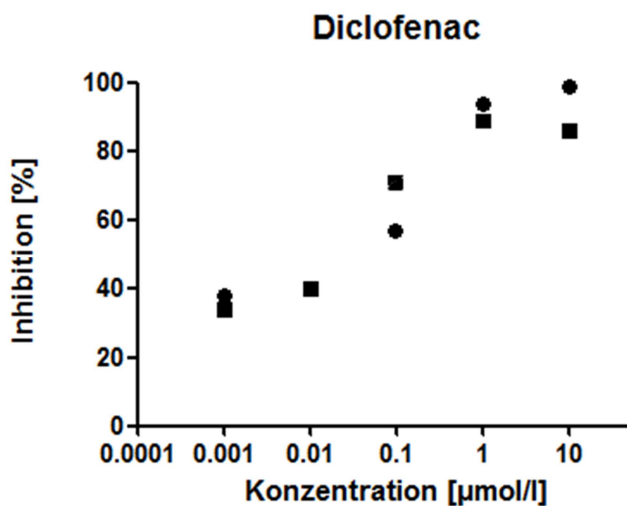


Abbildung 15: Mittelwerte für die Inhibition [%] der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Diclofenac [Konzentration in $\mu\text{mol/l}$]

IV ERGEBNISSE

2.7 Gesamtübersicht zur COX I- und COX II-Hemmung

Carprofen, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam übten eine stärker hemmende Wirkung auf die COX I als auf die COX II aus. Bei Diclofenac und Firocoxib verhielt es sich entgegengesetzt. Die stärkste Hemmung der TXB₂-Synthese erfolgte durch Ketoprofen. Beim Einsatz von 1 µmol/l lag hier bezogen auf die Mittelwerte mit 99 % die stärkste Hemmung der COX I vor. Eine vergleichbare prozentuale Hemmung konnte beim Einsatz einer höheren Konzentration (10 µmol/l) Diclofenac oder Flunixin-Meglumin erfolgen. Die geringste COX I-Inhibition wurde durch Carprofen und Firocoxib ausgelöst. Beim Einsatz von 10 µmol/l erfolgte hier im Mittel lediglich eine Hemmung von etwa 40 %. Diclofenac und Firocoxib waren im Vergleich zu den anderen untersuchten NSAID die potentesten COX II-Inhibitoren. Ab einer Konzentration von 1 µmol/l konnte eine hemmende Wirkung der COX II von mehr als 89 % aufgezeigt werden. Der Einsatz von 10 µmol/l Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam kann mit einer über 90 %igen Inhibition der COX II ebenfalls als sehr wirkungsvoll bewertet werden.

Tabelle 50: IC₅₀ der COX I und COX II für die NSAID Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam

| Wirkstoff | IC ₅₀ COX I [µmol/l] | IC ₅₀ COX I [µg/ml] | IC ₅₀ COX II [µmol/l] | IC ₅₀ COX II [µg/ml] |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Carprofen | 40 | 10,95 | 50 | 13,68 |
| Diclofenac | 0,2 | 0,06 | 0,01 | 0,003 |
| Firocoxib | 28 | 9,59 | 0,1 | 0,03 |
| Flunixin-Meglumin | 0,06 | 0,03 | 0,2 | 0,1 |
| Ketoprofen | 0,005 | 0,001 | 0,2 | 0,05 |
| Meloxicam | 1 | 0,35 | 2,1 | 0,74 |

V DISKUSSION

V DISKUSSION

1 Literaturanalyse

Die hier durchgeführte Literaturanalyse erfolgte im Sinne einer Metaanalyse mit dem Ziel, die Evidenz der Nachweis- und Karenzzeiten von NSAID beim Pferd zu untersuchen.

1.1 Methodik

Die Beurteilung der ausgewerteten Primärstudien erfolgte mithilfe einer in dieser Arbeit entwickelten „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“. Dabei wurde die Evidenz der Untersuchungen ausschließlich in Hinblick auf die hier gewählte Fragestellung untersucht und bewertet, so dass die in dieser Arbeit getroffene Aussage zur Studienevidenz nicht verallgemeinert oder direkt auf andere Fragestellungen übertragen werden kann. Es wurden Publikationen berücksichtigt und ausgewertet, die mindestens zu drei Zeitpunkten nach der Wirkstoffanwendung Analysen von Wirkstoffkonzentrationen im Plasma- und/oder Urin je Pferd beinhalteten. Jedes Applikations- und Dosierungsschema musste dabei an mindestens zwei Pferden untersucht worden sein. Die unter diesen Kriterien ausgewählten Veröffentlichungen untersuchten damit nicht zwangsläufig die hier diskutierte Fragestellung, sondern verfolgten mitunter abweichende Ziele. Dadurch bedingt erfuhren diese Studien mitunter eine schlechtere Evidenzbewertung, da die ausgewählten Daten zur Veröffentlichung unter einem von der hier untersuchten Fragestellung abweichenden Gesichtspunkt vom Autor ausgewertet und selektiert wurden. Die Bewertung konnte in dieser Arbeit nur unter Berücksichtigung der veröffentlichten Daten und Informationen erfolgen. Sehr häufig mussten aufgrund

V DISKUSSION

des eingeschränkten Umfangs der veröffentlichten Informationen Abstriche bei der Bewertung der Evidenz vorgenommen werden. So konnte die Evidenz von Dissertationen häufig besser bewertet werden als beispielsweise die von *Proceedings*.

Die vier Aspekte „Pferde“, „Versuch“, „Analytik“ und „Auswertung“ wurden bei der Bewertung der Evidenz der Studien gleich stark gewichtet. Inwiefern die vier ausgewählten Aspekte jedoch tatsächlich die Evidenz der einzelnen Untersuchung im gleichen Ausmaß charakterisieren, ist nicht eindeutig zu belegen. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass eine gleichrangige Beurteilung der vier Aspekte allenfalls im Mittel auf die einzelnen Wirkstoffe zutreffend ist. Es muss angenommen werden, dass unterschiedliche Aspekte bei den jeweiligen Wirkstoffen mitunter eine andere Wichtigkeit erfahren. Beispielsweise könnte davon ausgegangen werden, dass durch eine Pferdehaltung in einer schlecht gesäuberten Strohbox bei Wirkstoffen mit guter oraler Bioverfügbarkeit und hoher Eliminationsrate über den Urin, die Ausscheidungszeit durch Rekontamination entscheidend verlängert wird. POPOT et al. (2011) zeigten dies am Beispiel von Flunixin-Meglumin. Demzufolge müsste bei der Untersuchung von Wirkstoffen wie Flunixin-Meglumin den Haltungsbedingungen eine größere Bedeutung zukommen, als dies bei Wirkstoffen mit geringer oraler Bioverfügbarkeit oder einer Ausscheidung in Form inaktiver Metaboliten notwendig erscheint. Ein weiteres Beispiel für einen Faktor, der die Evidenz einer Studie in unterschiedlichem Maße beeinflussen könnte, stellt die Probenaufbereitung und -lagerung nach der Probengewinnung da. SCHENK (2008) untersuchte die Wiederfindungsrate von Wirkstoffen unter verschiedenen Probenaufbereitungs-, Lagerungs- und Transportbedingungen mit dem Ergebnis, dass die

V DISKUSSION

Widerfindungsrate bei einigen Wirkstoffen durch diese Bedingungen beeinflusst wird und bei anderen nicht. Dies bedeutet, dass die Probenaufbereitung und -lagerung bei stabilen Wirkstoffen wie z.B. Flunixin-Meglumin den Wirkstoffnachweis kaum beeinflussen und somit bei der Bewertung der Evidenz vernachlässigt werden könnten. Bei weniger stabilen Stoffen hingegen – wie z.B. bei Meloxicam – wird der Wirkstoffnachweis durch die Probenaufbereitung und -lagerung verändert und damit die Aussagekraft der Studie zur Nachweiszeit entscheidend beeinflusst.

Jeder einzelne zu bewertende Aspekt wurde mit maximal drei zu erreichenden Punkten bewertet. Diese Skalierung erschien ausreichend und angemessen, um eine finale Kategorisierung in vier verschiedene Evidenzstufen der Studien vorzunehmen. Das Punktbewertungsschema ermöglichte, dass Defizite in einem Aspekt durch Vollständigkeit in anderen Bereichen ausgeglichen werden konnten. Demnach könnte eine Untersuchung mit einem vollständigen Defizit in einem Gesichtspunkt (z.B. keine Angaben zur verwendeten Analytik), unter vollständiger Erfüllung der „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“ in allen weiteren drei Aspekten, durchaus eine valide Aussage zu einer Nachweiszeit ermöglichen. Dieser Zusammenhang muss kritisch hinterfragt werden und stellt mitunter einen Schwachpunkt des verwendeten Bewertungssystems dar. Tatsächlich lag der beschriebene Fall allerdings in keiner der ausgewerteten Studien vor.

Untersuchungen von KLAUS et al. (1997) und KNYCH et al. (2014) erfuhren trotz fehlender Analyse von Urinkonzentrationen eine Einstufung in die Kategorie A. Begründet ist dies dadurch, dass eine fehlende Urinkonzentrationsanalyse lediglich einen Punktabzug im Aspekt „Versuch“ zur Folge hatte. Die Aussage zur Ausscheidungszeit kann in diesen Untersuchungen nur im Hinblick auf die reine

V DISKUSSION

Plasmaausscheidungszeit als valide bezeichnet werden. Bei Wirkstoffen mit einer geringen Urinausscheidungsrate, wie z.B. Firocoxib (LETENDRE et al. 2008), könnte auch ohne das Vorliegen von Urinausscheidungszeiten eine valide Aussage zur Nachweiszeit erfolgen. Beim Wirkstoff Metamizol, konnte nur aufgrund einer zweiten Untersuchung der Kategorie A, d.h. einer Untersuchung mit hoher Evidenz, eine valide Aussage zur Nachweiszeit getroffen werden. Da der aktive Hauptmetabolit 4-Methyl-Aminoantipyrin über eine hohe Urinausscheidungsrate verfügt (LEVENS 2005), wäre eine valide Aussage zur Nachweiszeit alleine auf Grundlage der Untersuchung von KLAUS et al. (1997), der lediglich den Konzentrationsverlauf im Serum untersuchte, nicht möglich gewesen.

1.2 Bewertung der Ergebnisse der Literaturanalyse

Mithilfe der vorliegenden Literaturanalyse zu Nachweis- und Karenzzeiten konnte bei vier von sieben in Deutschland für Pferde zugelassenen NSAID eine valide, sich an der Wirksamkeit orientierenden Nachweiszeit angegeben werden. Bei drei für das Pferd zugelassenen NSAID konnte dagegen keine valide Aussage getroffen werden. Für den zusätzlich untersuchten Wirkstoff Carprofen war die Angabe einer validen, sich an der Wirksamkeit orientierenden Nachweiszeit mithilfe der ausgewerteten Publikationen ebenfalls nicht möglich.

Der hier verfolgte Ansatz zur Bestimmung der Nachweiszeiten, die sich an der Wirksamkeit der Substanzen orientierten, entspricht den Vorgaben des EHSLC. Tabelle 51 beinhaltet eine Gegenüberstellung von den hier analysierten und vorgeschlagenen Nachweiszeiten und den angegebenen Nachweiszeiten des EHSLC.

V DISKUSSION

Das EHSLC veröffentlicht für alle untersuchten Wirkstoffe eine Nachweiszeit. Alle durch das EHSLC veröffentlichten Nachweiszeiten sind ein bis neun Tage länger als die hier ermittelten Zeiten. Die Ursache für diese Differenz könnte darin begründet liegen, dass in der vorliegenden Arbeit kein „Risikomanagement“ (siehe II 2.2.2.) durchgeführt wurde. Das bedeutet, die Nachweiszeiten der vorliegenden Arbeit berücksichtigten lediglich die Zeit bis zum Unterschreiten der niedrigsten berechneten IPC und IUC. Es erfolgte keine Anpassung und Umwandlung der ermittelten IPC und IUC in ein ESL bzw. HSL. Im Rahmen der Risikoanalyse des EHSLC erfolgt diese Umwandlung durch verbandspolitische Entscheidungen. Dabei kann anhängig von der verbandspolitischen Risikoeinschätzung für den jeweiligen Wirkstoff ein ESL bzw. HSL niedriger oder höher sein als die errechnete IPC bzw. IUC (TOUTAIN 2010b). Da die ESL bzw. HSL nicht veröffentlicht werden, könnte anhand der Ergebnisse dieser Literaturanalyse vermutet werden, dass eine Anpassung der IPC und ICU bei den hier untersuchten Wirkstoffen Firocoxib, Meloxicam, Metamizol und Phenylbutazon durch Aufrundung, d.h. Erhöhung der Konzentration erfolgte. Dadurch könnten beispielweise die vergleichsweise kürzeren Nachweiszeiten des EHSLC gegenüber den hier angegebenen Nachweiszeit erklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine abweichende zur Verfügung stehende Datengrundlage zur Bestimmung der Nachweiszeiten. Es ist denkbar, dass die Untersuchungen, auf denen die Nachweiszeiten des EHSLC beruhen, nicht veröffentlicht wurden oder nicht in dem Umfang veröffentlicht wurden, dass eine Literaturanalyse, wie Sie im hier durchgeführt wurde, zum gleichen Ergebnis kommt. Die Vermutung wird darin bestärkt, dass für vier Wirkstoffe vom EHSLC eine Nachweiszeit veröffentlicht wird, für die in dieser Untersuchung geschlussfolgert

V DISKUSSION

werden musste, dass keine ausreichende evidenzbasierte Datengrunde vorhanden war. Die mit Abstand größte Differenz zwischen der hier angegebenen Nachweiszeit und die des EHSLC betrifft den Wirkstoff Phenylbutazon. Die Erklärung hierfür liefert die Untersuchung von ORSZAG (2008), der die Nachweiszeit von Phenylbutazon in Abhängigkeit vom LOD untersuchte. Die berechnete IPC für Phenylbutazon rangierte zwischen 8 bis 18 ng/ml und die IUC betrug 2 bis 50 ng/ml. Unter Berücksichtigung der niedrigsten IUC beträgt die Nachweiszeit nach ORSZAG (2008) 16 Tage (LOD 10 ng/ml), wohingegen die Nachweiszeit für ein LOD von 50 ng/ml (höchste IUC) nach ORSZAG (2008) mit sieben Tage angegeben wird. Letztere entspricht der veröffentlichten Nachweiszeit des EHSLC.

Für Flunixin-Meglumin stand mit 29 Untersuchungen eine quantitativ sehr gute Datengrundlage zur Verfügung. Es gibt jedoch keine deutsch-, englisch- oder französischsprachige Untersuchung, die die in dieser Arbeit verwendete „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeit“ in vollem Umfang erfüllte. Die Angabe einer validen Nachweiszeit wäre auch auf Grundlage von mehreren sich ergänzenden und untereinander bestätigenden Studien der Kategorie B denkbar gewesen. Die für Flunixin-Meglumin mit B bewerteten Arbeiten kamen jedoch teils zu sehr gegensätzlichen Ergebnissen. Die Ursache für diese Differenzen konnte aufgrund der vorhandenen Informationen nicht ausgemacht werden. Somit konnte für Flunixin-Meglumin keine valide Nachweiszeit bestimmt werden.

Für die untersuchten NSAID aus der Gruppe der Arylpropionsäurederivate, Carprofen, Ketoprofen und Vedaprofen, bei denen es sich um chirale Substanzen handelt, konnten ebenfalls keine validen Nachweiszeiten mithilfe der ausgewerteten Veröffentlichungen abgeleitet werden. Derzeit existieren Untersuchungen mit hoher

V DISKUSSION

Evidenz zur enantioselektiven Pharmakokinetik und Pharmakodynamik dieser Substanzen, welche die Bestimmung der IPC und Plasmaausscheidungszeit ermöglichten. Es fehlen jedoch Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten dieser Wirkstoffe über den Urin. So konnten keine Urin-Plasma-Konzentrationsverhältnisse der Eliminationsphase bestimmt werden und infolgedessen konnte keine Berechnung der IUC erfolgen. Demnach war die Angabe einer validen Nachweiszeit für Carprofen, Ketoprofen und Vedaprofen nicht möglich.

Die Berechnung der IUC für Firocoxib und Flunixin-Meglumin erfolgte unter Verwendung eines geschätzten Mittelwertes von R_{ss} . Davon abweichend konnten bei der Berechnung der IUC für die Wirkstoffe Meloxicam, Metamizol und Phenylbutazon auch die in Untersuchungen angegebenen Streuungen des R_{ss} berücksichtigt werden. In Folge dessen verfügen die angegebenen IUC der drei letztgenannten Wirkstoffe über eine weitere Spannbreite und eine höhere Sicherheit. Der Grund für die Divergenz in der Berechnungsmethode lag in den unterschiedlich verfügbaren Datenqualitäten. Für Firocoxib und Flunixin-Meglumin wurden keine Streuungsmaße für R_{ss} in den ausgewerteten Untersuchungen angegeben. Grundsätzlich sollte aber davon ausgegangen werden, dass das R_{ss} über ausgesprochen hohe Streuungen verfügt und keinen fixen Faktor darstellt. Es gibt viele endogene und exogene Faktoren, die die Ausscheidung einer Substanz mit dem Urin beeinflussen. Dazu zählen beispielweise die interindividuelle Harnproduktion und Einflussfaktoren der renalen Durchflussrate, wie tageszeitliche Schwankungen, Stress, Dehydratation, Training, Wasser- und Futteraufnahme (GERKEN u. SAMS 1993; SAMS 1996). Neben dem Harnvolumen beeinflusst auch der pH-Wert im Urin die Urinkonzentration von NSAID (HOUSTON et al. 1985). MOSS u. HAYWOOD (1973) zeigten, dass die

V DISKUSSION

Ausscheidung von Phenylbutazon beim Pferd bei einem niedrigen Urin-pH-Wert (4,6-5,5) dreimal langsamer erfolgte als bei einem hohen Urin-pH-Wert (7,5-8,9). Demzufolge stellt Urin für den Nachweis von wirksamen Konzentrationen eine wenig geeignete Matrix da (TOUTAIN 2010b). Für den Nachweis von Dopingsubstanzen ist jedoch Urin als Untersuchungsmatrix vorzuziehen, da die in der Regel höheren Wirkstoffkonzentrationen im Urin einen längeren Nachweis ermöglichen als im Blut.

Tabelle 51: Zusammenfassung der Ergebnisse der Literaturanalyse sowie Gegenüberstellung der Nachweiszeiten dieser Arbeit und Nachweiszeiten nach EHSLC (2014b)

| Wirkstoff | Anzahl Studien | EPC [µg/ml] | IPC [ng/ml] | R _{ss} | IUC [ng/ml] | NWZ [d] | EHSLC NWZ [d] |
|-------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|---------|---------------|
| Carprofen | 9 | 3,5-10,8 | 7-22 | - | - | - | 11 |
| Firocoxib | 5 | 0,1 | 0,2-0,3 | 0,3 | 0,5-0,9 | 19 | 15 |
| Flunixin-Meglumin | 29 | 0,5-1 | 1-2 | 100 | 100-200 | - | 6 |
| Ketoprofen | 14 | 8-17 | 16-34 | - | - | - | 4 |
| Meloxicam | 9 | 0,3-1,1 | 0,6-2,2 | 13-18 | 0,9-40 | 5 | 3 |
| Metamizol | 2 | 28-86* | 60-170* | 8-49* | 790-4940* | 4 | 3 |
| Phenylbutazon | 49 | 4-9 | 8-18 | 0,2-3 | 2-50 | 16 | 7 |
| Vedaprofen | 1 | 1,2 | 2,4 | - | - | - | 4 |

* nach LEVENS (2005)

V DISKUSSION

1.3 Vergleich der berechneten Ausscheidungszeiten mit den Nachweiszeiten aus Ausscheidungsversuchen

Beim Vergleich der durch Extrapolation berechneten Ausscheidungszeit mit den Nachweiszeiten aus Ausscheidungsversuchen konnte festgestellt werden, dass die berechnete Ausscheidungszeit unter Berücksichtigung der gleichen Grenzkonzentration tendenziell kürzer war. Dies wurde besonders deutlich bei dem Wirkstoff Phenylbutazon. Während die berechnete Plasmaausscheidungszeit bis zum Erreichen der IPC von 8 ng/ml nach intravenöser Anwendung zwei bis sieben Tage betrug (siehe II 1.3.3.), konnte nach ORSZAG (2008) erst am elften Tag das LOD von 10 ng/ml von allen sechs untersuchten Pferden unterschritten werden. Die Ursache hierfür könnte in einer Ungenauigkeit, der zur Extrapolation verwendeten mittleren Halbwertszeit liegen. Für die in pharmakokinetischen Untersuchungen bestimmte Halbwertszeit von Phenylbutazon wurde in den ausgewerteten Untersuchungen durchschnittlich ein maximaler Zeitraum von 48 h berücksichtigt. Es könnte gemutmaßt werden, dass die Elimination zum Ende der Ausscheidung mit sinkender Wirkstoffkonzentration langsamer erfolgt. Diese Vermutung wird durch das Ergebnis der Untersuchung von ORSZAG (2008) unterstützt. Nach ORSZAG (2008) verändert sich die Nachweiszeit von Phenylbutazon nicht, wenn das LOD von 100 ng/ml auf 50 ng/ml im Urin halbiert wurde. Eine Reduzierung des LOD von 25 ng/ml auf 10 ng/ml verlängerte die Nachweiszeit von Phenylbutazon nach intravenöser Anwendung jedoch von 7 auf 16 Tagen im Urin und von 7 auf 11 Tagen im Plasma. Es kann geschlussfolgert werden, dass Ausscheidungsversuche im Hinblick auf die Fragestellung zur Nachweiszeit über eine größere Evidenz verfügen als die Berechnung der Ausscheidungszeit über Extrapolation.

V DISKUSSION

1.4 Anwendbarkeit des PK/PD Modells nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) für NSAID

Vor dem Hintergrund, die Analyseempfindlichkeit für den Nachweis von therapeutischen Wirkstoffen bei Doping- und Medikationskontrollen an die Wirksamkeit der Substanzen anpassen zu können, entwickelten TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ein PK/PD-Modell zur Bestimmung der IPC und IUC (siehe II 2.2.1.1.). Die Gültigkeit dieses PK/PD-Modells ist nur gegeben, wenn der pharmakologische Effekt der angewendeten Substanz systemisch und reversibel ist und mit der Plasmakonzentration korreliert. Bei zeitgleichem Einsatz mehrerer Substanzen ist die Anwendung des Modells schwierig.

Durch die Anwendung des PK/PD-Modells nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) bei der Berechnung der IPC und IUC in der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die geforderte systemische und reversible Wirksamkeit bei NSAID vorliegt und mit der Plasmakonzentration korreliert.

Aufgrund ihrer Eigenschaften verfügen NSAID über besondere pharmakokinetische Eigenschaften, die bei der Anwendung des PK/PD-Modells nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berücksichtigt werden sollten.

Alle NSAID, mit Ausnahme der Salicylate, verfügen über eine ausgesprochen hohe Proteinbindung (>90 %) (HANSON u. MADDISON 2008). Diese Eigenschaft scheint mitverantwortlich dafür zu sein, dass es trotz eines geringen Verteilungsvolumens zu einer Wirkstoffanreicherung und längeren Persistenz am Entzündungsort kommt (UNGEMACH 2006). Nach OWENS et al. (1995) war die Ketoprofen-Konzentration in entzündlich veränderter Synovialflüssigkeit 6,5-mal höher als die Konzentration in der Synovialflüssigkeit von gesunden Pferden. Insbesondere in der Eliminationsphase

V DISKUSSION

übersteigen die Wirkstoffkonzentrationen im Entzündungsexsudat die Plasmakonzentrationen. Nach HIGGINS et al. (1984) und LEES et al. (1991a) lag 24 h nach der systemischen Applikation von Phenylbutazon und Meloxicam ein Exsudat:Plasma-Wirkstoffkonzentrationsverhältnis von 1:3 vor; für Carprofen betrug dieses 48 h nach der Anwendung 1:853 (LEES et al. 1994).

Während der Wirkstoffspiegel im Plasma schnell abnimmt, erfolgt die Ausscheidung aus dem entzündlichen Kompartiment also nur langsam (LEES et al. 2004b). Nach LANDONI u. LEES (1995b) war die Halbwertszeit im entzündlichen Exsudat für Flunixin-Meglumin fast 5 mal und für S(+)-Ketoprofen sogar 15 mal größer als im Plasma. Aus diesem Grund verfügen NSAID trotz kürzerer Plasmahalbwertszeit über eine verhältnismäßig lange Wirkungsdauer (HIGGINS et al. 1984; LEES u. HIGGINS 1986a; LEES et al. 1991a; LANDONI u. LEES 1995b).

Zusammenfassend kann also angenommen werden, dass die Plasma-Wirkstoffkonzentration nicht zu jedem Zeitpunkt die therapeutische Aktivität widerspiegeln (HIGGINS et al. 1986; LEES et al. 2004b; UNGEMACH 2006; HANSON u. MADDISON 2008).

1.5 Von der Nachweiszeit zur Karenzzeit

Die meisten Pferdesportverbände und -organisationen beschränken sich bei der Risikokommunikation (siehe II 2.2.3.) auf die Angabe von Nachweiszeiten. Das heißt, es erfolgt lediglich die Veröffentlichung von Ausscheidungszeiten, die in Untersuchungen an wenigen Pferden unter Anwendung von routinemäßig eingesetzten und international standardisierten Analyseverfahren bestimmt werden konnten (TOUTAIN 2010b). Dabei stellt die Nachweiszeit die Ausscheidungszeit von

V DISKUSSION

dem Pferd dar, bei dem der Wirkstoff am längsten nachgewiesen werden konnte. Die Angabe der Nachweiszeit erfolgt somit ohne statistische Berücksichtigung von Streuungsmaßen und ohne die Beachtung von Variabilität, die von Abweichungen vom Versuchsprotokoll ausgehen könnten, wie z.B. abweichende Dosierung, Applikationsart, Galenik usw. Nach TOUTAIN (2010a) ist der größte Unsicherheitsfaktor bei der Festlegung einer Nachweiszeit biologischen Ursprungs. Insbesondere die Variabilität der Halbwertszeit eines Wirkstoffes bestimmt das Ausmaß der notwendigen Sicherheitsspanne zwischen Nachweis- und Karenzzeit. Die Variationskoeffizienten von Halbwertszeiten aus Untersuchungen, mit in dieser Arbeit hoch bewerteter Evidenz, lagen ungefähr zwischen 13-50 %. Dabei streuen die Variationskoeffizienten zwischen einzelnen Untersuchungen erheblich (Tabelle 52). Aus diesem Grund könnte die Ableitung von Karenzzeiten mithilfe von durchschnittlichen Streuungsmaßen nur mit geringer Evidenz erfolgen.

Tabelle 52: Variationskoeffizienten [%] der Halbwertszeit von Untersuchungen mit hoher Evidenz

| Untersuchung | Wirkstoff | Pferdeanzahl | Variationskoeffizient [%] |
|------------------------|---------------|--------------|---------------------------|
| KNYCH et al. (2014) | Firocoxib | 9 | 45 ^{°*} |
| TOUTAIN et al. (2004b) | Meloxicam | 8 | 35 [*] |
| LEVENS (2005) | Metamizol | 10 | 47 |
| KLAUS et al. (1997) | Metamizol | 7 | 31 [*] |
| AUTHIE et al. (2010) | Phenylbutazon | 8 | 22 ^{*#} |
| AUTHIE et al. (2010) | Phenylbutazon | 8 | 13 ^{*^} |

* berechneter Wert, anhand der veröffentlichten Daten, [°]intravenöse Wirkstoffanwendung, [#] ohne Training, [^] mit Training

V DISKUSSION

Die Ermittlung von Karenzzeiten nach TOUTAIN (2010a) und KIETZMANN u. DÜE (2009) (siehe II 2.2.3.2.) muss unter Berücksichtigung der Streuungsmaße der entsprechenden Untersuchung erfolgen. Diese komplexe statistische Transferleistung sollte von den Pferdesportverbänden und -organisationen erfolgen und nicht in die volle Verantwortung der behandelnden Tierärzte und/oder Aktiven (Reiter, Fahrer, Voltigierer usw.) gelegt werden.

2 *In-vitro*-Untersuchung

2.1 Methodik

In der *In-vitro*-Untersuchung wurde ein Vollblut-Assay zur Bestimmung der COX I- und COX II-Inhibition durch Carprofen, Diclofenac, Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam durchgeführt. Die dominierende wissenschaftliche Meinung ist, dass *In-vitro*-Vollblut-Assays zur Bestimmung der COX I- und COX II-Hemmung durch NSAID die tatsächliche *In-vivo*-Aktivität am besten widerspiegeln, da hier die gleiche Wirkstoff-Proteinbindung vorliegt, wie in natürlichen Körperflüssigkeiten (Lees 2002, McCann 2004).

Der Assay zur Bestimmung der COX I-Aktivität basiert auf der Bildung von TXB₂. Die in dieser Untersuchung erreichte TXB₂-Konzentration in der Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe von 27 ng ist vergleichbar mit den Werten von BRIDEAU et al. (2001) (26 ng/ml) und BUNTENKÖTTER (2012) (37 ng/ml).

Zur Bestimmung der COX II-Aktivität erfolgte eine Stimulation der PGE₂-Produktion durch die Anreicherung von Plasma mit 100 µg/ml LPS. Dadurch konnte die Plasmaausgangskonzentration von 0,2 ng/ml PGE₂ in der Negativkontrolle auf 4,5 ng/ml in der stimulierten Positivkontrolle erhöht werden. BRIDEAU et al. (2001)

V DISKUSSION

erreichten unter Verwendung eines identischen Versuchsprotokolls und der gleichen PGE₂-Ausgangskonzentration von 0,2 ng/ml eine 8fache PGE₂-Anreicherung. BUNTENKÖTTER (2012) erzielte wie in der vorliegenden Untersuchung nach der LPS-Stimulation eine vergleichbare PGE₂-Konzentration von 3,9 ng/ml.

Alle verwendeten NSAID lagen in Pulverform vor und wurden in DMSO entsprechend ihres Molekulargewichtes in Konzentrationen von 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 mmol/l gelöst. Dabei muss berücksichtigt werden, dass DMSO eine eigene Wirkung besitzt (SAEED et al. 1988). Die hier vorliegende Endkonzentration betrug in jedem Probenansatz weniger als fünf Prozent, so dass angenommen werden kann, dass keine Beeinträchtigung der COX I- und COX II-Aktivität durch DMSO vorlag (BRIDEAU et al. 2001).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die IC₅₀ zur vergleichenden Beurteilung der COX I- und COX II-Inhibition berechnet. Die Betrachtung der IC₈₀ kann mitunter zu abweichenden Ausprägungen der einzelnen COX I- und COX II-Selektivitäten führen. BERETTA et al. (2005) zeigten, dass die Untersuchung der IC₈₀ für Phenylbutazon und Flunixin-Meglumin eine größere COX II-Selektivität widerspiegelt als die IC₅₀, während für Meloxicam und Carprofen die COX II-Selektivität der IC₈₀ geringer war als die der IC₅₀. Die Ursache hierfür liegt in den unterschiedlichen Anstiegen der Inhibitionskurven der einzelnen Wirkstoffe im Pferdeblut. Nach STEPPA et al. (2002) und WARNER et al. (1999) ist für die klinische Wirksamkeit der Vergleich der COX I:COX II-*Ratio* auf Grundlage der IC₈₀ relevanter, da lediglich eine stark ausgeprägte COX II-Inhibition eine klinische Auswirkung mit sich bringt. In der hier vorliegenden Untersuchung ist jedoch die vergleichende Betrachtung der IC₅₀ mit der nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechneten EPC vorrangig.

V DISKUSSION

Nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) entspricht die EPC in etwa der EC_{50} und kann durch Division mit dem Faktor 50 in eine IPC umgewandelt werden. Zusätzlich sollte die interindividuelle Variabilität mit dem Faktor 10 berücksichtigt werden.

Die COX I- und COX II-Hemmung spiegelt nicht in jedem Fall das vollständige Wirkungspotential der einzelnen Wirkstoffe wider. Einige der untersuchten NSAID verfügen über weitere Wirkungsmechanismen, die für die klinische Wirksamkeit von Bedeutung sind (siehe II 1.4.). Nach LEES et al. (2002) verfügt Carprofen beispielweise in der klinisch wirksamen empfohlen Dosierung von 0,7 mg/kg lediglich über eine gering ausgeprägte COX I- und COX II-Hemmung.

2.2 Vergleich der Ergebnisse der *In-vitro*-Untersuchung mit Ergebnissen anderer Studien

Derzeit existieren vier weitere Untersuchungen, die mithilfe eines Vollblut-Assays die COX I- und COX II-Aktivität von unterschiedlichen NSAID beim Pferd untersuchten.

Für Flunixin-Meglumin lag die IC_{50} der COX I mit 0,06 $\mu\text{mol/l}$ etwas niedriger als die IC_{50} der COX II mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$. Die Untersuchung von BRIDEAU et al. (2001) lieferte identische Ergebnisse. Nach BERETTA et al. (2005) lag die IC_{50} der COX II mit 0,02 $\mu\text{mol/l}$ niedriger, wodurch sich eine COX II-Spezifität für Flunixin-Meglumin ergab.

BUNTENKÖTTER (2012) kalkulierte jeweils eine IC_{50} von 0,05 $\mu\text{mol/l}$ und konnte somit keine COX-Spezifität ausmachen. Die Angaben zur IC_{50} der COX II in den vier Untersuchungen unterlagen größeren Schwankungen als die der COX I (Tabelle 24).

Es wird vermutet, dass die LPS Stimulation einen zusätzlichen Unsicherheitsfaktor bei der Bestimmung der COX II-Aktivität darstellte und möglicherweise die vergleichsweise höheren Schwankungen darauf zurückzuführen sein könnten.

V DISKUSSION

Anhand der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass Flunixin-Meglumin *in vitro* eine potente COX I- und COX II-Hemmung auslöst. Aufgrund der größeren Schwankungen bei den angegebenen IC_{50} der COX II und hinsichtlich der geringen Differenz der IC_{50} der COX I und COX II werden unterschiedliche COX-Spezifitäten beschrieben.

Firocoxib verfügte in der durchgeführten *In-vitro*-Untersuchung über eine sehr ausgeprägte COX II-Spezifität. Die COX I konnte in den untersuchten Konzentrationen nur äußerst moderat gehemmt werden. Die hier ermittelten IC_{50} der COX I und COX II entsprechen den Werten anderer Untersuchungen (Tabelle 27) (MCCANN et al. 2002; EMA 2010, 2014).

Die Untersuchung von BERETTA et al. (2005) lieferte divergierende Ergebnisse von den in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte der COX I und COX II von Meloxicam (Tabelle 38). Ursächlich für die Abweichung in den Angaben zur IC_{50} der COX I könnte der in dieser Arbeit stattgefundene Datenausfall für die Konzentrationen 0,001 und 0,1 $\mu\text{mol/l}$ sein. Bedingt dadurch errechnete sich die hier angegebene IC_{50} aus den mittleren Inhibitionen von lediglich drei verschiedenen Konzentrationen und ist damit nur als Wert mit geringer Evidenz zu bewerten. Die Inhibition der COX II unterlag in der vorliegenden Untersuchung größeren Schwankungen und weicht in Teilen auch von einer zu erwartenden durchschnittlichen sigmoidalen Dosis-Wirkungsbeziehung ab. Hierfür könnten mutmaßlich die im Versuchsablauf beinhaltenden Unsicherheitsfaktoren, wie z.B. die LPS-Stimulation oder die Probenaufbereitung ursächlich beteiligt gewesen sein.

V DISKUSSION

Zu dem Wirkstoff Ketoprofen existieren derzeit keine vergleichbaren Untersuchungen zur *In-vitro*-Bestimmung der COX I- und COX II-Aktivität mittels Vollblut-Assay beim Pferd. LANDONI u. LEES (1995b) untersuchten *in vivo* den Verlauf der TXB₂- und PGE₂-Konzentrationen nach der Verabreichung von Ketoprofen mit dem Ergebnis einer EC₅₀ der COX I von 0,24 µmol/l und einer EC₅₀ der COX II von 0,22 µmol/l. Die so ermittelte EC₅₀ der COX II entspricht der hier ermittelten IC₅₀, wohingegen die IC₅₀ der COX I in der vorliegenden Untersuchung deutlich niedriger ausfiel (Tabelle 42). LANDONI u. LEES (1996) zeigten für S(+)-Ketoprofen eine intensivere Hemmung der COX I als der COX II. Demnach könnte eine mögliche Erklärung für die verschiedenen Angaben zur IC₅₀ der COX I beispielweise mit einer höheren S(+)-Ketoprofen-Konzentration *in vivo* erklärt werden. Nach JAUSSAUD et al. (1993) ist eine Inversion von R(-)- zu S(+)-Ketoprofen für eine Dominanz von S(+)-Ketoprofen *in vivo* verantwortlich. Zur Inversion von Ketoprofen *in vitro* liegen keine Untersuchungen vor. Aufgrund des abweichenden Versuchsablaufs kommen jedoch noch weitere mögliche Ursachen in Frage. Beide Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass Ketoprofen ein potenter COX I- und COX II-Inhibitor ist. LANDONI u. LEES (1995b) untersuchten zusätzlich weitere Wirkungsmechanismen, wie die Hemmung der β-Glucuronidase im Exsudat und die Reduzierung einer intradermalen Bradykinin-induzierten Schwellung durch Ketoprofen. Hierbei konnten zwar vergleichbare Werte für die IC₅₀ bestimmt werden, bei jedoch deutlich niedrigerem maximalem Effekt.

Die IC₅₀ der COX I- und COX II-Hemmung für Diclofenac betragen 0,06 µg/ml vs. 0,003 µg/ml und spiegeln damit eine geringe COX II-Spezifität wieder. Aufgrund von fehlenden pharmakodynamischen Untersuchungen zu Diclofenac beim Pferd ist

V DISKUSSION

keine vergleichende Auswertung der Daten möglich. Nach CALDWELL et al. (2004) und ANDERSON et al. (2005) konnten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der äußerlich lokalen Anwendung von 72 mg Diclofenac Serum- und Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden, die die hier ermittelte IC_{50} überstiegen. Infolgedessen könnte vermutet werden, dass neben der lokalen Wirksamkeit auch systemisch wirksame Konzentrationen erreicht werden.

Die für Carprofen gemessenen COX I- und COX II-Aktivitäten unterlagen großen Schwankungen und ergaben im Mittel keine zu erwartende sigmoidale Dosis-Konzentrationsbeziehung. Nach dem Vergleich der Angaben zur IC_{50} der COX I und COX II in anderen Untersuchungen konnten auch hier große Streuungen beobachtet werden (Tabelle 47). Die Angaben zur IC_{50} der COX I von Carprofen rangieren zwischen 0,48 $\mu\text{mol/l}$ und 50,89 $\mu\text{mol/l}$ und die IC_{50} der COX II wird mit 0,24 $\mu\text{mol/l}$ bis 15,6 $\mu\text{mol/l}$ angegeben (LEES et al. 2000; BERETTA et al. 2005). Eine mögliche Ursache für diese abweichenden Angaben könnte darin liegen, dass in den unterschiedlichen Untersuchungen sowie in den einzelnen Proben der jeweiligen Untersuchung verschiedene S(+):R(-)-Konzentrationsverhältnissen vorgelegen haben. LEES et al. (2000) zeigten eine deutlich höhere pharmakodynamische Aktivität für S(+)-Carprofen im Vergleich zur pharmakodynamischen Aktivität von R(-)-Carprofen. Zur Untersuchung der COX I- und COX II-Aktivität wurde im durchgeführten Vollblut-Assay ein 50:50 Gemisch beider Enantiomere verwendet. In welchem Ausmaß im Rahmen einer *In-vitro*-Untersuchung eine Inversion von Carprofen stattfindet und ob dies in jeder Probe mit gleicher Intensität erfolgt, ist unbekannt und stellt einen zusätzlichen Unsicherheitsfaktor bei der Untersuchung von chiralen Substanzen dar. Es könnte möglich sein, dass die Inversion in der

V DISKUSSION

vorliegenden Untersuchung nicht in jeder Probe mit gleicher Intensität stattgefunden hat und darin eine mögliche Ursache für die gemessenen Schwankungen liegt. Es wäre denkbar, dass geringere IC_{50} durch einen höheren Anteil S(+)-Carprofen bedingt worden sind.

Neben den bereits diskutierten gemessenen Schwankungen konnten für Carprofen jedoch im Mittel auch keine deutlichen COX I- und COX II-Hemmungen für die untersuchten Konzentrationen nachgewiesen werden. Nach LEES et al. (2002) wurden auch *in vivo* nach der intravenösen Applikation der klinisch wirksamen Dosierung von 0,7 mg/kg bei Pferden mit induzierter akuter Entzündung nur vergleichsweise geringe COX I und COX II-Hemmungen durch Carprofen ermittelt. LEES et al. (2002) schlussfolgerten, dass primär andere Wirkungsmechanismen für die klinische Wirksamkeit von Carprofen beim Pferd verantwortlich sein müssen.

3 Vergleich der berechneten EPC mit der IC_{50} bzw. EC_{50}

Nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechnet sich die EPC aus dem Quotienten von intravenöser Standarddosierung und totaler *Clearance* und entspricht der EC_{50} des Wirkstoffes. Vergleichende pharmakokinetische Untersuchungen zwischen gesunden Pferden und Pferden mit induzierter lokaler Entzündung kamen zu dem Ergebnis, dass lokale Entzündungen die Pharmakokinetik, insbesondere die *Clearance* von NSAID, signifikant beeinflussen. Nach MILLS et al. (1996) verfügte Phenylbutazon bei Pferde mit induzierter lokaler Weichteilentzündung über eine höhere *Plasmaclearance* und ein größeres Verteilungsvolumen als bei Pferden der Kontrollgruppe. OWENS et al. (1995) zeigten, dass die mittlere Plasmahalbwertszeit von Ketoprofen bei gesunden Pferden signifikant länger war als bei Pferden mit

V DISKUSSION

induzierter Synovitis. Die Ursache für diesen Effekt ist unbekannt (OWENS et al. 1995). Im Folgenden soll diskutiert werden, ob eine EPC, die sich aus der *Plasmaclearance* gesunder Pferde berechnet, ungefähr der EC_{50} des Wirkstoffes entspricht.

Da der primäre Wirkungsmechanismus der NSAID die Hemmung der COX I und COX II darstellt (KOLLIAS-BAKER 2004), könnte vermutet werden, dass die in einem Vollblut-Assay ermittelten IC_{50} der COX I und COX II repräsentative EC_{50} des molekularen Effektes der NSAID widerspiegeln. Tabelle 53 beinhaltet eine Gegenüberstellung der hier ermittelten IC_{50} und der auf pharmakokinetische Daten der Literaturanalyse basierenden berechneten EPC.

Für Firocoxib wurde der Vergleich der EPC mit der IC_{50} der COX II vorgenommen, da bei diesem Wirkstoff eine sehr ausgeprägte COX II-Spezifität vorliegt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dem die COX II hemmenden Effekt um den primären Wirkungsmechanismus von Firocoxib handelt. Bei den anderen untersuchten Wirkstoffen ist der Unterschied zwischen IC_{50} der COX I und COX II für einen ungefähren Vergleich mit der EPC nicht ausschlaggebend.

In der vorliegenden Untersuchung konnte für Carprofen lediglich eine IC_{50} von größer als 2,73 $\mu\text{g/ml}$ geschätzt werden, da für die hier untersuchten Konzentrationen keine 50 % COX I und COX II-Inhibition gemessen wurde. Die *in vitro* ermittelten IC_{50} der untersuchten Wirkstoffe sind durchschnittlich höher als die nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ermittelten EPC. Vergleicht man jedoch beispielsweise die EC_{50} von Flunixin-Meglumin und Phenylbutazon aus *In-vivo*-Untersuchungen, die statt des molekularen Effektes klinische Effekte des Wirkstoffes berücksichtigen, so kann eine Übereinstimmung dieser Werte gefunden werden. Nach TOUTAIN et al. (1994)

V DISKUSSION

betrug die EC_{50} für Flunixin-Meglumin bezogen auf die Schrittlänge bei induzierter Karpalgelenksarthritis $0,93 \mu\text{g/ml}$ und entspricht damit der EPC von $0,5-1 \mu\text{g/ml}$. Die auf gleicher Weise bestimmte EC_{50} für Phenylbutazon wurde mit $3,6 \mu\text{g/ml}$ angegeben (TOUTAIN et al. 1994) und ist damit der geringsten berechneten EPC von $4 \mu\text{g/ml}$ gleichzusetzen. Infolgedessen könnte mutmaßlich geschlussfolgert werden, dass die nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) ermittelten EPC sich im Mittel mehr am klinischen Effekt als am molekularen Effekt orientieren.

Tabelle 53: Vergleich der in einem Vollblut-Assay ermittelten IC_{50} der COX I und COX II mit der nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechneten EPC

| Wirkstoff | IC_{50} COX I [$\mu\text{g/ml}$] | IC_{50} COX II [$\mu\text{g/ml}$] | EPC [$\mu\text{g/ml}$] | Bewertung |
|-------------------|---|--|--------------------------|--------------------------------|
| Carprofen | >> 2,73 | >> 2,73 | 3,5-10,8 | $EPC \geq IC_{50}$ |
| Diclofenac | 0,06 | 0,003 | | |
| Firocoxib | 9,59 | 0,03 | 0,1 | $EPC > IC_{50 \text{ COX II}}$ |
| Flunixin-Meglumin | 0,03 | 0,1 | 0,5-1 | $EPC > IC_{50}$ |
| Ketoprofen | 0,001 | 0,05 | 8-17 | $EPC \gg IC_{50}$ |
| Meloxicam | 0,35 | 0,74 | 0,3-1,1 | $EPC \geq IC_{50}$ |

VI ZUSAMMENFASSUNG

Nicole Tabbert (2015)

Nachweis- und Karenzzeiten sowie *In-vitro*-Untersuchung zur Wirkung Nicht-steroidaler Antiphlogistika beim Pferd

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Überprüfung der Evidenz von Nachweis- und Karenzzeiten wichtiger NSAID beim Pferd auf Grundlage verfügbarer Publikationen. Darüber hinaus erfolgte eine *In-vitro*-Untersuchung zur Bestimmung der IC₅₀ der COX I und COX II für die Substanzen Carprofen, Diclofenac, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen und Meloxicam.

Die Überprüfung der Nachweis- und Karenzzeiten für die Substanzen Carprofen, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen, Meloxicam, Metamizol, Phenylbutazon und Vedaprofen erfolgte unter Anwendung einer Literaturanalyse von Primärstudien im Sinne einer Metaanalyse. Anhand einer, in dieser Arbeit entwickelten „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“, fand eine Klassifizierung der ausgewerteten Publikationen in einer von vier Evidenzkategorien statt. Unter der Berücksichtigung der nach TOUTAIN u. LASSOURD (2002) berechneten IPC und IUC, erfolgte die Berechnung und Analyse von Ausscheidungszeiten.

Die sich an der Wirksamkeit orientierende Nachweiszeit betrug für Firocoxib 19 Tage, für Meloxicam 5 Tage, für Metamizol 4 Tage und für Phenylbutazon 16 Tage. Für Flunixin-Meglumin existiert derzeit keine Publikation, die der in dieser Arbeit verwendete „Bewertungsgrundlage zur Untersuchung von Nachweiszeiten“ in vollem Umfang entspricht. Für die untersuchten NSAID aus der Gruppe der Arylpropionsäurederivate, Carprofen, Ketoprofen und Vedaprofen, existieren

VI ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen mit hoher Evidenz zur enantioselektiven Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Demzufolge war die Berechnung der IPC und Plasmaausscheidungszeit zwar möglich, zur Angabe von Nachweiszeiten fehlten jedoch valide Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten dieser Wirkstoffe über den Urin.

Darüber hinaus wurde in einer *In-vitro*-Untersuchung die Hemmung der COX I und COX II durch Carprofen, Diclofenac, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen und Meloxicam in den Konzentrationen 0,001 bis 10 µmol/l in einem Vollblut-Assay analysiert. Für Carprofen konnte nur eine moderate COX I- und COX II-Hemmung nachgewiesen werden. Diclofenac wies eine IC₅₀ der COX I von 0,2 µmol/l und der COX II von 0,01 µmol/l auf. Über eine ausgeprägte COX II-Spezifität verfügte Firocoxib mit einer IC₅₀ der COX I von 28 µmol/l und der COX II von 0,1 µmol/l. Für Flunixin-Meglumin berechnete sich die IC₅₀ der COX I mit 0,06 µmol/l und die der COX II mit 0,2 µmol/l. Die IC₅₀ der COX II für Ketoprofen entsprach der von Flunixin-Meglumin, wohingegen die IC₅₀ der COX I mit 0,005 µmol/l deutlich niedriger war. Für Meloxicam wurde eine IC₅₀ der COX I von 1 µmol/l und eine IC₅₀ der COX II von 2,1 µmol/l berechnet.

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die eliminationskinetischen Studien, die die Basis der durch die Pferdesportverbände und -organisationen angegebenen Nachweiszeiten darstellen, nicht vollständig publiziert sind. Die Veröffentlichung weiterer evidenz-basierter Untersuchungen erscheint notwendig, um valide, sich an der Wirksamkeit orientierende Nachweiszeiten für alle wichtigen NSAID beim Pferd angeben zu können.

VII SUMMARY

VII SUMMARY

Nicole Tabbert (2015)

Detection and withdrawal times and *in vitro* studies to investigate the effect for NSAID for horses

The aim of this study was to validate the evidence of detection and withdrawal times for essential NSAID for horses. Moreover for Carprofen, Diclofenac, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen and Meloxicam the IC₅₀ of COX I and COX II were determined *in vitro* by means of a whole blood assay.

Validation of detection and withdrawal times for Carprofen, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen, Meloxicam, Metamizol, Phenylbutazon and Vedaprofen were based on a literature analysis of primary studies according to a meta-analysis. In this study a “basis of evaluation to investigate detection times” was developed and used to range the publication in one of four categories of evidence. In consideration of IPC and IUC, which were calculated by TOUTAIN u. LASSOURD (2002), the time of drug elimination was calculated and analyzed. Detection times, which followed the efficiency of the drug, were 19 days for Firocoxib, 5 days for Meloxicam, 4 days for Metamizol and 16 days for Phenylbutazone. For Flunixin-Meglumin there was no study that met all criteria of the “basis of evaluation to investigate detection times”. There were evidenced-based studies of enantioselective pharmacokinetics and pharmacodynamics for Carprofen, Ketoprofen and Vedaprofen. They allowed calculating the IPC and the time of drug elimination in plasma. However no detection time can be assessed, because there were no evidence-based investigations of drug elimination in urine for these drugs. Furthermore in a pharmacodynamic *in vitro* study Carprofen, Diclofenac, Flunixin-Meglumin, Firocoxib, Ketoprofen and Meloxicam

VII SUMMARY

were given in the concentration range of 0,001 $\mu\text{mol/l}$ to 10 $\mu\text{mol/l}$ to whole blood of horses. The inhibition of COX I and COX II was determined by measuring coagulation-induced TXB_2 and lipopolysaccharide-induced PGE_2 concentration, respectively in an enzyme linked immunosorbent assay. Carprofen had only moderate potency to inhibit the COX I and COX II in the investigated concentrations. For Diclofenac the IC_{50} of COX I was 0,2 $\mu\text{mol/l}$ and of COX II the IC_{50} was calculated to be 0,01 $\mu\text{mol/l}$. It was shown that Firocoxib is a potent and selective inhibitor of COX II in whole blood of horses. IC_{50} of COX I and COX II was calculated to be 28 $\mu\text{mol/l}$ and 0,1 $\mu\text{mol/l}$, respectively. Concentrations of Flunixin-Meglumin that resulted in 50 % inhibition of COX I and COX II activity in vitro were 0,06 $\mu\text{mol/l}$ and 0,2 $\mu\text{mol/l}$, respectively. The IC_{50} of COX II for Ketoprofen can be compared with that for Flunixin-Meglumin, whereas the IC_{50} of COX I was much lower. It was calculated to be 0,005 $\mu\text{mol/l}$. Concentrations of Meloxicam that produced 50 % inhibition of COX I and COX II were 1 $\mu\text{mol/l}$ and 2,1 $\mu\text{mol/l}$, respectively.

In this study it was shown that kinetic studies of drug elimination, which are the basis of detection times from equine sports federations and -organizations were not published completely. Further publications of evidence-based investigations are required to specify detection times for all NSAID for horses, which are validated and follow the efficiency of the drug.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

VIII LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, D., C. KOLLIAS-BAKER, P. COLAHAN, R. KEENE, R. LYNN u. D. HEPLER (2005): Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses.
Vet Ther 6, 57-66

ANFOSSI, P., R. VILLA, C. MONTESISSA u. S. CARLI (1997): Intramuscular bioavailability of ketoprofen lysine salt in horses.
Vet Quarterly 19, 65-68

ARAUJO, A. C., M. C. SALVADORI, M. E. VELLETRI u. M. M. CAMARGO (1990): Influence of furosemide on the detection of flunixin meglumine in horse urine samples.
J Anal Toxicol 14, 146-148

ARCI (2014a): Racing Commissioners International.
<http://arcicom.businesscatalyst.com/>
Stand 15.07.2014

ARCI (2014b): Uniform Classification Guidelines for Foreign Substances and Recommended Penalties and Model Rule January 2014.
<http://arcicom.businesscatalyst.com/assets/uniform-classification-guidelines%2c-version-07-00.pdf>
Stand 16.07.2014

ARLT, S. (2013): Untersuchungen zur Einbindung der Evidenzbasierten Reproduktionsmedizin in die veterinärmedizinische Lehre und Praxis.
Berlin, Freie Univ. Fachber. Veterinärmed., Habil.-Schr.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

ARMSTRONG, S. u. P. LEES (2002): Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNF- α by equine chondrocytes and synoviocytes.

J Vet Pharmacol Ther 25, 145-153

ARMSTRONG, S., P. TRICKLEBANK, A. LAKE, S. FREAN u. P. LEES (1999): Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in equine plasma and synovial fluid – a comparison with ketoprofen.

J Vet Pharmacol Ther 22, 196-201

AUER, D. E. (1992): Administration of Therapeutic Substances in the Performance Horse.

Aust Equine Vet 10(2), 67-71

AUTHIE, E. C., P. GARCIA, M. A. POPOT, P. L. TOUTAIN u. M. DOUCET (2010): Effect of an endurance-like exercise on the disposition and detection time of phenylbutazone and dexamethasone in the horse: application to medication control.

Equine Vet J 42, 240-247

BERETTA, C., G. GARAVAGLIA u. M. CAVALLI (2005): COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis.

Pharmacol Res 52, 302-306

BOGAN, J., A. GALBRAITH, P. BAXTER, N. ALI u. S. MARRINER (1984): Effect of feeding on the fate of orally administered phenylbutazone, trimethoprim and sulphadiazine in the horse.

Vet Rec 115, 599-600

BRIDEAU, C., C. VAN STADEN u. C. C. CHAN (2001): In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats.

Am J Vet Res 62, 1755-1760

VIII LITERATURVERZEICHNIS

BRINK, P., F. DEGRAVES, W. R. RAVIS, D. JOHANSEN, J. D. CAMPBELL u. S. H. DURAN (1998): Stereospecific pharmacokinetics of free and protein-bound ketoprofen in serum and synovial fluid of horses after intravenous and intramuscular administration.

Am J Vet Res 59, 739-743

BRUCE, R. B., W. R. MAYNARD u. L. K. DUNNING (1974): Oxyphenbutazone and phenylbutazone determination in plasma and urine by GLC.

J Pharm Sci 63, 446-448

BUNTENKÖTTER, K. (2012): Untersuchung zur Pharmakokinetik von Salicylsäure nach oraler Applikation von Acetylsalicylsäure beim Pferd.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

CALDWELL, F. J., P. E. MUELLER, R. C. LYNN u. S. C. BUDSBERG (2004): Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses.

Am J Vet Res 65, 271-276

CAO, C., K. MATSUMURA, K. YAMAGATA u. Y. WATANABE (1998): Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor.

Brain Res Mol Brain Res 56, 45-56

CAYMAN-CHEMICAL-COMPANY (2013a): Kit Booklet Thromboxane B₂ Express EIA Kit - Monoclonal. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI

CAYMAN-CHEMICAL-COMPANY (2013b): Kit Booklet Prostaglandin E₂ Express EIA Kit. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI

VIII LITERATURVERZEICHNIS

CHANDRASEKHARAN, N. V., H. DAI, K. L. T. ROOS, N. K. EVANSON, J. TOMSIK, T. S. ELTON u. D. L. SIMMONS (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression.

Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 13926-13931

CHAY, S., W. E. WOODS, T. NUGENT, J. W. BLAKE u. T. TOBIN (1982): The pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the horse: flunixin meglumine (Banamine).

Equine Pract 4, 16-23

CHAY, S., W. E. WOODS, T. E. NUGENT, T. WECKMAN, T. HOUSTON, F. SPRINKLE, J. W. BLAKE, T. TOBIN, L. R. SOMA, J. YOCUM u. J. D. SMITH (1984): Population distributions of phenylbutazone and oxyphenbutazone after oral and i.v. dosing in horses.

J Vet Pharmacol Ther 7, 265-276

CHENG, Z., Q. A. MCKELLAR, A. NOLAN u. P. LEES (1996): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of phenylbutazone and oxyphenbutazone in the donkey.

J Vet Pharmacol Ther 19, 149-151

CHITTENDEN, J. (2011): Study Design and Data Analysis.

In: RIVIERE, J.E. (Hrsg.): Comparative Pharmacokinetics, Principles, Techniques & Applications

Wiley-Blackwell, UK, S. 295-313

CHRISTENSEN, J., L. BLYTHE u. A. CRAIG (1985): Effects of oral cimetidine on plasma concentrations of phenylbutazone in horses.

J Vet Pharmacol Ther 8, 404-412

VIII LITERATURVERZEICHNIS

COAKLEY, M., K. E. PECK, T. S. TAYLOR, N. S. MATTHEWS u. K. L. MEALEY (1999): Pharmacokinetics of flunixin meglumine in donkeys, mules, and horses. Am J Vet Res 60, 1441-1444

COLAHAN, P. T., J. E. BAILEY, C. C. CHOU, M. JOHNSON, B. L. RICE, G. L. JONES u. J. P. CHEEKS (2002): Effect of flunixin meglumine on selected physiologic and performance parameters of athletically conditioned thoroughbred horses subjected to an incremental exercise stress test. Vet Ther 3, 37-48

CORVELEYN, S., P. DEPREZ, G. WEKEN, W. BAEYENS u. J. P. REMON (1996): Bioavailability of ketoprofen in horses after rectal administration. J Vet Pharmacol Ther 19, 359-363

COX, S., L. DUDENBOSTEL, C. SOMMARDAHL, J. YARBROUGH, M. SALEH u. T. DOHERTY (2012): Pharmacokinetics of firocoxib and its interaction with enrofloxacin in horses. J Vet Pharmacol Ther 35, 615-617

COX, S., N. VILLARINO, C. SOMMARDAHL, V. KVATERNICK, C. ZARABADIPOUR, L. SIGER, J. YARBROUGH, A. AMICUCCI, K. REED, D. BREEDING u. T. DOHERTY (2013): Disposition of firocoxib in equine plasma after an oral loading dose and a multiple dose regimen. Vet J 198, 382-385

CPMA (1997): Analytical Methodology for Detection and Conformation of Drugs in equine Body fluids. Canadian-Pari-Mutuel Agency, Canada

CPMA (2014): Schedule of Drugs 2011
http://www.equinecanada.ca/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=5588&Itemid=88&lang=en

Stand 21.07.2014

VIII LITERATURVERZEICHNIS

DELATOUR, P., F. GARNIER u. R. MAIRE (1996): Enantiosélectivité de l'excrétion des glucuronides du carprofène chez l'homme, le chien et le cheval.

Bull Acad Natle Méd 180, 1565-1572

DELBEKE, F., L. VYNCKIER u. M. DEBACKERE (1993): The disposition of suxibuzone in the horse.

J Vet Pharmacol Ther 16, 283-290

DERENDORF, H., T. GRAMATTÉ, H. G. SCHÄFER u. A. STAAB (2011): Strategie bei der Untersuchung pharmakokinetischer Eigenschaften bei Arzneimitteln.

In: DERENDORF, H., T. GRAMATTÉ, H. G. SCHÄFER u. A. STAAB (Hrsg.):

Pharmakokinetik kompakt, Grundlagen und Praxisrelevanz

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 348-355

DUMASIA, M. C., S. BRUCE u. E. SCHOFIELD (2002): Detection of COX-2 selective NSAIDs: Biotransformation and identification of In Vivo metabolites of Meloxicam in equine urine.

In: 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Florida, 343-348

DVR (2014): Rennordnung (RO) In der Neufassung vom 1. Januar 1991 mit Änderungen bis Dezember 2009

http://www.nam.de/Rennordnung2009_12.pdf

Stand 21.07.2014

DYKE, T. M., R. A. SAMS u. S. B. COSGROVE (1997): Disposition of flunixin after intramuscular administration of flunixin meglumine to horses.

J Vet Pharmacol Ther 20, 330-332

EHSLC (2014a): European Horserace Scientific Liaison Committee

<https://www.ehslc.com/>

Stand 15.07.2014

VIII LITERATURVERZEICHNIS

EHSLC (2014b): EHSLC Detection Times

https://www.ehslc.com/images/uploads/documents/DETECTION_TIMES_EHSLC_header_270813.pdf

Stand 21.07.2014

EHSLC (2014c): The Science behind this work

<https://www.ehslc.com/detection-times/the-science-behind-this-work>

Stand 19.11.2014

EMA (2010): Scientific Discussion

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000142/WC500065936.pdf

Stand 11.11.2014

EMA (2014): Anhang I Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels

http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000142/WC500065939.pdf

Stand 11.11.2014

EMA (2015): Committee for Veterinary Medical Products Carprofen Summary Report

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011412.pdf

Stand 23.02.2015

FEI (2014a): Veterinary Regulations 13th Edition 2013

<http://www.fei.org/fei/regulations/veterinary>

Stand 21.07.2014

FEI (2014b): FEI List of Detection Times Stand 27.08.2013

http://www.feicleansport.org/Detection_Times_Lab.pdf

Stand 21.07.2014

VIII LITERATURVERZEICHNIS

FINOCCHIO, E. J., F. J. OZOG, F. W. OEHME, J. H. JOHNSON u. G. W. OSBALDISTON (1970): Detection of phenylbutazone and oxyphenbutazone in the urine of thoroughbreds.

J Am Vet Med Assoc 156, 454-456

FN (2014b): Listen der verbotenen Substanzen und Methoden Stand 06.12.2012

<http://www.pferd-aktuell.de/shop/index.php/cat/c114#20606>

Stand 21.07.2014

FN (2014c): Erlaubte Substanzen und Substanzen mit empfohlenen Karenzzeiten

<http://www.pferd-aktuell.de/shop/index.php/cat/c105#20605>

Stand 21.07.2014

FOREMAN, J. H., A. BARANGE, L. M. LAWRENCE u. L. L. HUNGERFORD (2008): Effects of single-dose intravenous phenylbutazone on experimentally induced, reversible lameness in the horse.

J Vet Pharmacol Ther 31, 39-44

FOREMAN, J. H., B. E. BERGSTROM, K. S. GOLDEN, J. J. ROARK, D. S. COREN, C. R. FOREMAN u. S. A. SCHUMACHER (2012): Dose titration of the clinical efficacy of intravenously administered flunixin meglumine in a reversible model of equine foot lameness.

Equine Vet J Suppl 44, 17-20

FU, J. Y., J. L. MASFERRER, K. SEIBERT, A. RAZ u. P. NEEDLEMAN (1990): The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes.

J Biol Chem 265, 16737-16740

GERKEN, D. F. u. R. A. SAMS (1985): Inhibitory effects of intravenous chloramphenicol sodium succinate on the disposition of phenylbutazone in horses. J Pharmacokinet Biopharm 13, 467-476

VIII LITERATURVERZEICHNIS

GERKEN, D. F. u. R. A. SAMS (1988): Pharmacokinetics of oxyphenbutazone in horses.

J Vet Pharmacol Ther 11, 283-287

GERKEN, D. F. u. R. A. SAMS (1993): Factors affecting drug withholding time estimates in horses.

Vet Clin North Am Equine Pract 9, 461-479

GERRING, E., P. LEES u. J. TAYLOR (1981): Pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolites in the horse.

Equine Vet J 13, 152-157

GIULIANO, E. A. (2004): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 34, 707-723

HANSON, P. D. u. J. E. MADDISON (2008): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chondroprotective agents.

In: MADDISON, J. E., S. W. PAGE u. D. B. CHURCH (Hrsg.): Small Animal Clinical Pharmacology

Saunders Elsevier, USA, S. 287-308

HIGGINS, A. J., P. LEES u. J. B. TAYLOR (1984): Influence of phenylbutazone on eicosanoid levels in equine acute inflammatory exudate.

Cornell Vet 74, 198-207

HIGGINS, A. J., P. LEES, J. B. TAYLOR u. C. P. EWINS (1986): Flunixin meglumine: quantitative determination in and effects on composition of equine inflammatory exudate.

Br Vet J 142, 163-169

VIII LITERATURVERZEICHNIS

HOUDESHELL, J. W. H., P.W. (1977): A new nonsteroidal, anti inflammatory analgesic for horses.

J Equine Med Surg 1, 57-63

HOUSTON, T., S. CHAY, W. E. WOODS, G. COMBS, S. KAMERLING, J. W. BLAKE, A. G. EDMUNDSON, R. VESSINEY u. T. TOBIN (1985): Phenylbutazone and its metabolites in plasma and urine of thoroughbred horses: population distributions and effects of urinary pH.

J Vet Pharmacol Ther 8, 136-149

HVT (2014): Satzungen und Ordnungen des HVT Stand 1. Mai 2013

[http://hvt.de/web/home.nsf/Download/TRO_01052013.pdf/\\$File/TRO_01052013.pdf](http://hvt.de/web/home.nsf/Download/TRO_01052013.pdf/$File/TRO_01052013.pdf)

Stand 21.07.2014

IFHA (2014): International Agreement on Breeding, Racing and Wagering

11. April 2014

<http://www.ifhaonline.org>

Stand 15.07.2014

IHRC (2014a): Indiana Horse Racing Commission 2013 Medication Withdrawal

Times Stand 14.08.2013

http://www.in.gov/hrc/files/Medication_2013_Withdrawal_Times.pdf

Stand 21.07.2014

IHRC (2014b): Indiana Administrative Code Article 8. Human and Equine Health

http://www.in.gov/legislative/iac/iac_title?iact=71&iaca=8

Stand 21.07.2014

JARAIZ, V., C. RODRIGUEZ, M. D. SAN ANDRES, F. GONZALEZ u. S. A. M. I.

(1999b): Pharmacokinetics and bioequivalence of two suxibuzone oral dosage forms in horses.

J Vet Pharmacol Ther 22, 247-254

VIII LITERATURVERZEICHNIS

JARAIZ, V., C. RODRIGUEZ, M. D. SAN ANDRES, F. GONZALEZ u. M. I. SAN ANDRES (1999a): Disposition and tolerance of suxibuzone in horses. *Equine Vet J* 31, 411-416

JAUSSAUD, P., C. BELLON, S. BESSE, D. COURTOT u. P. DELATOUR (1993): Enantioselective pharmacokinetics of ketoprofen in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 16, 373-376

JAUSSAUD, P., D. COURTOT, P. DORON u. J. L. GUYOT (1985): Chronopharmacocinétique de la phénylbutazone chez le cheval. Application au contrôle antidopage. *Ann Rech Vét* 16, 385-391

JAUSSAUD, P., D. COURTOT, J. L. GUYOT u. J. PARIS (1987): Identification of a flunixin metabolite in the horse by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 423, 123-130

JENNY, E., V. W. STEINIJANS u. P. SEIFERT (1979): Pharmacokinetic interaction of isopropylaminophenazone and phenylbutazone in the horse. *J Vet Pharmacol Ther* 2, 101-108

JENSEN, R. C., J. H. FISCHER u. M. J. CWIK (1990): Effect of age and training status on pharmacokinetics of flunixin meglumine in thoroughbreds. *Am J Vet Res* 51, 591-594

JOHNSON, C., P. TAYLOR, S. YOUNG u. J. BREARLEY (1993): Postoperative analgesia using phenylbutazone, flunixin or carprofen in horses. *Vet Rec* 133, 336-336

KIETZMANN, M. (1983): Einführung in die Kinetik für die Praxis. *Prakt Tierarzt* 7, 577-584

VIII LITERATURVERZEICHNIS

KIETZMANN, M. u. M. DÜE (2009): Welche Arzneimittel benötigt der Tierarzt zeitnah zum Turniereinsatz aus pharmakologischer Sicht? Konsequenzen für das Reglement am Beispiel der „Medicine Box“.

Pferdeheilkunde 4, 322-326

KIETZMANN, M., M. DÜE, T. WEINBERGER u. M. MACHNIK (2006):

Überlegungen zur Abschätzung von Karenzzeiten bei Sportpferden.

Pferdespiegel 9, 107-109

KIM, J. Y., S. J. KIM, K.-J. PAENG u. B. C. CHUNG (2001): Measurement of ketoprofen in horse urine using gas chromatography-mass spectrometry.

J Vet Pharmacol Therap 24, 315-319

KLAUS, A.-M., Y. SCHLINGLOFF, U. KLEINITZ, M. BÖTTCHER u. H.-J. HAPKE (1997): Pharmacokinetic study of dipyrone metabolite 4-MAA in the horse and possible implications for doping control.

J Vet Pharmacol Ther 20, 204-208

KLUGE, K. u. F. R. UNGEMACH (1999): Doping im Pferdesport.

In: DIETZ, O. u. B. HUSKAMP (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis,

Enke Verlag, Stuttgart, S. 60-77

KNYCH, H., S. STANLEY, R. ARTHUR u. M. MITCHELL (2014): Detection and pharmacokinetics of three formulations of firocoxib following multiple administrations to horses.

Equine Vet J 1-5

KOLLIAS-BAKER, C. (2004): Non-steroidal anti-inflammatory drugs.

In: BRETONE, J. J. u. L. J. I. HORSPOOL (Hrsg.): Equine Clinical Pharmacology,

SAUNDERS, Philadelphia, USA, S. 247-266

VIII LITERATURVERZEICHNIS

KROMIDAS, S. (2011): Handbuch Validierung in der Analytik.
Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland

KUJUBU, D. A., B. S. FLETCHER, B. C. VARNUM, R. W. LIM u. H. R. HERSCHMAN (1991): TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue.
J Biol Chem 266, 12866-12872

KVATERNICK, V., M. POLLMEIER, J. FISCHER u. P. D. HANSON (2007): Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses.
J Vet Pharmacol Ther 30, 208-217

LANDONI, M. F. u. P. LEES (1995a): Influence of formulation on the pharmacokinetics and bioavailability of racemic ketoprofen in horses.
J Vet Pharmacol Ther 18, 446-450

LANDONI, M. F. u. P. LEES (1995b): Comparison of the anti-inflammatory actions of flunixin and ketoprofen in horses applying PK/PD modelling.
Equine Vet J 27, 247-256

LANDONI, M. F. u. P. LEES (1996): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse.
J Vet Pharmacol Ther 19, 466-474

LANDUYT, J., F. DELBEKE u. M. DEBACKERE (1993): The intramuscular bioavailability of a phenylbutazone preparation in the horse.
J Vet Pharmacol Ther 16, 494-500

VIII LITERATURVERZEICHNIS

LEES, P. (2009): Analgesic, antiinflammatory, antipyretic drugs.

In: RIVIERE, J. E. u. M. G. PAPICH (Hrsg.): Veterinary Pharmacology and Therapeutics

Wiley-Blackwell, New Jersey, S. 457-486

LEES, P., F. S. ALIABADI u. M. F. LANDONI (2002): Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of racemic carprofen in the horse.

J Vet Pharmacol Ther 25, 433-448

LEES, P., P. DELATOUR, E. BENOIT u. A. P. FOSTER (1991b): Pharmacokinetics of carprofen enantiomers in the horse.

Acta Vet Scand Suppl 87, 251-253

LEES, P., C. P. EWINS, J. B. TAYLOR u. A. D. SEDGWICK (1987a): Serum thromboxane in the horse and its inhibition by aspirin, phenylbutazone and flunixin.

Br Vet J 143, 462-476

LEES, P. u. A. J. HIGGINS (1985a): Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse.

Equine Vet J 17, 83-96

LEES, P. u. A. J. HIGGINS (1986a): Effects of a phenylbutazone paste in ponies: model of acute nonimmune inflammation.

Am J Vet Res 47, 2359-2363

LEES, P., A. J. HIGGINS, I. C. MAWHINNEY u. D. S. REID (1986b): Absorption of phenylbutazone from a paste formulation administered orally to the horse.

Res Vet Sci 41, 200-206

LEES, P., M. F. LANDONI, S. ARMSTRONG u. S. FREAN (2000): New insights into inflammation with particular reference to the role of COX enzymes.

In: 8th EAVPT International Congress, Jerusalem, J Vet Pharmacol Ther (Suppl),

VIII LITERATURVERZEICHNIS

LEES, P., M. F. LANDONI, J. GIRAUDEL u. P. L. TOUTAIN (2004b):

Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest.

J Vet Pharmacol Ther 27, 479-490

LEES, P., T. E. MAITHO u. J. B. TAYLOR (1985b): Pharmacokinetics of phenylbutazone in two age groups of ponies: a preliminary study.

Vet Rec 116, 229-232

LEES, P., S. A. MAY, M. HOEIJMAKERS, A. COERT u. P. V. RENS (1999):

A pharmacodynamic and pharmacokinetic study with vedaprofen in an equine model of acute nonimmune inflammation.

J Vet Pharmacol Ther 22, 96-106

LEES, P., Q. MCKELLAR, S. A. MAY u. B. LUDWIG (1994): Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the horse.

Equine Vet J 26, 203-208

LEES, P., A. D. SEDGWICK, A. J. HIGGINS, K. E. PUGH u. U. BUSCH (1991a):

Pharmacodynamics and pharmacokinetics of miloxicam in the horse.

Brit Vet J 147, 97-108

LEES, P., J. B. TAYLOR, A. J. HIGGINS u. A. D. SEDGWICK (1988): In vitro and in vivo binding of phenylbutazone and related drugs to equine feeds and digesta.

Res Vet Sci 44, 50-56

LEES, P., J. B. TAYLOR, A. J. HIGGINS u. S. C. SHARMA (1986c): Phenylbutazone and oxyphenbutazone distribution into tissue fluids in the horse.

J Vet Pharmacol Ther 9, 204-212

VIII LITERATURVERZEICHNIS

LEES, P., J. B. TAYLOR, T. E. MAITHO, J. D. MILLAR u. A. J. HIGGINS (1987b): Metabolism, excretion, pharmacokinetics and tissue residues of phenylbutazone in the horse.

Cornell Vet 77, 192-211

LEHMANN, W., H. J. WINTZER u. H. H. FREY (1981): Kinetik einiger analgetisch-antiinflammatorischer Arzneimittel in Serum und Synovia beim Pferd.

Dtsch Tierärztl Wochenschr 88, 209-260

LETENDRE, L. T., R. K. TESSMAN, S. R. MCCLURE, V. J. KVATERNICK, J. B. FISCHER u. P. D. HANSON (2008): Pharmacokinetics of firocoxib after administration of multiple consecutive daily doses to horses.

Am J Vet Res 69, 1399-1405

LEVENS, H. (2005): Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Arzneistoffes Metamizol hinsichtlich der Dopingrelevanz beim Pferd.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

MACHNIK, M. (2014): laut persönlicher Mitteilung Sporthochschule Köln, Institut für Biochemie, Warendorf.

MAHMOOD, K. T. u. M. ASHRAF (2010): Pharmacokinetics of ecofriendly Meloxicam in healthy horses.

Pakistan J Sci 62, 198-201

MAITHO, T., P. LEES u. J. TAYLOR (1986): Absorption and pharmacokinetics of phenylbutazone in Welsh Mountain ponies.

J Vet Pharmacol Ther 9, 26-39

MAYLIN, G. A. (1974): Disposition of phenylbutazone in the horse.

In: 20th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Las Vegas, 243-248

VIII LITERATURVERZEICHNIS

MCCANN, M. E., C. BRIDEAU, W. C. BLACK, D. ZHANG u. G. J. HICKEY (2002):
In vitro activity and in vivo efficacy of a novel COX-2 inhibitor in the horse.

Proceedings of the academy of Veterinary Internal Medicine. Abstract 114, 789

MCKELLAR, Q., J. BOGAN, R. FELLEBERG, B. LUDWIG u. G. CAWLEY (1991):
Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse.

Equine Vet J 23, 280-284

MEALEY, K., N. MATTHEWS, K. PECK, A. RAY u. T. TAYLOR (1997): Comparative
pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in clinically
normal horses and donkeys.

Am J Vet Res 58, 53-55

MEALEY, K. L., N. S. MATTHEWS, K. E. PECK, M. L. BURCHFIELD, B. S.
BENNETT u. T. S. TAYLOR (2004): Pharmacokinetics of R (-) and S (+) carprofen
after administration of racemic carprofen in donkeys and horses.

Am J Vet Res 65, 1479-1482

MILLS, P., J. NG u. D. AUER (1996): The effect of inflammation on the disposition of
phenylbutazone in thoroughbred horses.

J Vet Pharmacol Ther 19, 475-481

MOHAMMED, H. O. (1991): Phenylbutazone and Flunixin Meglumine: Establishing
Maximum Allowed Levels for American Horse Shows Association Rules.

In: 37th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners San
Francisco, California, 47-59

MOORE, J. N., H. E. GARNER, J. E. SHAPLAND u. D. G. HATFIELD (1981):
Prevention of endotoxin-induced arterial hypoxaemia and lactic acidosis with flunixin
meglumine in the conscious pony.

Equine Vet J 13, 95-98

VIII LITERATURVERZEICHNIS

MOSS, M. u. P. HAYWOOD (1973): Persistence of phenylbutazone in horses producing acid urines.

Vet Rec 93, 124-125

NOBLE, G., S. EDWARDS, J. LIEVAART, J. PIPPIA, R. BOSTON u. S. RAIDAL (2012): Pharmacokinetics and safety of single and multiple oral doses of meloxicam in adult horses.

J Vet Intern Med 26, 1192-1201

NORHEIM, G., R. HØIE, A. FRØSLIE u. T. BERGSJØ (1978): Gas-chromatographic determination of small amounts of phenylbutazone and oxyphenbutazone in horse plasma and urine.

Fresenius J Anal Chem 289, 287-288

ORSZAG, A. (2008): Cinétiques d'élimination plasmatique et urinaire de la phénylbutazone chez le cheval dans le cadre de la lutte anti-dopage: Application au contrôle des médicaments.

Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire, Diss.

OWENS, J., S. KAMERLING u. S. BARKER (1995): Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis.

J Vet Pharmacol Ther 18, 187-195

PELLEGRINI-MASINI, A., R. H. POPPENGA u. R. W. SWEENEY (2004): Disposition of flunixin meglumine injectable preparation administered orally to healthy horses.

J Vet Pharmacol Ther 27, 183-186

PIPERNO, E., D. J. ELLIS, S. M. GETTY u. T. M. BRODY (1968): Plasma and Urine Levels of Phenylbutazone in the Horse.

J Am Med Vet Assoc 153, 195-198

VIII LITERATURVERZEICHNIS

POPOT, M. A., P. GARCIA u. Y. BONNAIRE (2011): Doping control in horses: housing conditions and oral recycling of flunixin by ingestion of contaminated straw. *J Vet Pharmacol Ther* 34, 612-614

RIRDC (2014): Detection times for equine medications
<https://rirdc.infoservices.com.au/items/13-038>
Stand 21.07.2014

RMTC (2014a): Controlled Therapeutic Medications
http://www.rmtcnet.com/resources/RMTC%20Therapeutic%20Substances%20List-12_19_13.pdf
Stand 21.07.2014

RMTC (2014b): Withdrawal Time Guidance from RMTC Concerning Flunixin (Banamine)
<http://www.rmtcnet.com/resources/Flunixin%20Withdrawal%20Guidance.pdf>
Stand 21.07.2014

ROSE, R., J. KOHNKE u. J. BAGGOT (1982): Bioavailability of phenylbutazone preparations in the horse.
Equine Vet J 14, 234-237

RUDY, J. (1988): Effects of Multiple Doses of Flunixin on Plasma and Urinary Concentrations in Horses.
In: 7th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Kentucky, 289-296

SAEED, S. A., S. J. KARIMI u. A. SURIA (1988): Differential effects of dimethyl sulfoxide on human platelet aggregation and arachidonic acid metabolism.
Biochem Med Metab Biol 40, 143-150

VIII LITERATURVERZEICHNIS

SAMS, R. A. (1996): Pharmacokinetic studies of drugs in racehorses.

In: 11th International Conference of racing Analysts and Veterinarians, Queensland, Australia, 345-354

SAMS, R. A., D. F. GERKEN u. S. M. ASHCRAFT (1995): Pharmacokinetics of ketoprofen after multiple intravenous doses to mares.

J Vet Pharmacol Ther 18, 108-116

SAMS, R. A., D. F. GERKEN u. S. M. ASHCRAFT (1999): Detection and identification of flunixin after multiple intravenous and intramuscular doses to horses.

J Anal Toxicol 23, 372-379

SAMS, R. A., D. F. GERKEN, T. M. DYKE, S. M. REED u. S. M. ASHCRAFT (1997): Pharmacokinetics of intravenous and intragastric cimetidine in horses I. Effects of intravenous cimetidine on pharmacokinetics of intravenous phenylbutazone.

J Vet Pharmacol Ther 20, 355-361

SCHATZMANN, U., M. GUGELMANN, J. VON CRANACH, B. LUDWIG u. W. REHM (1989): Pharmacodynamic evaluation of the peripheral pain inhibition by carprofen and flunixin in the horse.

Schweiz Arch Tierheilkd 132, 497-504

SCHENK, I. (2008): Stability of a representative selection of drugs in horse blood.

In: 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Antalya, Turkey, 180-190

SCHOTT, H., D. HODGSON, W. BAYLY u. P. GOLLNICK (1991): Renal responses to high intensity exercise.

In: 3th International Conference on Equine exercise physiology, 361-367

VIII LITERATURVERZEICHNIS

SEMRAD, S. D., G. E. HARDEE, M. M. HARDEE u. J. N. MOORE (1985): Flunixin meglumine given in small doses: pharmacokinetics and prostaglandin inhibition in healthy horses.

Am J Vet Res 46, 2474-2479

SEMRAD, S. D., G. E. HARDEE, M. M. HARDEE u. J. N. MOORE (1987): Low dose flunixin meglumine: effects on eicosanoid production and clinical signs induced by experimental endotoxaemia in horses.

Equine Vet J 19, 201-206

SEMRAD, S. D., R. A. SAMS, O. N. HARRIS u. S. M. ASHCRAFT (1993): Effects of concurrent administration of phenylbutazone and flunixin meglumine on pharmacokinetic variables and in vitro generation of thromboxane B₂ in mares.

Am J Vet Res 54, 1901-1905

SHORT, C. R., G. E. SWAN, A. J. GUTHRIE, M. S. G. MÜLDERS, V. M. KILLEEN, J. P. NURTON u. D. J. ADAMSON (1996): Ketoprofen disposition in conditioned and unconditioned horses.

In: 11th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians, Queensland, Australia, 360-363

SINCLAIR, M. D., K. L. MEALEY, N. S. MATTHEWS, K. E. PECK, T. S. TAYLOR u. B. S. BENNETT (2006): Comparative pharmacokinetics of meloxicam in clinically normal horses and donkeys.

Am J Vet Res 67, 1082-1085

SMITH, P., J. CALDWELL, R. SMITH, M. HORNER u. M. MOSS (1987): The bioavailability of phenylbutazone in the horse.

Xenobiotica 17, 435-443

VIII LITERATURVERZEICHNIS

SNOW, D. H. u. T. A. DOUGLAS (1983): Studies on a new paste preparation of phenylbutazone.

Vet Rec 112, 602-607

SOMA, L. R., E. BEHREND, J. RUDY u. R. W. SWEENEY (1988): Disposition and excretion of flunixin meglumine in horses.

Am J Vet Res 49, 1894-1898

SOMA, L. R., D. E. GALLIS, W. L. DAVIS, T. A. COCHRAN u. C. WOODWARD (1983): Phenylbutazone kinetics and metabolite concentrations in the horse after five days of administration.

Am J Vet Res 44, 2104-2109

SOMA, L. R., C. E. UBOH, J. RUDY u. J. FEGELY (1992): Plasma concentrations of flunixin in the horse: its relationship to thromboxane B₂ production.

J Vet Pharmacol Ther 15, 292-300

SORACI, A., E. BENOIT, P. JAUSSAUD, P. LEES u. P. DELATOUR (1995): Enantioselective glucuronidation and subsequent biliary excretion of carprofen in horses.

Am J Vet Res 56, 358-361

SPENCER, W. A., F. C. CAMARGO, W. KARPIESIUK, C. HUGHES, K. H. STIRLING, P. J. CASEY u. T. TOBIN (2008): Review of the Current Status of Thresholds/Withdrawal Time Guidelines for Therapeutic Medications in Performance Horses.

In: 54th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners (AAEP), San Diego

STEPPA, H. K., J. C. JONES u. S. C. BUDSBERG (2002): Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood.

Am J Vet Res 63, 91-94

VIII LITERATURVERZEICHNIS

STEVENSON, A. J., M. P. WEBER, F. TODI, M. MENDONCA, J. D. FENWICK, E. KWONG, L. YOUNG, R. LEAVITT, R. NESPOLO, P. BEAUMIER u. ET AL. (1990): The influence of furosemide on plasma elimination and urinary excretion of drugs in standardbred horses.

J Vet Pharmacol Ther 13, 93-104

SULLIVAN, M. u. D. SNOW (1982): Factors affecting absorption of non-steroidal anti-inflammatory agents in the horse.

Vet Rec 110, 554-558

TEGEDER, I., J. PFEILSCHIFTER u. G. GEISLINGER (2001): Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors.

FASEB Journal 15, 2057-2072

TEVELL ÅBERG, A., C. OLSSON, U. BONDESSON u. M. HEDELAND (2009): A mass spectrometric study on meloxicam metabolism in horses and the fungus *Cunninghamella elegans*, and the relevance of this microbial system as a model of drug metabolism in the horse.

J Mass Spectrom 44, 1026-1037

TIERSCHUTZGESETZ (2013): in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 90 des vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist.

TOBIN, T., J. W. BLAKE u. R. VALENTINE (1977): Drug interactions in the horse: effects of chloramphenicol, quinidine, and oxyphenbutazone on phenylbutazone metabolism.

Am J Vet Res 38, 123-127

TOBIN, T., L. DIRIKOLU, K. BREWER u. H. C. G. (2013): A clinician's guide to factors affecting withdrawal times for equine therapeutic medications.

Vet J 198, 313-321

VIII LITERATURVERZEICHNIS

TOBIN, T., J. D. HARKINS u. R. A. SAMS (1999): Testing for therapeutic medications: analytical/pharmacological relationships and limitations' on the sensitivity of testing for certain agents.

J Vet Pharmacol Ther 22, 220-233

TOUTAIN, P. L. (2010a): How to extrapolate a withdrawal time from an EHSLC published detection time: a Monte Carlo simulation appraisal.

Equine Vet J 42, 248-254

TOUTAIN, P. L. (2010b): Veterinary Medicines and Competition Animals: The Question of Medication Versus Doping Control.

In: CUNNINGHAM, F., J. ELLIOTT u. P. LEES (Hrsg.): Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 315-339

TOUTAIN, P. L., A. AUTEFAGE, C. LEGRAND u. M. ALVINERIE (1994): Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in the horse: pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling.

J Vet Pharmacol Ther 17, 459-469

TOUTAIN, P. L. u. C. CESTER (2004a): Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint.

Am J Vet Res 65, 1533-1541

TOUTAIN, P. L. u. V. LASSOURD (2002): Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in the horse.

Equine Vet J 34, 242-249

VIII LITERATURVERZEICHNIS

TOUTAIN, P. L., N. REYMOND, V. LAROUTE, P. GARCIA, M. A. POPOT, Y. BONNAIRE, A. HIRSCH u. R. NARBE (2004b): Pharmacokinetics of meloxicam in plasma and urine of horses.

Am J Vet Res 65, 1542-1547

TWOMEY, B. M. u. M. M. DALE (1992): Cyclooxygenase-independent effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the neutrophil respiratory burst.

Biochem Pharmacol 43, 413-418

UNGEMACH, F. (2006): Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen.

In: LÖSCHER, W u. F.R. UNGEMACH (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren

Verlag Parey, Stuttgart, S. 364-403

USEF (2014): 2014 Guidelines for Drugs and Medications

<https://www.usef.org/documents/drugsMeds/drugsMedsGuidelines2014.pdf>

Stand 21.07.2014

VANDER WERF, K., E. DAVIS u. B. KUKANICH (2013): Pharmacokinetics and adverse effects of oral meloxicam tablets in healthy adult horses.

J Vet Pharmacol Ther 36, 376-381

VANE, J. R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drugs.

Nat New Biol 231, 232-235

VANE, J. R. u. R. M. BOTTING (2003): The mechanism of action of aspirin.

Thromb Res 110, 255-258

VIII LITERATURVERZEICHNIS

VERDE, C. R., M. I. SIMPSON, A. FRIGOLI u. M. F. LANDONI (2001):

Enantiospecific pharmacokinetics of ketoprofen in plasma and synovial fluid of horses with acute synovitis.

J Vet Pharmacol Ther 24, 179-185

VERNIMB, G. u. P. HENNESSEY (1977): Clinical studies on flunixin meglumine in treatment of equine colic.

J Equine Med Surg 1, 111-116

VETIDATA (2014):

www.vetidata.de

Stand 21.07.2014.

WARNER, T. D., F. GIULIANO, I. VOJNOVIC, A. BUKASA, J. A. MITCHELL u. J. R. VANE (1999): Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis.

In: Proceedings of the National academy of Sciences, USA, 7563-7568

WELSH, J. C., P. LEES, G. STODULSKI, H. CAMBRIDGE u. A. P. FOSTER (1992): Influence of feeding schedule on the absorption of orally administered flunixin in the horse.

Equine Vet J Suppl 62-65

WHITTEM, T., E. FIRTH, H. HODGE u. K. TURNER (1996): Pharmacokinetic interactions between repeated dose phenylbutazone and gentamicin in the horse.

J Vet Pharmacol Ther 19, 454-459

WINDELER, J. (2008): Externe Validität.

Z Evid Fortbild Qual Gesundheitswes 102, 253-259

VIII LITERATURVERZEICHNIS

WITZMANN, P. (2010): Was ist Leistungssteigerung beim Turnierpferd im Wettkampf?

bptinfo 8/10, 13-14

XIE, W. L., J. G. CHIPMAN, D. L. ROBERTSON, R. L. ERIKSON u. D. L. SIMMONS (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.

In: Proc Natl Acad Sci USA, 2692-2696

ZERTUCHE, J. M., M. P. BROWN, R. GRONWALL u. K. MERRITT (1992): Effect of probenecid on the pharmacokinetics of flunixin meglumine and phenylbutazone in healthy mares.

Am J Vet Res 53, 372-374

IX TABELLENVERZEICHNIS

IX TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: NSAID, Wirkstoffgruppen mit Beispielen | 3 |
| Tabelle 2: Derzeit in Deutschland für Pferde zugelassene NSAID | 10 |
| Tabelle 3: ARCI Klassifizierung der verbotenen Substanzen | 15 |
| Tabelle 4: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Carprofen..... | 27 |
| Tabelle 5: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Firocoxib | 27 |
| Tabelle 6: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Flunixin-Meglumin..... | 28 |
| Tabelle 7: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Ketoprofen | 28 |
| Tabelle 8: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Meloxicam | 29 |
| Tabelle 9: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Metamizol | 29 |
| Tabelle 10: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Phenylbutazon..... | 30 |
| Tabelle 11: Vergleich von Nachweis- und Karenzzeiten für Vedaprofen..... | 30 |
| Tabelle 12: Kriterien zur Gegenüberstellung von Untersuchungen | 32 |
| Tabelle 13: Punktvergabeschema und prozentuale Verteilung | 33 |
| Tabelle 14: Bedeutung der Kategorien A-D | 34 |
| Tabelle 15: Bedingungen und Modalitäten der Applikation..... | 36 |
| Tabelle 16: Verwendete Chemikalien | 41 |
| Tabelle 17: Verwendete Verbrauchsmaterialien | 41 |
| Tabelle 18: Verwendete Geräte..... | 42 |
| Tabelle 19: Verdünnung der Proben vor der Durchführung des TXB ₂ EIA | 43 |
| Tabelle 20: Protokoll zum TXB ₂ und PGE ₂ EIA | 46 |
| Tabelle 21: Punktbewertung der Publikationen zu Flunixin-Meglumin..... | 48 |
| Tabelle 22: Literaturoswertung von Flunixin-Meglumin | 49 |
| Tabelle 23: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Flunixin-Meglumin aus | |
| <i>In-vivo</i> -Versuchen | 50 |
| Tabelle 24: Vergleichende Angaben zur IC ₅₀ von Flunixin-Meglumin aus | |
| <i>In-vitro</i> -Versuchen..... | 50 |
| Tabelle 25: Ausscheidungszeitberechnung für Flunixin-Meglumin | 53 |
| Tabelle 26: Punktbewertung der Publikationen zu Firocoxib | 56 |
| Tabelle 27: Vergleichende Angaben zur IC ₅₀ von Firocoxib aus <i>In-vitro</i> -Versuchen. | 57 |
| Tabelle 28: Ausscheidungszeitberechnung für Firocoxib | 59 |
| Tabelle 29: Punktbewertung der Publikationen zu Phenylbutazon..... | 62 |

IX TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tabelle 30: Literaturlauswertung von Phenylbutazon | 63 |
| Tabelle 31: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Phenylbutazon aus | |
| <i>In-vivo</i> -Versuchen | 65 |
| Tabelle 32: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Oxyphenbutazon beim Esel aus. | |
| <i>In-vivo</i> -Versuchen | 65 |
| Tabelle 33: Vergleichende Angaben zur IC ₅₀ von Phenylbutazon aus | |
| <i>In-vitro</i> -Versuchen | 66 |
| Tabelle 34: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung für Phenylbutazon | 68 |
| Tabelle 35: Punktbewertung der Publikationen zu Meloxicam..... | 71 |
| Tabelle 36: Literaturlauswertung von Meloxicam | 71 |
| Tabelle 37: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Meloxicam aus | |
| <i>In-vivo</i> -Versuchen | 72 |
| Tabelle 38: Vergleichende Angaben zur IC ₅₀ von Meloxicam aus | |
| <i>In-vitro</i> -Versuchen | 72 |
| Tabelle 39: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung für Meloxicam..... | 74 |
| Tabelle 40: Bioverfügbarkeit von Ketoprofen | 76 |
| Tabelle 41: Punktbewertung der Publikationen zu Ketoprofen | 77 |
| Tabelle 42: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Rac-Ketoprofen..... | 78 |
| Tabelle 43: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von S(+)-Ketoprofen | 78 |
| Tabelle 44: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung für Rac-Ketoprofen..... | 80 |
| Tabelle 45: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Vedaprofen | 82 |
| Tabelle 46: Punktbewertung der Publikationen zu Carprofen..... | 85 |
| Tabelle 47: Vergleichende Angaben zur EC ₅₀ von Carprofen..... | 86 |
| Tabelle 48: Plasma-Ausscheidungszeitberechnung für Carprofen | 88 |
| Tabelle 49: Punktbewertung der Publikationen zu Metamizol | 90 |
| Tabelle 50: IC ₅₀ der COX I und COX II für die NSAID Carprofen, Diclofenac,..... | |
| Firocoxib, Flunixin-Meglumin, Ketoprofen und Meloxicam | 99 |
| Tabelle 51: Zusammenfassung der Ergebnisse der Literaturlauswertung | 107 |
| Tabelle 52: Variationskoeffizienten der Halbwertszeit | 111 |
| Tabelle 53: Vergleich der in einem Vollblut-Assay ermittelten IC ₅₀ | 120 |

X ABBILDUNGSVERZEICHNIS

X ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausscheidungszeit | 39 |
| Abbildung 2: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von Flunixin-Meglumin | 52 |
| Abbildung 3: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von Firocoxib..... | 58 |
| Abbildung 4: terminaler Plasmakonzentrationsverläufe von Phenylbutazon | 67 |
| Abbildung 5: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von Meloxicam | 73 |
| Abbildung 6: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von Rac-Ketoprofen | 79 |
| Abbildung 7: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von R(-)-Vedaprofen | 83 |
| Abbildung 8: terminaler Plasmakonzentrationsverlauf von R(-)-Carprofen | 87 |
| Abbildung 9: terminaler Serumkonzentrationsverlauf von 4-Methyl-Aminoantipyrin . | 91 |
| Abbildung 10: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut ... von sechs Pferden durch Carprofen | 94 |
| Abbildung 11: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut ... von sechs Pferden durch Firocoxib | 95 |
| Abbildung 12: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut ... von sechs Pferden durch Flunixin-Meglumin | 96 |
| Abbildung 13: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut ... von sechs Pferden durch Ketoprofen | 97 |
| Abbildung 14: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut ... von sechs Pferden durch Meloxicam | 98 |
| Abbildung 15: Mittelwerte für die Inhibition der COX I (●) und II (■) aus dem Blut von sechs Pferden durch Diclofenac | 98 |

XI DANKSAGUNG

XI DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Doktorarbeit haben viele Personen einen entscheidenden Anteil beigetragen:

Mein größter Dank geht an Herrn Prof. Dr. Kietzmann und Herrn Dr. Michael Düe, zum einen für die Überlassung des sehr interessanten Themas, sowie zum anderen für die hervorragende fachliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Der Deutschen Reiterlichen Vereinigung danke ich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Ganz besonders dankbar bin ich Maren Friebe, PhD und Dr. Christian Wunderlich für die Hilfe bei der Planung und Durchführung der *In-vitro*-Untersuchung und der ausgezeichneten Betreuung dieser Dissertation. Christian erwies sich als exzellenter Korrekturleser und hatte immer aufmunternde Worte für mich parat.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Kietzmann für die unglaublich schöne, gesellige, lustige und unvergessliche Zeit am Institut. Die täglichen Mensagänge, gesunden Salattage, Unmengen an Kuchen und Süßigkeiten, das gemeinsame Waffelbacken, der Weihnachtsmarktbesuch und viele weitere Erlebnisse hätte ich nicht missen wollen.

Zudem gilt mein Dank der reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken der Tierärztlichen Hochschule Hannover dafür, dass ich von den Klinikpferden Blut für die *In-vitro*-Untersuchung gewinnen durfte. Besonders möchte ich dabei die unkomplizierte Hilfe der Mitarbeiter und Doktoranden hervorheben.

XI DANKSAGUNG

Beim Institut für Biochemie an der DSHS in Köln, vor allem beim Herrn Dr. Marc Machnik möchte ich mich für die kurzfristige Bereitstellung von Wirkstoffen für die *In-vitro*-Untersuchung bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzen Herzen bei meiner Familie, meinem Freund Arne, meinem Hund Johnny und all meinen wunderbaren Freunden für die unermüdliche Unterstützung und den hervorragenden Freizeitausgleich, der schöner, abwechslungsreicher und ausgiebiger nicht hätte sein können.