

Sandra Mensinger

Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Pradofloxacin in einem „Tissue-Cage“-Modell beim Hund



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-61-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und
klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

und

der Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen
Betreuer: Prof. Dr. N. Schmeer

Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Pradofloxacin in einem „Tissue-Cage“-Modell beim Hund

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sandra Mensinger
Tierärztin aus Rheinbach

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. A. Moritz

Prof. Dr. N. Schmeer

Tag der Disputation: 18. Dezember 2009

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sandra Mensinger

Für Barthel

INHALTSVERZEICHNIS

1	 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	4
2	 LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	Antiinfektiva	5
2.1.1	Chinolone	6
2.1.1.1	Pradofloxacin	7
2.1.1.2	Wirkungsmechanismus der Fluorochinolone	7
2.2	Modelle zur Abschätzung von Antibiotikakonzentrationen am Infektionsort	8
2.2.1	Das „Tissue-Cage“-Modell	9
2.2.1.1	Anwendung des „Tissue-Cage“-Modells beim Hund in der Veterinärmedizin	10
2.2.1.2	Beschaffenheit des „Tissue-Cage-Fluids“	11
2.3	Pharmakokinetik	11
2.3.1	Pharmakokinetische Parameter	12
2.3.2	Modellunabhängige Pharmakokinetik	13
2.3.3	Pharmakokinetik von Pradofloxacin beim Hund	14
2.4	Pharmakodynamik	14
2.4.1	Die minimale Hemmstoffkonzentration	15
2.4.2	Bakterielle Abtötungskinetiken	16
2.4.3	Postantibiotische und Sub-MHK-Effekte	17
2.4.3.1	Postantibiotischer Effekt (PAE)	17
2.4.3.2	Postantibiotische Sub-MHK-Effekte (PA-SME)	18
2.4.3.3	Sub-MHK-Effekt (SME)	19
2.4.3.4	Postantibiotische und Sub-MHK-Effekte von Pradofloxacin in vitro	19
2.4.4	Die „Mutant Prevention Concentration“ (MPC)	20
2.5	PK/PD-Modell	21
2.5.1	Verhältnis von C_{max} /MHK und AUC_{24} /MHK	21
2.5.2	Verhältnis von AUC_{24} /MPC	22
3	 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Material	23
3.2	Versuchstiere, Haltung und Fütterung	28
3.3	Anfertigung und Implantation der „Tissue-Cages“	28
3.3.1	Probenentnahme aus den „Tissue-Cages“	30

3.3.2	Gewinnung von Exsudat aus einem „Tissue-Cage“	31
3.3.2.1	Herstellung einer Carrageenan-Lösung	31
3.3.2.2	Induktion einer sterilen Entzündung im „Tissue-Cage“	31
3.3.2.3	Bestimmung der Zellzahl im „Tissue-Cage-Fluid“	32
3.3.2.4	Proteingehalt von „Tissue-Cage-Fluid“	32
3.3.3	Entfernung der „Tissue-Cages“	33
3.3.3.1	Histopathologische Untersuchung der „Tissue-Cages“	33
3.4	Pharmakokinetik	34
3.4.1	Prüfgegenstand	34
3.4.2	Applikation des Prüfgegenstandes	34
3.4.3	Studien zur Pharmakokinetik in Serum und „Tissue-Cage-Fluid“	34
3.4.4	Probenentnahmen und Probenaufbereitung	35
3.4.4.1	Untersuchungen des „Tissue-Cage-Fluids“	35
3.4.4.2	Blutuntersuchungen	35
3.4.4.2.1	Pharmakokinetik	36
3.4.4.2.2	Hämatologie und klinisch-chemische Blutuntersuchung	36
3.4.4.3	Analytik	37
3.4.4.4	Pharmakokinetische Berechnungen	37
3.4.5	Statistik	37
3.5	Pharmakodynamik	38
3.5.1	Testsubstanzen	39
3.5.2	Testorganismen	39
3.5.3	MHK-Bestimmung in Transsudat	39
3.5.4	Ermittlung der bakteriziden Aktivität in Transsudat	40
3.5.5	Postantibiotische Effekte bei <i>S. aureus</i> in Transsudat	40
3.5.6	Abtötungsverlauf in Transsudat und Exsudat bei authentischen Wirkstoffspiegeln	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	42
4.2	Implantation der „Tissue-Cages“	42
4.2.1	Bestimmung der Zellzahl im „Tissue-Cage-Fluid“	42
4.2.2	Proteingehalt in Transsudat und Exsudat	46
4.2.3	Entfernung der „Tissue-Cages“	46
4.2.3.1	Histopathologische Untersuchung der „Tissue-Cages“	47
4.3	Pharmakokinetik	49

4.3.1	Applikation des Prüfgegenstandes	49
4.3.2	Klinische Allgemeinuntersuchungen	49
4.3.3	Pharmakokinetik von Pradofloxacin in Serum und „Tissue-Cage-Fluid“	50
4.3.3.1	Erste Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum und Transsudat	50
4.3.3.2	Zweite Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum, Transsudat und Exsudat (Mehrfachapplikation)	53
4.3.3.3	Dritte Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum, Transsudat und Exsudat (Einmalapplikation)	56
4.3.4	Untersuchungen des „Tissue-Cage-Fluids“	59
4.3.5	Hämatologie und klinische Chemie	59
4.4	Pharmakodynamik	63
4.4.1	Untersuchung des „Tissue-Cage-Fluids“ auf bakterielle Kontamination	63
4.4.2	MHK-Bestimmung in Transsudat	64
4.4.2.1	MHK von Pradofloxacin für <i>E. coli</i>	64
4.4.2.2	MHK von Pradofloxacin für <i>S. aureus</i>	65
4.4.2.3	MHK von Enrofloxacin für <i>E. coli</i>	66
4.4.2.4	MHK von Enrofloxacin für <i>S. aureus</i>	67
4.4.3	Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin in Transsudat	68
4.4.3.1	Zeitlicher Verlauf der Abtötung von <i>E. coli</i>	68
4.4.3.2	Zeitlicher Verlauf der Abtötung von <i>S. aureus</i>	69
4.4.4	Postantibiotische Effekte von Pradofloxacin bei <i>S. aureus</i> in Transsudat	71
4.4.5	Abtötungsverlauf in Trans- und Exsudatproben bei authentischen Wirkstoffspiegeln	74
4.4.5.1	Abtötungsverlauf für <i>E. coli</i> in Exsudat und Transsudat	74
4.4.5.2	Abtötungsverlauf bei <i>S. aureus</i> in Exsudat	77
5	DISKUSSION	81
5.1	Beurteilung des „Tissue-Cage“-Modells	82
5.2	Pharmakokinetik von Pradofloxacin	86
5.3	Pharmakodynamische Aspekte	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	SUMMARY	101
8	ANHANG	104

9	LITERATURVERZEICHNIS	133
10	DANKSAGUNG	151

Abkürzungsverzeichnis

Im Text verwendete Abkürzungen

AI	Akkumulationsindex
AUC_{0-24}	Fläche unter der Kurve 0h – 24h
AUC_{last}	Fläche unter der Kurve bis zum letzten Probenentnahmezeitpunkt
AUC_{inf}	Fläche unter der Kurve, Extrapolation nach unendlich
b. w.	body weight
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cfu/mL	colony forming units per milliliter
Cl/F	scheinbare Gesamtplasmaclearance nach oraler Applikation ⁸
C_{max}	maximale Wirkstoffkonzentration ⁸
cm	Zentimeter
CV	geometrischer Variationskoeffizient
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
ENR	Enrofloxacin
Ex	Exsudat
fl	Femtoliter
g	Gramm
h	Stunde
ID	Identifikation
KBE	koloniebildende Einheiten
$K_3\text{EDTA}$	Trikalium-Ethylendiamintetraessigsäure
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

log	Logarithmus
< LoQ	unter der Bestimmungsgrenze (below limit of quantitation)
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MIC	minimum inhibitory concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPC	Mutant Prevention Concentration
MRT	Mittlere Verweilzeit
MSW	Mutant Selection Window
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid-Lösung
n. s.	keine Probe (no sample)
PAE	Postantibiotischer Effekt
PA-SME	Postantibiotischer Sub-MHK-Effekt
PD	Pharmakodynamik
pg	Picogramm
PK	Pharmakokinetik
PRA	Pradofloxacin
upm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SME	Sub-MHK-Effekt
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit

Abkürzungsverzeichnis

TC	„Tissue-Cage“
TCF	„Tissue-Cage-Fluid“
TFC/MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
T_{\max}	Zeit bis nach Arzneimittelgabe die maximale Konzentration erreicht ist ⁸
Trans	Transsudat
U	Unit
u. a.	und andere, unter anderem
vgl.	vergleich
Vv.	<i>Venae</i>
V_z/F	Scheinbares Verteilungsvolumen während der terminalen Phase nach extravasaler Applikation ⁸
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
%	Prozent

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Bakterielle Infektionen kommen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin häufig vor. Durch das zunehmende Auftreten bakterieller Resistenzen ist der verantwortungsvolle und gezielte Einsatz von antibakteriellen Wirkstoffen von besonderer Bedeutung. Deshalb sollte möglichst vor der Verabreichung eines Antibiotikums ein Resistenztest durchgeführt werden. Die eingesetzte Dosierung sollte zu einer mikrobiologischen Heilung führen²⁷. Dazu muss eine ausreichende Menge des antibakteriellen Wirkstoffs an den Ort des Infektionsgeschehens gelangen. Bakterielle Infektionen treten meist im extrazellulären Bereich der Gewebe auf^{7,18}. Somit gilt es im Rahmen der Dosisfindung durch pharmakokinetische Studien herauszufinden, wie viel von einem verabreichten Wirkstoff tatsächlich im Gewebe ankommt. Neben der Erstellung klassischer Konzentrations-Zeit-Profile wurden daher Versuche unternommen, die Wirkstoffkonzentration im Gewebe zu bestimmen. Dies erfolgte beispielsweise durch die Analyse von Biopsien oder mit Hilfe von Modellen, welche die Gewinnung von extrazellulärer Flüssigkeit ermöglichten. Pradofloxacin ist ein neues Fluorochinolon der dritten Generation, das sich in der Zulassung für die Veterinärmedizin befindet. Fluorochinolone der dritten Generation weisen eine erweiterte Wirksamkeit gegen grampositive und/oder gramnegative Erreger sowie Anaerobier und Mykoplasmen auf¹⁰⁶.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Erhebung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Daten für Pradofloxacin. Dazu sollte ein sogenanntes „Tissue-Cage“-Modell etabliert werden, um 1. die Gewebepenetration von Pradofloxacin zu prüfen und 2. pharmakodynamische Untersuchungen in biologischen Medien („Tissue-Cage-Fluid“) durchzuführen. Dazu sollten die üblichen In-vitro-Parameter der Pharmakodynamik in „Tissue-Cage-Fluid“ geprüft und darüber hinaus Studien zur antibakteriellen Wirksamkeit in natürlichen Medien mit authentischem Wirkstoffgehalt durchgeführt werden. Die pharmakokinetischen Parameter wurden für *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* beim Hund erhoben, obwohl die orale Suspension für Katzen zugelassen werden soll. Da es wahrscheinlich ist, dass in der Praxis diese Suspension auch für kleine Hunde genutzt wird, soll diese Arbeit Basisinformationen bzgl. der Pharmakokinetik und der Verträglichkeit der oralen Suspension beim Hund liefern.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Antiinfektiva

Unter dem Begriff Antiinfektiva werden Chemotherapeutika und Antibiotika zusammengefasst. Chemotherapeutika sind synthetisch hergestellte, antibakterielle Wirkstoffe. Antibiotika kommen ursprünglich in sehr geringen Konzentrationen in der Natur vor und sind von Mikroorganismen gebildete Substanzen, die auf andere Mikroorganismen wachstumshemmend oder letal wirken¹⁷. Die klassische Definition versteht also unter Antibiotika Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen oder Bakterien; modernere Definitionen verwenden vorzugsweise den Begriff der Antiinfektiva¹⁴⁹. Im allgemeinen Sprachgebrauch ist jedoch der Terminus Antibiotika sowohl für natürliche als auch für synthetisch gewonnene Substanzen üblich und wird daher in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet.

Die ersten synthetisch hergestellten antimikrobiellen Wirkstoffe waren 1935 die Sulfonamide. Das erste Antibiotikum, Penicillin, wurde 1929 von Fleming entdeckt und ab 1940 vermarktet^{72,160,189}. Der Einsatz von Antibiotika dient der Metaphylaxe und Heilung bakterieller Infektionskrankheiten¹⁴⁶. Durch Prophylaxe im Rahmen chirurgischer Eingriffe konnten postoperative Komplikationen reduziert werden. Antiinfektiva retten Patienten, die vor der Entdeckung der antibakteriellen Wirkstoffe nicht überlebt hätten¹⁶¹. Antibiotika können anhand ihres Wirkungsspektrums und ihres Wirkungstyps (bakteriostatisch oder bakterizid) differenziert werden. Außerdem lassen sie sich zum einen nach ihrer Zielstruktur bei Bakterien, wie der Proteinsynthese, der Zellwand, der DNA-Replikation oder der Enzyme der Zellwandbiosynthese¹⁷ und zum anderen anhand ihrer Struktur in unterschiedliche Klassen einteilen. In den Leitlinien der Bundestierärztekammer für den sorgsamen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln²⁷ sind folgende für Tiere zugelassene Wirkstoffgruppen aufgeführt: Aminoglykoside, Amphenicole, Ansamycine, Beta-Lactame, Chinolone, Fusidinsäure, Lincosamide, Makrolide, Pleuromutiline, Polypeptidantibiotika, Sulfonamide und Tetracycline. Im Jahr 2005 waren in der Veterinärmedizin die Tetrazykline die mit Abstand am häufigsten eingesetzten Antibiotika in Deutschland¹⁴⁶ und in Frankreich¹¹², gefolgt von den Beta-Lactamen, den Sulfonamiden, den Makroliden sowie den

Aminoglykosiden und Polypeptiden. Der Einsatz von Chinolonen und den anderen Antibiotikagruppen blieb auf vergleichsweise niedrigem Niveau¹⁴⁷.

2.1.1 Chinolone

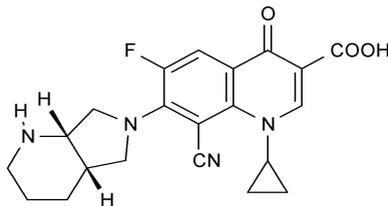
Die Chinolone stellen eine der größten, weltweit in Human- und Veterinärmedizin eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffklassen dar^{141,180}. Sie haben sich von Wirkstoffen, die ausschließlich zur Behandlung von Harnwegsinfektionen verwendet wurden, zu Substanzen mit einem breiten Wirkungsspektrum und zahlreichen Indikationen entwickelt¹¹. Als erster Vertreter dieser Stoffklasse kam in den 1960er Jahren Nalidixinsäure auf den Markt, welche 1962 als Nebenprodukt in der Malariaforschung entdeckt wurde⁹⁸. Die Chinolone werden anhand ihrer strukturellen Optimierung und dem damit verbundenen Wirkungsspektrum im Allgemeinen in drei Generationen eingeteilt¹⁰⁶: Die erste Generation, z. B. Nalidixinsäure und Oxolinsäure, besitzt ein limitiertes Wirkungsspektrum gegen Enterobacteriaceae und einige andere gramnegative Organismen sowie eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und eine begrenzte Verteilung ins Gewebe. Die zweite Generation (Norfloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Danofloxacin, Marbofloxacin u. a.) mit einer erweiterten antibakteriellen Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien und Wirksamkeit gegen bestimmte grampositive Kokken, stellen die ersten Fluorochinolone dar. Diese wurden in den 1980er Jahren entwickelt. Enrofloxacin war dabei das erste Fluorochinolon, das für die Veterinärmedizin zur Verfügung stand¹⁸². Fluorochinolone verfügen über eine höhere orale Verfügbarkeit und eine verbesserte systemische Verteilung. Die dritte Generation der Chinolone verfügt zum einen über die günstigen Eigenschaften der zweiten Generation und darüber hinaus über ein erweitertes antibakterielles Spektrum gegen grampositive Bakterien, Anaerobier und Mykobakterien. Weiterhin haben diese Wirkstoffe eine gute orale Bioverfügbarkeit und eine längere Verweildauer im Körper, wodurch ein Dosierungsintervall von 24 Stunden ermöglicht wird⁷⁹. Eine vierte Generation der Chinolone wurde beschrieben, die sogenannten Desfluorochinolone, welche nicht die Fluorierung an Position C6 im Molekül aufweisen, die seit der zweiten Generation den Fluorochinolonen gemein ist und der ganzen Stoffklasse diesen Namen gegeben hat¹⁸⁰. Mit den Desfluorochinolonen eröffnen sich neue Wege in der Entwicklung der Chinolon-Forschung¹³⁹⁻¹⁴¹. Die Einteilung der einzelnen Stoffe in die Chinolon-Generationen ist nicht einheitlich. So gibt es beispielsweise auch

Autoren, die Marbofloxacin und Enrofloxacin als Fluorochinolone der dritten Generation bezeichnen^{134,183}.

2.1.1.1 Pradofloxacin

Pradofloxacin ist ein neues C8-Cyanofluorochinolon der dritten Generation, welches zur Behandlung bakterieller Infektionen bei Hund und Katze entwickelt wurde⁷⁷. Indikationen für den Einsatz von Pradofloxacin beim Hund sind Pyodermien, Wundinfektionen, Abszesse, Cystitis, Prostatitis sowie Gingivitis und Periodontitis. Pradofloxacin unterscheidet sich von Enrofloxacin durch eine Cyanogruppe an C8 und einen Pyrrolidinopiperidinring an C7. Dadurch kommt es zu einer höheren Aktivität gegen *E. coli* und *S. aureus* (Wildtyp-Stämme) sowie gegen Fluorochinolon-resistente Stämme¹⁹⁹. Abhängig vom Substituenten an Position C7 können die größten Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit einer Substanz auftreten. Pyrrolidine an dieser Position bieten die höchste Wirksamkeit gegen grampositive Erreger^{45,46}. Ein Substituent an C8 beeinflusst die In-vivo-Eigenschaften des Wirkstoffs und die antibakterielle Aktivität, besonders gegen anaerobe Spezies⁹.

Abbildung 1. Pradofloxacin



2.1.1.2 Wirkungsmechanismus der Fluorochinolone

Für Fluorochinolone gibt es zwei molekulare Zielstrukturen („dual targeting“) an denen Wechselwirkungen mit Bakterienzellen entstehen können. Die erste Zielstruktur, die DNA-Gyrase, entdeckte die Arbeitsgruppe von Gellert 1976 und die zweite wurde 1990 von Kato et al. beschrieben^{49,65,82}. Die Gyrase, eine Typ-II-Topoisomerase, ist an der Kontrolle der Topologie der DNA-Stränge des bakteriellen Chromosoms beteiligt und katalysiert unter ATP-Verbrauch eine negative Überspiralisierung der umeinander gewundenen DNA-Stränge durch vorübergehende Einführung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Chinolone

binden an den Enzym-DNA-Komplex, dadurch kommen Replikation und Transkription der DNA zum Erliegen und eine dauerhafte Induktion der SOS-Antwort (Reparatur von DNA-Schäden) wird ausgelöst, was schließlich zum Zelltod führt. Weiterhin hemmen Chinolone auch die DNA-Synthese von Plasmiden und bestimmten Bakteriophagen⁷⁴. Die Topoisomerase IV, ebenfalls eine Typ-II-Topoisomerase, vermittelt die Lockerung der Doppelstrang-DNA und die Trennung der Tochterchromosomen nach der DNA-Replikation¹⁰⁶. Die Chinolone stören die Aktivität der Topoisomerase IV, indem sie die Religation der gespaltenen DNA durch das Enzym verhindern¹³⁹. Die Behinderung der DNA-Replikation verläuft langsamer, wenn Topoisomerase IV die Zielstruktur der Chinolone ist⁵¹. Die Gyrase wird als primäre Zielstruktur für gramnegative Bakterien angesehen^{51,80,81,141,180}, während Topoisomerase IV von den meisten Chinolonen vorzugsweise in grampositiven Bakterien gehemmt wird^{51,80}. Allerdings kann die Gyrase auch bei grampositiven Bakterien als primäres Ziel dienen und manche Chinolone haben eine ähnliche Affinität für beide Zielstrukturen¹⁴¹.

2.2 Modelle zur Abschätzung von Antibiotikakonzentrationen am Infektionsort

Die meisten Arzneimittel entfalten ihre Wirkung nicht im Blut, sondern in einem bestimmten Zielgewebe, in welches sie über das zentrale Kompartiment gelangen müssen¹¹⁹. Bakterielle Infektionen finden meist im Extrazellularraum der Gewebe statt. Somit ist die Interstitialflüssigkeit der Zielort für antibakteriell wirksame Substanzen und ihre Konzentration dort von höchstem Interesse, um einen Therapieerfolg zu prognostizieren und eine angemessene Dosierung zu evaluieren^{18,119,124}. Zur Dosisfindung für ein Antibiotikum werden jedoch üblicherweise die Pharmakokinetik des betreffenden Wirkstoffs im Plasma bzw. Serum sowie die *in vitro* ermittelte minimale Hemmstoffkonzentration der jeweiligen Pathogene herangezogen. Es kann aber nicht immer ein Gleichgewicht zwischen der Arzneimittelkonzentration im Plasma/Serum und der im Gewebe vorausgesetzt werden. Suboptimale Konzentrationen im Zielgewebe können zu Therapieversagen und bakterieller Resistenzentwicklung führen¹¹⁹. Daher wurden neben der Untersuchung von Gewebeproben (Biopsien, Homogenate), in denen extra- und intrazelluläre Antibiotikumkonzentrationen enthalten sind, verschiedene Modelle entwickelt, die zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration in der

Interstitialflüssigkeit dienen sollen, wie z. B. die „Skin-Blister“-Technik^{148,159}, die Mikro dialyse bzw. Ultrafiltration¹⁸ und das „Tissue-Cage“-Modell.

2.2.1 Das „Tissue-Cage“-Modell

Das „Tissue-Cage“-Modell wurde zuerst 1963 von Guyton⁷¹ beschrieben und zur Untersuchung der Physiologie der Interstitialflüssigkeit verwendet. Die erste Nutzung des Modells mit einem antibakteriellen Wirkstoff erfolgte 1972 durch Waterman und Kastan^{36,191}. „Tissue-Cages“ (TCs) sind perforierte Hohlräume von unterschiedlicher Gestalt, Größe und Material, z. B. Kugeln aus Polypropylen^{3,76}, Silikonschläuche^{14,156,163} oder Edelstahlnetz-kammern¹⁴, die meist subkutan^{3,68,156,163} oder in Organe implantiert werden^{55,56}. Es wird ein künstlicher Hohlraum im Gewebe geschaffen, eine Gewebekammer, in der sich Flüssigkeit („Tissue-Cage-Fluid“, TCF) sammelt, die durch die vorhandenen Perforationen hinein diffundiert und folglich in direkter Verbindung mit der Interstitialflüssigkeit steht und repräsentativ für diese ist. Um den TC herum bildet sich eine Kapsel und hoch vaskularisiertes Granulationsgewebe wächst in den TC ein³⁶. Der TC ermöglicht die mehrfache Gewinnung von Interstitialflüssigkeit und somit die Durchführung pharmakokinetischer Studien zum Vergleich des Konzentrationsverlaufes in Plasma/Serum und TCF. Die Arbeitsgruppe von Lees und Higgins⁷⁶ entwarf ein TC-Inflam-mationsmodell, um die Pathogenese und die Mechanismen akuter Entzündungen zu untersuchen. Die Penetration nichtsteroidaler Antiphlogistika ins Exsudat und deren Wirkung konnte verfolgt werden, indem mithilfe des Reizstoffes Carrageenan eine sterile Entzündung im TC induziert wurde^{10,33,34,90,97}. Diese Methode wurde ebenfalls zum Vergleich der Pharmakokinetik diverser Antibiotika in Transsudat (TC ohne Entzündung) und Exsudat (TC mit induzierter Entzündung) eingesetzt^{4,5}. Dabei wurden auch pharmakodynamische Untersuchungen, sogenannte Ex-vivo-Studien durchgeführt, d. h. nach Verabreichung des jeweiligen Antibiotikums wurden Plasma-/Serum-, Transsudat- und Exsudatproben entnommen, mit Bakterien beimpft und durch Auszählung der KBE/ml die Effektivität des Wirkstoffs beurteilt. Andere Arbeitsgruppen erforschten die antibakterielle Wirkung verschiedener Antibiotika in vivo, indem sie bakterielle Erreger direkt in den TC einbrachten^{21,67,68,183}. Das TC-Modell fand bereits häufig Anwendung in der Humanmedizin, dabei wurden Labortiere wie Hund^{55,56,71,185,191}, Meerschwein^{23,35}, Kaninchen^{29,75,202}, Ratte^{102,121} und Maus⁸⁹ unter anderem zur Untersuchung von Fremdkörperinfektionen^{143,177} sowie Schweine¹⁶ eingesetzt. Eine vielfältige

Verwendung des TC-Modells erfolgte ebenfalls in der Veterinärmedizin, hier direkt in der jeweiligen Zieltierspezies: Hund, Katze¹⁶⁴, Rind^{5,13,14,103,155}, Schaf^{3,10,154}, Ziege^{4,153,156}, Schwein^{190,192}, Huhn³², Pferd^{21,76,183} und Kamel².

2.2.1.1 Anwendung des „Tissue-Cage“-Modells beim Hund in der Veterinärmedizin

Walker und Mitarbeiter untersuchten die Konzentration der Fluorochinolone Norfloxacin¹⁸⁶, Ciprofloxacin¹⁸⁸ und Enrofloxacin¹⁸⁷ in Serum und TCF gesunder Hunde nach oraler Applikation unterschiedlicher Dosierungen (Norfloxacin 11 bzw. 22 mg/kg, Ciprofloxacin 11 bzw. 23 mg/kg und Enrofloxacin 2,75, 5,5 bzw. 11 mg/kg) an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Dosierungsintervall von 12 Stunden. Nach der 1. und 7. Applikation wurden Blut- und TCF-Proben zur Konzentrationsbestimmung entnommen. In allen drei Studien wurde die maximale Konzentration im TCF später erreicht und entsprach etwa 50 % der Serumkonzentration. Die Elimination der Wirkstoffe aus dem TCF erfolgte langsamer als aus dem Serum. Die Halbwertszeit im TCF war größer als im Serum. Folglich war die Gesamtexposition (AUC) im TCF ähnlich der AUC im Serum.

Die Arbeitsgruppe um Gruet⁶⁹ erprobte die Möglichkeit zur Prävention chirurgischer Infektionen mit einer einzigen intravenösen Injektion von 2 bzw. 4 mg/kg Marbofloxacin, die etwa 15 Minuten vor der subkutanen Implantation eines TCs und dessen Infektion mit *S. intermedius* erfolgte. Bei den mit Marbofloxacin behandelten Hunden wurde eine niedrigere Anzahl an KBE/ml festgestellt als bei der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Konzentration von Marbofloxacin in Plasma und Exsudat war ähnlich.

Boothe und Mitarbeiter²⁰ injizierten Hunden mit jeweils einem nicht entzündeten und einem durch Carrageenan-Injektion entzündeten TC intravenös Leukozyten mit radioaktiv markiertem Enrofloxacin, um zu evaluieren, ob Enrofloxacin von den Leukozyten zum Infektionsort transportiert wird. In Plasma, peripheren Leukozyten, dem Fluid aus den Kontroll-TCs und den Basiswerten der entzündeten TCs konnte kein Enrofloxacin nachgewiesen werden. Enrofloxacin fand sich nur in TCF aus entzündeten TCs. Daraus schlossen die Autoren, dass Leukozyten für den Transport von Enrofloxacin an den Infektionsort verantwortlich sind und somit die Konzentration des Arzneimittels am Ort der Entzündung erhöht werden kann.

Die Konzentration von Cefovecin, einem Cephalosporin der 3. Generation, nach einmaliger subkutaner Injektion von 8 mg/kg wurde von Stegemann und Mitarbeitern in Plasma, Transsudat und Exsudat untersucht. Exsudat wurde auch in dieser Studie mithilfe von Carrageenan erzeugt. Die maximale Konzentration in Transsudat und Exsudat war geringer als im Plasma und wurde später erreicht. Außerdem zeigte sich die antibakterielle Wirksamkeit von Cefovecin gegen *S. intermedius* in Plasma, Transsudat und Exsudat in sogenannten Ex-vivo-Studien¹⁶³.

Des Weiteren wurde die Pharmakokinetik der nichtsteroidalen Antiphlogistika Phenylbutazon und Naproxen²⁰³, Tolfenaminsäure¹⁰⁸, Carprofen¹⁰⁷ sowie Phenylbutazon, Naproxen und Flunixin¹⁴⁵ im TC-Modell geprüft.

2.2.1.2 Beschaffenheit des „Tissue-Cage-Fluids“

Wie in Abschnitt 2.2.1 bereits erwähnt, ist das TCF laut Clarke repräsentativ für die Interstitialflüssigkeit und sein Proteingehalt entspricht etwa der Hälfte des Serumproteingehaltes³⁶. Die Arbeitsgruppe von Lees und Higgins⁷⁶ entwickelte ein TC-Modell zur Untersuchung von Entzündungsreaktionen. In diesem Zusammenhang prägten sie die Begriffe Transsudat für TCF in Abwesenheit einer Entzündung und entsprechend Exsudat für TCF mit Entzündungsreiz im TC. Dabei ist das Exsudat zellreicher, es kommt zu einem Anstieg der Leukozyten, wohingegen im Transsudat die Leukozytenzahl gering und gleichbleibend ist¹⁵². Diese Begriffe werden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls entsprechend verwendet. Im Allgemeinen weist ein Exsudat einen höheren Proteingehalt auf als ein Transsudat; das spezifische Gewicht liegt über 1016 und die Leukozytenzahl übersteigt 5000 kernhaltige Zellen/ μl ^{78,194}. Bezüglich des pH-Wertes des TCFs, welcher die Penetration und Wirkung der Arzneimittel beeinflusst, gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Laut Clarke haben Gerding und Mitarbeiter höhere pH-Werte für TCF ermittelt als den physiologischen pH-Wert des Blutes, Carbon und Mitarbeiter haben jedoch niedrigere pH-Werte im TCF gemessen³⁶.

2.3 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik ist definiert als der Prozess der Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination eines Arzneimittels im Körper¹⁷⁰. Die traditionelle pharmakokinetische Datenanalyse ergibt Konzentrations-Zeit-Kurven, welche das

Verhalten einer Substanz in Plasma oder Serum beschreiben¹²⁴. Da in der vorliegenden Arbeit pharmakokinetische Studien mit Pradofloxacin durchgeführt wurden, werden im folgenden Abschnitt die Parameter der Pharmakokinetik kurz erläutert.

2.3.1 Pharmakokinetische Parameter

Die höchste Konzentration eines Arzneimittels, die im Referenz-Kompartiment erreicht wird, wird als C_{\max} bezeichnet¹¹³ und die Zeit, die benötigt wird, bis nach Arzneimittelgabe die maximale Konzentration erreicht ist, nennt man T_{\max} . Diese beiden Parameter können direkt aus den Konzentrations-Zeit-Daten abgelesen werden¹⁹³. Für die Genauigkeit dieses Parameterpaars ist die Wahl der Probenentnahmezeitpunkte entscheidend. Diese werden im Allgemeinen anhand der sogenannten „Fünfer-Regel“ ausgewählt. Demnach werden 5 Proben vor Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (Absorptionsphase), 5 Proben während der Distributionsphase (ca. eine terminale Halbwertszeit) und 5 Proben in der Eliminationsphase (bis zum 5-fachen der terminalen Halbwertszeit) genommen^{157,172,193}. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) ist proportional der Gesamtmenge des Pharmakons und kann mittels einer Integralfunktion, als Zeitintegral über die Konzentrationen, berechnet werden^{133,138}. Unter AUC_{last} versteht man die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt Null bis zur letzten messbaren Konzentration. Die AUC_{inf} symbolisiert die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt Null bis unendlich⁸. Die Bestimmung der AUC_{inf} erfolgt durch Extrapolation. Es sollte angegeben werden, wie die AUC ermittelt wurde z. B. basierend auf der Trapezregel (linear oder log-linear)¹¹³. Mit den oben genannten Parametern werden also die maximale Exposition sowie die gesamte Exposition eines Arzneimittels im Körper beschrieben. Ein weiterer Schlüsselparameter der Pharmakokinetik ist die Bioverfügbarkeit, die den Anteil eines extravasal applizierten Arzneimittels darstellt, der den systemischen Kreislauf erreicht und somit am Wirkort verfügbar wird^{111,172}. Da es nicht möglich ist, die Transportvorgänge für die gesamte Wirkstoffmenge im Blut zu betrachten, wird unter der Annahme, dass sich das Blutvolumen im Rahmen des Untersuchungszeitraumes nicht verändert, die Konzentrationsänderung des Wirkstoffs im Blut evaluiert. Einen Umrechnungsfaktor zwischen Konzentration und Dosis (Gesamtwirkstoffmenge) stellt das Verteilungsvolumen, ein hypothetisches Volumen der Körperflüssigkeit, dar. Unter dem scheinbaren Verteilungsvolumen ist das Flüssigkeitsvolumen zu

verstehen, dass zur Auflösung der gesamten Arzneistoffmenge erforderlich wäre, um dieselbe Konzentration wie die im Plasma gefundene zu erhalten^{26,31,111}. Dieser Parameter wird genutzt, um die Menge eines Arzneimittels im Körper aus einer gemessenen Plasmakonzentration abzuschätzen, um beispielsweise die erste Dosis in einem Behandlungsplan zu kalkulieren und somit sofort die erforderliche therapeutisch wirksame Plasmakonzentration zu erhalten¹⁷⁵. Zur Festlegung einer adäquaten Dosis ist es weiterhin von besonderer Bedeutung, die Elimination des Arzneistoffes aus dem Organismus zu betrachten. Dazu wird in erster Linie die Clearance herangezogen. Im Allgemeinen wird die Clearance als der Teil des Plasmavolumens, der innerhalb einer bestimmten Zeitspanne von einem Arzneimittel befreit wird, bezeichnet. Meist spricht man von Plasmaclearance, weil Plasma die am häufigsten zur Konzentrationsbestimmung eines Arzneimittels verwendete Matrix ist. Es ist aber auch möglich, die Clearance bestimmter Organe z. B. Leber oder Niere zu bestimmen^{12,111,173}. Laut Toutain und Bousquet-Mélou¹⁷³ sollte die Clearance formal als Verhältnis von Eliminationsrate und Arzneimittelkonzentration definiert werden. Um die Abnahme einer Arzneimittelkonzentration weiter zu beschreiben, wird die Halbwertszeit verwendet. Die Halbwertszeit bezeichnet die Zeit, in der die Arzneimittelkonzentration auf die Hälfte ihrer Anfangskonzentration abgesunken ist. Sie ist vor allem bei Mehrfachapplikationen relevant, da von ihr die Akkumulation eines Arzneistoffes beeinflusst wird. Daher erfolgt ihre Bestimmung hauptsächlich, um ein angemessenes Dosierungsintervall festzulegen^{66,174}. Ein weiterer Parameter, der Auskunft über die Zeit gibt, in der sich ein Stoff im Körper aufhält, ist die mittlere Verweilzeit („mean residence time“). Er stellt die Verweilzeit eines Moleküls von der Aufnahme bis zur Elimination dar¹³².

2.3.2 Modellunabhängige Pharmakokinetik

Die modellfreie (kompartimentfreie) Pharmakokinetik, die routinemäßig genutzt wird¹³⁷ und auch gemäß der EMEA Richtlinie zur Durchführung pharmakokinetischer Studien im Zieltier⁵⁷ angewendet werden kann, stellt die Parameter dar, die man direkt aus den gemessenen Blutkonzentrationen eines Wirkstoffs errechnen kann. Dabei erfolgt keine Anpassung dieser Daten an ein theoretisches Modell²⁶. In der vorliegenden Arbeit wurde die Pharmakokinetik von Pradofloxacin anhand dieser Methode bestimmt.

2.3.3 Pharmakokinetik von Pradofloxacin beim Hund

Die Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach oraler Applikation beim Hund wurde in mehreren Studien untersucht. Nach der Applikation von Pradofloxacin-Tabletten in einer Dosierung von 3 mg/kg KG pro Tag konnten hohe Serumkonzentrationen (1,4 µg/ml nach der ersten Applikation und 1,6 µg/ml nach der fünften Applikation) festgestellt werden, welche nach 2,1 bzw. 1,5 Stunden erreicht wurden. Die ermittelte Halbwertszeit ermöglicht einen Dosierungsintervall von 24 Stunden⁶². Die orale Bioverfügbarkeit der Tabletten lag bei nahezu 100 Prozent⁶⁴. Zur Bioverfügbarkeit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* liegen bisher keine Untersuchungen beim Hund vor.

In einer Dosislinearitätsstudie wurde die Konzentration von Pradofloxacin in Serum und Haut miteinander verglichen. Dazu wurden Serum- und Biopsieproben entnommen. Es zeigte sich, dass nach mehrfacher oraler Applikation die Konzentration in Haut und Serum linear mit der Dosis anstieg. Die Konzentration in der Haut war höher als im Serum und die Elimination aus der Haut erfolgte verzögert⁶³. Eine andere Studie stellte die Konzentrationen von Pradofloxacin in Serum und Haut von Hunden mit und ohne Pyodermie dar. Die Autoren fanden heraus, dass die Pradofloxacin-Konzentration in Proben aus erkrankten Hautregionen höher war als in Proben von nicht betroffenen Hautstellen und im Serum sowie in Haut- und Serumproben der Kontrolltiere¹³⁶.

In einer Studie von Bregante und Mitarbeitern²⁵ zeigte Pradofloxacin im Hund eine niedrige In-vitro-Plasmaproteinbindung von etwa 29 – 37 %.

Des Weiteren konnte die Akkumulation von Pradofloxacin in Leukozyten nach oraler Gabe von 3 bzw. 12 mg/kg KG gezeigt werden. Der Vergleich der Konzentration von Pradofloxacin in Plasma und Leukozyten ergab einen 6- bis 8-fach höheren C_{max} -Wert in den Leukozyten¹⁹.

2.4 Pharmakodynamik

Die Pharmakodynamik beschreibt die Wirkung eines Arzneimittels auf den Organismus bzw. dessen Wirkung auf Mikroorganismen im oder auf dem Körper^{94,170}. Bei antibakteriell wirksamen Substanzen versucht die Pharmakodynamik, im Körper (z. B. im Serum) gemessene Arzneimittelkonzentrationen, also die Pharmakokinetik, mit mikrobiologischen oder

klinischen Effekten zu korrelieren, um eine therapeutisch wirksame Dosierung festzulegen⁵³. Die antibakterielle Wirksamkeit wird üblicherweise zunächst *in vitro* untersucht. Dazu stehen mehrere Bewertungsparameter zur Verfügung, welche in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

2.4.1 Die minimale Hemmstoffkonzentration

Ein Hauptparameter der Pharmakodynamik ist die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK). Sie charakterisiert die Empfindlichkeit eines Bakterienstammes gegenüber einem bestimmten Antibiotikum^{93,115,178}. Als minimale Hemmstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) bezeichnet man die niedrigste Antibiotikumkonzentration, bei der in einem Dilutionstest kein sichtbares Wachstum von Mikroorganismen feststellbar ist. Ein solcher Reihenverdünnungstest, der in 2-fachen Verdünnungsschritten ausgeführt wird, kann in flüssigem (Makro- oder Mikrodilution) oder festem Nährmedium (Agardilution) mit einem Standard-Inokulum von 5×10^5 KBE/ml oder 5×10^4 KBE/Vertiefung der Mikrotiterplatte und einer Inkubationsdauer von 16 bis 20 Stunden bei 35 °C durchgeführt werden³⁸. Die MHK-Bestimmung ist eine Endpunktbestimmung, bei der nicht das Absterbeverhalten einer Bakterienpopulation ermittelt wird, sondern lediglich die geringste bakteriostatisch wirksame Konzentration. Es wird ein MHK-Bereich dargestellt, da Stämme einer Bakterienspezies bzw. Isolate eines Stammes eine unterschiedliche Empfindlichkeit haben können. Aus diesem Grund werden gewöhnlich einige Hundert Isolate eines Stammes auf ihren MHK-Wert getestet und daraus die MHK_{50} sowie die MHK_{90} bestimmt. Darunter versteht man den MHK-Wert für 50 bzw. 90 % der Stämme einer Spezies^{92,94,178}.

Die MHK-Werte von Pradofloxacin, Enrofloxacin und anderen Chinolonen für Stämme von *S. intermedius*, *S. aureus*, und *E. coli* wie die Referenzen *S. aureus* ATCC 6538 und *E. coli* ATCC 8739 wurden im Agardilutionstest ermittelt⁷⁷. Für Pradofloxacin ergab sich ein MHK-Wert von 0,015 – 0,03 $\mu\text{g/ml}$ für *E. coli* ATCC 8739 und 0,03 – 0,06 $\mu\text{g/ml}$ für *S. aureus* ATCC 6538. Die minimale Hemmstoffkonzentration von Enrofloxacin war etwa doppelt so hoch (0,03 – 0,06 $\mu\text{g/ml}$ für *E. coli* und 0,06 – 0,125 $\mu\text{g/ml}$ für *S. aureus*). Pradofloxacin erwies sich als hochwirksam gegen 973 getestete Isolate aus den USA, vor allem gegen grampositive Erreger sowie *Mykoplasma spp.* und war deutlich effektiver als

Amoxicillin-Clavulansäure und andere getestete Chinolone¹. In einer Studie mit caninen und felinen Isolaten aus Deutschland konnte ein ähnliches Ergebnis verzeichnet werden, wobei Pradofloxacin Amoxicillin-Clavulansäure, Cephalexin, Clindamycin und den Chinolonen Enrofloxacin, Marbofloxacin, Difloxacin und Orbifloxacin überlegen war⁴⁴. Die Aktivität von Pradofloxacin gegen anaerobe Bakterien wurde in mehreren In-vitro-Studien belegt^{158,166,168}.

Neben der traditionellen MHK-Ermittlung in Nährmedien erfolgte die Bestimmung von MHK-Werten auch in biologischen Flüssigkeiten (Plasma, Transsudat und Exsudat). Dabei konnten optische Methoden zur Erfassung des Wachstums nicht eingesetzt werden, da in den ohnehin trüben Medien keine durch Bakterienwachstum verursachten Unterschiede im Trübungsgrad erkennbar wären. Daher wurde die minimale Hemmstoffkonzentration über Bestimmungen der KBE/ml ermittelt und definiert als die niedrigste Konzentration, bei der die Bakterienzahl unterhalb des Anfangsinokulums von 5×10^5 KBE/ml blieb^{3,5,151}.

2.4.2 Bakterielle Abtötungskinetiken

Eine weitere Möglichkeit, die antibakterielle Wirksamkeit einer Substanz in vitro zu beschreiben, ist die bakterizide Aktivität. Dazu werden Abtötungskinetiken erstellt. Einer Bakterienkultur in Nährlösung wird das zu testende Antibiotikum zugefügt und die Reduktion der KBE/ml im Verlauf der Zeit erfasst. Es wird beobachtet, wann die Wirkung des Antibiotikums einsetzt und wie lange der Effekt anhält. Diese Abtötungskurven werden mit Wachstumskontrollen (ohne Zusatz eines Antibiotikums) verglichen. In diesen Studien ist die Wirkstoffkonzentration konstant. Im Gegensatz dazu stehen die dynamischen In-vitro-Modelle. Dabei kann zwischen Modellen mit konstanter und variabler Antibiotikumkonzentration unterschieden werden. Modelle mit wechselnden Antibiotikumkonzentrationen, die durch Verdünnung oder Diffusion hervorgerufen werden, simulieren pharmakokinetische Konzentrations-Zeit-Profile^{100,116}. Die antibakterielle Aktivität von Pradofloxacin gegen *S. intermedius*⁸⁸ sowie die MHK und „Mutant Prevention Concentrations“ für 3 Wildtyp und 15 Fluorochinolon-resistente *E. coli*-Stämme¹⁰⁵ wurden in solchen Modellen ermittelt.

Die bakterizide Aktivität von Pradofloxacin gegenüber *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 sowie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13882, einem Feldstamm von *Salmonella typhimurium* und *Pasteurella multocida* wurde geprüft.

Es zeigte sich eine verbesserte bakterizide Aktivität gegen *S. aureus* und die getesteten gramnegativen Stämme. Zudem konnte statische Aktivität gegen *S. aureus* und *E. coli* bereits bei niedrigen Konzentrationen festgestellt werden²⁰⁰.

Andere Studien beschreiben Abtötungskinetiken von Fluorochinolonen in natürlichen Körperflüssigkeiten aus dem Zieltier, wie Serum-, Transsudat- oder Exsudatproben, die nach Applikation eines Antibiotikums gewonnen wurden. So kann der Verlauf der Abtötung unter möglichst authentischen Bedingungen ermittelt werden, indem die Proben *in vitro* mit einem Inokulum des zu testenden Mikroorganismus versetzt und nach Inkubation die KBE/ml bestimmt werden^{3,5,151,153}.

2.4.3 Postantibiotische und Sub-MHK-Effekte

Neben den bereits genannten antibakteriellen Wirkungen, Wachstumshemmung und Abtötung, existieren weitere antibakterielle Effekte von Antibiotika. Nach initialer Exposition gegenüber hohen Antibiotikakonzentrationen, kommt es *in vivo* zum Absinken der Wirkstoffkonzentration, und viele Substanzen zeigen eine fortdauernde Hemmwirkung auf die verbliebene Bakterienpopulation¹⁸¹. Die bekanntesten Parameter sind der postantibiotische Effekt (PAE), der postantibiotische Sub-MHK-Effekt (PA-SME) und der Sub-MHK-Effekt (SME). Diese Parameter ermöglichen eine noch präzisere Beschreibung der antibakteriellen Wirksamkeit einer Substanz^{30,99,104}. Für diverse Antibiotikaklassen konnte ein PAE nachgewiesen werden²⁸, so auch für die Fluorochinolone^{22,181,190}. Zusätzlich wurden eine Verringerung der Expression von Virulenzfaktoren sowie das sog. „post-antibiotic leucocyte enhancement“ (PALE) beschrieben, die in dieser Arbeit nicht weiter behandelt werden. Darunter versteht man eine erhöhte Empfindlichkeit von Zellen in der postantibiotischen Phase gegenüber Phagozytose. Es kommt zu einer Steigerung der Leukozytenaktivität, die auch für Fluorochinolone belegt ist^{96,135,181}.

2.4.3.1 Postantibiotischer Effekt (PAE)

Der *In-vitro*-PAE ist definiert als die Zeit, in der bakterielles Wachstum unterdrückt wird, nachdem die Mikroorganismen kurzzeitig einer relativ hohen Antibiotikumkonzentration ausgesetzt waren. Der PAE kann folgendermaßen

berechnet werden: $PAE = T - C$, dabei ist T die Zeit, die benötigt wird, bis die KBE/ml der vorbehandelten Bakterienkultur um $1 \log_{10}$ angestiegen ist verglichen mit der KBE/ml, die direkt nach Waschung/Verdünnung ausgezählt wurde, und C ist die entsprechende Zeit, die dafür in einer unbehandelten Kontrolle erforderlich ist. Es muss zwischen dem PAE in vitro und dem PAE in vivo unterschieden werden¹¹³.

Der In-vivo-PAE ist die Zeit bis eine Bakterienkultur in einem Gewebe behandelte Tiere im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle um $1 \log_{10}$ gewachsen ist, nachdem die Antibiotikumkonzentration im Serum oder am Infektionsort unter die MHK gesunken ist. Der In-vivo-PAE umfasst somit auch die Sub-MHK-Effekte¹¹³. Der erste In-vivo-PAE wurde von Vogelmann und Mitarbeitern¹⁸⁴ in einem Infektionsmodell mit neutropenischen Mäusen ermittelt. Zudem wurde der Effekt bei Kaninchen im „Tissue-Cage“-Modell gezeigt¹²⁶. Im Allgemeinen dauern die postantibiotischen Effekte in vivo länger an als in vitro¹²⁵.

2.4.3.2 Postantibiotische Sub-MHK-Effekte (PA-SME)

Der postantibiotische Sub-MHK-Effekt beschreibt den Effekt eines Antibiotikums unterhalb der MHK auf das Bakterienwachstum, der nach vorheriger Exposition einer höheren Konzentration als der MHK auftritt. Die Berechnung erfolgt analog zur PAE-Berechnung ($PA-SME = T_{pa} - C$), dabei ist T_{pa} die Zeit, die Bakterien, die zuvor einem Antibiotikum und anschließend einer Sub-MHK ausgesetzt waren, für ein Wachstum von $1 \log_{10}$ benötigen und C die Zeit, die bei einer unbehandelten Kontrollpopulation für das entsprechende Wachstum erforderlich ist¹¹³. Dieses Zeitintervall schließt den PAE und die zusätzliche Zeit ein, in der das Wachstum durch Sub-MHK-Effekte unterdrückt wird^{129,131}.

Die postantibiotischen Sub-MHK-Effekte haben wahrscheinlich eine größere klinische Relevanz als der PAE, da in vivo immer Konzentrationen unterhalb der MHK nach oder evtl. während einer Antibiotikatherapie entstehen, weil die Eliminierung eines Arzneistoffes im Körper nicht mit einem Mal erfolgt. Lange postantibiotische Sub-MHK-Effekte können damit zur Abdeckung des Therapieintervalls beitragen¹²⁵.

2.4.3.3 Sub-MHK-Effekt (SME)

Die Zugabe von Antibiotikakonzentrationen unterhalb der minimalen Hemmstoffkonzentration führt zu einer kurzzeitigen Verringerung der KBE/ml. Diesen Effekt bezeichnet man als Sub-MHK-Effekt¹¹³. Er tritt direkt auf, ohne dass die Bakterienpopulation zuvor einem Antibiotikum ausgesetzt war. Odenholt und Mitarbeiter¹²⁸ stellten die Hypothese auf, dass der SME die Verteilung der Antibiotika-Sensibilität einer Bakterienpopulation widerspiegelt, in der es empfindliche Subpopulationen gibt, die unterhalb der MHK gehemmt werden. Man beobachtet ein Absinken der KBE/ml und interpretiert das Wiederanstiegen der KBE/ml als Wachstum von weniger empfindlichen Varianten. Der SME repräsentiert demgemäß die benötigte Zeit, bis die Subpopulation mit geringerer Empfindlichkeit dominant wird. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den SME ist die Interaktion der Antibiotika mit dem Immunsystem, was anhand von Studien mit immungeschwächten bzw. immunkompetenten Mäusen/Ratten belegt wurde, da bei immunkompetenten Tieren niedrigere Antibiotikakonzentrationen ausreichen, um einen Effekt zu erzielen, als bei Tieren mit Neutropenie¹²⁵. Zur Kalkulation des SME kann folgende Formel verwendet werden: $SME = T_S - C$, dabei ist T_S die Zeit, die für eine Bakterienkultur, die ausschließlich mit Antibiotikakonzentrationen unterhalb der MHK in Kontakt war, erforderlich ist, um im Vergleich zum Ausgangswert direkt nach Waschung/Verdünnung der Zellen um 1 \log_{10} anzusteigen; und C ist die Zeit, die eine unbehandelte Kontrolle für das entsprechende Wachstum braucht¹²⁷.

2.4.3.4 Postantibiotische und Sub-MHK-Effekte von Pradofloxacin in vitro

Die postantibiotischen Effekte von Pradofloxacin bei *E. coli*- und *S. aureus*-Referenzstämmen sowie jeweils drei Isolaten von *E. coli* und *S. intermedius* von Hunden mit Pyodermie wurden bei einer Standarddichte von 10^6 bis 10^7 KBE/ml ermittelt. Der PAE betrug etwa 2 – 2,5 Stunden. Die postantibiotischen Effekte konnten durch die Zugabe von $\frac{1}{2}$ MHK zu den vorbehandelten und anschließend gewaschenen Zellen deutlich verlängert werden. Der Autor schloss daraus, dass Sub-MHK-Konzentrationen und die daraus resultierenden postantibiotischen Effekte zur Abdeckung des Therapieintervalls und zum Erreichen des

Behandlungserfolgs beitragen¹⁹⁷. In weiteren Studien wurden die postantibiotischen Sub-MHK-Effekte von Pradofloxacin bei den Referenzkeimen *E. coli* ATCC 8739 und *S. aureus* ATCC 6538 in Bakterienpopulationen mit sehr hoher Dichte (10^9 bis 10^{10} KBE/ml) evaluiert. Es ergaben sich postantibiotische Sub-MHK-Effekte von 5 - 11 Stunden bei $\frac{1}{2}$ MHK. Bei *S. aureus* zeigte sich nach 2-stündiger Exposition mit der 2-fachen MPC von 1,1 $\mu\text{g/ml}$ Pradofloxacin nach Waschung und Verdünnung der Zellpopulationen ein PAE von $2 \pm 0,5$ h. Abhängig von der Verdünnungsstufe (10^3 - oder 10^5 -fach) konnte ein PA-SME von etwa 10 - 11 Stunden bei Zugabe von $\frac{1}{2}$ MHK zur gewaschenen, vorbehandelten Zellpopulation beobachtet werden. Unbehandelte Kontrollen, die verdünnt in Nährmedium mit $\frac{1}{2}$ MHK gegeben wurden, wiesen einen SME von mindestens 5 Stunden auf¹⁹⁸.

2.4.4 Die „Mutant Prevention Concentration“ (MPC)

Die „Mutant Prevention Concentration“ (MPC) bezeichnet eine Antibiotikumkonzentration, bei der das Wachstum einer großen Population ($> 10^9$ KBE/ml) gehemmt wird. Durch das hohe Inokulum steigt die Wahrscheinlichkeit, dass in der Population resistente Subpopulationen vorliegen und dass diese Mutanten bei Konzentrationen, die zwischen der MHK und der MPC liegen, selektiert werden. Den Bereich zwischen MHK und MPC bezeichnet man als „Mutant Selection Window“ (MSW)^{47,48,113,204}.

Die Existenz des „Mutant Selection Window“ in vivo wurde in einer Studie mit Levofloxacin und *S. aureus* in einem „Tissue-Cage“-Modell beim Kaninchen bestätigt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die in vitro erhobenen Grenzwerte gut zu den in vivo festgestellten passen und dass Konzentrationen oberhalb des MSW die Unterdrückung resistenter Subpopulationen erwarten lassen⁴⁰.

MPC-Kurven liefern eine Analyse der großen Population hinsichtlich der Verteilung der Antibiotika-Empfindlichkeit. Würde die Antibiotikumkonzentration während der Therapie über der MPC gehalten, könnte eine Vermehrung von Mutanten abgewendet werden^{52,130,205}.

Die MPCs von Pradofloxacin und anderen veterinärmedizinischen Fluorochinolonen bezüglich *E. coli*- und *S. aureus*-Stämmen sowie einem

S. intermedius-Stamm wurden ermittelt. Für die Kontrollstämme *E. coli* ATCC 8739 und *S. aureus* ATCC 6538 ergab sich für Pradofloxacin eine MPC von 0,2 – 0,25 µg/ml (*E. coli*) bzw. 0,5 - 0,6 µg/ml (*S. aureus*). Insgesamt zeigte Pradofloxacin die niedrigsten MPC-Werte und daher ein höheres Potenzial zur Verhinderung der Selektion resistenter Mutanten als die anderen getesteten Fluorochinolone^{195,196}. In einer anderen Studie wurde die MPC von Pradofloxacin für den anaeroben Keim *Porphyromonas gingivalis* bestimmt¹⁶⁵.

2.5 PK/PD-Modell

Eine antibakterielle Therapie sollte im Idealfall nicht nur zur klinischen sondern auch zur bakteriologischen Heilung führen. Werden nicht alle pathogenen Organismen ausgelöscht, kann es während oder am Ende einer Therapie zur Vermehrung weniger empfindlicher Subpopulationen, mit höherem MHK-Wert und potenzieller Resistenz, kommen. Daher wird mithilfe des PK/PD-Modells, welches die in vivo ermittelten Parameter der Pharmakokinetik mit dem in vitro bestimmten MHK-Wert verbindet, versucht, geeignete Dosierungen festzulegen. Drei Indizes werden genutzt: das AUC/MHK-Verhältnis, das C_{max} /MHK-Verhältnis und die Zeit, in der die Plasmakonzentration die MHK überschreitet¹⁷⁶. Im Folgenden werden ausschließlich die für Chinolone relevanten Indizes behandelt.

2.5.1 Verhältnis von C_{max} /MHK und AUC_{24} /MHK

Üblicherweise werden bei konzentrationsabhängigen Antibiotika wie Chinolonen entweder die ermittelte maximale Konzentration oder die Gesamtexposition des Antibiotikums innerhalb eines Dosierungsintervalls von 24 Stunden durch die minimale Hemmstoffkonzentration des zu bekämpfenden Erregers geteilt. Für Fluorochinolone wird im Allgemeinen ein Verhältnis von C_{max} /MHK von > 10 oder ein Verhältnis von AUC_{24} /MHK > 125 als optimal für die Wirksamkeit gegen gramnegative Pathogene angesehen. Dosierungspläne, die kein größeres AUC_{24} /MHK-Verhältnis von 100 bzw. C_{max} /MHK-Verhältnis von > 8 aufweisen können, werden als Risikofaktor für die Entstehung von Resistenzen gramnegativer Erreger betrachtet^{59,70,109,181}. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die oben genannten Daten aus Tierversuchen mit neutropenischen Mäusen oder humanmedizinischen Studien mit kranken, immunschwachen Patienten stammen und dass ähnliche Beziehungen bei erkrankten, immunkompetenten

Haustieren zwar bestehen, die Verhältnisse (AUC_{24}/MHK , C_{max}/MHK) aber wahrscheinlich unterschiedlich sind, weil Antibiotika und Immunsystem die Erreger gemeinsam bekämpfen¹⁰⁹. Andere Autoren gaben an, dass ein AUC_{24}/MHK -Verhältnis von 40 zur Eliminierung von grampositiven Bakterien bei immunkompetenten Patienten ausreichend sei^{54,201}. In sog. Ex-vivo-Studien bei Wiederkäuern wurden AUC_{24}/MHK -Daten von Danofloxacin ermittelt, die unter dem herkömmlichen Wert von 125 lagen, mit denen aber dennoch eine bakterizide Wirkung gezeigt werden konnte⁹⁵. Studien mit dem Fluorochinolon Ibafoxacin bei Katzen zeigten in Abtötungskinetiken in vitro, dass bakterielle Eliminierung mit AUC_{24}/MHK - und C_{max}/MHK -Verhältnissen unter den herkömmlichen Zielwerten stattfand³⁹.

In einer Studie mit einem dynamischen In-vitro-Modell, mit dem die ungebundene Wirkstoffkonzentration nach einer einmaligen oralen Applikation von 3 mg PRA/kg KG simuliert wurde, lag das AUC_{24}/MHK -Verhältnis von Pradofloxacin über 125 und das C_{max}/MHK -Verhältnis über 10. Getestet wurden drei Stämme von *S. intermedius*⁸⁸.

2.5.2 Verhältnis von AUC_{24}/MPC

Da auf der MHK basierende PK/PD-Grenzwerte weniger geeignet sind, die selektive Verstärkung resistenter Subpopulationen zu unterdrücken, wurde versucht, PK/PD-Indizes zu erstellen, die direkt die Empfindlichkeit resistenter Subpopulationen berücksichtigen wie z.B. das Verhältnis von AUC_{24}/MPC ²⁰⁵. Die In-vitro-Pharmakokinetik von Ciprofloxacin im Verhältnis zur MPC von *E. coli* wurde geprüft und es zeigte sich, dass ein bestimmtes AUC_{24}/MPC -Verhältnis (≥ 22) die Neigung zur Selektion resistenter Populationen beeinflussen kann¹³⁰. In einer Studie mit fünf Fluorochinolonen und *S. aureus* war das AUC_{24}/MPC -Verhältnis ebenfalls der einzige Parameter, der mit der Prävention von Resistenzentwicklung korrelierte⁶.

Für Pradofloxacin wurde in einem dynamischen In-vitro-Modell ein AUC/MPC -Verhältnis von 73 – 92 ermittelt, um die Selektion resistenter Mutanten bei drei Wildtyp-Stämmen von *E. coli* zu verhindern¹⁰⁵.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Bei der Durchführung des experimentellen Teils kamen die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte, Materialien und Präparate zur Anwendung.

Tabelle 1. Verwendete Materialien und Geräte

Geräte / Materialien / Präparate	Hersteller / Firma
ADVIA [®] 120 Hämatologiesystem	Siemens Medical Solutions Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
Anatomische Pinzette, Standard	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Aqua dest. (Hausanlage)	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Arterienklemme, Halstead-Mosquito	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Blutentnahmesystem: Monovette [®]	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blutentnahmesystem: Vacuette [®]	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
Buster Halskragen	Kruuse, Langeskov, Dänemark
Buster OP-Cover (60 x 90 cm)	Kruuse, Langeskov, Dänemark
Carprofen (Rimadyl [®]) Injektionslösung, Tabletten	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CASO (Caseinpepton-Sojamehlpepton)-Agar/-Bouillon	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cephalexin (Rilexine [®]) Tabletten	Virbac GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland
Chirurgische Pinzette, Standard	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Columbia Agar mit 5 % Schafblut	BD, Diagnostic Systems, Sparks, MD USA
Dampf-Autoklav Typ 17	MELAG oHG Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Diazepam 10 Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
dog&cat body (Größe S, M)	VetMedCare, Höchst, Österreich
Einmal OP-Haube	Heiland Vet GmbH, Hamburg, Deutschland
Einmalkittel	Heiland Vet GmbH, Hamburg, Deutschland
Einmal-Skalpelle Figur 22	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Einwegkanüle, 21 G, 0.8 x 40 mm	Luer Lock, Terumo, Leuven, Belgien,
Elektronische Stoppuhren	Lange, Deutschland
Emla®	AstraZeneca GmbH; Wedel, Deutschland
Endotrachealtuben (6,0 – 8,0 mm)	Willy Rüschi GmbH, Kernen i.R.; Deutschland
Enrofloxacin-Stammlösung	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
Erlenmeyerkolben	DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland
Facemask, Einmal-Gesichtsmaske	IREMA Ireland, Kilmallock Co. Limerick, Republic of Ireland
Falcon Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
Fasszange nach Allis	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Feindosierungsspritzen (1, 2, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Foldback-Klemmer, 32 mm	Jakob Maul GmbH, Bad König, Deutschland
Formaldehydlösung 35 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Giemsa-Stammlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe, Vasco OP Sensitive	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Hebel-Revolver Lochzange	VBW Werkzeugfabrik GmbH, Remscheid, Deutschland
Heiland Infusionsgerät DIN 58362	Heiland Vet GmbH, Hamburg, Deutschland
Heizplatte	Heidolph Instruments GmbH&CoKG, Schwabach, Deutschland
Henry Schein® Sterilisationsbeutel (9x23 cm)	Heiland Vet GmbH, Hamburg, Deutschland
Hibiscrub® (Chlorhexidinguconat 4 %)	SSL Healthcare Nederland N.V. Leerdam, Nederland
IDEXX VetTest® Trockenchemie Analysegerät	IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Deutschland
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Inhalationsnarkosegerät (Dräger Titus)	Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland
Inkubationsschrank, Function Line, Typ B 12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Isofluran CP®	CP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kanülen 20 G x 3/4	Access Technologies, Skokie, Illinois, USA
Ketaminhydrochlorid	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Kodan®-Spray	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Lambda-Carrageenan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lichtmikroskop, Nikon Labophot Type 104	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Medetomidin (Domitor®)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Mehrfachentnahme-Kanüle	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
Microbank™ Kryo-Probengefäße	Pro-Lab Inc., Ontario, Canada
Monitor Mindray MEC 1000 Vet	Mindray, Shenzhen, China
Monosyn 5.0	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Mullbinden	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Mullkompressen (5x5 cm)	Wilh. Weisweiler GmbH & Co.KG, Münster, Deutschland
Nadelhalter nach Mathieu	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension	Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland
Pradofloxacin-Stammlösung	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
Präparierscheren Metzenbaum	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Probengefäße, Eppendorf Reaktionsgefäße (Polypropylen; 1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Redon-Drain (2,5 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Rolta® Wattebinden	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Schere, stumpf-stumpf	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Schermaschine Aesculap Typ 104	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Schermaschine, Moser Arco	Ehaso, Solingen, Deutschland

Schüttelwasserbad GFL 1086	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Silikonkleber NuSil MED 1137	Polytec-PT GmbH, Waldbronn, Deutschland
Spectrophotometer Spectronic 301	Milton Roy Co, Analytical Products Div., Rochester, NY, USA
ssniff [®] , Alleinfutter für Hunde	ssniff–Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Sterilbank Clean Air BS 5726	Fa. Thermo Quest, Engelsbach, Deutschland
Technoklav 50	Integra Biosciences GmbH, Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Tuchklemme, Backhaus	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
TYGON [®] Silikonschlauch (12,7 mm)	Saint-Gobain Verneret, Charny, Frankreich
Vasofix Braunüle (20 Gauge) und Mandrin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vicryl 3.0	Johnson & Johnson, St.-Stevens-Woluwe, Belgien
Vortexer, Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH&CoKG, Schwabach, Deutschland
Waage, Mettler AE 200	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.2 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

In den Studien wurden 6 adulte weibliche Beagle aus der Kolonie der Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Deutschland, zu Versuchszwecken gezüchtet bei Bomholt, Castrop-Rauxel, Deutschland oder Marshall BioResources, North Rose, NY, USA eingesetzt. Die Hunde waren durch eintätowierte Nummern an der Ohrinnenseite individuell und unveränderlich gekennzeichnet. Zum Zeitpunkt der „Tissue-Cage“ (TC)-Implantation waren die Tiere zwischen 15 und 26 Monate alt. Das Körpergewicht betrug zwischen 9,3 kg und 15,4 kg (Median 10,8). Alle Hunde waren regelmäßig geimpft und entwurmt. Vor der TC-Implantation wurden die Hunde einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen.

Die Haltung der Hunde erfolgte in Einzelboxen. Jede Box war mit Tenderfoot – Boden, Tränke und Futtertrog ausgestattet. Die Lichtverhältnisse waren einem 12-Stundenrhythmus angepasst. Die Temperatur wurde mittels einer Klimaanlage kontrolliert und lag stetig zwischen 18 °C und 23 °C. Die Tiere hatten Auslauf im Außengehege und erhielten einmal täglich bedarfsgerecht entsprechend den Herstellerangaben handelsübliches Trockenfutter für Hunde. Trinkwasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

3.3 Anfertigung und Implantation der „Tissue-Cages“

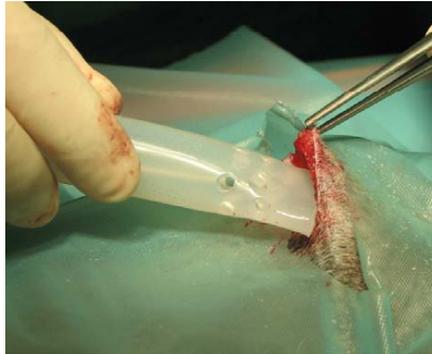
Die „Tissue-Cages“ (TCs) wurden unter einer Sterilbank aus jeweils 8,5 cm langen Silikonschlauchstücken (1,27 cm Innendurchmesser) von Hand angefertigt. Mit Hilfe einer Lochzange und einer Schablone wurden beide Enden mit jeweils 12 Löchern von 4 mm Durchmesser versehen und mit speziellem Silikonkleber verschlossen. Bis zur völligen Aushärtung des Klebers nach 24 Stunden wurden die Enden von Foldback-Klemmen zusammengehalten. Ein TC hatte eine Oberfläche von etwa 44 cm² und ein Volumen von etwa 11 cm³. Die Austauschfläche eines TC, über welche das TCF mit der Umgebung in Verbindung stand, entsprach ca. 7 % der Gesamtoberfläche.

Abbildung 2. „Tissue-Cage“



Die Implantation der zuvor autoklavierten TCs (Melag Dampf-Autoklav, 1 bar, 50 min) erfolgte unter Allgemeinanästhesie mit Medetomidin (0,04 mg/kg KG), Diazepam (0,5 mg/kg KG), Ketamin (2,5 mg/kg KG) als Prämedikation und Inhalationsnarkose (Isofluran nach Wirkung, 1,5 - 2,5 % der Atemluft). Während der Operation wurden EKG, Herzfrequenz, Atmung und Sauerstoffsättigung mittels eines Überwachungsmonitors kontrolliert. Jedem Hund wurden auf der linken Körperseite ein TC am Brustkorb und ein TC an der Flanke eingesetzt. Auf der rechten Körperseite wurde nur ein TC am Brustkorb implantiert. Vor der Implantation erfolgte eine großflächige Rasur im Bereich der seitlichen Brustwand. Zur anschließenden Desinfektion dienten Hibiscrub® und Kodan®-Spray. Die Haut wurde auf einer Länge von ca. 1 – 3 cm eingeschnitten und es folgte die stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche, in die der TC hineingeschoben werden konnte. Der TC wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Monosyn) mit einer einzelnen Naht an der darunterliegenden Muskulatur fixiert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss mit Unterhaut- und Hautnaht (Vicryl). Die Hunde mussten zum Schutz der Implantationsstellen 14 Tage lang einen Halskragen und zusätzlich einen „Body“ tragen. Am Tag der Implantation begann eine 10-tägige Infektionsprophylaxe mit Cephalexin (Rilexine®, Dosierung 2 x täglich 25 mg/kg KG). Zur Schmerzprophylaxe erhielten die Tiere 3 bis 4 Tage lang Carprofen (Rimadyl®, Dosierung 1 x täglich 4 mg/kg KG). Anschließend war eine Einheilungszeit von etwa 8 Wochen erforderlich. Der Einheilungsverlauf wurde anfangs durch tägliche, später durch zweimal wöchentliche Adspektion und Palpation überwacht.

Abbildung 3. Implantation eines „Tissue-Cages“



3.3.1 Probenentnahme aus den „Tissue-Cages“

Die Entnahmestellen wurden vor der ersten Probenentnahme geschoren. 30 Minuten vor der Probennahme diente die Auftragung einer 5%igen Lidocaincreme (Emla[®]) zur Lokalanästhesie der Haut über den TCs. Eine Desinfektion der Haut mit Hibiscrub[®] und Kodan[®]-Spray erfolgte kurz vor der Punktion. Die Probenentnahme erfolgte immer mit sterilen Handschuhen. Der TC wurde mit einer Hand fixiert und eine Kanüle (20 G x 3/4) mit einem kurzen, kräftigen Schwung durch Haut und TC-Wand gestochen. Anschließend wurde eine Einmalspritze aufgesetzt und aspiriert. Etwa 0,5 bis 0,8 ml Flüssigkeit pro Entnahme waren im Rahmen einer Kinetikstudie mit mehreren Entnahmezeitpunkten pro Tag zu gewinnen. Bei größeren Zeitabständen zwischen den Probenentnahmen (z. B. mehrere Tage) konnten bis zu 5 ml Flüssigkeit aus einem TC entnommen werden. Aliquots zur Zellzahlbestimmung (Ausstrich und ggf. ADVIA[®] 120) wurden entnommen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 4 °C mit 5000 x g zentrifugiert. Bis zur Weitergabe der Proben an das analysierende Labor (Dr. R. Krebber, Bayer CropScience AG – D-ROCS, Monheim, Deutschland) verblieben diese tiefgekühlt bei mindestens –18 °C in der Prüfeinrichtung.

Abbildung 4. Probenentnahme aus einem „Tissue-Cage“



3.3.2 Gewinnung von Exsudat aus einem „Tissue-Cage“

Mit Hilfe von Lambda Carrageenan, einem aus Rotalgen gewonnenen Polysaccharid, wurde eine Inflammation erzeugt.

3.3.2.1 Herstellung einer Carrageenan-Lösung

Zur Herstellung einer 1%igen Carrageenan-Lösung mussten 0,5 g Carrageenan und 50 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung in einem Erlenmeyerkolben mit einem Magnetrührer auf einer Heizplatte bis zum Auflösen des Carrageenans erhitzt werden. Die fertige Carrageenan-Lösung wurde anschließend gleichmäßig auf 6 Gefäße verteilt, verschlossen und bei 121 °C für 15 min autoklaviert (Technoklav 50). Die Lösung wurde bis zum Gebrauch vor Licht geschützt aufbewahrt.

3.3.2.2 Induktion einer sterilen Entzündung im „Tissue-Cage“

Die Carrageenan-Lösung wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. 30 Minuten vor Injektion in den TC wurde wie bei den Probenentnahmen eine lokalanästhetische Creme (Emla®) auf die Haut über den entsprechenden TCs aufgetragen. 0,5 ml TCF wurden aus den TCs entnommen und anschließend 0,5 ml Carrageenan-Lösung unter sterilen Bedingungen in den TC injiziert. Die Carrageenan-Injektion erfolgte in der jeweiligen Studie zum Zeitpunkt der ersten Applikation von *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension*.

3.3.2.3 Bestimmung der Zellzahl im „Tissue-Cage-Fluid“

Zur Ermittlung der Zellzahl und Zelldifferenzierung im TCF wurden vor und nach jeder Studie Ausstriche definierter Menge (10 bzw. 20 μl) angelegt, nach Pappenheim (3 min May-Grünwald-Lösung; 2 min May-Grünwald-Lösung/aqua dest. 1:1; 18 min Giemsa-Gebrauchslösung (10 Tropfen Giemsa-Konzentrat in 10 ml aqua dest.)) gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Nach Möglichkeit erfolgte die Auszählung von 200 Zellen. In den beiden Studien mit Verwendung des Entzündungsmediators Carrageenan mussten zusätzlich von jeder entnommenen TCF-Probe Ausstriche angefertigt werden, um das Vorliegen einer Entzündung im TC nachzuweisen. Sofern ausreichend Probenvolumen vorhanden war, diente der ADVIA[®] 120 zur Bestimmung der absoluten Zellzahl. Das Gerät ist nicht für TCF validiert. Um nach der Zelldifferenzierung die absolute Zellzahl der Leukozytenuntergruppen zu ermitteln, konnte der errechnete Prozentwert der Zellauszählung mit der absoluten Zellzahl multipliziert werden.

3.3.2.4 Proteingehalt von „Tissue-Cage-Fluid“

Zur Charakterisierung des TCFs und Differenzierung zwischen Trans- und Exsudat, wurden 8 h nach Carrageenan-Injektion entnommene TCF-Proben aus der 3. Pharmakokinetikstudie, auf ihren Proteingehalt untersucht. Bis zur Analyse wurden die Proben etwa 9 Monate bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte exemplarisch an 3 Trans- und 3 Exsudatproben (Hund ID 0831, ID 0868 und ID 0847) mit dem Bio-Rad Protein Assay. Der Test beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford²⁴, bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung eines Farbstoffs (Coomassie-Brilliantblau G-250) an Protein proportionale Farbänderungen hervorrufen. Der eingesetzte Farbstoff hat in seiner an Protein gebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Als Standard kam bovines Serumalbumin zur Anwendung. Zur Erstellung einer Eichgeraden diente eine Extinktionsbestimmung mit Serumalbumin-Standards von 0,2 bis 1,4 mg Protein/ml. Die zu testenden TCF-Proben wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Von diesen Proben wurde jeweils ein Volumen von 10, 20 und 40 μl gegen Aqua dest. geprüft (Spectrophotometer Spectronic 301) und der Proteingehalt der Probe konnte hochgerechnet werden. Für die Trans- und Exsudatproben wurden abschließend Mittelwerte (\pm SD) gebildet.

3.3.3 Entfernung der „Tissue-Cages“

Nach Abschluss aller Studien erfolgte die Entfernung der TCs. Dazu mussten die Tiere wie zur Implantation narkotisiert und vorbereitet werden. Über dem TC wurde ein ca. 2 - 3 cm langer Schnitt gesetzt und der von einer Gewebekapsel umgebene TC konnte frei präpariert werden. Anschließend wurde eine Drainage in die subkutane Wundhöhle gelegt, um eine mögliche Serombildung zu reduzieren. Nach 2 Tagen konnte diese entfernt werden. Infektions- und Schmerzprophylaxe erfolgten wie bei der Implantation. Die Wunden wurden mittels Halskragen, Verband und „Body“ vor Verunreinigung und Manipulation durch das Tier geschützt.

3.3.3.1 Histopathologische Untersuchung der „Tissue-Cages“

Nach der Exstirpation wurden die TCs in einer 10%igen Formalinlösung fixiert und zur histopathologischen Untersuchung an Dr. M. Rinke (Bayer Schering Pharma AG, GDD-GED-GTOX Pathology and Clinical Pathology, Elberfeld, Deutschland) gesandt. Dort wurden nach der makroskopischen Beurteilung von jedem TC 5 Proben angefertigt, wobei die Schnittführung quer durch die Region der Perforation, durch die Mitte des Schlauchstücks, durch die Verklebungsstelle an den Enden und durch das im Innern befindliche fadenähnliche Gewebe gesetzt wurde. Das Silikonmaterial musste beim Zuschneiden entfernt werden und es erfolgte eine Einbettung der Proben in Paraffin. Schnitte von etwa 5 Mikrometern Dicke wurden hergestellt, mit Hämalaun und Eosin (H&E) gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Tabelle 2 zeigt die Einteilung der pathologischen Veränderungen.

Tabelle 2. Einstufung der pathologischen Veränderungen

	Ausmaß der pathologischen Veränderung
minimal	nur gering, schwer zu finden, herdförmig
geringgradig	in mehreren Gesichtsfeldern erkennbar, ohne große Stärke
mittelgradig	30 bis 50 % einer Gewebeprobe betroffen
hochgradig	bis zu 75 % einer Gewebeprobe betroffen
massiv	nahezu gesamte Gewebeprobe betroffen

3.4 Pharmakokinetik

3.4.1 Prüfgegenstand

Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension der Charge KP03R5N, verwendbar bis 20.Okt.2008, kam in allen pharmakokinetischen Studien zur Anwendung. Die Stabilität der Formulierung und deren Wirkstoffgehalt wurden analytisch (BHC-AH-RD Analytics, Leverkusen, Deutschland) bestätigt.

3.4.2 Applikation des Prüfgegenstandes

Die Tiere wurden in allen Studien in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Applikationstagen aufgeteilt. Für die Dosisberechnung mussten die Tiere bei der jeweiligen Einschlussuntersuchung gewogen werden. In Abhängigkeit vom Körpergewicht erhielten die Hunde *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* in einer Dosierung von 3 mg/kg KG oral im nüchternen Zustand. Die Dosis wurde auf 10 µl genau berechnet. Die Suspension wurde mit einer Einwegspritze auf den Zungengrund appliziert und jeder unbeabsichtigte Verlust von Prüfsubstanz während der Applikation dokumentiert. Ungefähr 30 Minuten nach der Applikation erfolgte eine Kontrolle der Hundeboxen auf erbrochene Prüfsubstanz, um eine erfolgreiche Applikation zu verifizieren.

3.4.3 Studien zur Pharmakokinetik in Serum und „Tissue-Cage-Fluid“

Insgesamt wurden drei Studien zur Pharmakokinetik von *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* zwischen Januar und Juni 2008 im Animal Center, der GLP-Prüfeinrichtung der Bayer Animal Health GmbH, Monheim, Deutschland, durchgeführt. Die Studien waren im Rahmen des Versuchsvorhabens Nr. 250/a22, Methode M033 bei der zuständigen Behörde angezeigt. Die Bestimmungen des geltenden Tierschutzgesetzes wurden eingehalten.

Am Anfang und am Ende jeder Studie erfolgte eine klinische Untersuchung der Hunde. Einschlusskriterien für die Studien waren eine Allgemeinuntersuchung ohne auffällige Befunde sowie eine geringe Anzahl von Entzündungszellen im TCF.

Tabelle 3. Zusammenfassung des Studiendesigns

	Studie 1	Studie 2	Studie 3
Applikation	Mehrfachapplikation (5 Tage)	Mehrfachapplikation (5 Tage)	Einmalapplikation
Probenentnahme	Serum Transsudat (TCA) ¹⁾ Transsudat (TCB) ¹⁾	Serum Transsudat Exsudat	Serum Transsudat Exsudat
Zeitpunkte der Probenentnahmen (h) Serum und TCF	0; 0,5 ²⁾ ; 1 ²⁾ ; 1,5 ²⁾ ; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 96; 96,5 ²⁾ ; 97; 97,5 ²⁾ ; 98; 100; 102; 104; 106; 108; 120; 126; 132; 144; 168; 192	0; 1 ²⁾ ; 2; 5; 8; 11; 24; 96; 97 ²⁾ ; 98; 101; 104; 107; 120; 126; 132; 144; 168	0; 1 ²⁾ ; 2; 5; 8; 11; 24; 30; 36; 48; 72

¹⁾ TCA = linke Körperseite, TCB = rechte Körperseite; ²⁾ nur Serum

In der 1. und 2. Studie (Mehrfachapplikation) wurden nach der 1. Applikation (0 h) und nach der 5. Applikation (96 h) Proben zur Bestimmung der Pharmakokinetik entnommen.

3.4.4 Probenentnahmen und Probenaufbereitung

3.4.4.1 Untersuchungen des „Tissue-Cage-Fluids“

Die TCF-Proben wurden wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben entnommen und aufbereitet. Weiterhin erfolgte zu Beginn und am Ende jeder Studie eine bakteriologische Untersuchung des TCFs eines jeden TCs. Dazu mussten jeweils 100 µl TCF auf Blutagar-Platten (Columbia-Agar mit 5 % Schafblut) ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert werden.

3.4.4.2 Blutuntersuchungen

Die Blutentnahmen erfolgten steril durch Punktion der *Vv. jugulares* mit einem geeigneten Blutentnahmesystem (Monovette® 4,5 ml oder Vacuette® 4 ml) und Einwegkanülen. Die Entnahmestellen wurden vor der ersten Blutentnahme und bei Bedarf auch im Verlauf der Studien geschoren.

3.4.4.2.1 Pharmakokinetik

Zur Serumgewinnung mussten etwa 4 ml Vollblut 10 min bei 4 °C mit 3220 x g zentrifugiert und der Überstand aus den Serum-Röhrchen in Probengefäße abpipettiert werden. Eine Serumprobe sollte ca. 2 ml umfassen. Bis zur Weitergabe der Serumproben an das analysierende Labor zur Konzentrationsbestimmung von Pradofloxacin (Dr. R. Krebber, Bayer CropScience AG–D-ROCS, 40789 Monheim, Deutschland) verblieben diese tiefgekühlt bei mindestens –18 °C in der Prüfeinrichtung.

3.4.4.2.2 Hämatologie und klinisch-chemische Blutuntersuchung

Eine hämatologische Untersuchung von K₃EDTA-Blutproben (1 ml) erfolgte ohne weitere Aufbereitung zeitnah zur Entnahme zu Beginn und zum Abschluss jeder Studie mit dem Hämatologiesystem ADVIA® 120. Zusätzlich wurde in Studie 2 und 3 im gesamten Studienverlauf zu jedem Probenentnahmezeitpunkt eine hämatologische Untersuchung durchgeführt. Ein automatisiertes Differentialblutbild konnte erstellt werden, welches die folgenden Parameter umfasste: Gesamtleukozytenzahl (WBC), Lymphozyten (Lymph), Monozyten (Mono), neutrophile Granulozyten (Neutr), eosinophile Granulozyten (Eos), Erythrozytenzahl (RBC), Hämatokrit (HCT), Hämoglobingehalt (HGB), mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) und Thrombozytenzahl (PLT).

Weiterhin erfolgte zu Beginn und am Ende jeder Studie die Untersuchung folgender klinisch-chemischer Parameter mit Hilfe eines Trockenchemie Analysegerätes (IDEXX VetTest®):

Albumin (Alb), Alkalische Phosphatase (AP), Alanin-Amino-Transferase (ALT), Harnstoff (Urea), Kreatinkinase (CK), Kreatinin (Crea), Gammaglutamyltransferase (GGT), Globulin (Glob), Glukose (Glu), Laktatdehydrogenase (LDH), Ammoniak (NH₃), Gesamtbilirubin (Tbil) und Gesamtprotein (TP). Die Proben wurden in Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen und vor der Analyse bei 4 °C mit 3220 x g 10 min zentrifugiert.

3.4.4.3 Analytik

Die Analyse der Serum- und TCF-Proben auf ihre Konzentration an Pradofloxacin erfolgte im Labor Dr. R. Krebber, Bayer CropScience AG, Residues, Operator and Consumer Safety, Monheim, Deutschland, mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (TFC/MS/MS) entsprechend der Methode 00620/E001^{86,87}.

3.4.4.4 Pharmakokinetische Berechnungen

Für alle pharmakokinetischen Berechnungen stand die Standardsoftware WinNonlin[®] (Version 5.2, Pharsight Corp., USA) zur Verfügung.

Sowohl für Serum als auch für TCF kam ein kompartmentfreies Modell zur Anwendung.

Die pharmakokinetischen Parameter C_{\max} , T_{\max} , $t_{1/2}$, AUC, Cl/F , V_z/F und MRT konnten ermittelt werden. Nach Mehrfachapplikationen erfolgte zusätzlich die Bestimmung des Akkumulationsindex (AI). C_{\max} und T_{\max} konnten mithilfe der Konzentrations-Zeit-Daten direkt bestimmt werden. $t_{1/2}$ wurde aus der terminalen Dispositionskonstanten λ_z mit der Gleichung $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda_z$ berechnet. λ_z wurde durch log-lineare Regression ermittelt. Die Kalkulation der AUC erfolgte gemäß der log-linearen Trapezregel. Die PRA-Konzentration wurde mit Bezug auf SI-Einheiten in $\mu\text{g/l}$ angegeben¹⁹³.

Zur Erstellung der Graphiken diente das Programm SigmaPlot[®] (Version 10.0 und 11.0, Systat Software Inc., San Jose CA, USA).

3.4.5 Statistik

Die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Ergebnisse erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Abgesehen vom Student-Newman-Keuls-Test, welcher mit einem Eigenprogramm der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen (Gießen, Deutschland) durchgeführt wurde, kam die BMDP Statistical Software (Version 8.1, Statistical Solutions Ltd., Cork, Irland) zur Anwendung.

Für jede Studie wurden zunächst die Einzelparameter aller 6 Hunde jeweils zu einem arithmetischen Mittelwert zusammengefasst und zu diesem der Standardfehler sowie der Variationskoeffizient errechnet. Da die Variable $t_{1/2}$ in allen Studien eine rechtsschiefe Verteilung aufwies, wurde sie logarithmisch transformiert.

Die Analyse der pharmakokinetischen Parameter der ersten und zweiten Studie erfolgte jeweils mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen mit den Faktoren ‚Applikationsnummer‘ und ‚Medium‘ sowie dem Wechselwirkungseffekt ‚Applikationsnummer x Medium‘. Der Akkumulationsindex wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA mit dem Faktor ‚Medium‘ ausgewertet. Anschließend erfolgten für die übrigen pharmakokinetischen Parameter paarweise Vergleiche mittels zweifaktorieller Varianzanalysen mit Messwiederholung bzgl. den Faktoren ‚Applikationsnummer‘ und ‚Medium‘, um auf Unterschiede zwischen den Medien (Serum, Transsudat, Exsudat) zu testen.

Bei der Auswertung der pharmakokinetischen Parameter der dritten Studie kam eine einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung bzgl. des Faktors ‚Medium‘ zur Anwendung. Weiterführend diente der Student-Newman-Keuls-Tests zum paarweisen Vergleich der Medien.

Für alle Berechnungen wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ berücksichtigt. Ergebnisse zwischen $p > 0,05$ bis $p = 0,08$ konnten als knapp signifikant bezeichnet werden⁵⁸.

3.5 Pharmakodynamik

Untersuchungen zur Ermittlung von MHK, Abtötungsverlauf und postantibiotischen Effekten (In-vitro-Studien) erfolgten mit TCF-Poolproben von gesunden (ohne Entzündungsreiz im TC), nicht vorbehandelten Tieren (Transsudat).

Um eine bakterielle Kontamination des TCFs auszuschließen, mussten je 100 μ l der für ein Experiment verwendeten TCF-Probe zunächst auf einer Caso-Agar-Platte ausgestrichen und über mehrere Tage bei 37 °C inkubiert werden.

Alle Experimente wurden mindestens einmal reproduziert.

Die graphische Präsentation der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot® (Version 11.0, Systat Software Inc., San Jose CA, USA).

3.5.1 Testsubstanzen

Zur Durchführung der In-vitro-Studien dienten eine Pradofloxacin-Standardlösung (Gehalt 474,8 µg PRA/ml) sowie eine Enrofloxacin-Standardlösung (Gehalt 585,4 µg ENR/ml). Die Stammlösungen wurden von einem unabhängigen Labor (BHC-AH-RD Analytics, Leverkusen, Deutschland) auf Wirkstoffgehalt und Stabilität geprüft.

3.5.2 Testorganismen

E. coli ATCC 8739 und *S. aureus* ATCC 6538 dienten als Modellkeime.

Die Stammhaltung der Keime erfolgte bei –80 °C in Microbank™ Kryo-Probengefäßen. Die Bakterien waren aus einem Lyophilisat der 6. Passage einer ATCC-Ampulle angelegt worden. Zur Herstellung einer Arbeitskulturstammkultur wurde eine Plastikperle aus dem Kryo-Probengefäß entnommen, auf einer Caso-Agar-Platte ausgestrichen, für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C für 4 Wochen gelagert. Die Keime wurden höchstens 5 x transferiert.

Für den Ansatz einer Flüssigkultur zur Herstellung eines Inokulums mussten abhängig von der Koloniegröße von einer Caso-Agar-Platte (Arbeitskultur) ein bis zwei Kolonien des gewünschten Stammes mit einer sterilen Impföse entnommen, in 30 ml Caso Bouillon in einem 200 ml Erlenmeyerkolben suspendiert und anschließend 17 h bei 37 °C und 100 upm im Schüttelwasserbad inkubiert werden.

3.5.3 MHK-Bestimmung in Transsudat

Wegen der natürlichen Trübung von TCF konnten die Standardmethoden, die auf Zunahme der Trübung durch Bakterienwachstum beruhen, nicht zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration eingesetzt werden. Daher erfolgte die Ermittlung der MHK-Werte durch Bestimmung der geringsten Wirkstoffkonzentration, bei der die KBE/ml eines Standard-Inokulums in einer Flüssigkultur über 16 bis 20 Stunden Inkubationszeit konstant blieb. Zunächst

wurden MHK-Bestimmungen mit PRA durchgeführt und anschließend zusätzlich mit ENR.

Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) wurden mit 1 ml Transsudat, PRA-Konzentrationen im Bereich von 0,008 bis 0,12 µg/ml (*E. coli*), 0,015 bis 0,24 µg/ml (*S. aureus*) bzw. ENR-Konzentrationen von 0,06 und 0,15 µg/ml (*E. coli*) sowie 0,125 bis 0,75 µg/ml (*S. aureus*) und einem Inokulum von 5×10^4 KBE/Ansatz befüllt und bei 37 °C inkubiert. Eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum wurde mitgeführt. Nach 0, 6, 20 und 24 h mussten Proben von 0,1 ml seriell 1:10 mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt und jeweils 100 µl auf Caso-Agar-Platten ausgestrichen werden. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend die KBE bestimmt.

3.5.4 Ermittlung der bakteriziden Aktivität in Transsudat

Um den Verlauf der Abtötung bei *E. coli* und *S. aureus* zu bestimmen, wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße (2ml) mit 1 ml Transsudat, einem Inokulum von 4×10^6 KBE/ml und unterschiedlichen Konzentrationen von PRA befüllt, die bei *E. coli* im Bereich von 0,06 bis 0,96 µg/ml und bei *S. aureus* zwischen 0,25 und 2,0 µg/ml lagen. Eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum wurde mitgeführt. Zur Bestimmung der KBE/ml mussten zu festgelegten Zeitpunkten (siehe Abschnitt 4.4.3) Proben von 0,1 ml seriell 1:10 mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt und jeweils 100 µl auf Caso-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden.

3.5.5 Postantibiotische Effekte bei *S. aureus* in Transsudat

Ein Aliquot von 20 ml einer Übernachtskultur (siehe Abschnitt 3.5.2) mit 1×10^9 KBE/ml wurde 10 min bei 5000 x g abzentrifugiert und anschließend in 1 ml 0,9%iger NaCl resuspendiert. Damit erfolgte die Herstellung von zwei Versuchsansätzen: Ansatz A enthielt 100 µl der Bakteriensuspension plus 1 ml Transsudat (Wachstumskontrolle), Ansatz B enthielt zusätzlich 1,1 µg PRA/ml (2-fache MPC¹⁹⁵). Eine Inkubation der Ansätze erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C. Dabei konnten Proben zur Bestimmung der KBE/ml nach 0, 1 und 2 h entnommen, seriell 1:10 verdünnt und jeweils 0,1 ml auf Caso-Agar-Platten ausgestrichen werden. Nach 2 h wurden beide Ansätze 10 min bei 13000 x g

zentrifugiert, die Pellets in NaCl gewaschen, in jeweils 1 ml 0,9%iger NaCl resuspendiert und 1:10000 verdünnt, so dass die Keimzahl etwa 1×10^3 KBE/ml betrug. Die nicht vorbehandelte Population wurde nach der Verdünnung in einen Ansatz mit 1,5 ml Transsudat (Wachstumskontrolle), einen Ansatz mit 1,5 ml Transsudat plus 0,03 µg PRA/ml (Bestimmung des SME) sowie in 1,5 ml Caso-Bouillon gegeben. Die vorbehandelte Population wurde auf vier Ansätze mit je 1,5 ml Transsudat verteilt. Ein Ansatz enthielt kein PRA (PAE), die anderen enthielten PRA in Sub-MHK-Konzentrationen von 0,03, 0,06, 0,09 µg/ml. Zudem wurde die vorbehandelte Population einem Ansatz mit 1,5 ml Caso-Bouillon und einem Ansatz mit Caso-Bouillon, der 0,03 µg PRA/ml enthielt, zugefügt, um die postantibiotischen Effekte in Transsudat mit denen in Nährmedium vergleichen zu können. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert und Proben zur Bestimmung der KBE/ml nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 22 und 30 h entnommen.

3.5.6 Abtötungsverlauf in Transsudat und Exsudat bei authentischen Wirkstoffspiegeln

Im Rahmen der 3. Pharmakokinetikstudie konnten nach Applikation von 3 mg PRA/kg KG Trans- und Exsudatproben bei der zu erwartenden maximalen PRA-Konzentration im TCF (nach 8 h) und am Ende des Therapieintervalls (24 h) entnommen, jeweils 350 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) aliquotiert, mit einer Vorkultur von *E. coli* bzw. *S. aureus* beimpft (Soll-Startkeimzahl 4×10^6 KBE/ml) und der zeitliche Verlauf der KBE/ml erfasst werden, um die antibakterielle Wirksamkeit von PRA in der natürlichen Matrix bei authentischem Wirkstoffgehalt zu prüfen. Dazu mussten Proben von 50 µl seriell 1:10 mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt und je 100 µl auf Caso-Agar-Platten zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 10, 24 h sowie nach 4 Tagen (Reproduktion *S. aureus*) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Die Auszählung der KBE/ml erfolgte jeweils nach 24 h und nach 48 h Inkubationszeit.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Vor Implantation der „Tissue-Cages“ (TCs) wurden die Hunde einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Diese ergab keine Auffälligkeiten mit Ausnahme von Hund ID 0869, der eine nicht entzündete, reponierbare *Hernia umbilicalis* aufwies. Da das Allgemeinbefinden des Hundes nicht beeinträchtigt war, musste der Bruch nicht als Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie betrachtet werden.

4.2 Implantation der „Tissue-Cages“

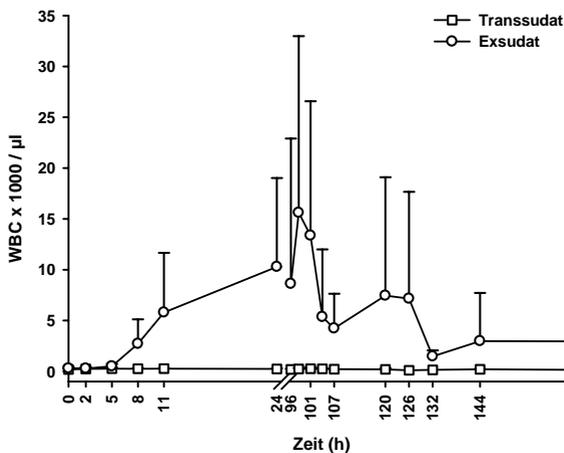
Bei 5 Hunden erfolgte wie in Abschnitt 3.3 beschrieben die Implantation von jeweils zwei TCs auf der linken Körperseite und eines TC am rechten Brustkorb. Ein Hund (ID 0847) erhielt auf der linken Körperseite einen TC an der Flanke und zwei TCs auf der rechten Körperseite. Die Operationen verliefen ohne Zwischenfälle. Es kam zu unterschiedlich stark ausgeprägter Serombildung im Bereich der Implantationsstellen und folglich zu unterschiedlich langen Einheilungsphasen.

4.2.1 Bestimmung der Zellzahl im „Tissue-Cage-Fluid“

Die Bestimmung der Zellzahl im TCF bzw. eine Zelldifferenzierung erfolgte durch mikroskopische Auswertung von Ausstrichen und bei ausreichend großem Probenvolumen zusätzlich mit dem ADVIA® 120 (Abschnitt 3.3.2.3). Vor und nach der 1. Pharmakokinetikstudie gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Zellzahl der genutzten TCs. In der 2. und 3. Pharmakokinetikstudie wurden zu allen Probenentnahmezeitpunkten Zellen ausgezählt und differenziert. Im Transsudat (TCs ohne Entzündungsreiz) war die Zellzahl gering und blieb jeweils über den gesamten Studienverlauf relativ konstant. In den TCs, in welche Carrageenan injiziert wurde, stieg die Zellzahl hingegen deutlich an, somit konnte das Vorliegen einer lokalen Entzündung belegt und Exsudat gewonnen werden. Die folgenden Abbildungen stellen zum einen die Gesamtleukozytenzahl in Trans- und Exsudat und zum anderen die Anteile der Leukozytenuntergruppen im Exsudat dar. In der 2. Studie war 8 h und in der 3. Studie 5 h nach der

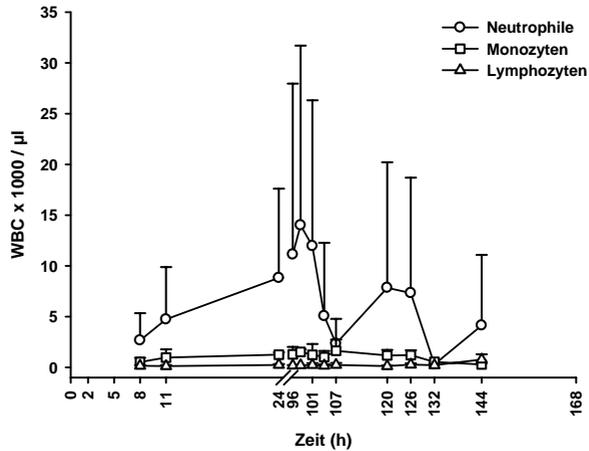
Carrageenan-Injektion ein deutlicher Anstieg der Leukozyten zu verzeichnen. Es befanden sich überwiegend neutrophile Granulozyten im Exsudat. In die Auswertung der Differenzierung gingen ausschließlich Ausstriche ein, die mindestens 100 Zellen enthielten. Des Weiteren konnte die absolute Zellzahl nur bestimmt werden, sofern ein Ergebnis des ADVIA® 120 vorlag. In der 2. PK-Studie (Abbildung 5) zeigte sich eine hohe mittlere Gesamtleukozytenzahl im Exsudat bei 98 h und 101 h, die durch Hund ID 0860 beeinflusst wurde, der deutlich mehr Leukozyten aufwies als die anderen Tiere. Zudem konnte die Zellzahl bei diesen Zeitpunkten nur von 3 Hunden bestimmt werden. Die Erhöhung der Zellzahl bei 120 h und 126 h begründet sich ebenfalls durch Hund ID 0860. Die Einzelwerte der Hunde sind im Anhang (Tabelle 11) einzusehen.

Abbildung 5. Gesamtleukozytenzahl (WBC) in Trans- und Exsudat (MW/SD) der 2. Pharmakokinetikstudie



Wie oben bereits erwähnt, waren die neutrophilen Granulozyten die dominierende Zellart im Exsudat. Im Entzündungsverlauf kam es zu einer Zunahme der Monozyten. Dieser Anstieg ging deutlich aus der mikroskopischen Bewertung der Ausstriche hervor. Er ist jedoch in den Abbildungen 6 und 8, welche die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen wiedergeben, nicht zu erkennen.

Abbildung 6. Differenzierung der Leukozyten im Exsudat (MW/SD) in der 2. Pharmakokinetikstudie



In der 3. PK-Studie konnte die Gesamtleukozytenzahl nach 30 h im Exsudat lediglich von einem Hund (ID 0869) berechnet werden, da bei den übrigen Hunden das Probenvolumen für eine Analyse mit dem ADVIA®120 nicht ausreichend war. Folglich fehlt die Standardabweichung an dieser Stelle (Abbildung 7).

Abbildung 7. Gesamtleukozytenzahl (WBC) in Trans- und Exsudat (MW/SD) der
3. Pharmakokinetikstudie

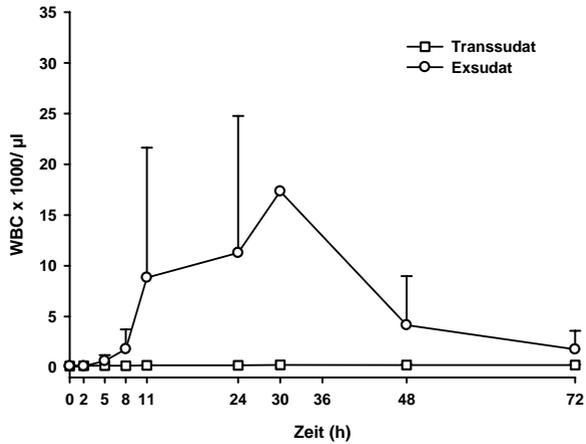
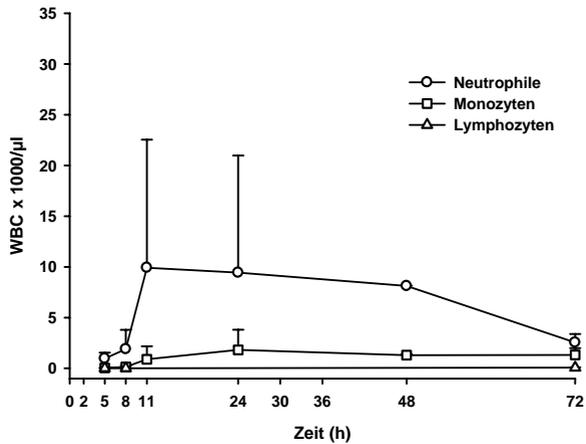


Abbildung 8. Differenzierung der Leukozyten im Exsudat (MW/SD) in der
3. Pharmakokinetikstudie



4.2.2 Proteingehalt in Transsudat und Exsudat

Im Transsudat (n = 3) ergab sich ein mittlerer Proteingehalt von 26,1 mg/ml ($\pm 5,0$). Im Exsudat (n = 2) lag der mittlere Proteingehalt bei 33,3 mg/ml ($\pm 7,4$). Die Exsudatprobe von Hund ID 0831 konnte nicht ausgewertet werden, da sie geronnen war.

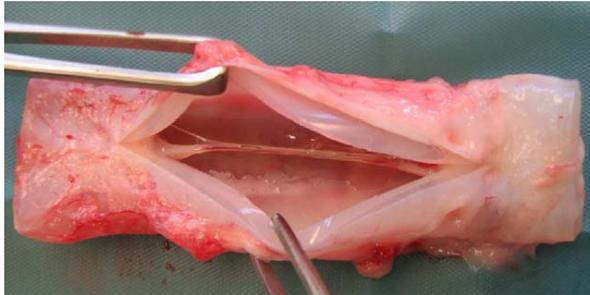
4.2.3 Entfernung der „Tissue-Cages“

Die TCs wurden über einen Zeitraum von 8 Monaten für die hier beschriebenen Studien genutzt. Ein TC sollte nach einer Carrageenan-Injektion nicht mehr für pharmakokinetische Studien eingesetzt werden⁹¹. Daher verwendeten wir in den beiden Studien mit Carrageenan-Injektion jeweils einen TC, der zuvor noch nicht mit Carrageenan behandelt worden war, zur Gewinnung von Exsudat. Der verbleibende dritte TC diente in allen Studien zur Entnahme von Transsudat. Im Rahmen unserer Studien konnte beobachtet werden, dass man auch nach der induzierten Entzündung eine ähnliche Menge TCF gewinnen kann wie aus anderen unbehandelten TCs und dass die Entzündungszellen nach einigen Wochen wieder auf den Ausgangswert vor Beginn der Studien zurückkehren.

Eine Exstirpation der TCs war problemlos möglich. Der TC war von festem Gewebe umgeben, das an den Perforationsstellen in den TC eindrang. Im Inneren erstreckte sich eine fadenähnliche Verbindung zwischen den Perforationsstellen der beiden Enden (siehe Abbildung 9).

Bei allen Hunden zeigte sich *post operationem* eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Serombildung. Nach mehreren Wochen kam es bei jedem Tier zur vollständigen Abheilung. Die Implantationsstellen waren adspektorisch und palpatorisch unauffällig, so dass die Hunde im Rahmen des sog. „Kölner Modells“ zur Vermittlung an Privatpersonen abgegeben werden konnten.

Abbildung 9. „Tissue-Cage“ nach Entfernung



4.2.3.1 Histopathologische Untersuchung der „Tissue-Cages“

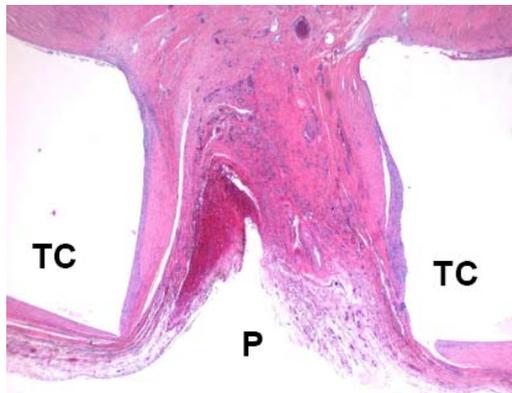
Die eingehielten TCs wurden ohne ausgeprägte Entzündungsreaktionen vertragen und deutlich vom umgebenden Gewebe abgegrenzt. Lediglich bei einem Tier (ID 0084) lag eine stärkere entzündliche Reaktion vor. Insgesamt war die entzündliche Reaktion bei den unbehandelten TCs schwächer als bei den mit Carrageenan behandelten TCs.

Der gesamte Silikonschlauch war von einer ca. 0,5 – 0,7 mm dicken, bindegewebigen Kapsel umgeben, die vornehmlich aus reifen kollagenen Fasern bestand. Auf ihrer inneren Oberfläche wies die Kapsel nahezu keine Verdickungen oder Unebenheiten auf. Bei den TCs ohne Entzündungsreiz (TC-A) waren nur in einzelnen Lokalisationen wenige Entzündungszellen sichtbar. Die entzündliche Komponente war bei den TCs mit Entzündungsreiz (TC-B und TC-C) stärker ausgeprägt und trat besonders bei Hund ID 0847 und Hund ID 0084 auf. Bei letzterem waren bei TC-B an vier von fünf Lokalisationen Entzündungszellen in mittelgradiger Stärke sowie eine größere Blutung mit Thrombusformation innerhalb des TC erkennbar.

An den Perforationsstellen war von Blut- und Lymphgefäßen durchzogenes Bindegewebe in das Innere der TCs vorgedrungen. Dies war bei den TCs mit Entzündungsreiz deutlicher ausgeprägt als bei den Kontrollen. Bei TC-B fand sich eine epitheliale Auskleidung der Öffnungen bei 3 Tieren (ID 0868, ID 0847, ID 0084) in geringer sowie bei einem Tier (ID 0869) in minimaler Form. Bei TC-C zeigte sich diese Aktivierung ebenfalls bei 2 Tieren (ID 0847, ID 0084) in geringer und bei 2 Tieren (ID 0831, ID 0869) in minimaler Form. Die epitheliale Auskleidung

erstreckte sich bei Hund ID 0084 bis in den Bereich des Silikonschlauchs hinein. Bei den TCs ohne Entzündungsreiz konnte hingegen nur bei einem Hund (ID 0847) eine epitheliale Auskleidung der Öffnungen beobachtet werden. Bei Hund ID 0868 zeigte sich in dieser Region bei allen TCs eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen. Diese fanden sich zudem bei Hund ID 0860 (TC-A) und bei den Hunden ID 0847, ID 0084 sowie ID 0869 (TC-C).

Abbildung 10. Histopathologische Untersuchung eines TC: Einwachsen von Bindegewebe in einen TC an der Perforationsstelle (P), HE, 2,5 x vergrößert, links gegen Plastik (TC) gut abgegrenzt, rechts leichte proliferative Veränderung (Foto: Dr. M. Rinke)



Die fadenartige Verbindung, die zwischen den beiden Enden im Innern der TCs beobachtet wurde, bestand in ihrer Anfangsphase aus reifen kollagenen Bindegeweben mit starker Neovaskularisation. In der Mitte der TCs umhüllte der kollagene Bindegewebsanteil eine zentrale Nekrose ohne erkennbar lebende Gefäße. Ein derartiges „Collagenous Bridging“ wurde bei allen 6 Hunden in allen TCs beobachtet, wobei der Grad der zentralen degenerativen Veränderung variierte.

Abbildung 11. Fadenartige Verbindung zwischen den TC-Enden, Längsschnitt HE, 10 x vergrößert, endothelartiger Überzug, zentrale Blutung und Nekrose (Foto: Dr. M. Rinke)



Des Weiteren zeigte sich bei TC-C eine verstärkte Pigmentablagerung (vermutlich Hämosiderin) bei Hund ID 0847 und Hund ID 0084 sowie in geringem Umfang bei Hund ID 0860.

4.3 Pharmakokinetik

4.3.1 Applikation des Prüfgegenstandes

Bei der Applikation des Prüfgegenstandes traten in keiner der drei Studien Komplikationen auf. Der Prüfgegenstand wurde von allen Tieren vollständig aufgenommen.

4.3.2 Klinische Allgemeinuntersuchungen

Zu Beginn und am Ende jeder Studie wurde eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt. Es ergaben sich außer der bereits in Abschnitt 4.1 erwähnten *Hernia umbilicalis* von Hund ID 0869 keine Auffälligkeiten. Während der Studien wurden Allgemeinbefinden, Futteraufnahme und Kotabsatz der Hunde täglich überwacht. In der 1. Studie zeigten Hund ID 0831 (am letzten Applikationstag und den beiden darauffolgenden Tagen) und Hund ID 0860 (am Tag der 2., 3. und 5. Applikation) wässrigen Kot und Hund ID 0868 eine reduzierte

Futtermittelaufnahme zwei Tage vor der Behandlung mit PRA und an drei Behandlungstagen. In der 2. und 3. Studie konnten diesbezüglich keine Besonderheiten beobachtet werden.

4.3.3 Pharmakokinetik von Pradofloxacin in Serum und „Tissue-Cage-Fluid“

Die Pharmakokinetik von PRA im Serum nach oraler Applikation von 3 mg/kg KG war reproduzierbar. Die Konzentrations-Zeit-Profile waren in allen drei Studien ähnlich. In der 1. Studie konnte belegt werden, dass die PRA-Penetration in jeden TC gleich war. Die 2. und 3. Studie zeigten, dass die mittlere PRA-Konzentration in Exsudat geringgradig höher war als in Transsudat. In der 2. PK-Studie konnten höhere PRA-Konzentrationen (MW) in Trans- und Exsudat festgestellt werden als in der 3. PK-Studie. In allen Studien fiel Hund ID 0084 im Vergleich zu den anderen Tieren durch eine höhere Serumkonzentration auf. Bei Hund ID 0847 war die PRA-Konzentration in Transsudat in beiden Studien höher als in Exsudat.

4.3.3.1 Erste Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum und Transsudat

Ziel der 1. Studie war es, den Konzentrationsverlauf von PRA im Serum mit dem in Transsudat zu vergleichen. Von jedem Hund wurden aus zwei verschiedenen TCs (linke (TCF-A) und rechte (TCF-B) Körperseite) Proben gewonnen, um zu prüfen, ob in jedem TC die gleiche PRA-Konzentration vorlag. Die mittlere maximale PRA-Konzentration im Transsudat entsprach 43,7 % der mittleren maximalen Serumkonzentration nach der 1. Applikation und 55,4 % nach der 5. PRA-Applikation. Nach der 5. Applikation zeigte sich im Serum eine mittlere maximale Konzentration von 1375 µg/l, im TCF-A ein $C_{\max,ss}$ von 788 µg/l und im TCF-B von 731 µg/l. In Abbildung 12 ist das mittlere Konzentrations-Zeit-Profil von PRA nach der 1. und 5. Applikation aufgezeichnet. Die Penetration in die TCs war langsamer als ins Serum, aber die Konzentration blieb von 8 h *post applicationem* an bis zum letzten Probenentnahmezeitpunkt in den TCs höher als im Serum. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der PRA-Konzentration in TCF-A und TCF-B ($p = 0,591$). Es lag ein globaler Unterschied zwischen den drei Medien vor ($p < 0,0001$). Serum unterschied sich sowohl von TCF-A als auch von TCF-B signifikant. Bezüglich der maximalen Konzentration konnte kein

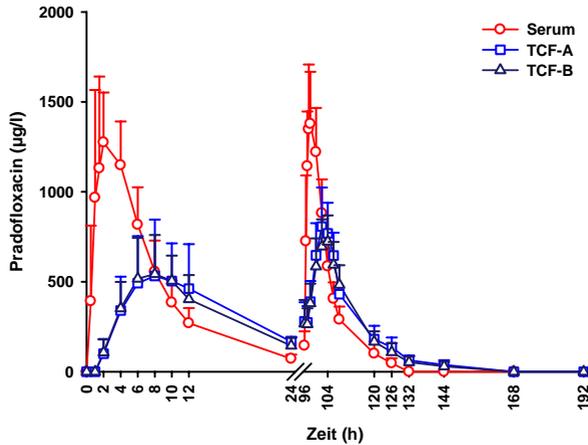
globaler Unterschied zwischen der 1. und 5. Applikation gezeigt werden ($p = 0,0951$). Die pharmakokinetischen Parameter konnten von allen Hunden vollständig berechnet werden, mit Ausnahme von Hund ID 0847. Bei diesem Tier fehlen $t_{1/2}$, AUC_{inf} , V_z/F und Cl/F nach der 1. Applikation, da nicht zu allen Probenentnahme-Zeitpunkten TCF aus TC-A gewonnen werden konnte und somit die genannten Parameter nicht zu ermitteln waren. Die maximale Konzentration wurde nach der 1. Applikation im Serum zwischen 1,0 und 4,0 h erreicht, im TCF-A zwischen 8,0 und 10 h und im TCF-B zwischen 6,0 und 10,0 h. Es zeigte sich diesbezüglich ein globaler Unterschied zwischen den Medien ($p < 0,0001$). Zwischen TCF-A und TCF-B konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,6606$). Die AUC_{last} betrug nach der 1. Applikation im Serum 10400 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$, im TCF-A 6805 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und im TCF-B 7255 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$. Die mittlere AUC_{last} nach der 5. Applikation lag im Serum bei 12417 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$, im TCF-A bei 13376 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und im TCF-B bei 12069 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$. Es gab diesbezüglich global signifikante Unterschiede bei beiden Faktoren (Medium und Applikation) sowie eine Wechselwirkung zwischen Applikation und Medium. TCF-A und TCF-B unterschieden sich hinsichtlich der AUC_{last} nicht signifikant ($p = 0,3366$). Die Ergebnisse der Varianzanalysen sind in Tabelle 36 im Anhang vollständig aufgeführt. In Tabelle 4 sind die pharmakokinetischen Parameter zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4. Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach der 1. Applikation in Serum und TCF

		Serum		TCF-A		TCF-B	
		Mittelwert*	Variation*	Mittelwert	Variation	Mittelwert	Variation
C_{max}	($\mu\text{g/l}$)	1299	22,5	518	52,8	560	34,0
T_{max}	(h)	1,8	1,0/4,0	9,0	8,0/10,0	8,0	6,0/10,0
$t_{1/2}$	(h)	3,8	13,0	10,6	52,5	8,1	34,4
AUC_{last}	($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	10400	23,3	6805	38,2	7255	29,3
AUC_{inf}	($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	10792	23,6	10203	25,6	9163	26,5
Cl/F	($\text{l/h}\cdot\text{kg}$)	0,28	23,6	0,29	25,6	0,33	26,5
V_z/F	(l/kg)	1,54	16,1	4,51	67,7	3,82	40,7
MRT_{last}	(h)	6,9	7,6	11,18	20,8	11,47	7,0

* Die Mittelwerte (Variation) wurden kalkuliert als geometrische Mittelwerte (geometrischer Variationskoeffizient CV %) für C_{max} , $t_{1/2}$, AUC , Cl/F , V_z/F und MRT ; und als Median (Minimum/Maximum (h)) für T_{max} .

Abbildung 12. Konzentrations-Zeit-Profil (MW/SD) von Pradofloxacin nach oraler Gabe von 3 mg/kg KG in Serum und TCF (1. und 5. Applikation).



Nach der 5. Applikation wurde PRA mit einer mittleren terminalen Halbwertszeit von 5,9 h aus dem Serum eliminiert. Im TCF-A lag die mittlere terminale Halbwertszeit bei 14,2 h und im TCF-B bei 10,7 h. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Pharmakokinetik nach der 5. Applikation.

Tabelle 5. Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach der 5. Applikation in Serum und TCF

	Serum		TCF-A		TCF-B	
	Mittelwert*	Variation*	Mittelwert	Variation	Mittelwert	Variation
C_{max,ss} (µg/l)	1375	23,7	788	29,0	731	21,8
T_{max,ss} (h)	98,0	97,5/100	103,0	102/104	104,0	102/104
T_½ (h)	5,9	20,8	14,2	41,2	10,7	57,7
AUC_{last} (µg*h/l)	12417	24,1	13376	23,0	12069	25,9
AUC_{inf} (µg*h/l)	12589	24,9	13794	23,3	12344	27,0
Cl/F (l/h*kg)	0,26	21,6	0,28	22,5	0,30	21,4
V_z/F (l/kg)	2,16	23,3	5,68	48,1	4,64	54,2
MRT_{inf} (h)	8,55	20,4	16,74	21,7	15,63	19,7

*Die Mittelwerte (Variation) wurden kalkuliert als geometrische Mittelwerte (geometrischer Variationskoeffizient CV %) für C_{max}, t_½, AUC, Cl/F, V_z/F und MRT; und als Median (Minimum/Maximum (h)) für T_{max}.

Basierend auf den mittleren Konzentrations-Zeit-Profilen von PRA in Serum und TCF im „steady state“ wurde der Akkumulationsindex (AI) berechnet. Der AI im Serum lag im Bereich von 1,04 bis 1,18 mit einem arithmetischen Mittel von 1,07. Im TCF-A befand sich der AI im Bereich von 1,13 bis 1,93 (MW 1,51) und im TCF-B variierte der AI zwischen 1,09 und 1,82 (MW 1,36). Damit konnte in Serum keine und nur eine geringe Akkumulation in TCF ermittelt werden. Der globale Unterschied zwischen den Medien bezüglich des AI war knapp signifikant ($p = 0,0846$).

Im Anhang sind die Konzentrations-Zeit-Profile sowie die pharmakokinetischen Parameter der einzelnen Hunde dargestellt (Abbildung 29 bis 34 und Tabelle 21 bis 26). Auffällig waren dabei Hund ID 0869, welcher im Verhältnis zu den anderen Hunden eine geringe Serumkonzentration erreichte (vgl. Abbildung 31) und Hund ID 0084, welcher hingegen nach der 1. und 5. Applikation eine deutlich höhere Serumkonzentration von PRA aufwies (Abbildung 33).

4.3.3.2 Zweite Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum, Transsudat und Exsudat (Mehrfachapplikation)

Die 2. PK-Studie diente zum einen der Reproduktion der 1. Studie (Konzentrations-Zeit-Verlauf von Serum und Transsudat) und zum anderen dem Vergleich von Transsudat und Exsudat, d. h. es sollte ermittelt werden, ob sich die PRA-Konzentration in gesundem und entzündetem Gewebe unterscheidet. TC-A wurde zur Entnahme von Transsudat und TC-B nach Carrageenan-Injektion zur Gewinnung von Exsudat genutzt. Die mittlere maximale PRA-Konzentration in Transsudat entsprach nach der 1. Applikation 51,7 % und im Exsudat 55,9 % des mittleren C_{\max} -Wertes im Serum. Nach der 5. Applikation lag die mittlere $C_{\max,ss}$ in Transsudat bei 63,2 % und in Exsudat bei 73,7 % der mittleren maximalen Serumkonzentration. Es lag ein globaler Unterschied bei den Faktoren ‚Applikation‘ ($p = 0,0039$) und ‚Medium‘ ($p = 0,0008$) vor, jedoch keine Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren. Serum und Transsudat ($p = 0,003$) sowie Serum und Exsudat ($p = 0,01$) unterschieden sich statistisch signifikant. Dies konnte bezüglich der maximalen Konzentration bei Transsudat und Exsudat nicht nachgewiesen werden ($p = 0,2758$). Die maximale Konzentration wurde nach der 5. Applikation im Serum nach 2 h (MW), im Transsudat nach 6,5 h (MW) und im Exsudat nach 8 h (MW) erreicht. Die PRA-

Konzentration in Trans- und Exsudat überstieg die Serumkonzentration von 8 h an bis zum letzten Probenentnahmezeitpunkt. Es lag hinsichtlich des T_{max} ein globaler Unterschied zwischen den Medien vor ($p < 0,0001$), der sich durch die signifikanten Unterschiede zwischen Serum und Transsudat ($p = 0,0005$) sowie Serum und Exsudat ($p = 0,0002$) begründet. Bei Transsudat und Exsudat konnte hingegen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p = 0,3632$). Die mittlere AUC_{last} nach der 1. Applikation lag im Serum bei $9553 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$, im Transsudat bei $7464 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und im Exsudat bei $8007 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$. Die AUC_{last} nach der 5. Applikation in Exsudat war größer als die AUC_{last} in Transsudat und im Serum. Hinsichtlich der AUC_{last} bestand ein globaler Unterschied für beide Faktoren und eine Wechselwirkung zwischen ‚Applikation‘ und ‚Medium‘. Der Unterschied zwischen den Medien Serum und Exsudat ($p = 0,0637$) sowie Transsudat und Exsudat ($p = 0,0621$) war knapp signifikant, für Serum und Transsudat ($p = 0,9392$) konnte statistisch kein signifikanter Unterschied dargelegt werden. Für die statistische Analyse standen abgesehen von folgenden Ausnahmen alle individuellen Datenprofile zur Verfügung: bei Hund ID 0847 fehlten Trans- und Exsudatproben, bei Hund ID 0084 Transsudatproben und bei Hund ID 0869 Exsudatproben zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter $t_{1/2}$, AUC_{inf} , V_z/F , Cl/F nach der 1. Applikation. Tabelle 6 fasst die pharmakokinetischen Parameter von PRA nach der 1. oralen Applikation zusammen:

Tabelle 6. Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach der 1. Applikation in Serum, Transsudat und Exsudat

		Serum		Transsudat		Exsudat	
		Mittelwert*	Variation*	Mittelwert	Variation	Mittelwert	Variation
C_{max}	($\mu\text{g/l}$)	1033	13,9	534	13,1	577	27,3
T_{max}	(h)	2,0	1,0/5,0	8,0	8,0/11,0	8,0	8,0/11,0
$t_{1/2}$	(h)	4,7	21,7	10,2	19,5	9,6	29,2
AUC_{last}	($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	9553	8,9	7464	9,6	8007	17,4
AUC_{inf}	($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	10272	10,2	9991	18,6	11182	8,5
Cl/F	($\text{l/h}\cdot\text{kg}$)	0,29	10,2	0,30	18,6	0,27	8,5
V_z/F	(l/kg)	1,98	29,4	4,41	12,2	3,71	27,2
MRT_{last}	(h)	7,85	8,7	12,33	4,9	11,71	9,4

*Die Mittelwerte (Variation) wurden kalkuliert als geometrische Mittelwerte (geometrischer Variationskoeffizient CV %) für C_{max} , $t_{1/2}$, AUC , Cl/F , V_z/F und MRT ; und als Median (Minimum/Maximum (h)) für T_{max} .

Nach der 5. Applikation wurde PRA aus dem Serum mit einer mittleren terminalen Halbwertszeit von 8 h eliminiert. In den TCs betrug die mittlere terminale Halbwertszeit ca. 11,5 h. Es lag hinsichtlich der $t_{1/2}$ ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Serum und Transsudat ($p = 0,0281$) sowie ein knapp signifikanter Unterschied zwischen Serum und Exsudat ($p = 0,0671$) vor. Der Unterschied zwischen Transsudat und Exsudat war statistisch nicht signifikant ($p = 0,893$). Die Ergebnisse aller Varianzanalysen sind in Tabelle 37 im Anhang aufgezeichnet. In Tabelle 7 ist die Pharmakokinetik nach der 5. Applikation dargestellt.

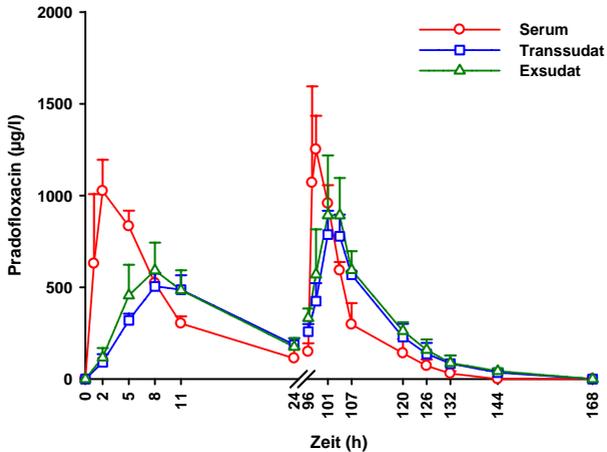
Tabelle 7. Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach der 5. Applikation in Serum, Transsudat und Exsudat

	Serum		Transsudat		Exsudat	
	Mittelwert*	Variation*	Mittelwert	Variation	Mittelwert	Variation
C_{max,ss} (µg/l)	1289	22,9	815	10,7	950	31,3
T_{max,ss} (h)	98,0	97/98	102,5	101/104	104,0	101/104
t_{1/2} (h)	8,0	53,4	11,6	53,1	11,45	35,0
AUC_{last} (µg*h/l)	12230	27,4	14290	23,6	16219	18,3
AUC_{inf} (µg*h/l)	12386	27,6	14538	22,8	16440	18,0
Cl/F (l/h*kg)	0,27	22,9	0,26	18,3	0,23	16,5
V_z/F (l/kg)	3,15	42,9	4,33	65,5	3,80	41,2
MRT_{inf} (h)	10,18	19,9	16,54	11,8	16,42	12,1

*Die Mittelwerte (Variation) wurden kalkuliert als geometrische Mittelwerte (geometrischer Variationskoeffizient CV %) für C_{max}, t_{1/2}, AUC, Cl/F, V_z/F und MRT; und als Median (Minimum/Maximum (h)) für T_{max}

Auch in dieser Studie wurde anhand der Serum- und TCF-Konzentrations-Zeit-Profile im „steady state“ der Akkumulationsindex ermittelt. Global konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medien ermittelt werden ($p = 0,6223$). Der AI im Serum lag in einem Bereich von 1,05 bis 1,78 mit einem arithmetischen Mittelwert von 1,22. Im Transsudat war der AI bei 1,40 (1,10 bis 2,01) und im Exsudat bei 1,34 (1,09 bis 1,68). Somit konnte wie in der 1. Studie lediglich eine geringe Akkumulation im TCF festgestellt werden.

Abbildung 13. Konzentrations-Zeit-Profil (MW/SD) von Pradofloxacin nach oraler Gabe von 3 mg/kg KG in Serum, Transsudat und Exsudat (1. und 5. Applikation)



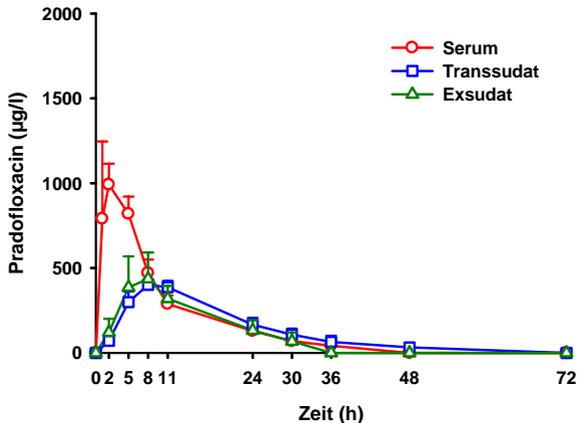
Die individuellen Konzentrations-Zeit-Profile sowie die Ergebnisse der pharmakokinetischen Berechnungen finden sich im Anhang (Abbildung 35 bis 40 und Tabelle 27 bis 32). Auch in dieser Studie fiel auf, dass Hund ID 0084 (Abbildung 39) eine deutlich höhere Serumkonzentration aufwies als die anderen Tiere. Bei 3 Hunden war die PRA-Konzentration im Exsudat höher als im Transsudat, bei Hund ID 0847 hingegen war es umgekehrt (Abbildung 38). Die übrigen beiden Tiere zeigten in Trans- und Exsudat etwa die gleiche PRA-Konzentration.

4.3.3.3 Dritte Pharmakokinetikstudie: Vergleich Serum, Transsudat und Exsudat (Einmalapplikation)

Die 3. PK-Studie wurde durchgeführt, um die in der 2. PK-Studie ermittelten Werte zu bestätigen bzw. um eine vollständige Kinetik (0–72 h) direkt nach Carrageenan-Injektion zu erfassen, was im Rahmen der Mehrfachapplikation von PRA nicht möglich war. In dieser Studie wurde TC-A zur Entnahme von Transsudat und TC-C nach Carrageenan-Injektion zur Gewinnung von Exsudat

genutzt. Die mittlere Konzentration von PRA nach einmaliger oraler Applikation von 3 mg/kg KG in Serum, Transsudat und Exsudat ist in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14. Konzentrations-Zeit-Profil (MW/SD) nach oraler Gabe von 3 mg Pradofloxacin/kg KG in Serum, Transsudat und Exsudat



Die maximale PRA-Konzentration im Serum von 1033 µg/l wurde nach 2 h erreicht. Die mittlere AUC_{last} lag bei 10547 µg*h/l und die mittlere AUC_{inf} bei 10900 µg*h/l. Die mittlere terminale Halbwertszeit lag wie nach der 5. Applikation der 2. PK-Studie bei ca. 8 h; in der 1. PK-Studie und nach der 1. Applikation der 2. PK-Studie wurde PRA allerdings schneller aus dem Serum eliminiert. Die Penetration von PRA in Transsudat und Exsudat war ähnlich: Die mittlere maximale PRA-Konzentration in Transsudat (408 µg/l nach 8 h) und Exsudat (422 µg/l nach 8 h) erreichte 40 % des C_{max} in Serum. Bei allen pharmakokinetischen Parametern außer dem Verteilungsvolumen und der MRT lag ein globaler Unterschied zwischen den drei Medien vor, was sich durch die signifikanten Unterschiede zwischen Serum und Transsudat bzw. Serum und Exsudat begründet. Zwischen Trans- und Exsudat konnte mit Ausnahme von der MRT kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (vgl. Tabelle 38, Anhang). Nach etwa 8 h überstieg die PRA-Konzentration in Trans- und Exsudat die Serumkonzentration. In Transsudat lag die Konzentration von diesem Zeitpunkt an bis zum letzten Probenentnahmezeitpunkt über der PRA-

Konzentration im Serum. In Exsudat und Serum hingegen war die PRA-Konzentration nach 24 h gleich und nach 30 h lag die PRA-Konzentration im Exsudat unter der PRA-Konzentration im Serum. Dies konnte in den vorangegangenen Studien nicht beobachtet werden. Die mittlere AUC_{last} betrug im Transsudat $8362 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und im Exsudat $6873 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$. Die mittlere AUC_{inf} lag im Transsudat bei $8582 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und im Exsudat bei $7002 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$. Die Elimination von PRA aus den TCs erfolgte mit einer mittleren terminalen Halbwertszeit von etwa 9 h im Transsudat und etwa 7 h im Exsudat. Dies wurde durch 3 Tiere beeinflusst, die im Exsudat eine geringe Halbwertszeit aufwiesen (ID 0084: 5,8 h; ID 0847: 5,05 h und ID 0869: 4,32 h; siehe Tabelle 35). In Tabelle 8 sind die Mittelwerte der pharmakokinetischen Parameter von PRA nach Einmalapplikation zusammengestellt. Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter standen vollständige Datenprofile von allen Hunden zur Verfügung ($n = 6$).

Auch in dieser Studie fiel Hund ID 0084 durch eine hohe Konzentration von PRA im Serum auf (vgl. Abbildung 45). Bei drei Hunden lag die PRA-Konzentration im Exsudat höher als im Transsudat, bei den anderen drei Hunden war es umgekehrt. Die individuellen Konzentrations-Zeit-Profile sowie die Ergebnisse der pharmakokinetischen Berechnungen sind im Anhang (Abbildung 41 bis 46 und Tabelle 33 bis 35) dargestellt.

Tabelle 8. Pharmakokinetik von Pradofloxacin nach Einmalapplikation

	Serum		Transsudat		Exsudat	
	Mittelwert*	Variation*	Mittelwert	Variation	Mittelwert	Variation
C_{max} ($\mu\text{g/l}$)	1033	17,2	408	8,7	422	42,0
T_{max} (h)	2,0	1,0/5,0	8,0	8,0/11,0	8,0	5,0/8,0
$t_{1/2}$ (h)	8,28	47,9	9,14	39,5	6,95	41,1
AUC_{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	10547	16,9	8362	18,6	6873	44,3
AUC_{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	10900	19,1	8582	19,8	7002	44,0
Cl/F ($l/h\cdot\text{kg}$)	0,28	19,1	0,35	19,8	0,43	44,0
V_z/F (l/kg)	3,29	29,1	4,61	21,9	4,29	26,3
MRT_{last} (h)	10,17	21,7	18,04	20,4	15,09	20,4

*Die Mittelwerte (Variation) wurden kalkuliert als geometrische Mittelwerte (geometrischer Variationskoeffizient CV %) für C_{max} , $t_{1/2}$, AUC, Cl/F , V_z/F und MRT ; und als Median (Minimum/Maximum (h)) für T_{max} .

4.3.4 Untersuchungen des „Tissue-Cage-Fluids“

Vor Beginn und am Ende jeder Studie wurde eine Probe aus jedem TC bakteriologisch untersucht (vgl. Abschnitt 3.4.4.1). Es konnte keine bakterielle Kontamination festgestellt werden.

4.3.5 Hämatologie und klinische Chemie

Die hämatologischen Untersuchungen dienten in erster Linie dazu, eine mögliche systemische Auswirkung der lokalen Entzündung im TC nachzuweisen. Daher stand die Auswertung des weißen Blutbildes im Vordergrund. Da in der 1. Studie kein Entzündungsreiz gesetzt wurde, werden hier vorrangig die Ergebnisse der 2. und 3. Studie behandelt. Nach der Injektion des Reizstoffes Carrageenan in die TCs kam es in der 2. Studie lediglich bei einem Hund und in der 3. Studie bei zwei von sechs Hunden zu einer geringgradigen Leukozytose. Zudem zeigte in beiden Studien jeweils ein Hund eine Gesamtleukozytenzahl am oberen Grenzwert (in Tabelle 9 und 10 fett gedruckt). In den Abbildungen 15 und 16 ist jeweils die Anzahl an neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten dargestellt. Bei Hund ID 0831 fiel in der 2. Studie eine Leukopenie bei den Probenentnahmen von 1 h bis 5 h sowie bei 98 h auf. Dies zeigte sich ebenfalls in der 3. Studie bei den Zeitpunkten 0 bis 2 h, bei 36 h und nach 72 h. In der 1. Studie konnte keine Leukopenie beobachtet werden, jedoch lag bei beiden hämatologischen Untersuchungen (0 h und 192 h) eine Neutropenie vor.

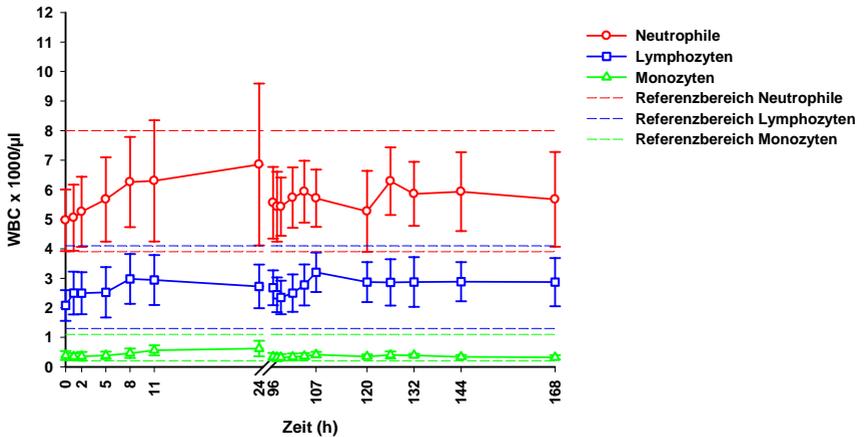
Tabelle 9. Gesamtleukozytenzahl in der 2. Pharmakokinetikstudie

Zeitpunkt	Gesamtleukozytenzahl [$\times 10^3 \mu\text{g/l}$]*						MW	SD
	ID 0831	ID 0868	ID 0869	ID 0847	ID 0084	ID 0860		
0 h	5,32	10,50	7,89	8,08	7,36	8,23	7,90	1,66
1 h	5,16	10,72	9,32	9,48	6,60	9,07	8,39	2,08
2 h	4,70	10,42	8,89	10,23	7,97	9,50	8,62	2,12
5 h	4,46	10,52	9,66	10,79	8,23	10,74	9,07	2,46
8 h	6,02	12,37	10,59	11,62	8,61	12,30	10,25	2,50
11 h	6,29	12,54	10,44	n.s.	8,10	13,93	10,26	3,13
24 h	5,78	10,49	11,91	15,54	6,92	13,81	10,74	3,82
96 h	5,39	10,47	10,36	10,32	8,33	9,80	9,11	1,99
97 h	5,34	10,45	9,38	10,23	7,08	9,43	8,65	2,01
98 h	5,20	9,79	9,28	10,14	8,25	8,64	8,55	1,78
101 h	5,60	10,13	9,71	10,30	8,01	10,35	9,02	1,89
104 h	6,49	10,60	10,85	11,04	7,77	10,65	9,57	1,94
107 h	6,93	11,03	11,09	10,74	8,16	11,18	9,86	1,84
120 h	5,62	10,46	9,02	12,04	7,40	9,16	8,95	2,25
126 h	5,99	10,74	10,18	12,46	9,80	11,04	10,04	2,18
132 h	6,99	10,76	11,15	n.s.	n.s.	n.s.	9,63	2,30
144 h	6,82	11,10	11,54	11,87	7,80	8,70	9,64	2,14
168 h	6,16	12,25	10,70	10,88	7,70	8,37	9,34	2,30
MW	5,79	10,85	10,11	10,99	7,53	10,29	-	-
SD	0,73	0,77	1,04	1,61	1,90	1,75	-	-

* Referenzbereich $5,3 - 13,9 \times 10^3 \mu\text{g/l}$; Werte außerhalb des Referenzbereiches sind *kursiv* gedruckt

Der arithmetische Mittelwert der neutrophilen Granulozyten stieg im Verlauf der 2. PK-Studie leicht an, näherte sich aber beim letzten Probenentnahmezeitpunkt wieder dem Ausgangswert. Die Standardabweichung war zu den Zeitpunkten 11 h und 24 h relativ groß, bei einigen Hunden trat eine Neutrophilie auf (vgl. Tabelle 15 im Anhang sowie Abbildung 15). Lymphozyten und Monozyten lagen innerhalb ihrer physiologischen Grenzwerte. Der arithmetische Mittelwert der eosinophilen Granulozyten blieb ebenfalls im gesamten Studienverlauf innerhalb des Referenzbereiches (nicht abgebildet).

Abbildung 15. Anzahl an Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten (MW/SD) in der 2. Pharmakokinetikstudie



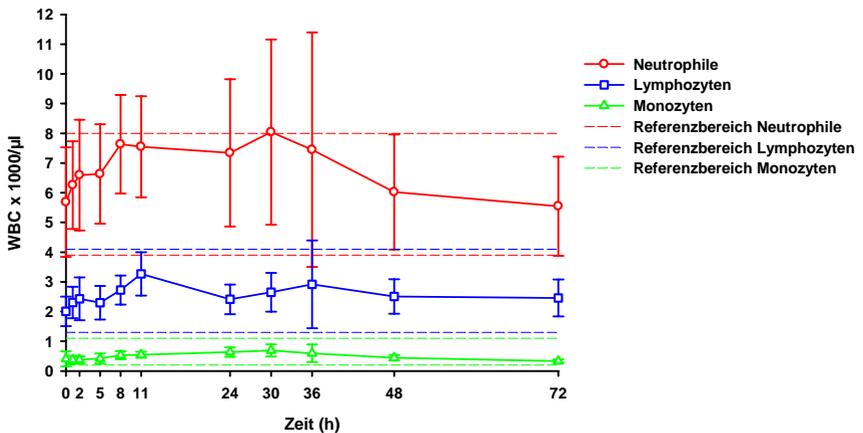
In der 3. PK-Studie blieb der arithmetische Mittelwert der neutrophilen Granulozyten ebenfalls innerhalb des Referenzbereiches, es zeigte sich jedoch bis zu 30 h ein Anstieg zur oberen Grenze, nach 72 h war der Ausgangswert wieder erreicht (Abbildung 16). Bei Lymphozyten (MW) und Monozyten (MW) kam es ausschließlich zu Veränderungen innerhalb der physiologischen Grenzwerte, mit Ausnahme der Lymphozyten bei 36 h (beeinflusst durch eine Lymphozytose bei Hund ID 0847). Die eosinophilen Granulozyten (MW) blieben während der 3. PK-Studie ähnlich wie in der 2. Studie im Referenzbereich (in Abbildung 16 nicht dargestellt). Im Anhang (Tabelle 16) sind die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Tiere aufgelistet.

Tabelle 10. Gesamtleukozytenzahl in der 3. Pharmakokinetikstudie

Zeitpunkt	Gesamtleukozytenzahl [$\times 10^3 \mu\text{g/l}$]						MW	SD
	ID 0831	ID 0868	ID 0869	ID 0847	ID 0084	ID 0860		
0 h	3,57	10,37	8,20	9,00	9,77	9,94	8,48	2,30
1 h	5,22	11,31	9,96	10,83	9,55	9,91	9,46	1,99
2 h	4,97	12,43	9,25	12,23	9,45	11,28	9,94	2,54
5 h	5,61	11,68	9,32	11,33	9,67	11,26	9,81	2,07
8 h	7,46	12,09	11,37	12,67	11,68	13,08	11,39	1,85
11 h	7,20	13,93	12,64	13,69	10,78	13,19	11,91	2,34
24 h	6,51	11,37	14,82	13,46	7,63	11,61	10,90	2,96
30 h	6,61	11,75	17,71	14,74	9,12	11,26	11,87	3,60
36 h	4,12	n.s.	16,49	15,40	n.s.	9,97	11,50	4,92
48 h	5,59	10,83	13,00	11,36	7,15	8,71	9,44	2,55
72 h	4,69	10,21	10,84	11,33	8,11	7,47	8,78	2,30
MW	5,60	11,60	12,15	12,37	9,29	10,70	-	-
SD	1,25	1,08	3,11	1,86	1,38	1,73	-	-

Referenzbereich $5,3 - 13,9 \times 10^3 \mu\text{g/l}$; Werte außerhalb des Referenzbereiches sind *kursiv* gedruckt

Abbildung 16. Anzahl an Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten (MW/SD) in der 3. Pharmakokinetikstudie



In der 1. PK-Studie (ohne Entzündungsreiz) wurde nur zu Beginn und am Ende der Studie eine hämatologische Untersuchung durchgeführt. Bei zwei Hunden konnte eine Erhöhung der Eosinophilen zum Zeitpunkt 0 h und bei einem Hund nach 192 h beobachtet werden. Die Gesamtleukozytenzahl war in dieser Studie bei allen Tieren innerhalb des physiologischen Referenzbereiches, mit Ausnahme von Hund ID 0831, der eine Leukopenie aufwies (s. o.).

Außerdem gab es in allen 3 Studien leichte Schwankungen bei der Erythrozytenzahl, dem Hämatokrit, dem Hämoglobingehalt, den Erythrozytenindizes und der Thrombozytenzahl. Diese Veränderungen traten bei allen Hunden unregelmäßig, teilweise auch bei Beginn der Studien auf und wurden somit nicht mit der Carrageenan-Injektion oder der Applikation von PRA in Zusammenhang gebracht und daher im Rahmen dieser Arbeit nicht als relevant angesehen. Die vollständigen Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen sind im Anhang (Tabelle 14 bis 16) dargestellt.

Die Parameter der klinischen Chemie (Albumin, Alkalische Phosphatase, Alanin-Amino-Transferase, Harnstoff, Ammoniak, Kreatinkinase, Kreatinin, Gammaglutamyltransferase, Globulin, Glukose, Laktatdehydrogenase, Gesamtbilirubin und Gesamtprotein) veränderten sich ausschließlich im Rahmen der physiologischen Referenzbereiche. Im Anhang (Tabelle 18 bis 20) sind die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Hunde sowie Mittelwerte der Studien aufgeführt.

4.4 Pharmakodynamik

Zur Abschätzung der antibakteriellen Aktivität von PRA und ENR in TCF wurden einige Parameter untersucht, durch die das antibakterielle Potenzial von Antibiotika routinemäßig *in vitro* charakterisiert wird.

4.4.1 Untersuchung des „Tissue-Cage-Fluids“ auf bakterielle Kontamination

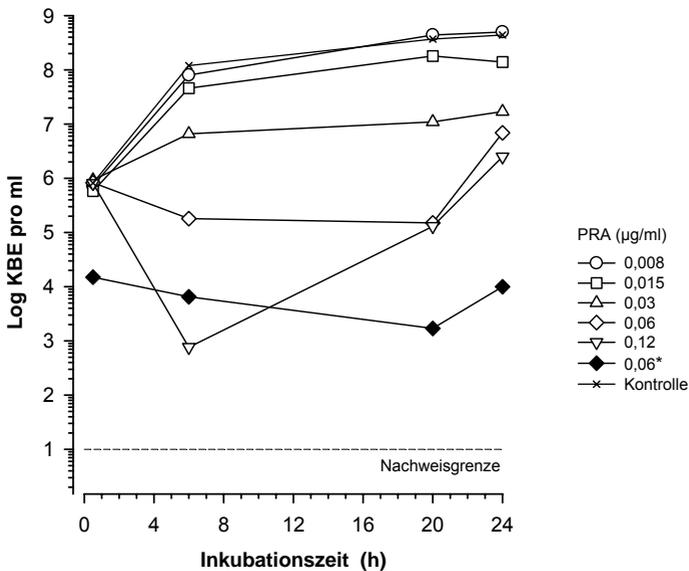
Alle TCF-Proben waren frei von bakterieller Kontamination.

4.4.2 MHK-Bestimmung in Transsudat

4.4.2.1 MHK von Pradofloxacin für *E. coli*

Bakteriostatische Aktivität wurde in Gegenwart von 0,06 µg PRA/ml (Abbildung 17, ◇) über 20 h erreicht. Bei der Reproduktion lag ein geringeres Inokulum von 2×10^4 KBE/ml vor (Abbildung 17, ◆). Somit konnte bakteriostatische Aktivität für Populationsdichten von 2×10^4 und 8×10^5 KBE/ml nachgewiesen werden. Bei niedrigeren Konzentrationen ($\leq 0,03$ µg PRA/ml) wuchs das Inokulum bis zu einer Dichte von etwa 3×10^8 KBE/ML aus. Bei 0,12 µg PRA/ml lag bereits eine starke bakterizide Aktivität vor, die zu einer Reduktion der KBE/ml um 3 \log_{10} innerhalb der ersten 6 h führte. Danach wuchs die Population jedoch wieder aus, so dass zum Zeitpunkt 20 h die Ausgangsdichte wieder erreicht war.

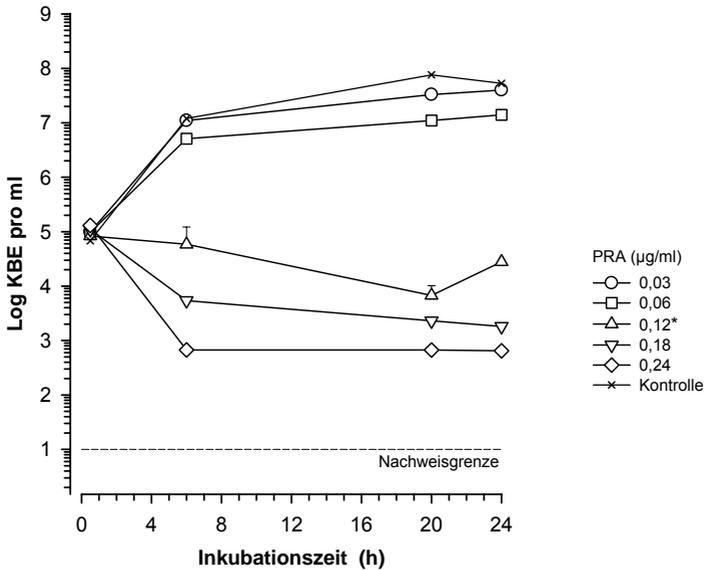
Abbildung 17. MHK von Pradofloxacin für *E. coli* in Transsudat
(* relevanter Ansatz aus der Reproduktion)



4.4.2.2 MHK von Pradofloxacin für *S. aureus*

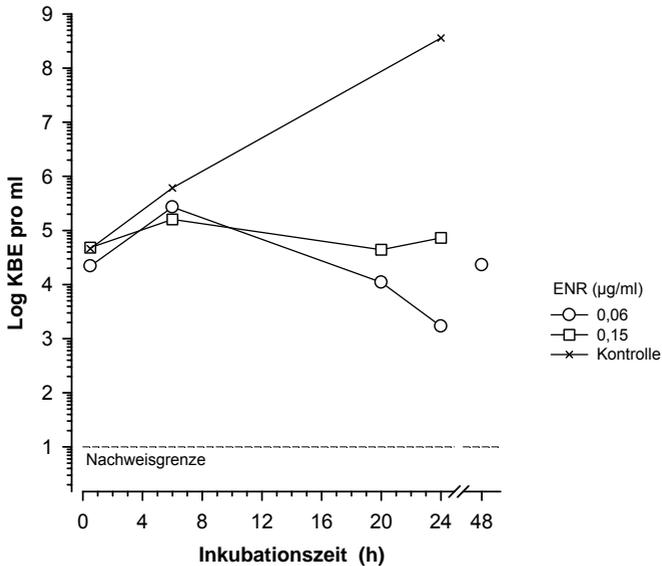
Bei einer Konzentration von 0,12 µg PRA/ml ergab sich über 24 h (Abbildung 18, Δ) bakteriostatische Aktivität. Bei PRA-Konzentrationen von ≤ 0,06 µg/ml kam es zum Auswachsen der Bakterienpopulationen innerhalb der ersten 6 h und einer Enddichte von ca. 10⁸ KBE/ml, die somit 10 % der Dichte in Caso-Bouillon entsprach. Eine Exposition von Konzentrationen ≥ 0,18 µg PRA/ml führte zu starken Reduktionen der Bakterienpopulationen. Bei 0,24 µg PRA/ml kam es innerhalb der ersten 6 h zu einer Verringerung der KBE/ml um 2 - 3 log₁₀. Danach lag statische Aktivität vor. In der Reproduktion ergab sich bei 0,24 µg PRA/ml eine Reduktion der KBE/ml bis unter die Nachweisgrenze von 10 KBE/ml (nicht abgebildet).

Abbildung 18. MHK von Pradofloxacin für *S. aureus* in Transsudat
(* Mittelwert und Standardabweichung aus beiden Experimenten)



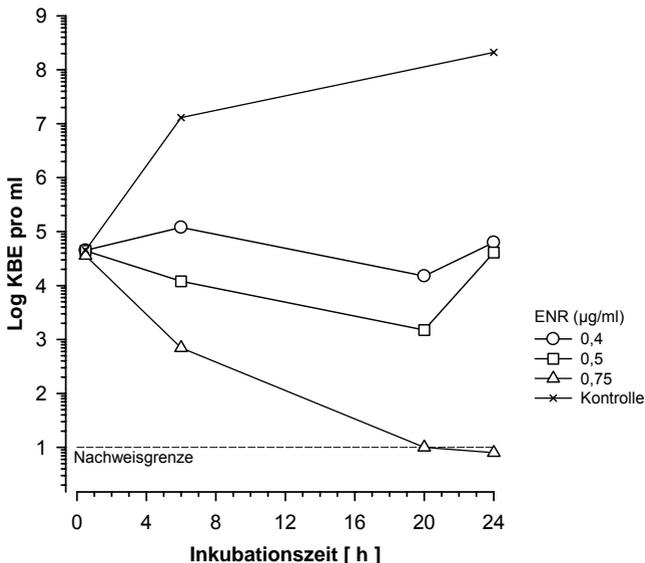
4.4.2.3 MHK von Enrofloxacin für *E. coli*

Mit ENR war bei 0,06 und 0,15 µg/ml bakteriostatische Aktivität nachweisbar. Entsprechend ist die geringere Wirkstoffkonzentration als MHK-Wert anzusehen (Abbildung 19, ○). Das Inokulum lag zwischen $2,5 \times 10^4$ und $4,6 \times 10^4$ KBE/ml. Die Kontrolle wuchs bis zu einer Dichte von 10^9 KBE/ml aus, die der maximalen Dichte in Caso-Bouillon entspricht.

Abbildung 19. MHK von Enrofloxacin für *E. coli* in Transsudat

4.4.2.4 MHK von Enrofloxacin für *S. aureus*

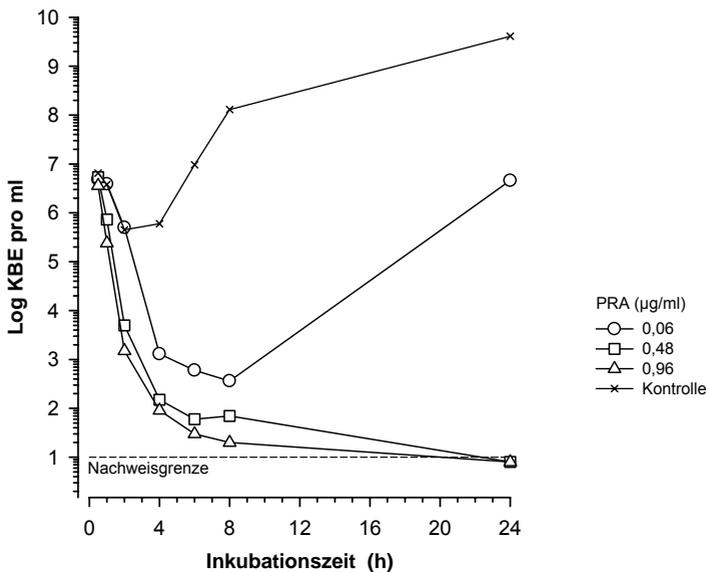
Bei einer Konzentration von 0,4 µg ENR/ml war eine konstante KBE/ml nach 24 h eindeutig nachweisbar (Abbildung 20, ○), während sich die KBE/ml bei niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen von 0,125 oder 0,25 µg/ml bis zur Enddichte von etwa 10^8 KBE/ml kontinuierlich erhöhten (nicht dargestellt). Die Exposition bei 0,5 µg ENR/ml führte über 20 h zu einer Reduktion um 1,5 \log_{10} . Danach begann die Population wieder auszuwachsen. Bei 0,75 µg ENR/ml ergab sich bereits eine starke bakterizide Wirkung. Nach 20 h war die Nachweisgrenze von < 10 KBE/ml erreicht. Mit $4,5 \times 10^4$ und $8,8 \times 10^4$ KBE/ml lagen die Inokula in der angestrebten Größenordnung.

Abbildung 20. MHK von Enrofloxacin für *S. aureus* in Transsudat

4.4.3 Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin in Transsudat

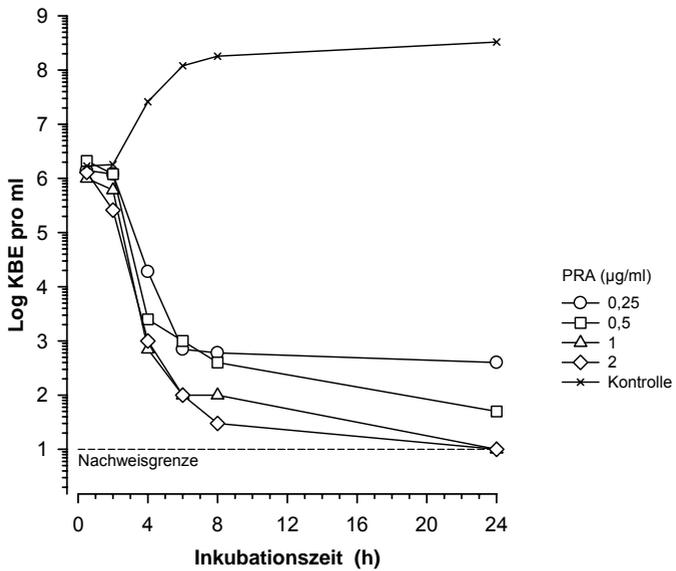
4.4.3.1 Zeitlicher Verlauf der Abtötung von *E. coli*

Die Wachstumskontrolle zeigte zunächst eine Reduktion der KBE/ml um $1 \log_{10}$, die möglicherweise einen Anpassungsvorgang des Inokulums aus Caso-Bouillon an Transsudat widerspiegelte. Erst nach 4 h begann die Population auszuwachsen. In Gegenwart von $0,06 \mu\text{g}$ PRA/ml zeigte sich bei 8 h eine Reduktion der KBE/ml um $4 \log_{10}$, anschließend kam es zum Auswachsen der Population, so dass nach 24 h die Inokulumdichte und nach 72 h die für TCF typische Enddichte erreicht wurde (Abbildung 21, ○). PRA-Konzentrationen von $0,48$ und $0,96 \mu\text{g}/\text{ml}$ bewirkten eine Abnahme der KBE/ml um etwa $4,5 \log_{10}$ nach 4 h. Nach 24 h war die Nachweisgrenze (≤ 10 KBE/ml) bereits unterschritten und bis zu 72 h ergab sich kein Wiederauswachsen.

Abbildung 21. Zeitlicher Verlauf der Abtötung von *E. coli* in Transsudat

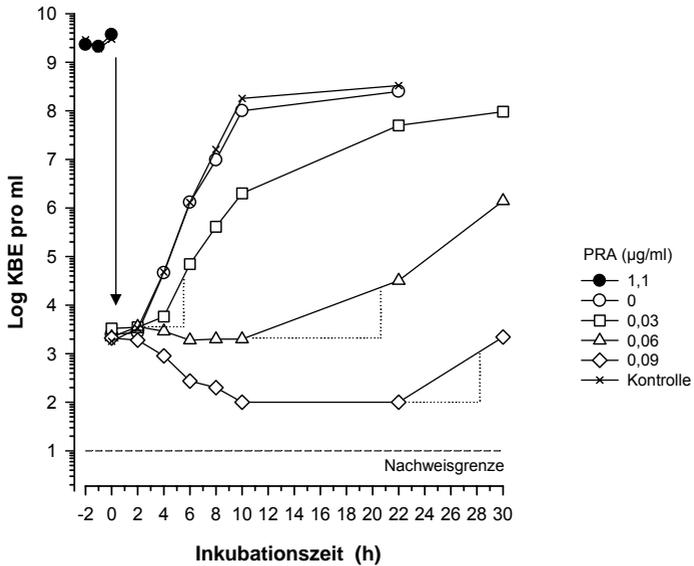
4.4.3.2 Zeitlicher Verlauf der Abtötung von *S. aureus*

Im Gegensatz zu *E. coli* kam es während der Adaptationsphase des Inokulums bei *S. aureus* nicht zur Verringerung der KBE/ml, sondern zu einer Wachstumsverzögerung von ca. 2 h. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,25 µg PRA/ml ($\frac{1}{2}$ x MPC) konnte statische Aktivität bis zu 2 h beobachtet werden, dann folgten eine Reduktion um 3 log₁₀ innerhalb von 6 h und statische Aktivität bis 24 h (Abbildung 22). Nach 72 h war die Nachweisgrenze (< 10 KBE/ml) erreicht. Eine Konzentration von 0,5 µg PRA/ml führte zunächst zu einer Reduktion von 4 log₁₀ nach 8 h, nach 72 h wurde die Nachweisgrenze (< 10 KBE/ml) erreicht. Bei 1 und 2 µg PRA/ml wurde *S. aureus* mit identischer, vermutlich maximaler Rate abgetötet: Nach 8 h lagen Restpopulationen von ≤ 100 KBE/ml vor und nach 24 h war die Nachweisgrenze (< 10 KBE/ml) erreicht. Auch nach 72 h Inkubation war *S. aureus* nicht mehr nachweisbar. Daher wurden die Versuchsansätze auf Sterilität geprüft, indem jeweils zwei Erlenmeyerkolben mit 100 ml Caso-Bouillon mit je 100 µl der Versuchsansätze beimpft und über 7 Tage inkubiert wurden. Selbst in der niedrigsten Wirkstoffkonzentration (0,25 µg PRA/ml) zeigte sich kein Bakterienwachstum.

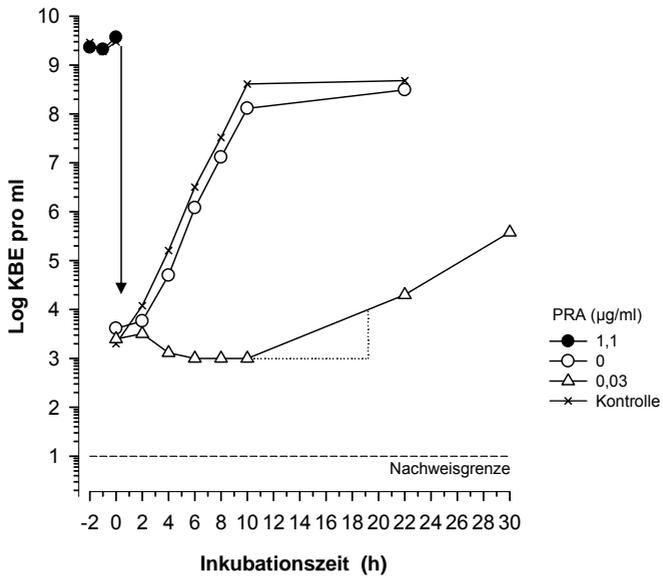
Abbildung 22. Zeitlicher Verlauf der Abtötung von *S. aureus* in Transsudat

4.4.4 Postantibiotische Effekte von Pradofloxacin bei *S. aureus* in Transsudat

Zur Bestimmung von postantibiotischen Effekten wurden Populationen mit hoher Dichte (10^9 KBE/ml) eingesetzt. Die KBE/ml in einer unbehandelten Wachstumskontrolle sowie im eigentlichen Ansatz, der 1,1 µg PRA/ml enthielt, blieben bei einer zweistündigen Exposition konstant. Danach wurde die unbehandelte Kontrolle zentrifugiert, das Pellet resuspendiert, auf 10^{-5} verdünnt und ihr Wiederauswachsen erfasst (x). Der Kurvenverlauf wird von der PAE-Kurve (o) überlagert (siehe Abbildung 23). Wurde die verdünnte, nicht vorbehandelte Wachstumskontrolle mit einer Sub-MHK Konzentration (0,03 µg PRA/ml) versetzt, konnte ein SME von 0,2 h festgestellt werden (in der Abbildung nicht dargestellt). Nach Ablauf der Vorbehandlung wurde PRA durch Zentrifugation und Waschen der Zellen in NaCl abgetrennt. Das Pellet wurde resuspendiert und danach auf 4 Ansätze verteilt. Ein Ansatz enthielt keinen Wirkstoff (PAE), die übrigen enthielten PRA in Sub-MHK-Konzentrationen (vgl. Abschnitt 3.5.5). Ein Vergleich der Auswachskinetiken der unbehandelten, verdünnten Population sowie der vorbehandelten Population ohne erneute Wirkstoffzugabe ergab einen PAE von 0,4 h (in Abbildung 23 aufgrund von Überlagerung der Kurven nicht deutlich zu erkennen). Bei einer Zugabe von $\frac{1}{4}$ MHK konnte ein PA-SME von 2,2 h beobachtet werden. Bei $\frac{1}{2}$ MHK zeigte sich ein PA-SME von 17 h und in Gegenwart von $\frac{3}{4}$ MHK kam es zu einer mindestens 10 h fortdauernden Abtötung und nachfolgender Bakteriotase, so dass das Therapieintervall vollständig abgedeckt wurde. Die oben genannten MHK-Angaben beziehen sich auf die in TCF ermittelten MHK-Werte. Die punktförmigen Linien in der Abbildung verdeutlichen jeweils die Zunahme der Population um $1 \log_{10}$ (Abbildung 23).

Abbildung 23. PAE und PA-SME von Pradofloxacin bei *S. aureus* in Transsudat

Als Vergleich zum TCF wurden der PAE und der PA-SME auch in Caso-Bouillon ermittelt. Es ergab sich ein deutlich verlängerter PAE von etwa 2 h und ein PA-SME (bei 0,03 µg PRA/ml = ½ MIC in Nährlösung) von 18 h (vgl. Abbildung 24).

Abbildung 24. PAE und PA-SME von Pradofloxacin bei *S. aureus* in Caso-Bouillon

4.4.5 Abtötungsverlauf in Trans- und Exsudatproben bei authentischen Wirkstoffspiegeln

Zur Bestimmung der in TCF effektiv vorliegenden antibakteriellen Aktivität wurden im Verlauf einer Pharmakokinetikstudie TCF-Proben an zwei Zeitpunkten entnommen: zum einen im Bereich der zu erwartenden C_{\max} von PRA im TC und zum anderen am Ende des Therapieintervalls nach 24 h. Diese Proben wurden entweder mit *E. coli* oder *S. aureus* beimpft, um deren Absterbekinetik zu ermitteln. Die Exsudatproben von zwei Hunden (ID 0869 und ID 0084) wurden jeweils unmittelbar nach der Entnahme hierfür eingesetzt. Die Reproduktion erfolgte ca. 3 Wochen später für *E. coli* mit einer Transsudatprobe (ID 0869) und für *S. aureus* mit einer Exsudatprobe (ID 0860). Diese Proben waren bis zum Versuchsbeginn bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden.

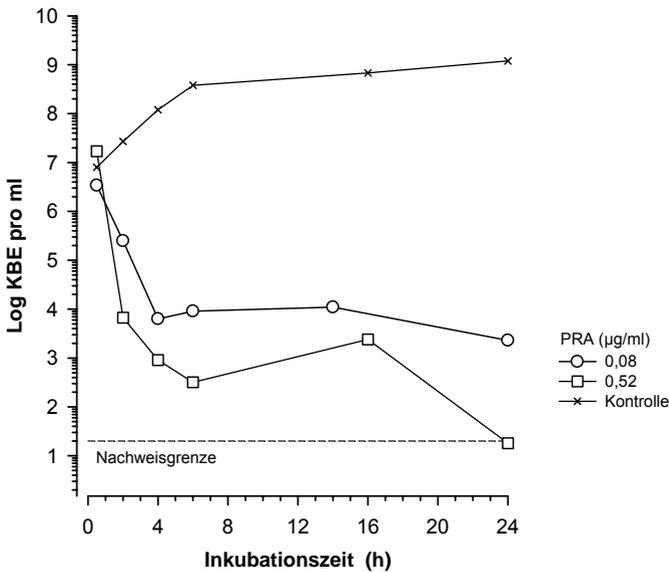
4.4.5.1 Abtötungsverlauf für *E. coli* in Exsudat und Transsudat

Der Abtötungsverlauf für *E. coli* wurde mit Proben von einem Hund (ID 0869) dargestellt. Somit war hier ein direkter Vergleich des antibakteriellen Potenzials von PRA in Trans- und Exsudat möglich. Es ergab sich eine höhere antibakterielle Wirksamkeit in Exsudat.

Die bei C_{\max} entnommene Exsudatprobe enthielt $0,52\text{ }\mu\text{g PRA/ml}$ (siehe Abbildung 43). Nach 6 h Inkubation zeigte sich eine Reduktion der KBE/ml um 4 log_{10} . Nach 24 h war die Nachweisgrenze von $\leq 20\text{ KBE/ml}$ erreicht (Abbildung 25).

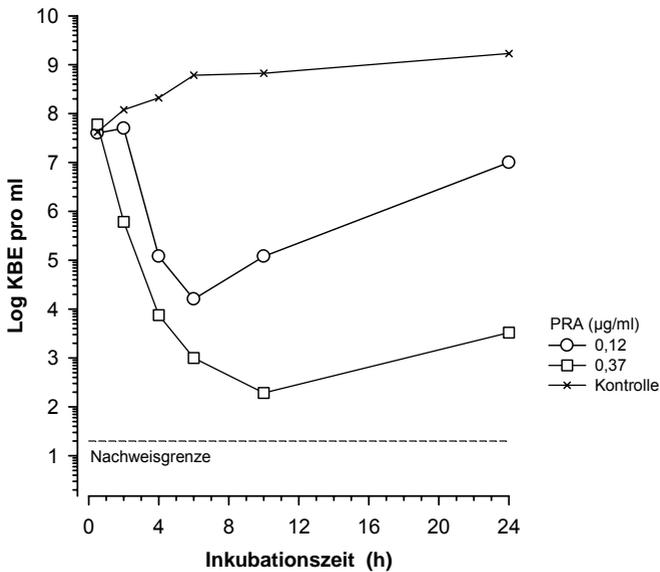
In der Exsudatprobe, die am Ende des Therapieintervalls gewonnen worden war, lagen $0,08\text{ }\mu\text{g PRA/ml}$ vor. Hier ergab sich eine Verringerung der KBE/ml um etwa $2,5\text{ log}_{10}$ nach 6 h und bakteriostatische Aktivität bis 24 h (Abbildung 25).

Abbildung 25. Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin gegen *E. coli* im Exsudat von Hund ID 0869



Eine Transsudatprobe, die 8 h nach Applikation von 3 mg PRA/kg KG entnommen worden war, enthielt 0,37 µg PRA/ml (vgl. Abbildung 43). Bei dieser Wirkstoffkonzentration kam es innerhalb von 10 h zu einer Reduktion der KBE/ml um 6 log₁₀. Anschließend stieg die Bakterienpopulation wieder um 1 log₁₀ an, jedoch mit deutlich verringerter Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 26).

Der Wirkstoffgehalt in der nach 24 h entnommenen Transsudatprobe lag bei 0,12 µg PRA/ml. In dieser Probe zeigte sich nach 6 h Inkubation eine Reduktion der KBE/ml um insgesamt 3 log₁₀. Anschließend kam es zu einem verzögerten Auswachsen der Bakterienpopulation. Bis zum Ende des Versuchs nach 50 h stieg die KBE/ml bis auf 2 x 10⁸ KBE/ml an (nicht abgebildet).

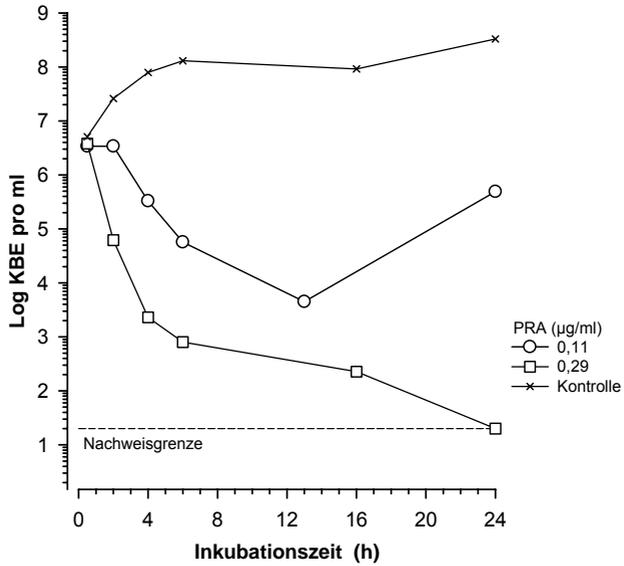
Abbildung 26. Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin gegen *E. coli* im Transsudat von Hund ID 0869

Zur Prüfung, ob in den wieder ausgewachsenen Populationen Varianten mit verringerter Empfindlichkeit vorlagen, wurden je 10 Klone der drei Versuchsansätze (Abbildung 26) aus der KBE-Bestimmung nach 24 h isoliert und deren MHK-Werte im Agardilutionstest ermittelt. Während die MHK in der Kontrolle zwischen 0,015 und 0,03 µg/ml lag, ergab sich in beiden Ansätzen mit Pradofloxacin eine Erhöhung der MHK auf 0,125 µg/ml. Parallel wurden die minimalen Hemmstoffkonzentrationen von Enrofloxacin ermittelt, die ebenfalls zwischen 0,015 und 0,03 µg/ml betragen und somit keine Erhöhung zeigten. In Gegenwart des Efflux-Inhibitors Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphthylamid verringerte sich die MHK für beide Substanzen auf 0,004 bis 0,008 µg/ml, was auf eine erhöhte Efflux-Aktivität für PRA hindeutete.

4.4.5.2 Abtötungsverlauf bei *S. aureus* in Exsudat

In der nach 8 h gewonnenen Exsudatprobe von Hund ID 0084 lag eine Wirkstoffkonzentration von 0,29 µg PRA/ml (vgl. Abbildung 45) vor. Die Population von *S. aureus* nahm kontinuierlich ab, und nach 24 h Inkubation war die Nachweisgrenze von ≤ 20 KBE/ml erreicht (Abbildung 27). Eine weitere Prüfung nach 48 h Inkubation ergab keinen Hinweis auf eine Restpopulation: das Ergebnis lag unter der Nachweisgrenze. Bei dieser Konzentration entsprach der initiale Verlauf der Abtötungskurve dem in Transsudat (vgl. Abschnitt 4.4.3.2; Abbildung 22, o).

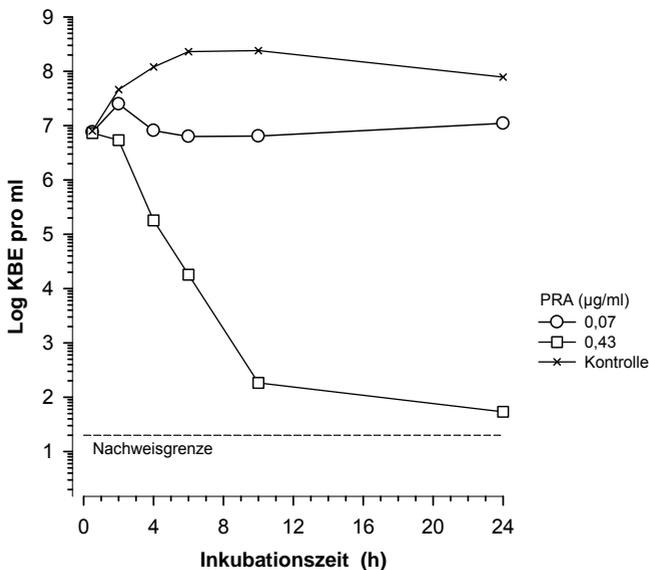
In der am Ende des Therapieintervalls entnommenen Exsudatprobe, deren PRA-Gehalt (0,11 µg/ml) in der Größenordnung der MHK für *S. aureus* in TCF lag, konnte sich *S. aureus* nach vorausgegangener Reduktion der Keimzahl um $3 \log_{10}$ bis zu 13 h nicht vermehren (Abbildung 27). Danach erfolgte jedoch ein Auswachsen der Population bis auf $1,2 \times 10^7$ KBE/ml nach 50 h Inkubation (nicht dargestellt).

Abbildung 27. Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin gegen *S. aureus* im Exsudat von Hund ID 0084

In einer Exsudatprobe von Hund ID 0860, die nach 8 h gewonnen und zwischengelagert worden war, wurde eine Wirkstoffkonzentration von 0,43 µg PRA/ml nachgewiesen (Abbildung 46). Zunächst zeigte sich bis zu 24 h Inkubation eine stetige Reduktion um etwa 5 log₁₀ (Abbildung 28). Die Nachweisgrenze wurde jedoch nicht ganz erreicht, und nach 96 h Inkubation war die Population wieder um etwa 2 log₁₀ angestiegen (nicht abgebildet).

Die bei 24 h entnommene Exsudatprobe enthielt 0,07 µg PRA/ml, was etwa der Hälfte der minimalen Hemmstoffkonzentration für *S. aureus* im TCF entsprach. Die Keimzahl in diesem Ansatz blieb bis zu 96 h, dem Ende des Versuchs, konstant; es lag zumindest bakteriostatische Aktivität vor.

Abbildung 28. Bakterizide Aktivität von Pradofloxacin gegen *S. aureus* im Exsudat von Hund ID 0860



Im Anschluss an den Versuch wurden nach 96 h isolierte Klone zunächst durch Bestimmung der MHK im Agardilutionstest nach CLSI-Richtlinien charakterisiert.

Für Klone der nach 8 h entnommenen Exsudatprobe (Abbildung 28, □) lag der MHK-Wert zwischen 0,06 und 0,125 µg PRA/ml. 2 von 10 dieser Klone, die den höheren MHK-Wert von 0,125 µg PRA/ml zeigten und ein Isolat mit dem MHK-Wert von 0,06 µg/ml wurden mittels DNA-Sequenz-Analyse (Prof. Dr. P. Heisig, Universität Hamburg) auf das Vorliegen einer Punktmutation im Chinolon-Resistenz-determinierenden Abschnitt des Gens für die Untereinheit A der Topoisomerase IV geprüft. Es lag keine Punktmutation vor.

Für 10 Klone aus der 24-h-Exsudatprobe (Abbildung 28, ○) ergab sich ein MHK-Wert von 0,06 µg PRA/ml und für 10 Klone der Kontrolle zwischen 0,03 und 0,06 µg PRA/ml, d. h. es war keine MHK-Erhöhung nachweisbar.

Vergleichend wurde wiederum die MHK von ENR ermittelt. Bei 2 von 10 Klonen der 8-h-Exsudatprobe zeigte sich eine Erhöhung der MHK auf 0,25 µg ENR/ml. Einer dieser Klone hatte ebenfalls eine MHK-Erhöhung gegenüber PRA gezeigt. In der 24-h-Exsudatprobe und der Kontrolle wurden keine Klone mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber ENR nachgewiesen. Die MHK-Werte lagen hier mit 0,12 µg ENR/ml an der oberen Grenze.

5 DISKUSSION

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines „Tissue-Cage“-Modells beim Hund. Mit Hilfe dieses Modells können Proben von Gewebsflüssigkeit entnommen werden, die sich in den Hohlräumen der subkutan implantierten TCs ansammelt. Durch Perforationen in den TCs befindet sich das TCF in ständigem Austausch mit der Interstitialflüssigkeit und ist somit repräsentativ für diese³⁶. Die Interstitialflüssigkeit ist von Interesse, weil bakterielle Infektionen meist im extrazellulären Bereich der Gewebe stattfinden. Das antibakterielle Potenzial einer Substanz wird in der Regel jedoch aus Einfachheitsgründen ausschließlich anhand der Serumkonzentration, die meist nicht den Ort der Infektion widerspiegelt, gemessen¹¹⁸. Dazu wird der MHK-Wert *in vitro* bestimmt. Wird ein „Tissue-Cage“-Modell in einer pharmakokinetischen Studie benutzt, so kann neben dem Konzentrations-Zeit-Verlauf im Serum gleichzeitig auch die Konzentration eines Wirkstoffs in Gewebsflüssigkeit bestimmt und somit die Penetration eines Antibiotikums an den Ort des Infektionsgeschehens abgeschätzt werden.

Pradofloxacin ist ein neues Chemotherapeutikum aus der Klasse der Fluorochinolone, das sich derzeit in der Zulassung befindet. Es ist das erste Fluorochinolon der dritten Generation, das für die Veterinärmedizin zur Bekämpfung bakterieller Infektionen bei Hund und Katze entwickelt wurde. Als Infektionserreger kommen beim Hund beispielsweise *Staphylococcus intermedius*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* bei Pyodermien, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus canis* und *E. coli* bei Wund- und Weichteilinfektionen, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *E. coli* und *Staphylococcus spp.* bei Harnwegsinfektionen sowie *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.* und *Fusobacterium spp.* bei Gingivitis und Periodontitis in Frage. Die hohe In-vitro-Effektivität von Pradofloxacin gegen gramnegative und grampositive Bakterien sowie Anaerobier wurde bereits in einigen Studien gezeigt^{1,44,158,166,168,200} und die klinische Wirksamkeit in mehreren umfangreichen Feldstudien belegt^{117,167,169}. Das Standard-Dosierungsschema der Pradofloxacin-Tabletten beim Hund liegt bei 3 mg/kg KG einmal täglich über 7 Tage. Die Behandlungsdauer kann jedoch bei Pyodermien (14 – 63 Tage) und Harnwegsinfektionen (7 – 21 Tage) verlängert werden. Für Katzen wurde eine orale Suspension von Pradofloxacin entwickelt. Da es in der Praxis durchaus

üblich ist, eine für Katzen zugelassene Formulierung auch bei kleinwüchsigen Hunden anzuwenden, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die wichtigsten pharmakokinetische Parameter für *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* in Serum und TCF beim Hund zu ermitteln. Dafür wurde das oben beschriebene „Tissue-Cage“-Modell genutzt. Die aus dem „Tissue-Cage“-Modell gewonnenen Proben wurden außerdem eingesetzt, um das pharmakodynamische Verhalten von Pradofloxacin in Gewebsflüssigkeit zu beurteilen. Zunächst kamen die gängigen In-vitro-Methoden zur Anwendung, um Basisinformationen für das antibakterielle Potenzial von Pradofloxacin im TCF zu generieren. Zudem wurden Absterbekinetiken in TCF-Proben mit authentischem Wirkstoffgehalt untersucht.

5.1 Beurteilung des „Tissue-Cage“-Modells

Ein zuvor beschriebenes Modell mit zylindrischen, aus einem Silikonschlauch gefertigten TCs^{91,152} kam beim Hund zur Anwendung. Im Gegensatz zu den in der Literatur aufgezeigten Problemen mit bakteriellen Infektionen nach der Implantation der TCs^{20,152,163}, verlief die Etablierung des Modells in dieser Arbeit ohne Zwischenfälle. Nach der Implantation kam es anfangs zu einer Serombildung an den Implantationsstellen, die bei den einzelnen Tieren unterschiedlich stark ausgeprägt war. Es traten keine bakteriellen Infektionen auf und nach der Einheilungsphase und dem Abklingen der Serome konnten alle implantierten TCs für die Studien genutzt werden. Aufgrund der mehrwöchigen Einheilungsphase ist eine langfristige Studienplanung bei der Arbeit mit diesem Modell unverzichtbar. Die TCs wurden von den Hunden gut toleriert und ihr Wohlbefinden sowie das Verhalten dadurch nicht beeinträchtigt. Durch die Lokalanästhesie der Haut über den TCs waren die Probenentnahmen nicht schmerzhaft. Nach Beendigung der Studien konnten die TCs entfernt werden, ohne dass die Tiere einen irreversiblen Schaden zurückbehielten. Daher kann das Modell bezüglich der Durchführbarkeit und unter Berücksichtigung der Tierschutzaspekte als geeignet betrachtet werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Implantation und die Exstirpation der TCs unter Allgemeinanästhesie erfolgen müssen, was für die Tiere ein gewisses Narkoserisiko bedeutet.

Die Verwendung des Entzündungsmediators Carrageenan im TC ist ethisch vertretbar, da nur eine lokal begrenzte, reversible Entzündung ausgelöst wird¹⁵², die offensichtlich nicht mit nennenswerten Schmerzen oder einer Beeinträchtigung

des Allgemeinbefindens einhergeht. Das Vorliegen einer Entzündung wurde in dieser Arbeit durch eine vergleichende Bestimmung der Zellzahl in TCF ohne (Transsudat) und mit Entzündungsreiz (Exsudat) belegt. In TCF ohne Entzündungsreiz wurde eine Leukozytenzahl im Bereich von 0 – 400 Zellen/ μ l beschrieben¹⁴⁵. Diese Ergebnisse konnten für Transsudat in dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich im Exsudat ein deutlicher Anstieg der Zellzahl, mit einem Maximum 24 h *post injectionem*, wohingegen im Transsudat die Zellzahl gering war und annähernd konstant blieb (vgl. Abschnitt 4.2.1). Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Entzündungsverlaufs nach Carrageenan-Injektion wurden ebenfalls in einer anderen Studie beim Hund⁸⁴ und für andere Tierarten wie Schaf, Ziege, Rind und Schwein ermittelt¹⁵². Die Hunde zeigten unterschiedlich starke Entzündungsreaktionen. Bei einem Hund war in der 2. Studie die maximale Leukozytenzahl nicht nach 24 h erreicht, sondern erst nach 96 h. Außerdem zeigte dieses Tier im gesamten Studienverlauf eine deutlich höhere Zellzahl als die anderen Hunde. Die dominierende Zellart im Exsudat waren neutrophile Granulozyten, was bei einer akuten Entzündungsreaktion auch zu erwarten war. Im Entzündungsverlauf kam es zu einer Zunahme der Monozyten^{84,85}. Zur weiteren Charakterisierung der TCF-Proben erfolgte eine Proteinbestimmung in Trans- und Exsudatproben. Die erhobenen Befunde stimmten mit Literaturangaben zum Proteingehalt in Transsudat (< 2,5 – 3,0 g/dl) bzw. in Exsudat (> 3,0 g/dl) überein⁷³. Um eine mögliche systemische Auswirkung der lokalen Entzündung zu prüfen, wurden hämatologische Untersuchungen durchgeführt. In der zweiten Studie fiel lediglich ein Hund mit einer geringgradigen Leukozytose auf, die nach 24 h und somit zeitgleich mit der maximalen Leukozytenzahl im Exsudat auftrat. In der 3. Studie zeigten zwei Hunde eine geringgradige Leukozytose zwischen 24 h und 36 h, also ebenfalls im Bereich der maximalen Zellkonzentration im TC. Dies könnte Ausdruck einer erhöhten individuellen Sensitivität oder aber auch durch Aufregung bei der Blutentnahme bedingt sein⁸⁵. Da bei der Mehrzahl der Hunde keine Leukozytose auftrat, scheint die Carrageenan-Injektion also nur in Einzelfällen zu systemischen Auswirkungen zu führen, die im weißen Blutbild sichtbar werden. In der Regel bleibt es bei einer milden, lokal begrenzten Entzündung und einer relativ konstanten Leukozytenzahl im Blut^{152,155}. Die bei einem Tier bei mehreren Blutuntersuchungen auftretende Leukopenie wurde nicht weiterführend untersucht, weil anscheinend kein Zusammenhang mit der Injektion von Carrageenan oder der Applikation von Pradofloxacin bestand, da sie u.a. auch zu Beginn der 3. Studie (Nullwert) auftrat.

Bei den hämatologischen Untersuchungen fielen weiterhin Veränderungen bei den eosinophilen Granulozyten auf. Die Eosinophilie trat vorwiegend bei einem Hund bei fast allen Probenentnahmen und bei einem weiteren Hund sporadisch auf. Eine Eosinophilie kann u.a. durch Parasitosen, Allergien, Läuseigkeit und Infektionskrankheiten in der Heilphase ausgelöst werden⁸⁵. Die hier zugrunde liegende Ursache konnte nicht geklärt werden. Des Weiteren gab es Veränderungen im roten Blutbild und bei den Thrombozyten, die durch die wiederholten Probenentnahmen bedingt sein könnten^{85,101,144}.

In der Literatur wurde bereits berichtet, dass die TCs als Fremdkörper mit der Zeit von einer immer dicker werdenden Gewebekapsel umgeben und die Perforationen der TCs mit Bindegewebe ausgefüllt werden¹⁴. Die histopathologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigten diesen Befund. Die TCs waren nach einer Verweildauer im Körper von 8,5 bis 11 Monaten von einer durchschnittlich 0,5 – 0,7 mm dicken Bindegewebskapsel umgeben. An den Perforationen wuchs das Bindegewebe, welches von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen war, in die TCs ein und im Inneren der TCs bildete sich eine fadenartige Verbindung aus Bindegewebe, welches in der Mitte des TCs eine zentrale Nekrose umhüllte (siehe Abschnitt 4.2.3.1). Insgesamt zeigten sich geringgradige Entzündungsreaktionen, die jedoch bei den einzelnen Hunden unterschiedlich stark ausgeprägt und bei den beiden TCs, in denen ein Entzündungsreiz gesetzt worden war, deutlicher waren als in TCs ohne Entzündungsreiz. Lediglich bei einem Hund zeigte sich eine stärkere entzündliche Reaktion, die vermutlich eine erhöhte individuelle Sensitivität auf die vom Organismus als Fremdkörper erkannten Implantate ausdrückt. Es bleibt offen, was die in TC-C bei 3 Hunden beobachteten Pigmentablagerungen im neu gebildeten Bindegewebe ausgelöst hat. Vermutlich handelte es sich dabei um Hämosiderin. Ablagerungen von Hämosiderin können durch Blutungen ausgelöst werden⁴¹. Möglicherweise sind sie im Rahmen der Probenentnahmen, durch Punktion eines Blutgefäßes entstanden oder beim Einwachsen des Gewebes durch Stauungen und Verschlüsse im Gewebe, die zur Thrombenbildung geführt haben. Aus dem starken Einwachsen von Bindegewebe an den Perforationsstellen ergibt sich möglicherweise ein Nachteil des Modells, da es das Diffusionsvermögen der interstitiellen Flüssigkeit in das Kammersystem und damit auch die Penetration des verwendeten Wirkstoffs beeinträchtigen könnte. Mit zunehmender Verweildauer des TCs im Körper ist deshalb mit einer geringeren Penetration in

die TCs zu rechnen. Der TC wird daher als tiefes peripheres, schwer zugängliches Kompartiment gesehen, was im Falle einer induzierten Entzündung einem Abszess nahekommen könnte^{2,36,151}. Grundsätzlich ist jedoch nicht geklärt, welcher physiologischen Struktur ein TC entsprechen soll¹⁷¹. In diesem Zusammenhang spielt auch die Beschaffenheit der TCs eine Rolle. Dabei ist das Verhältnis der perforierten Oberfläche zum Kammervolumen von entscheidender Bedeutung. Eine kleine Austauschfläche bei einem großen Kammervolumen spiegelt nicht den normalen Interstitialraum wider, sondern eher Gewebe mit geringer Durchblutung^{36,103}. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten zylindrischen TC hatten eine geringe Austauschfläche. Dadurch verliert das Modell jedoch nicht seine Aussagekraft, denn bei bakteriellen Infektionen kommt es häufig zu Flüssigkeitsansammlungen, Bildung von Granulationsgewebe und Abkapselung und damit auch zu Behinderung der Diffusion im betroffenen Gebiet³⁷.

Verschiedene Methoden sind gebräuchlich, um periphere Konzentrationen eines Wirkstoffes zu bestimmen. Hierzu gehören die direkte Biopsie der Gewebe, das „Tissue-Cage“-Modell und die Ultrafiltration. Ein Vorzug des „Tissue-Cage“-Modells ist, dass eine wiederholte Probenentnahme von Interstitialflüssigkeit möglich ist und somit erst die Erstellung von Konzentrations-Zeit-Kurven erfolgen kann. Weiterhin kann das Modell zum Vergleich von normaler und entzündeter Gewebsflüssigkeit herangezogen und zur Ex-vivo- oder In-vivo-Prüfung der antibakteriellen Wirksamkeit von Antiinfektiva genutzt werden. Das Modell stellt eine Brücke zwischen In-vitro-Untersuchungen und klinischen Prüfungen dar^{36,68}, da mit den aus dem Modell gewonnenen biologischen Medien pharmakodynamische Versuche wie beispielsweise eine MHK-Bestimmung außerhalb des Körpers durchgeführt werden können, was der Situation in vivo einen Schritt näher kommt, als Versuche in artifiziellem Nährmedium. Im „Tissue-Cage“-Modell wird die gesamte Wirkstoffkonzentration der Interstitialflüssigkeit bestimmt. Es kann nicht direkt zwischen an Protein gebundener und ungebundener Wirkstoffkonzentration unterschieden werden. Der freie, nicht an Protein gebundene Anteil des Wirkstoffs ist entscheidend, da nur er antibakteriell wirksam ist. Mit der Ultrafiltration hingegen kann die freie Wirkstoffkonzentration bestimmt werden, da die Gewinnung von Interstitialflüssigkeit durch eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von < 30000 Dalton erfolgt^{18,43}. Vielfach werden auch anhand von Gewebe-Biopsien/Homogenaten Rückschlüsse

auf die Wirksamkeit eines Antibiotikums gezogen. Dieser Methode ist das „Tissue-Cage“-Modell überlegen, da mit Homogenaten intra- und extrazelluläre Antibiotikumkonzentrationen vermischt werden, was zu einer Fehleinschätzung der Konzentration am Ort der Infektion führt. Wirkstoffe, die hauptsächlich extrazellulär verteilt sind, wie z. B. die Beta-Lactame und die Aminoglykoside, werden unterschätzt, wohingegen Wirkstoffe, die sich auch in den Zellen anreichern, wie z. B. Fluorochinolone oder Makrolide, überschätzt werden^{114,119,120}.

5.2 Pharmakokinetik von Pradofloxacin

Der Konzentrations-Zeit-Verlauf von Pradofloxacin im Serum bei Hunden nach oraler Applikation von Pradofloxacin-Tabletten in verschiedenen Dosierungen wurde bereits beschrieben und daraus das Standard-Dosierungsschema von 3 mg/kg KG festgelegt⁶². In weiteren Studien erfolgte die Prüfung der oralen Bioverfügbarkeit sowie die Bestimmung von Hautkonzentrationen^{63,64,136}. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig die Prüfung der Pharmakokinetik von Pradofloxacin im „Tissue-Cage“-Modell und darüber hinaus liegen zur Pharmakokinetik der oralen Suspension beim Hund noch keine veröffentlichten Ergebnisse vor. Die Standard-Dosierung von 3 mg/kg KG konnte für die orale Suspension bereits in pharmakokinetischen Studien bestätigt^{42,110} und daher bei den vorliegenden Untersuchungen eingesetzt werden.

Während einer der drei durchgeführten Pharmakokinetikstudien wurde bei 2 von 6 Hunden an einem bzw. mehreren Behandlungstagen Diarrhö festgestellt. Dies könnte durch Pradofloxacin bedingt sein, da gastrointestinale Störungen vereinzelt als Nebenwirkung einer Fluorochinolon-Therapie auftreten können¹⁶². Ein Tier zeigte während einer Studie eine reduzierte Futteraufnahme zwei Tage vor der Behandlung mit Pradofloxacin und an drei Behandlungstagen. Da dies auch schon vor Behandlungsbeginn auffiel, wurde die verringerte Nahrungsaufnahme nicht mit der Pradofloxacin-Therapie in Zusammenhang gebracht. Zur Prüfung der Verträglichkeit des Wirkstoffs wurde weiterhin zu Beginn und am Ende jeder Studie eine klinisch-chemische Blutuntersuchung durchgeführt. Dabei gab es keine Veränderungen. Insgesamt konnte *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* somit als gut verträglich beim Hund eingestuft werden.

Die Serum-Pharmakokinetik von *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* unterschied sich hinsichtlich der maximalen Konzentration und der AUC von den

für die Tablette ermittelten Daten. Die in den vorliegenden Studien gemessenen C_{\max} - und AUC-Werte lagen sowohl nach der 1. Applikation als auch nach der 5. Applikation unter den nach der Applikation von Pradofloxacin-Tabletten festgestellten Werten⁶². Dies könnte an dem in der Suspension verwendeten Ionenaustauscher liegen. Er dient dazu, den bitteren Geschmack des Wirkstoffs zu minimieren. Es kommt anscheinend zu einer unvollständigen Freisetzung. Studien zur Bioverfügbarkeit der oralen Suspension liegen beim Hund noch nicht vor, aber bei der Katze liegt die Bioverfügbarkeit bei nur 60 %⁶¹, wohingegen die Tablette eine Bioverfügbarkeit von 70 % aufweist⁶⁰. Die Pradofloxacin-Tablette ist beim Hund zu annähernd 100 % bioverfügbar⁶⁴. Die orale Suspension weist vermutlich auch beim Hund eine geringere Bioverfügbarkeit auf als die Tabletten. Die maximale Konzentration wurde in den vorliegenden Studien nach der gleichen Zeit erreicht wie nach Applikation der Tabletten und die Halbwertszeit („steady state“) war mit den Literaturangaben zur Tablette vergleichbar⁶². Der Akkumulationsindex lag in beiden Studien unterhalb des Grenzwertes, der für Wirkstoffe, die einmal täglich verabreicht werden und eine kürzere Halbwertszeit als 12 h haben, beschrieben wurde¹⁷⁴. Folglich kam es nicht zu einer Akkumulation des Wirkstoffs im Serum. Es bleibt offen, warum einer der Hunde in allen drei Studien eine höhere maximale Serumkonzentration zeigte als die anderen Tiere.

Das Hauptziel der Studien war die Untersuchung der Pharmakokinetik von Pradofloxacin in Gewebsflüssigkeit. Die maximale Konzentration im TCF war niedriger und wurde nach der maximalen Serumkonzentration erreicht. Die Elimination aus dem extravaskulären Bereich war langsamer als aus dem Serum. Diese Beobachtungen stimmten mit vorhandenen Literaturangaben überein, in denen Fluorochinolone, aber auch andere Antibiotika bei verschiedenen Spezies wie z. B. Hund, Rind und Kamel im „Tissue-Cage“-Modell untersucht wurden^{2,15,123,163,187,188}. Bei Kompartimenten („Tissue-Cages“) mit einer geringen Austauschfläche im Verhältnis zum Volumen zeigt sich keine Ähnlichkeit der Konzentrations-Zeit-Kurven in Serum und Gewebe, die maximale Konzentration im TC ist niedriger als 50 % der maximalen Serumkonzentration¹⁴². Die Konzentrations-Zeit-Verläufe im Gewebe sind folglich durch das angewendete Modell und wie zuvor bereits erwähnt auch durch das Alter der TCs bedingt. Diese Annahme wird bestärkt durch das Ergebnis einer Studie mit Marbofloxacin, welches direkt nach Implantation von TCs und Infektion derselben mit

S. intermedius i.v. verabreicht wurde und im Exsudat die gleiche Konzentrationen wie im Serum erreichte⁶⁹.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein geringfügiger Unterschied in der Wirkstoffkonzentration bei Transsudat und Exsudat. Die mittlere maximale Konzentration von Pradofloxacin im Exsudat überstieg die im Transsudat, jedoch konnte diesbezüglich kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Betrachtung der statistischen Auswertung muss berücksichtigt werden, dass es sich in den vorliegenden Studien um eine sehr geringe Fallzahl handelt ($n = 6$) und folglich ein nicht signifikanter Unterschied hier nicht beweisend ist. Die mittlere maximale PRA-Konzentration in Transsudat lag nach der 1. Applikation bei etwa 44 bis 52 % und nach der 5. Applikation bei 55 bis 63 % der mittleren maximalen Serumkonzentration. Für Exsudat konnte nach der 1. Applikation eine mittlere maximale PRA-Konzentration von fast 56 % und nach der 5. Applikation von ca. 74 % der mittleren maximalen Serumkonzentration festgestellt werden. In der 3. PK-Studie wurden niedrigere PRA-Konzentrationen festgestellt, die sowohl in Trans- als auch in Exsudat nur 40 % des mittleren C_{max} -Wertes in Serum erreichten. In der Literatur finden sich ähnliche Werte für Fluorochinolone im TCF^{2,186-188}. Dass die Penetration von Pradofloxacin in die TCs in der 3. PK-Studie insgesamt niedriger war als in den anderen beiden Studien, liegt wahrscheinlich am zunehmenden Alter der TCs, da, wie oben bereits beschrieben, mit der Zeit eine immer dicker werdende Kapsel den TC umhüllt und die Perforationen des TCs mit Bindegewebe ausgefüllt werden^{14,36}.

Die AUC in Trans- und Exsudat war nach der ersten Applikation bzw. Einfachapplikation geringer als im Serum. Im „steady state“ jedoch wurde in Transsudat und Exsudat eine höhere Gesamtexposition erreicht. Die hohe AUC im TCF wird beeinflusst durch die längere Halbwertszeit im TC. In einer Studie wurde allerdings bei drei Hunden im Exsudat eine geringere Halbwertszeit als in Serum und Transsudat beobachtet, was möglicherweise durch die Entzündungsreaktion ausgelöst wurde, da bei akuten Entzündungen eine vermehrte Durchblutung der betroffenen Lokalisation und somit ein schnellerer Abtransport des Wirkstoffs erfolgt¹⁹⁴.

Die Studien mit Entzündungsreiz sollten Aufschluss darüber geben, ob die Entzündung die Konzentration des Antibiotikums im TCF beeinflusst. Wie auch in anderen Studien^{5,163} war in der vorliegenden Arbeit die Wirkstoffkonzentration in

Transsudat und Exsudat ähnlich, obwohl in einer Studie mit radioaktiv markiertem Enrofloxacin belegt wurde, dass dies durch Leukozyten ins Exsudat transportiert wird²⁰. Zudem konnte die Akkumulation von Pradofloxacin in Leukozyten bereits gezeigt werden¹⁹. Möglicherweise ist aber die durch Leukozyten an den Ort des Infektionsgeschehens gebrachte Wirkstoffmenge nicht groß genug, um eine deutlich höhere Konzentration im Exsudat hervorzurufen. Die einzelnen Hunde zeigten unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der PRA-Konzentration in Trans- und Exsudat: meist war die Konzentration im Exsudat höher, was sich auch bei der Mittelwertberechnung bemerkbar machte. Bei einem Hund war jedoch in beiden Studien die Konzentration in Transsudat höher als in Exsudat, obwohl eine hohe Anzahl an Leukozyten im Exsudat vorhanden war. Dies zeigte sich in einer der Studien auch bei zwei weiteren Hunden. Warum diese individuellen Unterschiede auftraten, konnte nicht ermittelt werden.

Vergleicht man die vorliegenden Resultate mit den PRA-Konzentrationen, die von Fraatz und Mitarbeitern⁶³ nach mehrfacher oraler Applikation in der Haut ermittelt wurden, fällt auf, dass die PRA-Konzentration in der Haut anders als die Konzentration im TC die Serumkonzentration überstieg. Dies könnte zum einen durch eine verzögerte Elimination des Wirkstoffs aus der Haut⁶³ und zum anderen durch die Homogenisierung des Gewebes zustande kommen. Eine Hautprobe (Biopsie) enthält sowohl intra- als auch extrazellulär vorhandenen Wirkstoff, was besonders bei Fluorochinolonen, die sich auch intrazellulär anreichern, zu einer Überschätzung führen kann (s. o.). Im Gegensatz dazu wird bei einer TCF-Probe nur der extrazelluläre Wirkstoff bestimmt und dadurch ergibt sich eine niedrigere Konzentration.

5.3 Pharmakodynamische Aspekte

Die antibakterielle Aktivität von Pradofloxacin in der interstitiellen Flüssigkeit wurde mit Hilfe von Sensitivitätstests (MHK), Absterbekinetiken und postantibiotischen Effekten charakterisiert. Die Untersuchungen erfolgten mit Referenzstämmen von *E. coli* und *S. aureus*, da diese häufig vorkommende Infektionserreger sind. Durch die Auswahl eines gramnegativen sowie eines grampositiven Keimes konnte das antibakterielle Potenzial von Pradofloxacin in beiden Bereichen abgeschätzt werden. *E. coli* gehört zur Dickdarmflora und *S. aureus* kommt auf der Haut vor. Beide Bakterienspezies sind fakultativ pathogen, d. h. sie können unter

bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise bei mangelnder Hygiene oder geschwächter Immunabwehr zu Infektionen führen¹⁵⁰.

In der klinischen Praxis kommt der minimalen Hemmstoffkonzentration die größte Bedeutung zu. Sie wird eingesetzt, um die Empfindlichkeit eines Isolates gegenüber einer Auswahl von Antibiotika zu beurteilen. Der MHK-Wert wird auch für Modellrechnungen zur pharmakodynamischen Aktivität einer Substanz verwendet. Er ist somit ein Parameter für die Abschätzung des Therapieerfolgs und daraus resultiert die Therapieempfehlung. Ein weiteres Einsatzgebiet ist das sog. Resistenzmonitoring. In unterschiedlichen geografischen Bereichen (Bezirks-, Landes-, globale Ebene) wird das Auftreten von verminderter Empfindlichkeit bis hin zur Resistenz gegen individuelle Wirkstoffe sowie diverse Antibiotika-Klassen anhand der MHK überwacht. Bei der standardisierten Methode zur MHK-Bestimmung³⁸ wird eine relativ kleine Population (5×10^5 KBE/ml) eingesetzt und die Wirkstoffkonzentration ermittelt, die die Bildung von makroskopisch sichtbaren Kolonien in einem Zeitraum von 18 ± 2 Stunden hemmt. Die Untersuchungen erfolgen in synthetischen Nährlösungen oder Agar, die optimales Bakterienwachstum ermöglichen, wozu praktisch unbegrenzte Konzentrationen aller zum Wachstum notwendigen Stoffe vorhanden sein müssen. Völlig anders ist die Situation in natürlicher Umgebung, z. B. TCF, in der Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Eisen oder andere Spurenelemente, limitiert sind³⁶. Außerdem kommen diverse Immunabwehrmechanismen hinzu. Daher haben MHK-Werte, die in natürlichen Medien ermittelt wurden, vermutlich eine höhere klinische Relevanz, als die üblicherweise in Nährmedium erzeugten^{2,151}. Die MHK diverser Antibiotika, wie Danofloxacin oder Marbofloxacin, gegenüber verschiedenen Bakterienspezies wurde in Serum, Transsudat und Exsudat bei mehreren Tierarten durch Bestimmung der KBE/ml (siehe Abschnitt 2.4.1) untersucht. So zeigte sich für Marbofloxacin und Danofloxacin beim Kalb eine MHK-Erhöhung bzgl. eines Stammes von *M. haemolytica* in Müller-Hinton-Bouillon, Serum und Transsudat im Vergleich zu der in Agar ermittelten MHK. Die MHK-Unterschiede in Müller-Hinton-Bouillon und Agar zeigen, dass die MHK auch von der jeweiligen Bestimmungsmethode abhängt, was bei einem Vergleich von MHK-Werten berücksichtigt werden muss. Der MHK-Wert von Danofloxacin gegenüber einem *E. coli*-Stamm wurde in Müller-Hinton-Bouillon sowie Serum, Transsudat und Exsudat aus dem Kamel bestimmt. Im Serum war die MHK doppelt so hoch wie in

den anderen Medien. In diesem Fall gab es keine Angabe zur MHK im Agardilutionstest^{2,3,5,151}.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich für Pradofloxacin und Enrofloxacin sowohl für *E. coli* als auch für *S. aureus* in Transsudat eine Erhöhung der MHK um das 2- bis 3-fache im Vergleich zu Standard-Testbedingungen (Agardilution)⁷⁷. Ein Erklärungsansatz dafür war möglicherweise die Proteinbindung in natürlichen Flüssigkeiten². Wie oben bereits beschrieben unterscheidet sich die Zusammensetzung von Nährmedium und Interstitialflüssigkeit u. a. hinsichtlich des Elektrolytgehalts und der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren. In Nährmedium besteht kein Selektionsdruck, die Population findet optimale Wachstumsbedingungen vor und wächst bis zur maximal möglichen Dichte heran. Bakterien im Wachstum sind besonders empfindlich gegenüber antibakteriellen Substanzen. In natürlichen Medien (TCF) hingegen besteht auf Grund der Knappheit an Ressourcen ein allgemeiner Selektionsdruck. Die Population kann nicht ungehindert auswachsen. Hinzu kommt der Selektionsdruck durch das Antibiotikum. Somit könnte es sein, dass weniger empfindliche Subpopulationen dominieren und folglich zu einer Erhöhung der MHK führen.

Aus den oben genannten Unterschieden ergeben sich Konsequenzen für PK/PD-Kalkulationen, deren Grundlage die MHK ist. Da die Bedingungen *in vivo* andere sind als *in vitro*, kann das Modell irreführend sein. So könnte beispielsweise die Berechnung eines AUC₂₄/MHK-Verhältnisses mit einem *in vitro* ermittelten MHK-Wert zu einer Überschätzung der antibakteriellen Wirksamkeit führen.

Auch wenn man mit der Bestimmung der MHK im TCF den Bedingungen *in vivo* einen Schritt näher gekommen ist, so weist diese Methode ebenfalls Einschränkungen auf, da nur eine kleine Bakterienpopulation für einen festgelegten Zeitraum einer konstanten Antibiotikumkonzentration ausgesetzt wird². Im erkrankten Tier hingegen ist mit Populationen höherer Dichte zu rechnen und die Konzentration des Antibiotikums verringert sich kontinuierlich nach Erreichen von C_{max}.

Als zweiter pharmakodynamischer Parameter wurden Abtötungskinetiken im Transsudat untersucht. Diese haben wegen des methodischen Aufwands keine weite Verbreitung in der klinischen Diagnostik gefunden. Sie werden eher in der Forschung und Produktentwicklung eingesetzt. Die Abtötungsgeschwindigkeit und

das Ausmaß der Abtötung bei einer Populationsdichte von 10^6 bis 10^7 KBE/ml konnten ermittelt (vgl. Abschnitt 3.5.4 und 4.4.3) und mit dem beschriebenen Abtötungsverlauf in Nährmedium²⁰⁰ verglichen werden. Bei *E. coli* zeigte sich nach dem Transfer der Vorkultur in TCF eine Reduktion der Wachstumskontrolle um $1 \log_{10}$, was vermutlich einen Anpassungsvorgang an die limitierten Wachstumsbedingungen in Transsudat anzeigt, den die aus Nährmedium kommende Population durchlaufen musste. Das Ausmaß der Abtötung war in Transsudat größer als in Nährmedium. Bei $0,06 \mu\text{g PRA/ml}$ (= MHK in Transsudat) zeigte sich zunächst eine Reduktion der KBE/ml um $4 \log_{10}$ bis zu 8 h, dann stieg die Population bis zu 24 h auf die Anfangsdichte an und erst zwischen 24 h und 72 h kam es zum Auswachsen. Bei der gleichen Konzentration von Pradofloxacin in Nährmedium, die in diesem Medium der 2-fachen MHK entspricht, wuchs die Population nach einer anfänglichen Reduktion um $3 \log_{10}$ bereits nach 4 h aus. Bei höheren Konzentrationen (2-fache MPC¹⁹⁵) glich sich der Abtötungsverlauf in beiden Medien. Bei den Experimenten im TCF fiel auf, dass die Wachstumskontrolle in der Mehrzahl der Experimente nicht die in Nährmedium übliche Enddichte erreichte, sondern nur etwa 1/10 davon. Dies könnte wiederum auf die Limitierung aller Wachstumsfaktoren im TCF hinweisen (s. o.). Bei *S. aureus* waren die Unterschiede im Abtötungsverlauf noch deutlicher als bei *E. coli*. Zwar zeigte sich in Transsudat keine Reduktion der Wachstumskontrolle, aber es kam zu einer zweistündigen Verzögerung des Auswachsens. Bei $0,25 \mu\text{g PRA/ml}$ (2-fache MHK in Transsudat) kam es in Transsudat zunächst wie im Nährmedium zu einer Reduktion der KBE/ml um $3 \log_{10}$ nach 6 h, danach zu bakteriostatischer Aktivität bis 24 h und nach 72 h war die Nachweisgrenze erreicht, wohingegen die Population in Nährmedium nach 48 h auswuchs. Auch bei höheren Konzentrationen ($0,5$ und $1,0 \mu\text{g PRA/ml}$) wurde die Nachweisgrenze nur in Transsudat erreicht. Es kann folglich ein höheres Ausmaß der Abtötung in Transsudat beobachtet werden. Durch das höhere Inokulum bei den Abtötungskinetiken steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass sich Varianten in der Population befinden. Daher ist Abtötung schwerer zu erreichen als in kleineren Populationen. Ein Erklärungsansatz für die stärkere bakterizide Aktivität von Pradofloxacin in Transsudat im Vergleich zu Nährmedium könnte in der Limitierung der Nährstoffe in der natürlichen Flüssigkeit bestehen sowie in der möglichen Anwesenheit wirtseigener Abwehrstoffe.

Als dritter In-vitro-Parameter wurde der postantibiotische Effekt (PAE) bei *S. aureus* und in diesem Zusammenhang auch der postantibiotische Sub-MHK-Effekt in Transsudat untersucht. Normalerweise erfolgt dies wie die Untersuchung von Absterbekinetiken bei Keimdichten von 10^6 bis 10^7 KBE/ml. Hier wurde der PAE jedoch gleich bei Bakteriendichten, die vermutlich auch am Infektionsort vorliegen⁴⁸, untersucht. Entsprechend wurde zur Bestimmung des PAE eine Population hoher Dichte (10^9 KBE/ml) kurzzeitig einer im Zieltier maximal erreichbaren Wirkstoffkonzentration (2-fache MPC¹⁹⁵) ausgesetzt (siehe Abschnitt 3.5.5 und 4.4.4). Anschließend wurde der Wirkstoff durch Zentrifugation und Waschen der Zellen abgetrennt und die zeitliche Verzögerung bis zum Erreichen einer Dichte von $+1 \log_{10}$ KBE/ml im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollpopulation ermittelt. Der PAE in Transsudat war mit 0,4 h deutlich kürzer als in Caso-Bouillon (2 h), was möglicherweise durch eine Proteinbindung von Pradofloxacin im Transsudat verursacht wurde². Da der Wirkstoff nach Applikation in vivo nicht aus dem Patienten entfernt werden kann und der Abbau im Körper schrittweise erfolgt, ist die Bedeutung des PAE eher unklar.

Zur Abschätzung der therapeutischen Abdeckung des Dosierungsintervalls kommt dem postantibiotischen Sub-MHK-Effekt (PA-SME) vermutlich eine größere Bedeutung zu, da er zumindest den realen Verlauf der Wirkstoffkonzentration widerspiegelt¹²⁵: zunächst kommt es zu einer initialen Exposition bei hoher Fluorochinolon-Konzentration, gefolgt von absinkenden Restkonzentrationen des Wirkstoffs, die noch über einen längeren Zeitraum vorhanden sind. In vitro beobachtet man die bakteriostatische Wirkung von geringsten Wirkstoffkonzentrationen, die den Zellen in der postantibiotischen Phase (nach erfolgter Abtrennung des Wirkstoffs) in definierter Konzentration wieder zugesetzt werden. Die Verzögerung des Auswachsens wird quantifiziert durch den Zeitraum, nach welchem sich die KBE/ml wieder um $1 \log_{10}$ über dem Ausgangsniveau (nach Abtrennung) befinden.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen MHK-Werte für *S. aureus* in Transsudat ($0,12 \mu\text{g/ml}$) und Nährmedium ($0,06 \mu\text{g/ml}$), entsprachen sich die PA-SME bei $\frac{1}{2}$ MHK in den beiden Medien in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie. In Transsudat konnte bei $0,06 \mu\text{g PRA/ml}$ ein PA-SME von 17 h festgestellt werden und in Nährmedium wurde mit $0,03 \mu\text{g PRA/ml}$ ein PA-SME von 18 h erreicht. Dies bestätigt noch einmal die erhöhte MHK in Transsudat. Andere Studien belegten für Pradofloxacin in Nährmedium jedoch nur einen PA-

SME von 10 bis 11 Stunden bei $\frac{1}{2}$ MHK. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine geringere Konzentration ($0,023 \mu\text{g PRA/ml}$) als in unserer Studie eingesetzt wurde. Diese Konzentration ergibt sich aus dem ermittelten MHK-Bereich von $0,03$ bis $0,06 \mu\text{g PRA/ml}$, deren Mittelwert etwa $0,045 \mu\text{g/ml}$ entspricht¹⁹⁸. Bei einer $\frac{3}{4}$ MHK zeigte sich in Transsudat sogar eine 10 h andauernde Abtötung mit anschließender Bakterio­stase bis zu 24 h, so dass das Dosierungsintervall durch den PA-SME vollständig abgedeckt zu werden scheint.

Von besonderer Bedeutung ist, dass die Untersuchungen die Wirkung der Sub-MHK-Konzentrationen auch in diesen hohen Dichten, wie sie tatsächlich bei Infektionen vorkommen, zeigen konnten. In einem anfänglichen Inokulum von $> 10^9$ KBE/ml muss mit resistenten Mutanten gerechnet werden⁴⁸. Somit zeigte die eingesetzte Konzentration unterhalb der MHK eine bakterio­statische Wirkung auch auf weniger empfindliche Subpopulationen.

Die Untersuchungen zum PA-SME wurden nur für *S. aureus* durchgeführt, da sich persistierende Populationen ergaben, was bei *E. coli* nicht der Fall war.

Nachdem die Basisparameter der Pharmakodynamik in Transsudat untersucht waren, bestand ein besonderer Anreiz darin, den Abtötungsverlauf in Proben mit authentischem Wirkstoffgehalt zu verifizieren. Dies geschah mit Trans- und Exsudatproben, die im Rahmen einer Pharmakokinetikstudie zum Zeitpunkt der erwarteten maximalen Konzentration von Pradofloxacin im TCF und am Ende des Dosierungsintervalls genommen wurden.

Der Abtötungsverlauf von *E. coli* wurde in Transsudat und Exsudat von einem Hund untersucht. Dadurch war ein direkter Vergleich der antibakteriellen Wirksamkeit von Pradofloxacin in den beiden Medien möglich. In Exsudat konnte eine höhere maximale Konzentration von Pradofloxacin und somit eine größere Wirksamkeit festgestellt werden als in Transsudat. In beiden Medien überstieg der C_{max} -Wert die theoretische MPC von *E. coli*¹⁹⁵. Daraus folgt, dass auch in schwer zugänglichen, schlecht durchbluteten Geweben wahrscheinlich Konzentrationen erreicht werden können, die zur Abtötung führen und die Selektion resistenter Mutanten verhindern. Die am Ende des Dosierungsintervalls gezogene Exsudatprobe enthielt etwa die für Pradofloxacin im TCF ermittelte MHK und bewirkte zunächst eine Reduktion der Keime mit anschließender bakterio­statischer Aktivität bis zu 24 h. Damit war das Therapieintervall vollständig

abgedeckt. In Transsudat entsprach die Pradofloxacin-Konzentration 24 h *post applicationem* der 2-fachen MHK. Damit konnte zunächst eine Reduktion der KBE/ml um 3 \log_{10} erreicht werden, aber nach 6 h begann die Population verzögert auszuwachsen (vgl. Abschnitt 4.4.5.1). Das Dosierungsintervall war somit auch in diesem Fall abgedeckt, doch hätte mit der 2-fachen MHK eine stärkere antibakterielle Wirkung erwartet werden können. Im Exsudat war die Konzentration zu diesem Zeitpunkt niedriger, jedoch zeigte sich eine länger anhaltende bakteriostatische Wirkung. Dies könnte durch die im Exsudat evtl. nach Zentrifugation noch vorhandenen Körperabwehrstoffe, wie z. B. Enzyme der unspezifischen Abwehr¹⁰¹ kommen. Zudem muss jedoch berücksichtigt werden, dass in diesem Experiment mit Transsudat ein vergleichsweise höheres Inokulum eingesetzt wurde. Zur Klärung, ob in den eingesetzten Populationen Mutanten mit verminderter Empfindlichkeit existierten, wurden die MHK-Werte von Klonen aus der KBE-Bestimmung ermittelt (siehe Abschnitt 4.4.5.1). Es ergaben sich MHK-Erhöhungen für 19 von 20 Klonen von *E. coli* aus den beiden Pradofloxacin enthaltenden Transsudatproben, die in Gegenwart eines Efflux-Inhibitors reversibel waren. Folglich lag wahrscheinlich eine leicht erhöhte Efflux-Aktivität vor. Durch diesen gesteigerten Transport der Chinolone aus der Bakterienzelle wird die Wirkstoffkonzentration am Wirkungsort reduziert. Dieser Resistenzmechanismus, bei dem es zu Mutationen in steuernden Elementen von Efflux-Systemen kommt, wurde bei gramnegativen Bakterien, u. a. bei *E. coli* beschrieben^{83,122}.

Auch gegenüber *S. aureus* zeigte Pradofloxacin im Exsudat eine hohe antibakterielle Aktivität, die in Proben von zwei Hunden geprüft wurde. Dabei wurden individuelle Unterschiede bezüglich der maximalen Wirkstoffkonzentration sichtbar, die in beiden Fällen nicht die theoretische MPC von *S. aureus*¹⁹⁵ erreichte, aber zu einer bakteriziden Wirkung bis zu 24 h Inkubation führte. In einer der Proben blieb die Population nicht unter der Nachweisgrenze, sondern begann nach 96 h wieder zu wachsen. Daher wurde zunächst eine MHK-Bestimmung und im Anschluss eine DNA-Sequenz-Analyse der Klone mit höherem MHK-Wert durchgeführt, die jedoch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Punktmutation im Bereich der Chinolon-Resistenz-bestimmenden Region des Gens, das die Untereinheit A der Topoisomerase IV kodiert, ergab (vgl. Abschnitt 4.4.5.2). Die Ursache für die MHK-Erhöhung und das erneute Auswachsen der Population könnte hier wiederum eine gesteigerte Efflux-Aktivität

sein^{50,179}. Am Ende des Dosierungsintervalls lag bei einem Hund noch etwa die MHK von Pradofloxacin vor und bewirkte zunächst eine Reduktion der KBE/ml bis zu 13 h Inkubation und anschließend einen erneuten Anstieg der KBE/ml, der jedoch bis zu 24 h nicht über die Dichte des Anfangsinokulums hinausging. Mit der Hälfte der MHK, die in der Probe des anderen Hundes enthalten war, konnte bakteriostatische Aktivität über einen Zeitraum von 96 h Inkubation gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Therapieintervall auch bei *S. aureus* bei einer Standard-Dosierung von 3 mg PRA/kg KG vollständig abgedeckt werden kann.

Bisher liegen keine vergleichbaren Daten für Pradofloxacin vor. Für andere Fluorochinolone existieren mehrere Studien bei Nutztieren aber nicht beim Hund, in denen das antibakterielle Potenzial bei authentischem Wirkstoffgehalt geprüft wurde²⁻⁵. Dabei zeigten sich ähnliche Resultate.

Mit beiden Keimen erfolgte jeweils ein Versuch direkt nach der Probenentnahme. Die Proben für die Reproduktion wurden jedoch bis zum Versuchsbeginn bei -18 °C gelagert. Beim Vergleich der unabhängigen Befunde der beiden Versuche konnte kein nachteiliger Effekt durch die Lagerung festgestellt werden. Auch in anderen Studien wurde eine entsprechende Probenlagerung beschrieben^{2,163}.

Pharmakodynamische Studien mit Proben, die einen authentischen Wirkstoffgehalt aufweisen, erbringen nützliche Informationen bei der Abschätzung des Wirkungspotenzials und damit bei der Dosiskalkulation. Dennoch muss bei der Interpretation dieser Studien berücksichtigt werden, dass es nach wie vor Unterschiede zur Situation in vivo gibt: die Konzentration bleibt im Tier nicht über eine definierte Zeit konstant, bei einer Infektion ist die Bakterienpopulation größer als die in vitro üblicherweise eingesetzten KBE/ml und zudem können die körpereigenen Abwehrmechanismen nicht berücksichtigt werden¹⁵¹.

Insgesamt kann gesagt werden, dass das „Tissue-Cage“-Modell trotz seiner Limitierungen zur Einschätzung der Wirkstoffkonzentration an schlecht zugänglichen Infektionsorten und zur Durchführung pharmakodynamischer Untersuchungen in biologischen Medien geeignet ist. Durch die Bestimmung der gängigen In-vitro-Parameter zur antibakteriellen Wirksamkeit einer Substanz und damit verbundenen PK/PD-Kalkulationen mit Serum und TCF kann eine Verbindung zwischen In-vitro-Methoden und der In-vivo-Situation geschaffen

werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Basisparameter für Pradofloxacin ermittelt; im nächsten Schritt könnte die Pharmakodynamik für klinisch relevante pathogene Erreger evaluiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Pradofloxacin (PRA), ein neues Fluorochinolon, wird zur Behandlung bakterieller Infektionen bei Hund und Katze entwickelt. Dabei müssen u. a. die Pharmakokinetik und die antibakterielle Effektivität von PRA erfasst werden. Als Grundlage für die Pharmakokinetik dient normalerweise der Konzentrationsverlauf des Wirkstoffs im Serum. Bakterielle Infektionen treten aber seltener im Blut, sondern meist im extrazellulären Bereich der Gewebe auf. Die direkte Wirkstoffbestimmung aus Gewebeproben führt allerdings zu variierenden und somit zweifelhaften Ergebnissen. Daher wurde ein sog. „Tissue-Cage“-Modell etabliert. „Tissue-Cages“ (TCs) sind perforierte Hohlkörper. Durch ihre Implantation wird ein künstlicher Hohlraum im Gewebe geschaffen, in welchem sich „Tissue-Cage-Fluid“ (TCF) ansammelt, das repräsentativ für die Interstitialflüssigkeit ist. Somit konnte die PRA-Konzentration in Serum und Interstitialflüssigkeit (TCF, Transsudat und Exsudat) exakt bestimmt und verglichen werden. Weiterhin sollte die tatsächliche antibakterielle Aktivität von PRA unter annähernd physiologischen Bedingungen im TCF bestimmt werden.

Sechs adulten Beagle-Hündinnen wurden jeweils drei TCs subkutan implantiert. Nach der vollständigen Einheilung erfolgte die Applikation von *Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension* an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Studie 1 und 2) bzw. einmalig (Studie 3) in einer Dosierung von 3 mg/kg KG. Zur Gewinnung von Exsudat wurde zeitgleich zur ersten PRA-Applikation (Studie 2 und 3) durch Injektion einer 1%igen Carrageenan-Lösung eine sterile Entzündung in jeweils einem der TCs induziert. Blut- sowie Transsudat- und Exsudatproben wurden entnommen, zentrifugiert und mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie auf ihren Gehalt an PRA untersucht. Zur Abschätzung der antibakteriellen Aktivität diente: 1) die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von PRA gegenüber *E. coli* ATCC 8739 und *S. aureus* ATCC 6538 in Transsudat durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE), 2) die Erstellung von Abtötungskinetiken in Transsudat sowie 3) die Ermittlung postantibiotischer Effekte von PRA gegenüber *S. aureus* in Transsudat. Zudem wurden im Rahmen der 3. Studie nach 8 h (erwartete maximale PRA-Konzentration im TCF) und nach 24 h (am Ende des Dosierungsintervalls) TCF-Proben aliquotiert, mit jeweils ca. 4×10^6 KBE/ml von *E. coli* und *S. aureus* dotiert und bei 37 °C inkubiert. Daraus wurden Proben zur

Bestimmung der KBE/ml entnommen, um das antibakterielle Potenzial von PRA bei tatsächlichem Wirkstoffgehalt nach oraler PRA-Applikation zu prüfen. Nach Beendigung aller Studien erfolgte die operative Entfernung der TCs und im Anschluss daran eine histopathologische Untersuchung der TCs.

Pradofloxacin 2,5 % Oral Suspension erwies sich beim Hund als gut verträglich. Es zeigte sich in allen Studien ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der PRA-Konzentration in Serum und TCF. Die Wirkstoffkonzentration in Transsudat und Exsudat unterschied sich geringgradig. Die mittlere maximale Konzentration von Pradofloxacin im Exsudat überstieg die im Transsudat, jedoch konnte diesbezüglich kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die mittlere maximale PRA-Konzentration in Transsudat lag nach der 1. Applikation bei etwa 44 bis 52 % und nach der 5. Applikation bei 55 bis 63 % der mittleren maximalen Serumkonzentration. Für Exsudat konnte nach der 1. Applikation eine mittlere maximale PRA-Konzentration von fast 56 % und nach der 5. Applikation von ca. 74 % der mittleren maximalen Serumkonzentration festgestellt werden. Die mittlere maximale Konzentration von PRA (C_{\max}) in der 3. Studie (Einfachapplikation) betrug in Transsudat und Exsudat nur 40 % der mittleren maximalen Serumkonzentration. Wie die histopathologische Untersuchung der TCs zeigte, erklärt sich dies durch die zunehmende Verweildauer der TCs im Körper, da die TCs von einer Gewebekapsel umgeben und die Perforationen der TCs mit der Zeit von Bindegewebe ausgefüllt werden, wodurch die Diffusion in den TC erschwert wird. C_{\max} wurde im Serum nach etwa 2 h erreicht und im TCF nach 8 h. Die Fläche unter der Kurve (AUC) in Trans- und Exsudat war nach der 1. Applikation bzw. Einfachapplikation geringer als im Serum. Im „steady state“ jedoch wurde in Transsudat und Exsudat eine höhere Gesamtexposition erreicht, die durch die längere Halbwertszeit von PRA im TC begründet war. Die Pharmakokinetik von PRA im „Tissue-Cage“-Modell ist hinsichtlich des Verhältnisses zwischen Serum- und TCF-Konzentration mit Literaturangaben zu anderen Chinolonen vergleichbar.

Für PRA sowie für Enrofloxacin (ENR) als Referenzprodukt ergab sich sowohl für *E. coli* als auch für *S. aureus* in Transsudat eine Erhöhung der MHK um das 2- bis 3-fache im Vergleich zu Standard-Testbedingungen (Agardilution). Mithilfe der durchgeführten Abtötungskinetiken konnte in Transsudat eine stärkere bakterizide Aktivität von PRA gegenüber beiden Referenzkeimen nachgewiesen werden als in Nährmedium. Zur Bestimmung des postantibiotischen Effekts (PAE) von PRA

gegenüber *S. aureus* wurde eine Population hoher Dichte (10^9 KBE/ml) kurzzeitig einer im Zieltier maximal erreichbaren Wirkstoffkonzentration ausgesetzt. Der PAE in Transsudat war mit 0,4 h deutlich kürzer als in Caso-Bouillon (2 h). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen MHK-Werte für *S. aureus* in Transsudat (0,12 µg/ml) und Nährmedium (0,06 µg/ml), entsprachen sich die postantibiotischen Sub-MHK-Effekte (PA-SME) bei $\frac{1}{2}$ MHK in den beiden Medien (17 bzw. 18 h). Bei einer $\frac{3}{4}$ MHK zeigte sich in Transsudat sogar eine 10 h andauernde Abtötung mit anschließender Bakteriostase bis zu 24 h, so dass das Dosierungsintervall durch den PA-SME offenbar vollständig abgedeckt wurde. In Proben mit authentischem Wirkstoffgehalt nach oraler PRA-Applikation zeigte sich eine fortdauernde und hohe antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *E. coli* und *S. aureus*, auch noch am Ende des Dosierungsintervalls. Die Restkonzentrationen entsprachen dabei den jeweiligen in TCF ermittelten MHK-Werten.

7 SUMMARY

Pradofloxacin (PRA), a new fluoroquinolone, is being developed to treat bacterial infections in dogs and cats. The pharmacokinetic and antibacterial potential of PRA were therefore evaluated. The basis of pharmacokinetic analysis is the determination of concentration-time-profiles in serum. However, bacterial infections normally take place in the extracellular compartment of tissues. The determination of drug concentrations in a homogenized biopsy sample leads to varying and therefore doubtful results. For this reason, a tissue cage model has been established. Tissue cages (TCs) are perforated hollow devices. Through their implantation in the tissue, an artificial cavity is created in which fluid (tissue cage fluid, TCF) accumulates which is representative of interstitial fluid. Hence, the accurate concentration of PRA in serum and interstitial fluid (TCF, transudate and exudate) could be determined and compared. Furthermore, the actual antibacterial activity of PRA in TCF had to be investigated under almost physiological conditions.

Three TCs per animal were subcutaneously implanted in six adult female Beagle dogs. After complete recovery from surgery, pradofloxacin 2.5 % oral suspension (3 mg/kg b. w.) was administered to the dogs for five consecutive days (study 1 and 2) and also as a single administration (study 3). To generate inflammatory exudates, a 1 % carrageenan solution was injected into a single TC in each animal simultaneously with application of PRA (study 2 and 3). Blood, transudate and exudate samples were drawn, centrifuged and analyzed for their PRA concentration by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry. For the estimation of the antibacterial activity served: 1) the determination of PRA MICs against *E.coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538 in transudate by counting cfu/mL, 2) the performance of kill kinetics in transudate and 3) the investigation of postantibiotic effects (PAE) of PRA against *S. aureus* in transudate. Moreover, during study 3 TCF samples were aliquotted after 8 h (expected maximum concentration of PRA in TCF) and after 24 h (end of dosing interval), inoculated with either 4×10^6 cfu/mL of *E. coli* or *S. aureus* and incubated at 37°C to examine the antibacterial activity of PRA in samples with authentic concentrations. After completion of all studies the TCs were excised and afterwards a histopathologic investigation of the TCs was conducted.

The pradofloxacin oral suspension was well tolerated by all dogs. There was a statistically significant difference concerning the PRA concentration in serum and TCF in all studies. The concentration of the active substance in transudate and exudate differed slightly. The mean maximum concentration of PRA in exudate exceeded the concentration in transudate; however, a statistically significant difference could not be determined. The mean maximum concentration of PRA in transudate was approximately 44 to 52 % after the first application and 55 to 63 % of the mean serum concentration after the fifth application. In exudate a mean maximum PRA concentration of nearly 56 % after the first application and of approximately 74 % of the mean maximum serum concentration after the fifth application could be determined. In study 3 (single application), the mean maximum concentration of PRA (C_{\max}) in transudate and exudate reached only 40 % of the mean maximum serum concentration. As the histopathological investigation showed, this can be explained by the longer residence time of the TCs in the body which results in an increasing growth of tissue into and around the TCs so that the diffusion into the TCs was hindered. C_{\max} was achieved after approximately 2 h in serum and after 8 h in TCF. After the first application and after single application respectively, the AUC in transudate and exudate was smaller than in serum. At steady state, however, a higher total drug exposition was reached in transudate and exudate, which was caused by the longer half-life of PRA in the TC. Regarding the relationship between serum and TCF concentration, the pharmacokinetics of PRA in the tissue cage model is comparable with literature data from other quinolones.

For PRA as well as for enrofloxacin (ENR), as reference product, there was a 2- up to 3-fold increase of MIC against *E. coli* and *S. aureus* in transudate compared to standard test conditions (agar dilution). Kill kinetics showed a stronger bactericidal activity of PRA in transudate than in growth medium against both reference organisms. To determine the PAE of PRA on *S. aureus*, a population of high density (10^9 cfu/mL) was exposed short-term to a PRA concentration maximally attainable in the target animal. The PAE in transudate (0.4 h) was shorter than in broth (2 h). Considering the different MIC values of PRA against *S. aureus* in transudate (0.12 $\mu\text{g/mL}$) and growth medium (0.06 $\mu\text{g/mL}$), postantibiotic sub-MIC effects (PA-SME) were nearly equal in the two media (17 h/18 h) at $\frac{1}{2}$ MIC. At $\frac{3}{4}$ MIC killing could be observed in transudate up to 10 h followed by bacteriostatic activity up to 24 h, therefore the dosage interval was

completely covered by the PA-SME. Samples with authentic PRA concentrations showed a continuing and high antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* even at the end of the dosage interval. The residual concentrations corresponded to the respective MIC values determined in TCF.

8 ANHANG

Tabelle 11. Leukozytenzahl ($\times 10^3/\mu\text{l}$) in Transsudat und Exsudat der 2. PK-Studie

Zeit (h)	ID 0831		ID 0868		ID 0869		ID 0847		ID 0084		ID 0860	
	Trans	Ex	Trans	Ex	Trans	Ex	Trans	Ex	Trans	Ex	Trans	Ex
0	0,13	0,57	0,04	0,15	0,23	0,17	0,26	0,24	0,23	0,31	0,22	0,35
2	0,14	*0,11	0,14	0,30	0,33	*0,15	0,34	0,25	0,21	0,44	0,22	*0,42
5	0,13	*0,29	n.s.	0,38	0,42	*0,37	0,33	*0,40	0,23	0,56	0,21	*0,97
8	0,15	*1,21	0,22	1,31	0,33	n.s.	n.s.	2,18	0,32	1,88	0,27	6,97
11	n.s.	n.s.	n.s.	2,02	n.s.	n.s.	0,30	2,12	0,22	4,65	n.s.	14,40
24	0,15	3,03	0,19	2,03	0,26	4,52	0,20	21,17	0,29	10,19	0,32	20,74
96	0,16	0,81	0,17	0,69	0,15	2,02	0,21	6,95	0,27	3,85	0,12	37,38
98	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,29	7,72	0,29	3,57	0,11	35,52
101	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	6,95	0,36	4,58	0,14	28,55
104	0,24	0,90	n.s.	0,81	0,18	2,33	n.s.	6,93	0,31	3,06	n.s.	18,13
107	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,21	1,46	n.s.	8,03	n.s.	3,19	n.s.	n.s.
120	0,04	0,63	0,36	n.s.	0,16	1,25	0,17	4,65	0,23	2,60	n.s.	28,12
126	0,10	0,84	n.s.	n.s.	n.s.	1,39	n.s.	6,00	n.s.	1,97	n.s.	25,59
132	0,14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1,05	n.s.	n.s.	n.s.	1,89	n.s.	n.s.
144	n.s.	1,37	n.s.	0,29	0,25	0,85	n.s.	1,38	0,15	1,40	0,21	12,60
168	0,16	0,85	0,21	0,34	0,13	0,31	0,14	1,60	0,08	1,18	0,15	13,39
MW	0,14	0,96	0,19	0,83	0,24	1,32	0,25	5,10	0,25	2,83	0,20	17,37
SD	0,05	0,77	0,10	0,71	0,09	1,23	0,07	5,33	0,07	2,41	0,07	12,56

*Gesamtleukozytenzahl ausschließlich im Peroxidasekanal des ADVIA[®]120 gemessen;
n.s. = keine Probe (ADVIA[®] 120)

Tabelle 12. Leukozytenzahl ($\times 10^3/\mu\text{l}$) in Transsudat und Exsudat der 3. PK-Studie

Zeit (h)	ID 0831		ID 0868		ID 0869		ID 0847		ID 0084		ID 0860	
	Trans	Ex										
0	0,07	0,04	0,03	0,07	0,08	*0,02	0,24	0,19	0,07	0,14	0,17	0,24
2	0,09	*0,10	0,08	*0,08	0,15	0,14	0,10	*0,08	0,14	*0,14	0,27	*0,06
5	0,10	*0,68	0,10	*0,64	0,15	*1,70	0,17	0,33	0,15	0,24	0,24	0,15
8	0,12	*2,00	0,13	1,04	0,15	5,60	0,16	1,02	0,12	0,49	0,20	*0,57
11	0,20	n.s.	n.s.	3,18	0,12	31,22	0,20	7,71	0,17	1,14	0,24	0,89
24	0,14	n.s.	n.s.	n.s.	0,20	n.s.	n.s.	20,82	0,14	n.s.	0,25	1,72
30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,22	17,34	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
36	n.s.	n.s.										
48	0,29	0,49	0,22	0,61	0,18	9,52	n.s.	9,37	0,17	0,74	n.s.	n.s.
72	0,29	0,84	0,21	0,32	0,15	4,98	0,26	2,91	0,14	0,66	0,21	0,87
MW	0,16	0,69	0,13	0,85	0,16	8,82	0,19	5,30	0,14	0,51	0,23	0,64
SD	0,09	0,71	0,07	1,08	0,04	10,71	0,06	7,22	0,03	0,37	0,03	0,58

*Gesamtleukozytenzahl ausschließlich im Peroxidasekanal des ADVIA[®]120 gemessen;
n.s. = keine Probe (ADVIA[®]120)

Tabelle 13. Referenzbereiche und Einheiten für die hämatologischen Untersuchungen (Adiva[®] 120)

	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
Einheit	$\times 10^3/\mu\text{l}$	$\times 10^6/\mu\text{l}$	g/dl	%	fl	pg	g/dl	$\times 10^3/\mu\text{l}$				
Referenzbereich	5,3- 13,9	5,7- 8,8	12,9- 18,4	37,1- 57,0	58,8- 71,2	20,5- 24,2	31,0- 36,2	143,3- 400	3,9- 8,0	1,3-4,1	0,2- 1,1	0-0,6

In den folgenden Tabellen sind Werte außerhalb des Referenzbereiches *kursiv* gedruckt.

Tabelle 14. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der 1. PK-Studie

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0831/0h	6,44	5,80	14,20	41,00	70,60	24,40	34,60	240,00	3,84	1,81	0,63	0,05
0868/0h	10,10	6,90	16,50	48,70	70,50	23,90	33,90	383,00	5,79	3,30	0,42	0,33
0869/0h	10,65	7,91	18,30	55,00	69,50	23,10	33,30	319,00	5,96	3,33	0,47	0,56
0847/0h	11,57	6,96	15,40	47,50	68,20	22,20	32,50	621,00	6,65	3,43	0,46	0,76
0084/0h	7,52	7,12	16,60	49,40	69,30	23,30	33,60	451,00	3,27	2,92	0,42	0,64
0860/0h	10,20	6,47	15,00	44,40	68,70	23,10	33,60	571,00	6,48	2,68	0,59	0,20
0831/72h	6,12	5,21	12,50	37,20	71,40	24,00	33,60	369,00	3,76	1,79	0,40	0,06
0868/72h	10,21	5,49	13,40	38,70	70,50	24,40	34,60	387,00	6,15	2,94	0,50	0,44
0869/72h	10,77	6,44	15,40	45,40	70,50	23,90	34,00	306,00	6,50	3,22	0,33	0,51
0847/72h	13,19	6,15	13,80	43,20	70,30	22,50	32,00	466,00	8,31	3,44	0,32	0,80
0084/72h	7,77	6,26	14,10	44,10	70,50	22,50	31,90	484,00	4,02	2,71	0,40	0,43
0860/72h	10,39	5,93	12,60	41,40	69,80	21,30	30,50	604,00	6,58	2,59	0,40	0,52
MW	9,58	6,39	14,82	44,67	69,98	23,22	33,18	433,42	5,61	2,85	0,45	0,44
SD	2,15	0,76	1,73	4,97	0,91	0,96	1,22	121,63	1,53	0,57	0,09	0,25

Tabelle 15. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der 2. PK-Studie

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0831/0h	5,32	6,95	17,20	50,70	73,00	24,80	34,00	313,00	3,41	1,23	0,49	0,04
0868/0h	10,50	5,88	14,50	41,60	70,70	24,60	34,70	332,00	6,63	2,63	0,63	0,37
0869/0h	7,89	7,41	18,00	52,70	71,10	24,30	34,20	384,00	5,05	1,89	0,32	0,39
0847/0h	8,08	7,45	17,40	46,90	63,00	23,30	37,00	428,00	5,16	1,97	0,20	0,55
0084/0h	7,36	6,54	15,00	40,90	62,50	22,90	36,60	278,00	4,51	2,16	0,34	0,22
0860/0h	8,23	7,77	17,40	48,20	62,10	22,40	36,10	421,00	5,02	2,60	0,33	0,15
0831/1h	5,16	6,37	15,40	42,20	66,20	24,20	36,60	246,00	3,52	1,23	0,26	0,09
0868/1h	10,72	6,15	14,70	39,40	64,10	23,80	37,10	367,00	6,57	3,09	0,48	0,41
0869/1h	9,32	7,10	16,90	45,70	64,40	23,80	37,00	337,00	5,50	2,59	0,48	0,48
0847/1h	9,48	7,41	17,30	47,90	64,70	23,40	36,10	395,00	5,35	3,01	0,24	0,70
0084/1h	6,60	6,60	15,10	41,30	62,60	22,90	36,60	371,00	3,95	2,09	0,23	0,24
0860/1h	9,07	7,41	16,50	46,30	62,50	22,30	35,70	388,00	5,41	2,99	0,40	0,15
0831/2h	4,70	6,41	15,40	42,40	66,20	24,00	36,20	310,00	3,14	1,22	0,24	0,04
0868/2h	10,42	5,89	14,10	37,30	63,30	23,90	37,80	381,00	6,55	2,79	0,51	0,39
0869/2h	8,89	7,25	17,10	46,70	64,40	23,60	36,60	405,00	5,36	2,33	0,51	0,43
0847/2h	10,23	7,40	17,30	47,40	64,00	23,40	36,60	403,00	5,89	3,25	0,19	0,68
0084/2h	7,97	7,47	17,00	46,30	62,00	22,70	36,60	388,00	4,80	2,42	0,24	0,34
0860/2h	9,50	7,51	16,90	46,50	62,00	22,50	36,20	431,00	5,76	2,96	0,45	0,13

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0831/5h	4,46	6,54	15,70	43,20	66,00	24,00	36,40	345,00	2,99	1,13	0,24	0,02
0868/5h	10,52	5,78	13,70	36,60	63,30	23,70	37,50	401,00	6,85	2,72	0,44	0,36
0869/5h	9,66	7,03	16,60	45,00	64,10	23,70	37,00	413,00	6,14	2,35	0,50	0,44
0847/5h	10,79	7,27	17,00	46,50	64,00	23,30	36,40	400,00	6,03	3,60	0,27	0,66
0084/5h	8,23	7,51	17,10	46,90	62,50	22,80	36,40	408,00	5,29	2,21	0,33	0,22
0860/5h	10,74	7,07	16,00	43,80	61,90	22,60	36,50	403,00	6,72	3,14	0,55	0,12
0831/8h	6,02	6,89	16,60	45,10	65,50	24,10	36,70	377,00	3,79	1,75	0,29	0,04
0868/8h	12,37	6,56	15,70	41,80	63,70	23,90	37,60	439,00	7,54	3,70	0,53	0,38
0869/8h	10,59	7,78	18,30	49,80	64,00	23,50	36,70	440,00	6,68	2,60	0,54	0,42
0847/8h	11,62	7,97	18,50	50,40	63,20	23,20	36,70	423,00	6,22	4,00	0,32	0,77
0084/8h	8,61	8,14	18,50	50,90	62,60	22,80	36,40	462,00	5,35	2,51	0,39	0,16
0860/8h	12,30	7,69	17,40	47,50	61,80	22,60	36,50	414,00	7,97	3,32	0,71	0,11
0831/11h	6,29	6,54	15,70	43,00	65,80	24,00	36,50	312,00	3,93	1,85	0,33	0,08
0868/11h	12,54	6,34	15,20	40,40	63,60	24,00	37,70	419,00	7,41	3,85	0,60	0,40
0869/11h	10,44	7,77	18,10	49,70	64,00	23,30	36,40	350,00	6,36	2,86	0,55	0,40
0847/11h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0084/11h	8,10	7,06	16,30	44,10	62,40	23,10	37,00	160,00	4,74	2,44	0,52	0,20
0860/11h	13,93	7,51	16,80	46,20	61,60	22,30	36,30	410,00	9,05	3,70	0,80	0,11
0831/24h	5,78	6,28	14,90	41,70	66,50	23,80	35,80	310,00	3,72	1,57	0,34	0,06
0868/24h	10,49	5,84	13,70	37,80	64,70	23,50	36,30	412,00	6,06	3,25	0,51	0,49
0869/24h	11,91	6,74	16,00	43,60	64,70	23,80	36,70	397,00	8,14	2,48	0,65	0,40
0847/24h	15,54	7,47	17,40	47,90	64,10	23,30	36,40	336,00	10,22	3,46	0,90	0,72
0084/24h	6,92	7,23	16,50	45,00	62,20	22,80	36,80	399,00	3,86	2,29	0,37	0,26
0860/24h	13,81	7,05	16,00	44,00	62,30	22,70	36,40	387,00	9,12	3,30	0,96	0,20
0831/0h	5,39	6,61	15,70	44,60	67,50	23,70	35,10	351,00	3,56	1,52	0,20	0,05
0868/0h	10,47	5,73	13,70	36,70	64,00	24,00	37,40	400,00	6,58	2,77	0,54	0,45
0869/0h	10,36	6,90	16,40	44,70	64,70	23,80	36,70	435,00	6,51	2,76	0,29	0,65
0847/0h	10,32	7,36	17,00	47,50	64,60	23,10	35,80	367,00	6,21	2,98	0,26	0,71
0084/0h	8,33	7,46	17,10	47,00	63,00	23,00	36,50	404,00	4,61	2,85	0,39	0,34
0860/0h	9,80	6,79	15,60	42,50	62,60	23,00	36,80	352,00	5,87	3,20	0,41	0,20
0831/1h	5,34	6,49	15,60	43,60	67,10	24,10	35,90	300,00	3,64	1,39	0,18	0,04
0868/1h	10,45	5,77	13,70	37,80	65,50	23,70	36,20	359,00	6,58	2,78	0,53	0,42
0869/1h	9,38	6,50	15,40	43,00	66,10	23,70	35,80	340,00	5,94	2,50	0,30	0,50
0847/1h	10,23	7,48	17,60	48,20	64,40	23,50	36,40	395,00	6,24	2,92	0,22	0,64
0084/1h	7,08	6,46	15,00	40,80	63,20	23,30	36,90	395,00	4,27	2,17	0,31	0,25
0860/1h	9,43	6,65	15,10	41,60	62,50	22,80	36,40	380,00	5,87	2,89	0,40	0,17
0831/2h	5,20	6,09	14,60	40,80	66,90	24,00	35,80	290,00	3,67	1,26	0,19	0,02
0868/2h	9,79	5,42	12,80	35,30	65,10	23,50	36,20	384,00	6,27	2,54	0,48	0,37
0869/2h	9,28	6,51	15,40	42,40	65,20	23,70	36,30	332,00	5,94	2,35	0,33	0,52

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0831/48h	6,82	5,85	14,30	38,70	66,10	24,30	36,90	364,00	4,60	1,77	0,30	0,06
0868/48h	11,10	5,26	12,50	34,00	64,50	23,80	36,90	375,00	6,46	3,69	0,38	0,44
0869/48h	11,54	6,31	15,10	40,70	64,60	24,00	37,10	418,00	7,28	3,06	0,45	0,59
0847/48h	11,87	6,80	15,80	43,50	63,90	23,30	36,40	433,00	7,44	3,35	0,26	0,69
0084/48h	7,80	7,12	16,20	44,60	62,70	22,80	36,30	419,00	4,32	2,79	0,31	0,23
0860/48h	8,70	5,91	13,40	36,90	62,60	22,70	36,30	416,00	5,50	2,64	0,33	0,14
0831/72h	6,16	5,82	13,90	38,90	66,80	23,90	35,80	323,00	4,30	1,49	0,24	0,05
0868/72h	12,25	5,18	12,00	33,30	64,30	23,20	36,10	408,00	7,43	3,79	0,40	0,48
0869/72h	10,70	6,36	15,20	41,30	65,00	23,90	36,80	392,00	7,28	2,43	0,39	0,45
0847/72h	10,88	6,61	15,40	42,40	64,10	23,30	36,40	401,00	6,52	3,31	0,23	0,70
0084/72h	7,70	6,85	15,40	43,20	63,10	22,50	35,70	394,00	3,73	3,29	0,31	0,24
0860/72h	8,37	6,18	13,90	38,30	62,00	22,50	36,30	438,00	4,77	2,91	0,37	0,18
MW	9,29	6,64	15,55	42,54	64,07	23,43	36,58	376,03	5,72	2,69	0,39	0,34
SD	2,22	0,68	1,46	4,22	1,96	0,59	0,66	50,88	1,37	0,70	0,14	0,22

Tabelle 16. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der 3. PK-Studie

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0831/0h	3,57	6,21	14,70	40,20	64,80	23,60	36,50	532,00	2,21	1,10	0,19	0,04
0868/0h	10,37	6,01	14,10	39,30	65,30	23,50	36,00	449,00	7,05	2,47	0,49	0,29
0869/0h	8,20	6,63	15,80	42,50	64,20	23,90	37,20	446,00	5,43	1,96	0,23	0,47
0847/0h	9,00	7,39	17,10	46,30	62,70	23,20	37,00	424,00	5,70	2,43	0,19	0,57
0084/0h	9,77	6,94	16,30	43,40	62,60	23,40	37,40	401,00	6,49	2,12	0,82	0,24
0860/0h	9,94	7,40	16,80	45,70	61,80	22,70	36,70	592,00	7,23	1,96	0,53	0,13
0831/1h	5,22	6,65	15,70	42,90	64,50	23,60	36,50	358,00	3,39	1,46	0,23	0,07
0868/1h	11,31	6,87	16,50	44,90	65,50	24,00	36,60	467,00	7,65	2,59	0,47	0,46
0869/1h	9,96	5,99	14,50	38,50	64,20	24,30	37,80	401,00	6,50	2,28	0,33	0,73
0847/1h	10,83	7,21	16,90	45,40	63,00	23,40	37,20	375,00	6,69	3,07	0,20	0,74
0084/1h	9,55	7,73	18,10	49,10	63,50	23,40	36,90	312,00	6,37	2,24	0,50	0,27
0860/1h	9,91	6,62	15,20	40,90	61,80	22,90	37,10	448,00	6,94	2,18	0,51	0,16
0831/2h	4,97	6,20	14,50	39,60	63,90	23,40	36,50	448,00	3,26	1,35	0,25	0,07
0868/2h	12,43	6,18	14,90	40,10	64,80	24,10	37,20	399,00	8,36	3,00	0,44	0,50
0869/2h	9,25	5,78	13,90	36,90	63,90	24,00	37,60	417,00	6,05	2,18	0,31	0,62
0847/2h	12,23	7,58	17,40	47,00	62,00	23,00	37,00	397,00	7,56	3,43	0,29	0,79
0084/2h	9,45	7,11	16,70	44,90	63,10	23,50	37,30	422,00	6,37	2,19	0,44	0,32
0860/2h	11,28	7,04	16,10	43,00	61,00	22,80	37,40	491,00	7,95	2,43	0,56	0,21
0831/5h	5,61	6,14	14,50	39,40	64,20	23,60	36,80	416,00	3,73	1,48	0,27	0,06
0868/5h	11,68	5,93	14,20	38,30	64,60	23,90	37,00	432,00	8,34	2,37	0,49	0,38

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0869/5h	9,32	5,80	14,10	36,90	63,60	24,20	38,10	415,00	5,95	2,44	0,25	0,57
0847/5h	11,33	6,93	16,10	43,40	62,70	23,30	37,20	383,00	6,97	3,20	0,29	0,73
0084/5h	9,67	7,28	17,10	46,20	63,50	23,40	36,90	435,00	6,73	1,99	0,60	0,23
0860/5h	11,26	6,80	15,50	42,20	62,10	22,70	36,60	478,00	8,07	2,31	0,62	0,13
0831/8h	7,46	6,90	16,40	44,00	63,80	23,80	37,40	482,00	4,63	2,13	0,49	0,07
0868/8h	12,09	6,27	15,20	40,50	64,60	24,20	37,50	483,00	8,10	3,02	0,52	0,32
0869/8h	11,37	6,19	14,90	39,30	63,60	24,10	38,00	445,00	7,52	2,78	0,37	0,57
0847/8h	12,67	7,35	16,80	45,40	61,70	22,90	37,00	457,00	7,73	3,50	0,42	0,76
0084/8h	11,68	7,89	18,20	49,80	63,10	23,10	36,60	480,00	8,12	2,45	0,72	0,18
0860/8h	13,08	7,02	16,00	43,10	61,30	22,70	37,10	509,00	9,70	2,46	0,67	0,10
0831/11h	7,20	6,70	15,80	43,00	64,10	23,60	36,80	444,00	4,26	2,26	0,45	0,10
0868/11h	13,93	6,30	15,30	40,70	64,60	24,20	37,50	439,00	8,66	4,07	0,64	0,38
0869/11h	12,64	6,25	15,10	39,80	63,60	24,10	37,90	404,00	7,92	3,20	0,53	0,75
0847/11h	13,69	8,50	19,40	53,40	62,90	22,80	36,30	424,00	8,34	4,03	0,44	0,64
0084/11h	10,78	7,73	18,10	49,50	64,10	23,40	36,60	432,00	7,29	2,63	0,53	0,18
0860/11h	13,19	7,33	16,40	45,60	62,20	22,40	36,00	488,00	8,81	3,42	0,69	0,13
0831/24h	6,51	6,60	15,60	43,10	65,30	23,60	36,20	384,00	4,25	1,58	0,47	0,10
0868/24h	11,37	5,76	13,80	37,90	65,80	24,00	36,50	390,00	7,65	2,53	0,67	0,41
0869/24h	14,82	5,68	13,80	37,00	65,20	24,30	37,20	391,00	10,74	2,41	0,90	0,65
0847/24h	13,46	7,29	16,90	45,80	62,90	23,20	36,90	411,00	8,80	3,05	0,65	0,78
0084/24h	7,63	6,95	16,20	44,50	63,90	23,30	36,40	449,00	4,68	2,19	0,46	0,21
0860/24h	11,61	6,51	14,80	40,50	62,20	22,70	36,40	473,00	7,93	2,71	0,67	0,16
0831/30h	6,61	5,86	13,90	37,70	64,30	23,60	36,80	375,00	4,23	1,81	0,41	0,09
0868/30h	11,75	5,45	13,00	35,30	64,80	23,90	36,90	385,00	8,19	2,46	0,65	0,31
0869/30h	17,71	5,61	13,50	36,00	64,10	24,10	37,50	383,00	13,24	2,75	1,02	0,54
0847/30h	14,74	7,67	17,60	48,20	62,80	23,00	36,60	419,00	9,29	3,79	0,77	0,67
0084/30h	9,12	7,54	17,50	47,80	63,30	23,10	36,60	386,00	5,77	2,36	0,58	0,24
0860/30h	11,26	6,43	14,80	39,70	61,70	23,00	37,30	474,00	7,53	2,73	0,73	0,13
0831/36h	4,12	5,05	11,80	32,40	64,30	23,40	36,40	141,00	2,77	0,96	0,23	0,13
0868/36h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0869/36h	16,49	5,99	14,50	38,70	64,60	24,30	37,60	317,00	11,88	3,01	0,95	0,47
0847/36h	15,40	8,17	19,00	51,30	62,80	23,20	37,00	386,00	9,18	4,55	0,65	0,72
0084/36h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0860/36h	9,97	6,49	15,00	40,30	62,00	23,00	37,10	457,00	5,96	3,15	0,55	0,16
0831/48h	5,59	6,27	14,60	40,80	65,10	23,40	35,90	358,00	3,46	1,65	0,33	0,08
0868/48h	10,83	5,51	13,40	35,90	65,10	24,20	37,20	420,00	6,88	2,86	0,55	0,44
0869/48h	13,00	5,87	14,00	38,10	65,00	23,90	36,70	395,00	8,71	3,07	0,52	0,58
0847/48h	11,36	6,92	16,00	43,70	63,10	23,10	36,60	363,00	7,05	3,07	0,38	0,69
0084/48h	7,15	6,66	15,70	42,70	64,10	23,60	36,70	449,00	4,25	2,22	0,38	0,20

ID/Zeit	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	Neutr	Lymph	Mono	Eos
0860/48h	8,71	6,35	14,50	39,80	62,70	22,80	36,40	422,00	5,79	2,17	0,51	0,12
0831/72h	4,69	6,34	15,20	41,50	65,40	23,90	36,60	318,00	2,85	1,44	0,29	0,04
0868/72h	10,21	5,36	12,80	35,20	65,70	24,00	36,50	397,00	6,69	2,75	0,39	0,28
0869/72h	10,84	5,55	13,30	36,20	65,20	24,00	36,70	375,00	7,15	2,64	0,27	0,68
0847/72h	11,33	7,19	16,80	45,10	62,70	23,40	37,30	383,00	6,88	3,29	0,28	0,72
0084/72h	8,11	6,63	15,60	42,10	63,50	23,50	37,00	468,00	4,94	2,46	0,41	0,23
0860/72h	7,47	6,19	14,10	38,40	62,10	22,80	36,80	432,00	4,76	2,17	0,35	0,11
MW	10,28	6,61	15,50	41,98	63,63	23,49	36,92	419,16	6,77	2,53	0,48	0,36
SD	2,99	0,74	1,55	4,29	1,21	0,50	0,48	61,19	2,14	0,70	0,19	0,25

Tabelle 17. Referenzwerte für die klinisch-chemische Blutuntersuchung (IDEXX-VetTest®)

	AP	ALT	GGT	LDH	CK	Urea	Crea	NH ₃	Tbil	TP	Alb	Glob	Glu
Einheit	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l	μmol/l	g/l	g/l	g/l	mmol/l
Referenzwerte	23- 212	10- 100	0-7	40- 400	10- 200	2,5- 9,6	44- 159	0-98	0-15	52- 82	23- 40	25- 45	4,11- 7,94

Tabelle 18. Ergebnisse der klinisch-chemischen Blutuntersuchung der 1. PK-Studie

ID/Zeitpunkt	AP	ALT	GGT	LDH	CK	Urea	Crea	NH ₃	Tbil	TP	Alb	Glob	Glu
0831/0h	89,00	18,00	2,00	224,00	111,00	5,50	63,00	12,00	2,00	59,00	27,00	32,00	6,25
0868/0h	49,00	20,00	4,00	300,00	143,00	5,70	86,00	18,00	2,00	58,00	29,00	29,00	6,46
0869/0h	72,00	34,00	5,00	279,00	124,00	5,10	82,00	17,00	2,00	60,00	30,00	29,00	6,45
0847/0h	100,00	55,00	4,00	302,00	108,00	3,90	71,00	21,00	2,00	68,00	30,00	38,00	6,66
0084/0h	56,00	16,00	4,00	198,00	85,00	6,40	68,00	17,00	2,00	58,00	29,00	29,00	5,82
0860/0h	120,00	41,00	4,00	281,00	118,00	5,30	73,00	30,00	2,00	59,00	29,00	30,00	6,83
0831/72h	95,00	27,00	2,00	178,00	82,00	4,80	64,00	12,00	2,00	57,00	28,00	29,00	6,04
0868/72h	42,00	21,00	2,00	226,00	112,00	6,90	84,00	14,00	2,00	52,00	27,00	25,00	6,31
0869/72h	64,00	26,00	4,00	201,00	111,00	5,20	81,00	12,00	2,00	55,00	27,00	28,00	6,64
0847/72h	88,00	68,00	4,00	271,00	101,00	4,20	69,00	20,00	2,00	62,00	29,00	33,00	6,15
0084/72h	46,00	18,00	2,00	173,00	83,00	4,50	72,00	16,00	2,00	50,00	25,00	25,00	5,32
0860/72h	110,00	22,00	3,00	233,00	81,00	5,60	76,00	19,00	2,00	55,00	28,00	27,00	6,45
MW	77,58	30,50	3,33	238,83	104,92	5,26	74,08	17,33	2,00	57,75	28,17	29,50	6,28
SD*	26,38	16,40	1,07	46,43	19,33	0,86	7,73	5,07	0,00	4,67	1,47	3,58	0,41

Tabelle 19. Ergebnisse der klinisch-chemischen Blutuntersuchung der 2. PK-Studie

ID/Zeitpunkt	AP	ALT	GGT	LDH	CK	Urea	Crea	NH ₃	Tbil	TP	Alb	Glob	Glu
0831/0h	84,00	20,00	1,00	262,00	95,00	3,90	71,00	18,00	2,00	59,00	29,00	29,00	6,09
0868/0h	55,00	11,00	1,00	295,00	115,00	5,40	70,00	22,00	2,00	56,00	30,00	26,00	6,12
0869/0h	64,00	38,00	6,00	240,00	124,00	4,70	75,00	21,00	2,00	63,00	32,00	31,00	6,57
0847/0h	58,00	62,00	3,00	271,00	127,00	2,70	76,00	12,00	2,00	58,00	31,00	27,00	6,01
0084/0h	51,00	12,00	2,00	229,00	85,00	5,60	69,00	20,00	2,00	54,00	29,00	25,00	4,64
0860/0h	72,00	34,00	3,00	242,00	111,00	4,70	79,00	37,00	2,00	58,00	31,00	27,00	5,89
0831/72h	74,00	10,00	2,00	183,00	85,00	3,60	67,00	13,00	2,00	53,00	26,00	27,00	6,54
0868/72h	51,00	10,00	0,00	210,00	86,00	4,60	76,00	13,00	2,00	54,00	26,00	28,00	6,39
0869/72h	60,00	16,00	3,00	263,00	117,00	5,70	80,00	13,00	2,00	57,00	27,00	30,00	6,18
0847/72h	60,00	65,00	4,00	312,00	158,00	3,10	83,00	16,00	2,00	54,00	28,00	26,00	6,09
0084/72h	49,00	12,00	0,00	206,00	85,00	7,50	71,00	20,00	2,00	53,00	27,00	25,00	5,39
0860/72h	78,00	25,00	3,00	219,00	83,00	6,20	78,00	24,00	2,00	53,00	29,00	25,00	6,31
MW	63,00	26,25	2,33	244,33	105,92	4,81	74,58	19,08	2,00	56,00	28,75	27,17	6,02
SD	11,52	19,75	1,72	37,93	23,49	1,37	4,96	6,95	0,00	3,10	2,01	1,99	0,54

Tabelle 20. Ergebnisse der klinisch-chemischen Blutuntersuchung der 3. PK-Studie

ID/Zeitpunkt	AP	ALT	GGT	LDH	CK	Urea	Crea	NH ₃	Tbil	TP	Alb	Glob	Glu
0831/0h	144,00	17,00	0,00	322,00	111,00	3,60	70,00	24,00	2,00	59,00	27,00	32,00	5,46
0868/0h	54,00	17,00	0,00	255,00	120,00	3,80	81,00	17,00	2,00	56,00	30,00	27,00	5,73
0869/0h	91,00	27,00	4,00	328,00	138,00	3,00	79,00	22,00	2,00	65,00	32,00	33,00	6,40
0847/0h	63,00	74,00	3,00	321,00	112,00	2,60	89,00	18,00	2,00	60,00	30,00	30,00	5,80
0084/0h	64,00	37,00	0,00	437,00	140,00	4,00	70,00	27,00	2,00	58,00	30,00	28,00	4,77
0860/0h	90,00	53,00	3,00	384,00	141,00	4,40	83,00	38,00	2,00	62,00	34,00	28,00	6,23
0831/72h	110,00	10,00	0,00	233,00	84,00	3,30	67,00	11,00	2,00	57,00	28,00	29,00	6,54
0868/72h	51,00	10,00	3,00	217,00	104,00	5,40	83,00	12,00	2,00	54,00	28,00	26,00	6,43
0869/72h	83,00	14,00	3,00	221,00	86,00	3,10	76,00	16,00	2,00	58,00	25,00	32,00	6,24
0847/72h	59,00	46,00	4,00	229,00	109,00	3,60	84,00	16,00	2,00	57,00	29,00	28,00	6,48
0084/72h	59,00	11,00	0,00	179,00	74,00	5,70	76,00	18,00	2,00	54,00	28,00	26,00	5,18
0860/72h	81,00	26,00	2,00	200,00	80,00	5,70	79,00	19,00	2,00	56,00	30,00	26,00	6,40
MW	79,08	28,50	1,83	277,17	108,25	4,02	78,08	19,83	2,00	58,00	29,25	28,75	5,97
SD	27,24	20,28	1,70	80,12	23,74	1,07	6,57	7,31	0,00	3,19	2,34	2,49	0,58

Abbildung 29. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0831, 1. PK-Studie

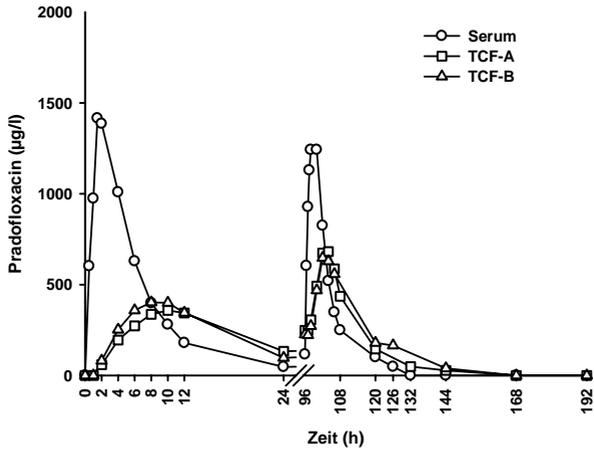


Abbildung 30. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0868, 1. PK-Studie

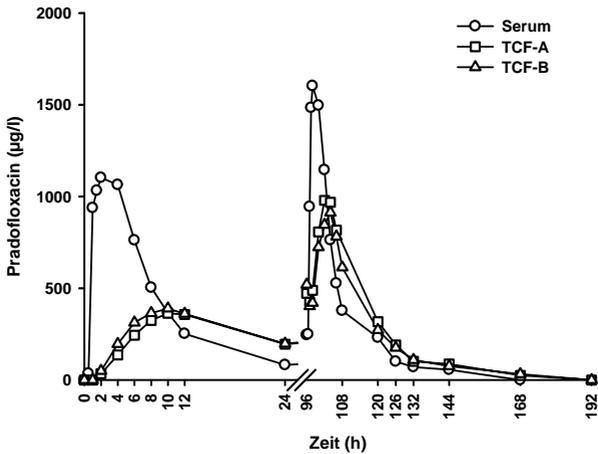


Abbildung 31. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0869, 1. PK-Studie

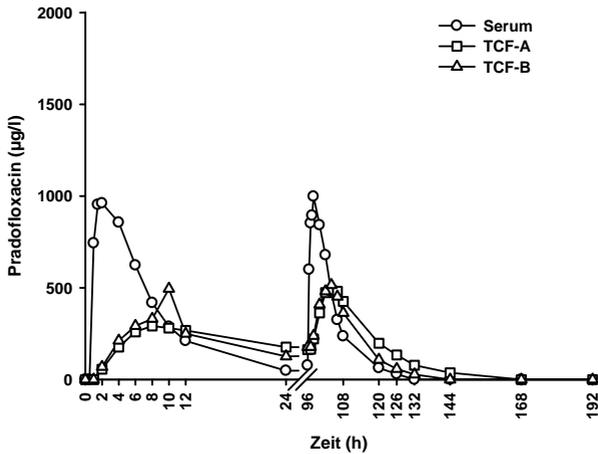


Abbildung 32. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0847, 1. PK-Studie

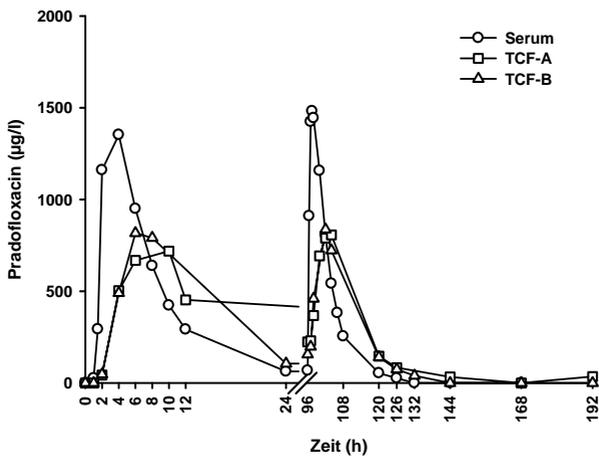


Abbildung 33. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0084, 1. PK-Studie

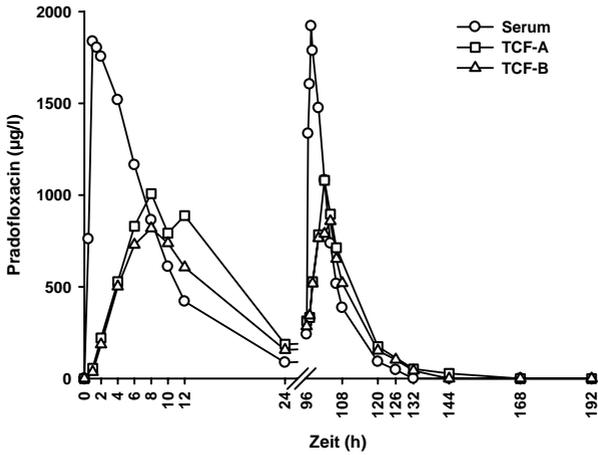


Abbildung 34. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0860, 1. PK-Studie

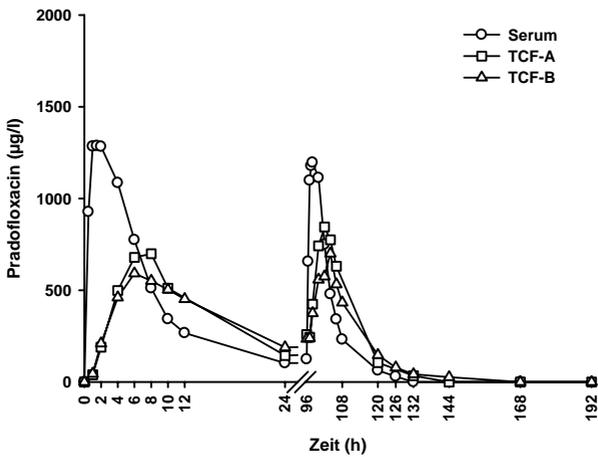


Abbildung 35. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0831, 2. PK-Studie

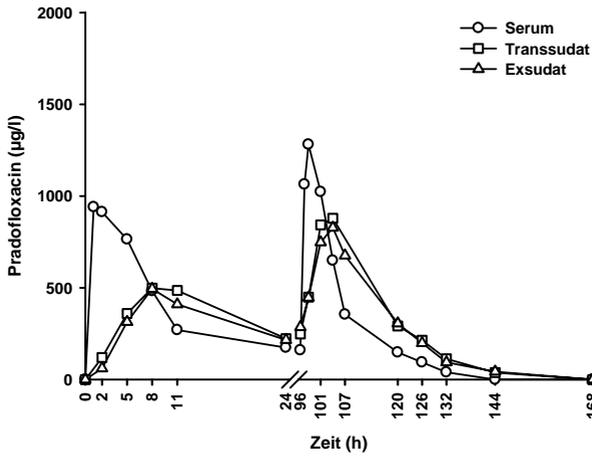


Abbildung 36. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0868, 2. PK-Studie

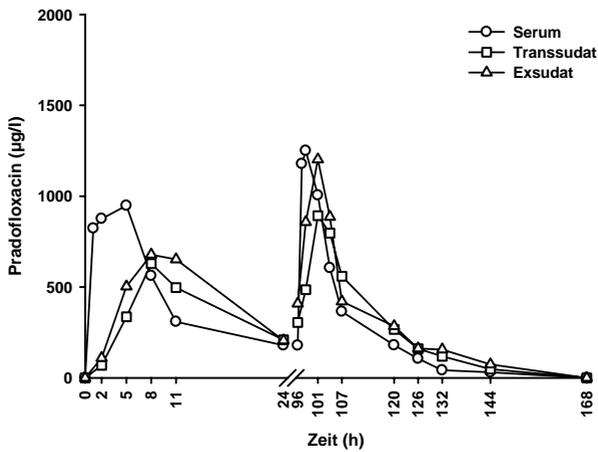


Abbildung 37. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0869, 2. PK-Studie

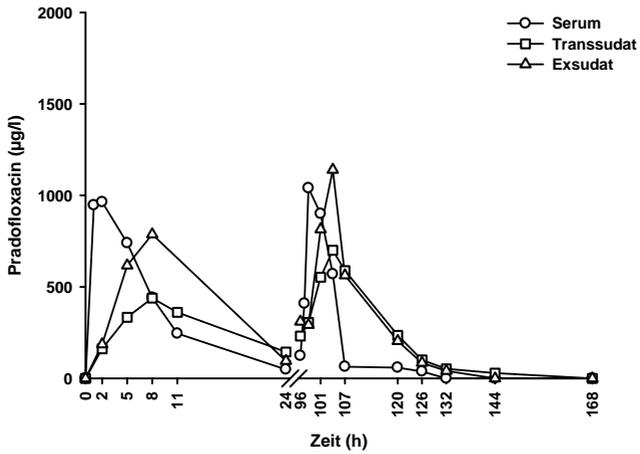


Abbildung 38. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0847, 2. PK-Studie

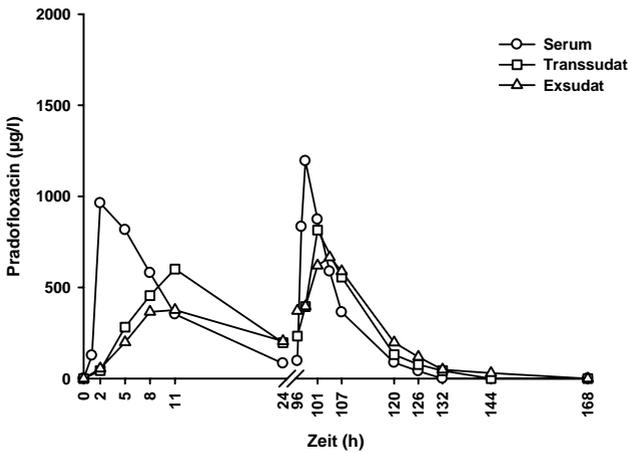


Abbildung 39. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0084, 2. PK-Studie

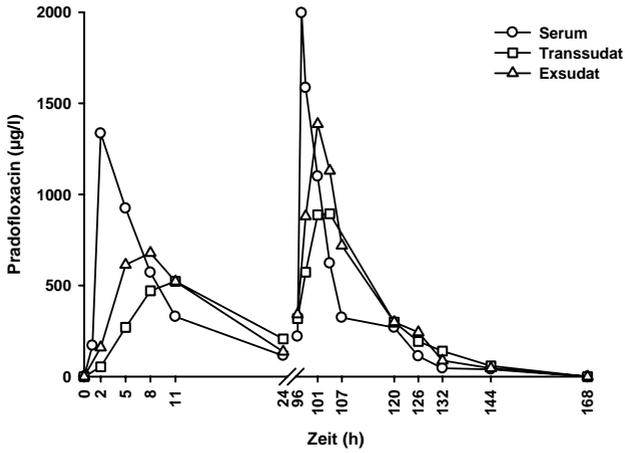


Abbildung 40. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0860, 2. PK-Studie

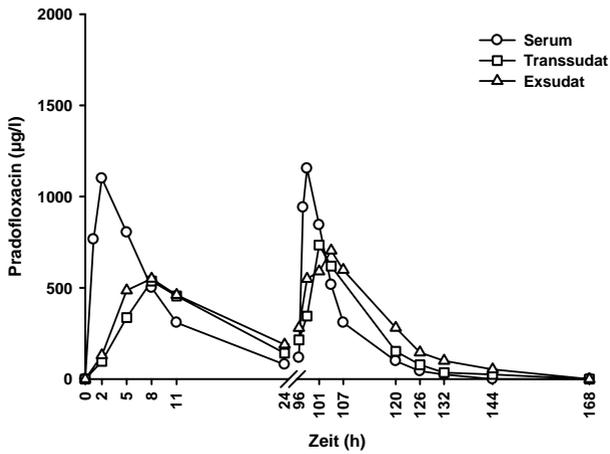


Abbildung 41. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0831, 3. PK-Studie

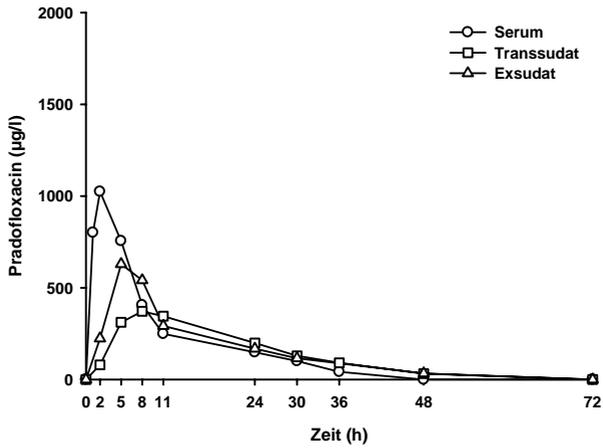


Abbildung 42. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0868, 3. PK-Studie

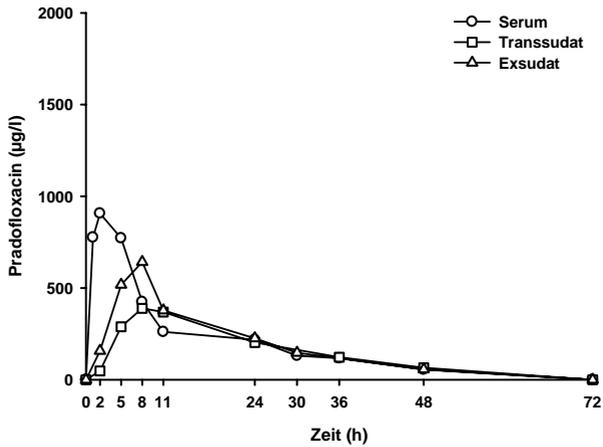


Abbildung 43. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0869, 3. PK-Studie

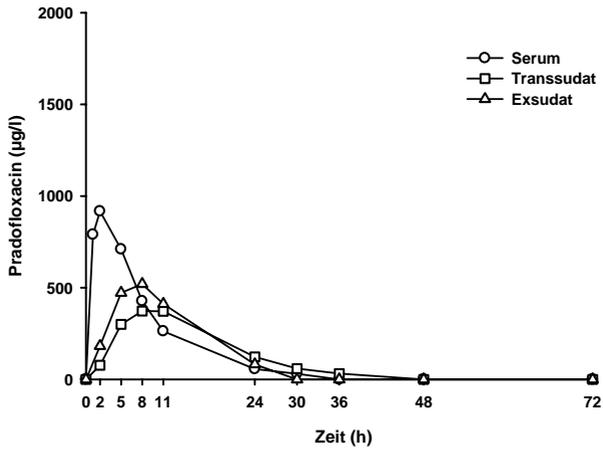


Abbildung 44. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0847, 3. PK-Studie

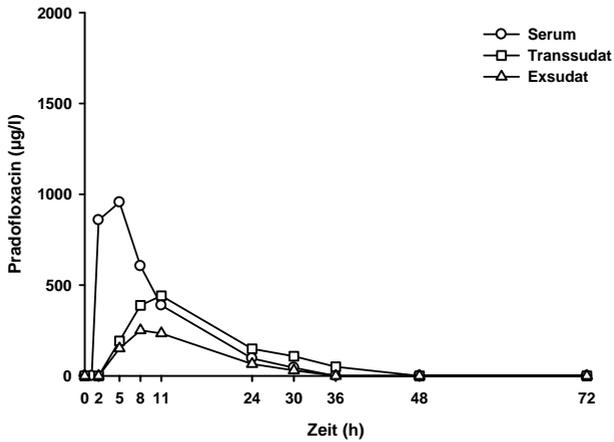


Abbildung 45. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0084, 3. PK-Studie

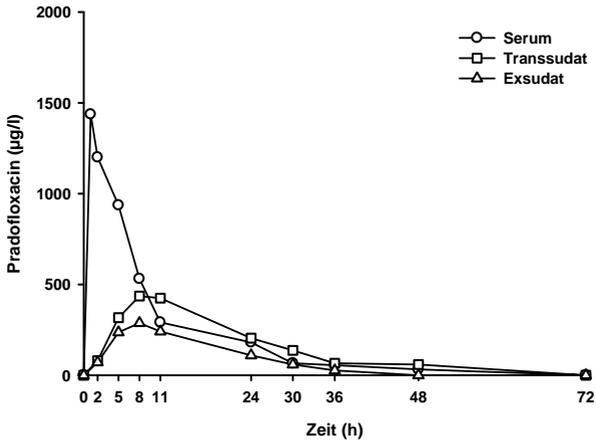


Abbildung 46. Konzentrations-Zeit-Profil von Hund ID 0860, 3. PK-Studie

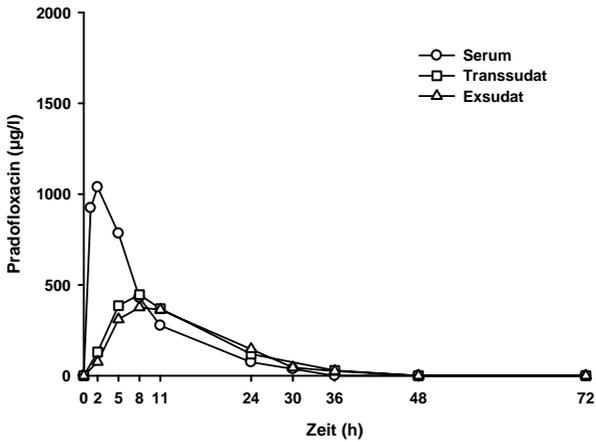


Tabelle 21. Serum-Pharmakokinetik der 1. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	1837	1,0	4,8	15601	16205	1,29	0,19	6,8
0831	1416	1,5	3,2	9144	9365	1,50	0,32	6,0
0847	1353	4,0	3,6	10358	10683	1,45	0,28	7,5
0860	1287	1,5	3,8	11056	11626	1,43	0,26	6,9
0868	1103	2,0	3,8	9792	10245	1,62	0,29	7,2
0869	961	2,0	3,9	7911	8180	2,05	0,37	6,9
N	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	1326	2,0	3,9	10644	11051	1,56	0,28	6,9
SD	301	1,0	0,5	2656	2785	0,27	0,06	0,5
Min	961	1,0	3,2	7911	8180	1,29	0,19	6,0
Median	1320	1,8	3,8	10075	10464	1,48	0,29	6,9
Max	1837	4,0	4,8	15601	16205	2,05	0,37	7,5
Geo. MW	1299	1,8	3,8	10400	10792	1,54	0,28	6,9
CV%	22,50	48,88	13,03	23,25	23,58	16,11	23,58	7,45

Tabelle 22. Serum-Pharmakokinetik der 1. PK-Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	1921	97,5	5,0	15674	15764	0,20	1,42	7,64	1,04
0831	1243	100,0	5,7	11518	11621	0,27	2,25	8,51	1,06
0847	1482	97,5	5,5	11588	11688	0,27	2,12	7,16	1,05
0860	1196	98,0	5,2	10922	11015	0,28	2,12	7,97	1,04
0868	1603	98,0	8,8	17372	18081	0,20	2,51	12,65	1,18
0869	998	98,0	5,7	9231	9334	0,34	2,79	8,34	1,06
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	1407	98,2	6,0	12718	12917	0,26	2,20	8,71	1,07
SD	331	0,9	1,4	3114	3299	0,05	0,46	1,99	0,05
Min	998	97,5	5,0	9231	9334	0,20	1,42	7,16	1,04
Median	1363	98,0	5,6	11553	11654	0,27	2,19	8,16	1,05
Max	1921	100,0	8,8	17372	18081	0,34	2,79	12,65	1,18
Geo MW	1375	98,2	5,9	12417	12589	0,26	2,16	8,55	1,07
CV%	23,70	0,94	20,84	24,08	24,91	21,60	23,25	20,37	4,79

Tabelle 23. Pharmakokinetik im TCF-A der 1. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	1008	8,0	6,4	12983	14723	1,90	0,20	11,29
0831	358	10,0	9,4	5423	7228	5,63	0,42	12,39
0847	719	10,0	Missing	5664	Missing	Missing	Missing	7,62
0860	699	8,0	7,2	8636	10141	3,09	0,30	10,68
0868	364	10,0	14,9	5763	9946	6,47	0,30	13,33
0869	292	8,0	20,8	5002	10303	8,72	0,29	12,89
N	6	6	5	6	5	5	5	6
NMiss	0	0	1	0	1	1	1	0
MW	573	9,0	11,7	7245	10468	5,16	0,30	11,37
SD	281	1,1	6,0	3095	2693	2,72	0,08	2,09
Min	292	8,0	6,4	5002	7228	1,90	0,20	7,62
Median	532	9,0	9,4	5713	10141	5,63	0,30	11,84
Max	1008	10,0	20,8	12983	14723	8,72	0,42	13,33
Geo MW	518	8,9	10,6	6805	10203	4,51	0,29	11,18
CV%	52,81	12,27	52,46	38,22	25,61	67,67	25,61	20,78

Tabelle 24. Pharmakokinetik im TCF-A der 1. PK-Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	1081	102	17,9	14993	15316	0,23	6,02	14,33	1,65
0831	682	104	18,6	11286	11621	0,32	8,63	16,17	1,69
0847	807	104	22,8	13540	14692	0,29	9,63	20,72	1,93
0860	845	102	7,8	11497	11637	0,29	3,21	12,03	1,13
0868	979	102	12,0	19791	20223	0,20	3,43	18,79	1,33
0869	487	104	11,5	10990	11197	0,37	6,08	20,27	1,31
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	814	103	15,1	13683	14114	0,28	6,17	17,05	1,51
SD	212	1	5,6	3371	3463	0,06	2,62	3,47	0,30
Min	487	102	7,8	10990	11197	0,20	3,21	12,03	1,13
Median	826	103	14,9	12518	13164	0,29	6,05	17,48	1,49
Max	1081	104	22,8	19791	20223	0,37	9,63	20,72	1,93
Geo MW	788	103	14,2	13376	13794	0,28	5,68	16,74	1,48
CV%	29,04	1,06	41,24	22,97	23,25	22,47	48,09	21,69	20,10

Tabelle 25. Pharmakokinetik im TCF-B der 1. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	819	8,0	6,2	10471	11867	2,26	0,25	10,98
0831	402	8,0	6,7	5637	6580	4,44	0,46	11,44
0847	817	6,0	5,8	8911	9796	2,58	0,31	10,49
0860	592	6,0	9,8	8645	11309	3,74	0,27	11,32
0868	390	10,0	14,1	6220	10262	5,97	0,29	12,88
0869	495	10,0	8,3	5158	6665	5,39	0,45	11,84
N	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	586	8,0	8,5	7507	9413	4,06	0,34	11,49
SD	194	1,8	3,1	2132	2283	1,49	0,09	0,82
Min	390	6,0	5,8	5158	6580	2,26	0,25	10,49
Median	544	8,0	7,5	7433	10029	4,09	0,30	11,38
Max	819	10,0	14,1	10471	11867	5,97	0,46	12,88
Geo MW	560	7,8	8,1	7255	9163	3,82	0,33	11,47
CV%	33,98	23,21	34,37	29,29	26,50	40,74	26,50	7,03

Tabelle 26. Pharmakokinetik im TCF-B der 1. Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	858	104	6,7	12951	13072	0,26	2,52	12,96	1,09
0831	647	102	11,2	12619	12820	0,32	5,10	19,27	1,29
0847	837	102	6,8	11593	11716	0,29	2,86	13,07	1,10
0860	700	104	20,9	11101	11477	0,32	9,76	15,91	1,82
0868	913	104	20,2	17961	18893	0,22	6,48	20,19	1,78
0869	515	104	7,1	8180	8309	0,42	4,28	13,88	1,11
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	745	103	12,1	12401	12715	0,31	5,17	15,88	1,36
SD	151	1	6,7	3207	3471	0,07	2,68	3,18	0,35
Min	515	102	6,7	8180	8309	0,22	2,52	12,96	1,09
Median	769	104	9,1	12106	12268	0,30	4,69	14,89	1,20
Max	913	104	20,9	17961	18893	0,42	9,76	20,19	1,82
Geo MW	731	103	10,7	12069	12344	0,30	4,64	15,63	1,33
CV%	21,83	1,00	57,67	25,91	26,95	21,44	54,22	19,72	24,65

Tabelle 27. Serum-Pharmakokinetik der 2. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)
0084	1335	2,0	4,0	10349	11018	1,58	0,27	7,98
0831	940	1,0	4,0	9683	10687	1,62	0,28	8,36
0847	963	2,0	5,8	9141	9832	2,54	0,31	8,23
0860	1100	2,0	6,2	9466	10183	2,64	0,29	7,44
0868	948	5,0	3,7	10576	11534	1,39	0,26	8,49
0869	964	2,0	5,0	8287	8640	2,51	0,35	6,77
N	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	1042	2,3	4,8	9584	10316	2,05	0,29	7,88
SD	155	1,4	1,0	833	1017	0,57	0,03	0,66
Min	940	1,0	3,7	8287	8640	1,39	0,26	6,77
Median	964	2,0	4,5	9574	10435	2,06	0,29	8,11
Max	1335	5,0	6,2	10576	11534	2,64	0,35	8,49
Geo. MW	1033	2,1	4,7	9553	10272	1,98	0,29	7,85
CV%	13,90	54,77	21,70	8,87	10,21	29,43	10,21	8,65

Tabelle 28. Serum-Pharmakokinetik der 2. PK-Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	1996	97,0	9,7	17203	17378	0,21	2,87	12,27	1,22
0831	1281	98,0	7,1	13606	13733	0,25	2,50	10,68	1,10
0847	1194	98,0	5,4	11145	11242	0,28	2,19	8,88	1,05
0860	1154	98,0	6,8	10987	11110	0,30	2,90	9,67	1,10
0868	1250	98,0	20,2	14629	14994	0,24	7,03	12,88	1,78
0869	1040	98,0	5,4	7981	8077	0,40	3,07	7,68	1,05
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	1319	97,8	9,1	12592	12756	0,28	3,43	10,34	1,22
SD	342	0,4	5,7	3236	3293	0,07	1,79	2,00	0,29
Min	1040	97,0	5,4	7981	8077	0,21	2,19	7,68	1,05
Median	1222	98,0	6,9	12376	12488	0,26	2,89	10,18	1,10
Max	1996	98,0	20,2	17203	17378	0,40	7,03	12,88	1,78
Geo. MW	1289	97,8	8,0	12230	12386	0,27	3,15	10,18	1,19
CV%	22,94	0,42	53,44	27,41	27,55	22,88	42,94	19,88	20,68

Tabelle 29. Pharmakokinetik im Transsudat der 2. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	523,0	11,0	Missing	7575	Missing	Missing	Missing	12,86
0831	498,0	8,0	13,0	7992	12189	4,63	0,25	12,40
0847	601,0	11,0	Missing	7891	Missing	Missing	Missing	13,08
0860	537,0	8,0	8,1	7038	8707	4,05	0,34	11,77
0868	629,0	8,0	10,2	8127	11192	3,93	0,27	12,36
0869	439,0	8,0	9,9	6331	8389	5,11	0,36	11,55
N	6	6	4	6	4	4	4	6
NMiss	0	0	2	0	2	2	2	0
MW	538	9,0	10,3	7492	10119	4,43	0,30	12,34
SD	69	1,5	2,0	689	1864	0,55	0,06	0,60
Min	439	8,0	8,1	6331	8389	3,93	0,25	11,55
Median	530	8,0	10,0	7733	9950	4,34	0,31	12,38
Max	629	11,0	13,0	8127	12189	5,11	0,36	13,08
Geo. MW	534	8,9	10,2	7464	9991	4,41	0,30	12,33
CV%	13,05	16,56	19,49	9,59	18,59	12,24	18,59	4,86

Tabelle 30. Pharmakokinetik im Transsudat der 2. PK-Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	894	104,0	10,4	18735	18922	0,21	3,11	18,06	1,25
0831	879	104,0	7,3	17572	17703	0,22	2,29	17,80	1,11
0847	815	101,0	6,8	10891	11014	0,31	3,06	13,34	1,10
0860	734	101,0	24,2	11302	11738	0,31	11,00	15,64	2,01
0868	893	101,0	11,0	16196	16394	0,24	3,78	17,77	1,28
0869	700	104,0	17,8	12978	13299	0,28	7,24	17,20	1,65
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	819	102,5	12,9	14612	14845	0,26	5,08	16,64	1,40
SD	85	1,6	6,8	3339	3284	0,05	3,38	1,83	0,36
Min	700	101,0	6,8	10891	11014	0,21	2,29	13,34	1,10
Median	847	102,5	10,7	14587	14846	0,26	3,45	17,48	1,27
Max	894	104,0	24,2	18735	18922	0,31	11,00	18,06	2,01
Geo. MW	815	102,5	11,6	14290	14538	0,26	4,33	16,54	1,37
CV%	10,68	1,60	53,1	23,55	22,80	18,25	65,52	11,79	24,3

Tabelle 31. Pharmakokinetik im Exsudat der 2. PK-Studie (1. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	679,0	8,0	6,9	8793	10151	2,93	0,30	10,83
0831	494,0	8,0	13,6	7123	11360	5,18	0,26	12,62
0847	376,0	11,0	Missing	6061	Missing	Missing	Missing	13,20
0860	550,0	8,0	10,3	8086	10894	4,09	0,28	11,68
0868	678,0	8,0	8,8	9828	12446	3,06	0,24	11,91
0869	787,0	8,0	Missing	8733	Missing	Missing	Missing	10,27
N	6	6	4	6	4	4	4	6
NMiss	0	0	2	0	2	2	2	0
MW	594	8,5	9,9	8104	11213	3,82	0,27	11,75
SD	149	1,2	2,8	1340	961	1,05	0,02	1,09
Min	376	8,0	6,9	6061	10151	2,93	0,24	10,27
Median	614	8,0	9,6	8410	11127	3,58	0,27	11,80
Max	787	11,0	13,6	9828	12446	5,18	0,30	13,20
Geo. MW	577	8,4	9,6	8007	11182	3,71	0,27	11,71
CV%	27,27	13,06	29,20	17,43	8,53	27,16	8,53	9,35

Tabelle 32. Pharmakokinetik im Exsudat der 2. PK-Studie (5. Applikation)

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	CL _{ss} /F (l/h/kg)	V _z /F (l/kg)	MRT _{INF} (h)	AI
0084	1386	104,0	12,78	21262	21492	0,17	3,19	15,44	1,37
0831	828	104,0	12,51	16911	17137	0,23	4,10	18,18	1,36
0847	665	101,0	18,37	13110	13441	0,28	7,39	16,50	1,68
0860	704	101,0	11,91	15411	15626	0,25	4,34	18,46	1,33
0868	1202	101,0	9,81	18271	18448	0,22	3,06	17,17	1,22
0869	1140	104,0	6,57	13712	13830	0,24	2,32	13,37	1,09
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	988	103	11,99	16446	16662	0,23	4,07	16,52	1,34
SD	296	1,6	3,89	3047	3041	0,04	1,78	1,90	0,20
Min	665	101,0	6,57	13110	13441	0,17	2,32	13,37	1,09
Median	984	104,0	12,21	16161	16381	0,24	3,65	16,83	1,34
Max	1386	104,0	18,37	21262	21492	0,28	7,39	18,46	1,68
Geo.MW	950	103,0	11,45	16219	16440	0,23	3,80	16,42	1,33
CV%	31,30	1,51	34,97	18,34	18,02	16,50	41,21	12,05	14,46

Tabelle 33. Serum-Pharmakokinetik der 3. PK-Studie

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	AUC ₀₋₂₄ (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	1437	1,00	16,94	13129	13911	11573	5,27	0,22	10,72
0831	1024	2,00	6,50	10577	10694	9141	2,63	0,28	11,20
0847	956	5,00	6,17	10191	10302	9635	2,59	0,29	9,65
0860	1038	2,00	6,60	9418	9537	8962	2,99	0,31	8,21
0868	907	2,00	12,67	12351	13357	9598	4,11	0,22	14,35
0869	917	2,00	5,68	8490	8593	8112	2,86	0,35	8,11
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	1047	2,33	9,09	10693	11066	9503	3,41	0,28	10,37
SD	199	1,37	4,64	1756	2122	1155	1,07	0,05	2,32
Min	907	1,00	5,68	8490	8593	8112	2,59	0,22	8,11
Median	990	2,00	6,55	10384	10498	9369	2,93	0,29	10,19
Max	1437	5,00	16,94	13129	13911	11573	5,27	0,35	14,35
Geo.MW	1033	2,08	8,28	10574	10900	9448	3,29	0,28	10,17
CV%	17,22	54,77	47,89	16,48	19,08	11,78	29,11	19,08	21,69

Tabelle 34. Pharmakokinetik im Transsudat der 3. PK-Studie

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	AUC ₀₋₂₄ (h*µg/l)	V _z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	436	8,00	12,20	10065	10286	7004	5,13	0,29	20,51
0831	372	8,00	9,14	9016	9181	6218	4,31	0,33	20,20
0847	441	11,00	5,82	7441	7546	5900	3,34	0,40	16,81
0860	446	8,00	7,37	7243	7376	6243	4,32	0,41	14,04
0868	389	8,00	16,45	10396	11084	6318	6,42	0,27	23,57
0869	373	8,00	7,40	6725	6858	5688	4,67	0,44	14,94
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	410	8,50	9,73	8481	8722	6229	4,70	0,36	18,35
SD	35	1,22	3,95	1560	1727	449	1,03	0,07	3,69
Min	372	8,00	5,82	6725	6858	5688	3,34	0,27	14,04
Median	413	8,00	8,27	8228	8363	6231	4,50	0,36	18,51
Max	446	11,00	16,45	10396	11084	7004	6,42	0,44	23,57
Geo. MW	408	8,44	9,14	8362	8582	6215	4,61	0,350	18,04
CV%	8,65	13,06	39,46	18,55	19,82	7,10	21,936	19,82	20,42

Tabelle 35. Pharmakokinetik im Exsudat der 3. PK-Studie

Tier ID	C _{max} (µg/l)	T _{max} (h)	t _½ (h)	AUC _{last} (h*µg/l)	AUC _{INF} (h*µg/l)	AUC ₀₋₂₄ (h*µg/l)	V _Z /F (l/kg)	Cl/F (l/h/kg)	MRT _{last} (h)
0084	287	8,00	5,80	5220	5325	4269	4,72	0,56	15,49
0831	629	5,00	10,15	9920	10103	7383	4,35	0,30	17,54
0847	251	8,00	5,05	3663	3754	3272	5,82	0,80	13,92
0860	376	8,00	7,50	6825	6960	5890	4,66	0,43	14,72
0868	642	8,00	11,66	11765	11975	8249	4,22	0,25	19,50
0869	520	8,00	4,32	6922	7000	6700	2,67	0,43	10,87
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
NMiss	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	451	7,50	7,41	7386	7520	5960	4,41	0,46	15,34
SD	171	1,22	2,94	2989	3037	1892	1,02	0,20	2,98
Min	251	5,00	4,32	3663	3754	3272	2,67	0,25	10,87
Median	448	8,00	6,65	6874	6980	6295	4,51	0,43	15,11
Max	642	8,00	11,66	11765	11975	8249	5,82	0,80	19,50
Geo. MW	422	7,40	6,95	6873	7002	5680	4,29	0,428	15,09
CV%	41,96	19,37	41,05	44,28	44,03	36,41	26,260	44,03	20,40

Tabelle 36. p-Werte der zweifaktoriellen Varianzanalysen der 1. PK-Studie

		Serum TCF-A TCF-B	Serum TCF-A	Serum TCF-B	TCF-A TCF-B
C_{max}	Applikation	0,0951	0,1023	0,1884	0,0579
	Medium	<0,0001	0,0001	0,0004	0,5910
	Appl. x Medium	0,1033	0,1027	0,3738	0,0118
T_{max}	Applikation	0,0476	0,0791	0,5623	0,0250
	Medium	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,6606
	Appl. x Medium	0,1037	0,0482	0,4618	0,1747
t_½	Applikation	0,0569	0,0739	0,0140	0,2364
	Medium	0,0033	0,0018	0,0070	0,5857
	Appl. x Medium	0,7432	0,5678	0,3782	0,7267
AUC_{last}	Applikation	0,0267	0,0315	0,0483	0,0158
	Medium	0,0049	0,0027	0,0142	0,3366
	Appl. x Medium	0,0008	0,0025	0,0031	0,1731
AUC_{inf}	Applikation	0,1352	0,1701	0,1019	0,1043
	Medium	0,2584	0,8869	0,1698	0,2193
	Appl. x Medium	0,0573	0,0403	0,0434	0,9469
V_z/F	Applikation	0,3114	0,5198	0,1504	0,4692
	Medium	0,0098	0,0098	0,0093	0,8001
	Appl. x Medium	0,8245	0,8421	0,6704	0,6254
Cl/F	Applikation	0,3443	0,3968	0,2166	0,4165
	Medium	0,0383	0,2866	0,0170	0,1491
	Appl. x Medium	0,8366	0,7893	0,6522	0,6155
MRT	Applikation	0,0019	0,0061	0,0174	0,0018
	Medium	<0,0001	0,0002	0,0001	0,5920
	Appl. x Medium	0,1565	0,1267	0,0152	0,5993

Tabelle 37. p-Werte der zweifaktoriellen Varianzanalysen der 2. PK-Studie

		Serum Transsudat Exsudat	Serum Transsudat	Serum Exsudat	Transsudat Exsudat
C_{max}	Applikation	0,0039	0,0049	0,0094	0,0012
	Medium	0,0008	0,0030	0,0100	0,2758
	Appl. x Medium	0,1411	0,9577	0,0496	0,1404
T_{max}	Applikation	0,0601	0,0560	0,0981	0,0599
	Medium	<0,0001	0,0005	0,0002	0,3632
	Appl. x Medium	0,1009	0,0844	0,2150	0,3632
t_½	Applikation	0,2175	0,0964	0,0771	0,6890
	Medium	0,0877	0,0281	0,0671	0,8930
	Appl. x Medium	0,4917	0,6531	0,1816	0,7721
AUC_{last}	Applikation	0,0020	0,0052	0,0027	0,0009
	Medium	0,0497	0,9392	0,0637	0,0621
	Appl. x Medium	0,0001	0,0049	<0,0001	0,2083
AUC_{inf}	Applikation	0,0230	0,0158	0,0270	0,0130
	Medium	0,1208	0,1803	0,0019	0,3464
	Appl. x Medium	0,0024	0,0410	0,0083	0,1592
V_z/F	Applikation	0,3742	0,1630	0,2464	0,7371
	Medium	0,4195	0,1328	0,3206	0,5313
	Appl. x Medium	0,6755	0,9500	0,1764	0,5521
Cl/F	Applikation	0,0261	0,0220	0,1367	0,0034
	Medium	0,3047	0,5529	0,0358	0,3416
	Appl. x Medium	0,3460	0,2255	0,2045	0,4226
MRT	Applikation	0,0009	0,0037	0,0010	0,0005
	Medium	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,6531
	Appl. x Medium	0,0291	0,0564	0,0150	0,6165

Tabelle 38. p-Werte der einfaktoriellen Varianzanalyse sowie des Student-Newman-Keuls-Tests der 3. PK-Studie

	Serum Transsudat Exsudat	Serum Transsudat	Serum Exsudat	Transsudat Exsudat
C_{max}	0,0001	<0,01	<0,01	nicht signifikant
T_{max}	<0,0001	<0,01	<0,01	nicht signifikant
t_½	0,2480	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
AUC_{last}	0,0191	<0,05	<0,05	nicht signifikant
AUC_{inf}	0,0144	<0,05	<0,05	nicht signifikant
V_z/F	0,1062	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
Cl/F	0,0490	nicht signifikant	<0,05	nicht signifikant
MRT	<0,0001	<0,01	<0,01	<0,01

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abraham, J., K. Ewert, and A. de Jong.** 2002. Pradofloxacin: Comparative in vitro activity against selected pathogens from the US. Abstract F-568. Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, San Diego, C.A.
2. **Aliabadi, F. S., B. H. Ali, M. F. Landoni, and P. Lees.** 2003. Pharmacokinetics and PK-PD modelling of danofloxacin in camel serum and tissue cage fluids. *Vet J.* **165**:104-118.
3. **Aliabadi, F. S., M. F. Landoni, and P. Lees.** 2003. Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:626-635.
4. **Aliabadi, F. S. and P. Lees.** 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration. *Am.J.Vet Res.* **62**:1979-1989.
5. **Aliabadi, F. S. and P. Lees.** 2002. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *J.Vet Pharmacol. Ther.* **25**:161-174.
6. **Allen, G. P., G. W. Kaatz, and M. J. Rybak.** 2004. In vitro activities of mutant prevention concentration-targeted concentrations of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* in a pharmacodynamic model. *Int.J.Antimicrob. Agents* **24**:150-160.
7. **Andes, D. and W. A. Craig.** 2002. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int.J.Antimicrob. Agents* **19**:261-268.
8. **Anonymus.** 1999. Clinical Pharmacokinetics preferred symbols. *Clinical Pharmacokinetics* **37**:87-9.
9. **Appelbaum, P. C. and P. A. Hunter.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int.J.Antimicrob. Agents* **16**:5-15.
10. **Arifah, A. K., M. F. Landoni, S. P. Frean, and P. Lees.** 2001. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in sheep. *Am.J.Vet Res.* **62**:77-86.
11. **Ball, P.** 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J.Antimicrob. Chemother.* **46 Suppl T1**:17-24.

12. **Baumann, A.** 2003. Clearance, p. 81-96. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
13. **Bengtsson, B., U. Bredberg, and J. Luthman.** 1992. Mathematical description of the concentration of oxytetracycline and penicillin-G in tissue cages in calves as related to the serum concentration. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **15**:202-216.
14. **Bengtsson, B., J. Luthman, and S. O. Jacobsson.** 1984. Evaluation of a tissue cage model for use in cattle. *Acta Vet Scand.* **25**:480-494.
15. **Bergan, T.** 1981. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev.Infect.Dis.* **3**:45-66.
16. **Bergan, T. and I. Versland.** 1978. The mini-pig as a model for penetration of penicillins. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl*135-142.
17. **Berger-Bächli, B.** 2001. Mechanismen der Antibiotika-Resistenzbildung in Bakterien. *Mitt.Lebensm.Hyg.* **92**:3-9.
18. **Bidgood, T. L. and M. G. Papich.** 2005. Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **28**:329-341.
19. **Boothe, D. M.** 2006. The accumulation of pradofloxacin in phagocytes. *Abstracts First International Veraflox Symposium, Berlin.*
20. **Boothe, D. M., A. Boeckh, and H. W. Boothe.** 2009. Evaluation of the distribution of enrofloxacin by circulating leukocytes to sites of inflammation in dogs. *Am.J.Vet Res.* **70**:16-22.
21. **Bosch, G., D. E. van, A. A. Bergwerff, A. B. Rijkenhuizen, and J. M. Ensink.** 2006. Clinical efficacy of local administration of ceftiofur in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **29**:31-36.
22. **Boswell, F. J., J. M. Andrews, R. Wise, and A. Dalhoff.** 1999. Bactericidal properties of moxifloxacin and post-antibiotic effect. *J.Antimicrob.Chemother.* **43 Suppl B**:43-49.
23. **Bouchenaki, N., P. E. Vaudaux, E. Huggler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew.** 1990. Successful single-dose prophylaxis of *Staphylococcus aureus* foreign body infections in guinea pigs by fleroxacin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**:21-24.

24. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
25. **Bregante, M. A., A. Jong de, E. Calvo, R. Hernandez, R. Rey, and M. A. Garcia.** 2003. Protein binding of pradofloxacin, a novel 8-cyanofluoroquinolone, in dog and cat plasma. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **26 (Suppl. 1)**:87-88.
26. **Brett, M. A.** 2003. Glossary, p. 145-155. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
27. **Bundestierärztekammer and Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten.** 2000. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln. *Deutsches Tierärzteblatt.*
28. **Bundtzen, R. W., A. U. Gerber, D. L. Cohn, and W. A. Craig.** 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev.Infect.Dis.* **3**:28-37.
29. **Cars, O., C. Henning, and S. E. Holm.** 1981. Penetration of ampicillin and dicloxacillin into tissue cage fluid in rabbits: relation to serum and tissue protein binding. *Scand.J.Infect.Dis.* **13**:69-74.
30. **Cars, O. and I. Odenholt-Tornqvist.** 1993. The post-antibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. *J.Antimicrob.Chemother.* **31 Suppl D**:159-166.
31. **Cawello, W.** 2003. The physiological basis of pharmacokinetics, p. 7-22. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
32. **Chansoriya, M., R. P. Awadhiya, J. L. Vegad, and A. K. Katiyar.** 1994. The avian inflammatory-reparative response: adaptation and utilization of a tissue cage model. *Avian Pathol.* **23**:153-158.
33. **Cheng, Z., Q. McKeller, and A. Nolan.** 1998. Pharmacokinetic studies of flunixin meglumine and phenylbutazone in plasma, exudate and transudate in sheep. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **21**:315-321.
34. **Cheng, Z., A. M. Nolan, and Q. A. McKellar.** 1998. Measurement of cyclooxygenase inhibition in vivo: a study of two non-steroidal anti-inflammatory drugs in sheep. *Inflammation* **22**:353-366.
35. **Chokr, A., D. Leterme, D. Watier, and S. Jabbouri.** 2007. Neither the presence of ica locus, nor in vitro-biofilm formation ability is a crucial parameter for some *Staphylococcus epidermidis* strains to maintain an infection in a guinea pig tissue cage model. *Microb.Pathog.* **42**:94-97.
36. **Clarke, C. R.** 1989. Tissue-chamber modeling systems-applications in veterinary medicine. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **12**:349-368.

-
37. **Clarke, C. R., C. R. Short, D. W. Bourne, and E. A. Usenik.** 1989. Subcutaneously implanted tissue chambers-a pharmacokinetic study. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **12**:312-321.
 38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Performance standards for antimicrobial disks and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition. M 31 - A 3 **28**.
 39. **Coulet, M., P. Cox, and J. Lohuis.** 2005. Pharmacodynamics of ibafloxacin in micro-organisms isolated from cats. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **28**:29-36.
 40. **Cui, J., Y. Liu, R. Wang, W. Tong, K. Drlica, and X. Zhao.** 2006. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J.Infect.Dis.* **194**:1601-1608.
 41. **Dämmrich, K. and H. Loppnow.** 1990. Stoffwechselstörungen, p. 64-153. *In: Stünzi and E. Weiss (eds.), Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin.* 8. Auflage, Parey Verlag Berlin, Hamburg.
 42. **Daube, G. and A. Schulten.** Unpublished data. 2006.
 43. **Davis, J. L., D. M. Foster, and M. G. Papich.** 2007. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J.vet.Pharmacol.Therap.* **30**:564-571.
 44. **de Jong, A. and I. Bleckmann.** 2003. Comparative activity of pradofloxacin against clinical canine and feline strains from Germany. Abstract F-419. Abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.American Society for Microbiology, Chicago.
 45. **Domagala, J. M.** 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J.Antimicrob.Chemother.* **33**:685-706.
 46. **Domagala, J. M. and S. E. Hagen.** 2003. Structure-activity relationships of the quinolone antibacterials in the new millenium: Some things change and some do not, p. 3-18. *In: D. C. Hooper and E. Rubinstein (eds.), Quinolone Antimicrobial Agents.*
 47. **Drlica, K.** 2001. A strategy for fighting antibiotic resistance. *ASM News* **67**:27-33.
 48. **Drlica, K.** 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob.Chemother.* **52**:11-17.

49. **Drlica, K. and D. C. Hooper.** 2003. Mechanisms of quinolone action, p. 19-40. *In:* D. C. Hooper and E. Rubinstein (eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents*.
50. **Drlica, K. and M. Malik.** 2003. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr.Top.Med.Chem.* **3**:249-282.
51. **Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns, and X. Zhao.** 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:385-392.
52. **Drlica, K. and X. Zhao.** 2007. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin.Infect.Dis.* **44**:681-688.
53. **Drusano, G. L.** 2004. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:289-300.
54. **Dudley, M. N. and P. G. Ambrose.** 2000. Pharmacodynamics in the study of drug resistance and establishing in vitro susceptibility breakpoints: ready for prime time. *Curr.Opin.Microbiol.* **3**:515-521.
55. **Eickenberg, H. U., N. G. Waterman, and L. Scharfenberger.** 1975. Concentration of antibiotics in renal interstitial fluid: an experimental model. *Urol.Res.* **3**:165-167.
56. **Eickenberg, H. U., N. G. Waterman, and L. Scharfenberger.** 1975. Renal interstitial fluid, urine, and serum antibiotic concentration. *Surg.Forum* **26**:589-591.
57. **EMA/CVMP.** 2000. Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species. EMA/CVMP/133/99-Final. effective after September 8, 2000.
58. **Failing, K.** 2009. Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland. Personal Communication.
59. **Forrest, A., D. E. Nix, C. H. Ballow, T. F. Goss, M. C. Birmingham, and J. J. Schentag.** 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:1073-1081.
60. **Fraatz, K.** 2006. Serum pharmacokinetics of pradofloxacin after oral administration to cats. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **29 (Suppl. 1)**:266.
61. **Fraatz, K. and G. Daube.** 2006. Pharmacokinetic properties of Veraflox tablets and oral suspension. First International Veraflox Symposium, Berlin 2006.
62. **Fraatz, K., K. Heinen, R. Krebber, M. Edingloh, and E. Heinen.** 2002. Serum pharmacokinetics of pradofloxacin in dogs after multiple oral

- administrations at various dosages. Abstract F-570. Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, San Diego, C.A.
63. **Fraatz, K., K. Heinen, R. Krebber, M. Edingloh, and E. Heinen.** 2003. Skin concentrations and serum pharmacokinetics of pradofloxacin in dogs after multiple oral administrations at four different dosages. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **26 (Supp. 1)**:89.
 64. **Fraatz, K., R. Krebber, M. Edingloh, and E. Heinen.** 2003. Oral bioavailability of pradofloxacin tablets and renal drug excretion in dogs. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **26 (Suppl. 1)**:88-89.
 65. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash.** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**:3872-3876.
 66. **Gieschke, R.** 2003. Half-life, p. 39-64. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
 67. **Greko, C., B. Bengtsson, A. Franklin, S. O. Jacobsson, B. Wiese, and J. Luthman.** 2002. Efficacy of trimethoprim-sulfadoxine against *Escherichia coli* in a tissue cage model in calves. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **25**:413-423.
 68. **Greko, C., M. Finn, A. Franklin, and B. Bengtsson.** 2003. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of danofloxacin against *Mannheimia haemolytica* in a tissue-cage model in calves. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:253-257.
 69. **Gruet, P., P. Richard, E. Thomas, and A. Autefage.** 1997. Prevention of surgical infections in dogs with a single intravenous injection of marbofloxacin: an experimental model. *Vet Rec.* **140**:199-202.
 70. **Gunderson, B. W., G. H. Ross, K. H. Ibrahim, and J. C. Rotschafer.** 2001. What do we really know about antibiotic pharmacodynamics? *Pharmacotherapy* **21**:302S-318S.
 71. **GUYTON, A. C.** 1963. A concept of negative interstitial pressure based on pressures in implanted perforated capsules. *Circ.Res.* **12**:399-414.
 72. **Häbich, D., F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, and S. Weigand.** 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? *Angew.Chem.Int.Ed.* **45**:5072-5129.
 73. **Hawkins, E. C. and W. A. Ware.** 2006. *In: R. W. Nelson and C. G. Couto (eds.), Innere Medizin der Kleintiere.* Elsevier, Urban&Fischer Verlag.

74. **Heisig, P. and B. Wiedemann.** 2001. [Action and reaction. Actions and resistance mechanisms of quinolone]. *Pharm.Unserer Zeit* **30**:382-393.
75. **Henning, C. and S. E. Holm.** 1981. Penetration of ¹⁴C-Ro 13-9904 into tissue cage fluid in rabbits. *Chemotherapy* **27 Suppl** 1:32-36.
76. **Higgins, A. J., P. Lees, and J. A. Wright.** 1984. Tissue-cage model for the collection of inflammatory exudate in ponies. *Res.Vet Sci.* **36**:284-289.
77. **Himmler, T., W. Hallenbach, A. Marhold, F. Pirro, H.-G. Wetzstein, and S. Bartel.** 2002. Synthesis and in vitro activity of pradofloxacin, a novel 8-cyanofluoroquinolone. Abstract F-566. Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, San Diego, C.A.188.
78. **Hirschberger, J.** 2005. Körperhöhlenergüsse, p. 241-248. *In: Kraft and Dürr (eds.), Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.*
79. **Hooper, D. C.** 2003. Introduction, p. xiii-xiv. *In: D. C. Hooper and E. Rubinstein (eds.), Quinolone Antimicrobial Agents.*
80. **Hooper, D. C.** 2003. Mechanisms of quinolone resistance, p. 41-67. *In: D. C. Hooper and E. Rubinstein (eds.), Quinolone Antimicrobial Agents.*
81. **Ince, D., X. Zhang, L. C. Silver, and D. C. Hooper.** 2002. Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a new desfluoroquinolone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:3370-3380.
82. **Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**:393-404.
83. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:814-820.
84. **Kirchner, T., D. C. Argentieri, A. G. Barbone, M. Singer, M. Steber, J. Ansell, S. A. Beers, M. P. Wachter, W. Wu, E. Malloy, A. Stewart, and D. M. Ritchie.** 1997. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **282**:1094-1101.
85. **Kraft, W., U. M. Dürr, M. Füll, H. Bostedt, and K. Heinritzi.** 2005. Hämatologie, p. 49-92. *In: Kraft and Dürr (eds.), Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.*

86. **Krebber, R.** 2003. Analytical method for the determination of pradofloxacin in serum and urine by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC/MS/MS). *J.Vet Pharmacol.Ther.* **26 (Suppl. 1):**102-103.
87. **Krebber, R.** 2003. Method for the determination of BAY 14-1877 in plasma and serum by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC/MS/MS). Bayer CropScience AG, Method 00620/E001.
88. **Kresken, M., S. Bagel-Trah, B. Körber-Irrgang, and H.-G. Wetzstein.** 2007. Comparative study on the pharmacodynamics of pradofloxacin and marbofloxacin against *Staphylococcus intermedius* in an in vitro pharmacodynamic model of infection. Abstract A-18. Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Chicago, IL.
89. **Kristian, S. A., T. Golda, F. Ferracin, S. E. Cramton, B. Neumeister, A. Peschel, F. Gotz, and R. Landmann.** 2004. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microb.Pathog.* **36:**237-245.
90. **Landoni, M. F. and P. Lees.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **19:**466-474.
91. **Lees, P.** 2007. Royal Veterinary College London, UK. Personal Communication.
92. **Lees, P., F. S. Aliabadi, and P. L. Toutain.** 2004. PK-PD modelling: An alternative to dose titration studies for antimicrobial drug dosage selection. *The Regulatory Affairs Journal* **15**.
93. **Lees, P., D. Concordet, F. S. Aliabadi, and P. L. Toutain.** 2006. Drug selection and optimization of dosage schedules to minimize antimicrobial resistance, p. 49-71. *In:* F. M. Aarestrup (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press, Washington, D.C.
94. **Lees, P., F. M. Cunningham, and J. Elliott.** 2004. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27:**397-414.
95. **Lees, P. and A. F. Shojaee.** 2002. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. *Int.J.Antimicrob.Agents* **19:**269-284.
96. **Lees, P., O. Svendsen, and C. Wiuff.** 2008. Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria, p. 77-101. *In:* L. Guardabassi, L. B. Jensen, and H. Kruse (eds.), *Guide to antimicrobial use in animals.* Willey, J.

-
97. **Lees, P., J. B. Taylor, A. J. Higgins, and S. C. Sharma.** 1986. Phenylbutazone and oxyphenbutazone distribution into tissue fluids in the horse. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **9**:204-212.
 98. **Leshner, G. Y., E. J. FROELICH, M. D. Gruett, J. H. BAILEY, and R. P. BRUNDAGE.** 1962. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J.Med.Pharm.Chem.* **91**:1063-1065.
 99. **Licata, L., C. E. Smith, R. M. Goldschmidt, J. F. Barrett, and M. Froscio.** 1997. Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:950-955.
 100. **Liu, P., M. Muller, and H. Derendorf.** 2002. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int.J.Antimicrob.Agents* **19**:285-290.
 101. **Lösch, U., J. Cihak, M. H. Erhard, and B. Kaspers.** 2000. Blut und Abwehr, p. 190-216. *In: W. von Engelhardt and G. Breves (eds.), Physiologie der Haustiere.* Enke Verlag, Stuttgart.
 102. **Lucet, J. C., M. Herrmann, P. Rohner, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew.** 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**:2312-2317.
 103. **Luthman, J., B. Bengtsson, and S. O. Jacobsson.** 1984. Penetration of antimicrobial agents into tissue cage fluid in cattle. *Zentralbl.Veterinarmed.A* **31**:303-313.
 104. **MacKenzie, F. M. and I. M. Gould.** 1993. The post-antibiotic effect. *J.Antimicrob.Chemother.* **32**:519-537.
 105. **Marcusson, L. L., S. K. Olofsson, P. Komp Lindgren, O. Cars, and D. Hughes.** 2008. Mutant prevention concentrations of pradofloxacin for wild-type and mutant strains of *Escherichia coli*. Abstract Z-036. Abstracts of the 108th General Meeting of the American Society for Microbiology.American Society for Microbiology, Boston, MA.
 106. **Martinez, M., P. McDermott, and R. Walker.** 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* **172**:10-28.
 107. **McKellar, Q. A., P. Delatour, and P. Lees.** 1994. Stereospecific pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the dog. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **17**:447-454.

-
108. **McKellar, Q. A., P. Lees, and G. Gettinby.** 1994. Pharmacodynamics of tolfenamic acid in dogs. Evaluation of dose response relationships. *Eur.J.Pharmacol.* **253**:191-200.
 109. **McKellar, Q. A., S. F. Sanchez Bruni, and D. G. Jones.** 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:503-514.
 110. **Mensing, S. and A. Schulten.** Unpublished data. 2006.
 111. **Morike, K. and M. Eichelbaum.** 2000. [Fundamentals of pharmacotherapy and pharmacokinetic principles]. *Internist (Berl)* **41**:328-331.
 112. **Moulin, G., P. Cavalie, I. Pellanne, A. Chevance, A. Laval, Y. Millemann, P. Colin, and C. Chauvin.** 2008. A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**:617-625.
 113. **Mouton, J. W., M. N. Dudley, O. Cars, H. Derendorf, and G. L. Drusano.** 2005. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J.Antimicrob.Chemother.* **55**:601-607.
 114. **Mouton, J. W., U. Theuretzbacher, W. A. Craig, P. M. Tulkens, H. Derendorf, and O. Cars.** 2008. Tissue concentrations: do we ever learn? *J.Antimicrob.Chemother.* **61**:235-237.
 115. **Mouton, J. W. and A. A. Vinks.** 2005. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin.Pharmacokinet.* **44**:201-210.
 116. **Mueller, M., A. de la Pena, and H. Derendorf.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:369-377.
 117. **Mueller, R. S. and B. Stephan.** 2007. Pradofloxacin in the treatment of canine deep pyoderma: a multicentred, blinded, randomized parallel trial. *Vet Dermatol.* **18**:144-151.
 118. **Muller, M., M. Brunner, R. Schmid, E. M. Putz, A. Schmiedberger, I. Wallner, and H. G. Eichler.** 1998. Comparison of three different experimental methods for the assessment of peripheral compartment pharmacokinetics in humans. *Life Sci.* **62**:L227-L234.
 119. **Muller, M., A. de la Pena, and H. Derendorf.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1441-1453.

120. **Muller, M., O. Haag, T. Burgdorff, A. Georgopoulos, W. Weninger, B. Jansen, G. Stanek, H. Pehamberger, E. Agneter, and H. G. Eichler.** 1996. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2703-2709.
121. **Murillo, O., M. E. Pachon, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, and J. Ariza.** 2009. High doses of levofloxacin vs moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: the effect of higher MIC-related pharmacokinetic parameters on efficacy. *J Infect.* **58**:220-226.
122. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* **178**:5853-5859.
123. **Nix, D. E., S. D. Goodwin, C. A. Peloquin, D. L. Rotella, and J. J. Schentag.** 1991. Antibiotic tissue penetration and its relevance: impact of tissue penetration on infection response. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1953-1959.
124. **Nix, D. E., S. D. Goodwin, C. A. Peloquin, D. L. Rotella, and J. J. Schentag.** 1991. Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1947-1952.
125. **Odenholt, I.** 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int.J.Antimicrob.Agents* **17**:1-8.
126. **Odenholt, I., S. E. Holm, and O. Cars.** 1988. An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect. *Scand.J.Infect.Dis.* **20**:97-103.
127. **Odenholt, I., E. Lowdin, and O. Cars.** 2003. Postantibiotic, postantibiotic sub-MIC, and subinhibitory effects of PGE-9509924, ciprofloxacin, and levofloxacin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:3352-3356.
128. **Odenholt-Tornqvist, I., E. Lowdin, and O. Cars.** 1991. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics in vitro. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1834-1839.
129. **Odenholt-Tornqvist, I., E. Lowdin, and O. Cars.** 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **36**:1852-1858.
130. **Olofsson, S. K., L. L. Marcusson, L. P. Komp, D. Hughes, and O. Cars.** 2006. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**:1116-1121.

131. **Pankuch, G. A. and P. C. Appelbaum.** 2009. Postantibiotic effects of telavancin against 16 gram-positive organisms. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:1275-1277.
132. **Papst, G.** 2003. Mean-time parameters, p. 97-106. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
133. **Papst, G.** 2003. The area under the concentration-time curve, p. 65-80. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
134. **Pirro, F., M. Edingloh, and N. Schmeer.** 1999. Bactericidal and inhibitory activity of enrofloxacin and other fluorquinolones in small animal pathogens. Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian **21**:19-25.
135. **Pruul, H. and P. J. McDonald.** 1990. Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. *J.Antimicrob.Chemother.* **25**:91-101.
136. **Restrepo, C., P. J. Ihrke, D. White, I. B. Spiegel, V. K. Affolter, and R. Vulliet.** 2008. The clinical efficacy and concentration time course of pradofloxacin in the skin and serum of dogs with and without pyoderma. NAVDF Abstract. *Veterinary Dermatology* **19**:106-113.
137. **Rohatagi, S., S. Kan, and H. Derendorf.** 1997. Non-compartmental analysis of pharmacokinetic data after multiple intravenous and oral administration. *Pharmazie* **52**:529-532.
138. **Röper, A. and P. M. Lauen.** 2006. Pharmakologisches Wissen - Pharmakodynamik und Pharmakokinetik, p. 1-7. *In: Anästhesie und Intensivmedizin.* Springer Berlin Heidelberg.
139. **Roychoudhury, S. and B. Ledoussal.** 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* **2**:51-65.
140. **Roychoudhury, S., T. L. Twinem, K. M. Makin, E. J. McIntosh, B. Ledoussal, and C. E. Catrenich.** 2001. Activity of non-fluorinated quinolones (NFQs) against quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **48**:29-36.
141. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:1109-1117.
142. **Ryan, D. M., O. Cars, and B. Hoffstedt.** 1986. The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues. *Scand.J.Infect.Dis.* **18**:381-388.

143. **Schaad, H. J., M. Bento, D. P. Lew, and P. Vaudaux.** 2006. Evaluation of high-dose daptomycin for therapy of experimental *Staphylococcus aureus* foreign body infection. *BMC.Infect.Dis.* **6**:74.
144. **Schafer, A. I.** 2004. Thrombocytosis. *N Engl J Med* **350**:1211-9.
145. **Scherkl, R., A. Hashem, and H. H. Frey.** 1996. [The tissue cage in dogs—a pharmacologic model for the representation of plasma and tissue kinetics]. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* **103**:174-177.
146. **Schneiderei, M.** 2007. Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin - Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen. Abstract 20. Jahrestagung der PEG 2006. *Chemotherapie Journal* **16**:17-18.
147. **Schneiderei, M.** 2008. Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.; Infektiologie Freiburg. GEMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch.25-28.
148. **Schreiner, A., K. B. Hellum, A. Digranes, and I. Bergman.** 1978. Transfer of penicillin G and ampicillin into human skin blisters induced by suction. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl*233-237.
149. **Schröder, H., K. Nink, J. Günther, and W. V. Kern.** 2003. Antibiotika: Solange sie noch wirken... *Gesundheit Gesellschaft Wissenschaft* **3**:7-16.
150. **Selbitz, H.-J.** 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere, p. 417-588. *In: A. Mayr (ed.), Rolle/Mayr: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Enke Verlag, Stuttgart.
151. **Shojaee, A. F. and P. Lees.** 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. *Res.Vet Sci.* **74**:247-259.
152. **Sidhu, P., A. F. Shojaee, M. Andrews, and P. Lees.** 2003. Tissue chamber model of acute inflammation in farm animal species. *Res.Vet Sci.* **74**:67-77.
153. **Sidhu, P. K., M. F. Landoni, F. S. Aliabadi, and P. Lees.** 2009. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in goats. *Vet J.*
154. **Sidhu, P. K., M. F. Landoni, F. S. Aliabadi, and P. Lees.** 2009. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res.Vet Sci.*
155. **Sidhu, P. K., M. F. Landoni, and P. Lees.** 2005. Influence of marbofloxacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolfenamic acid in calves. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **28**:109-119.

-
156. **Sidhu, P. K., M. F. Landoni, and P. Lees.** 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of tolfenamic acid and marbofloxacin in goats. *Res.Vet. Sci.* **80**:79-90.
 157. **Sierakowski, B.** 2003. Study designs tailor-made for different pharmacokinetic trials, p. 127-144. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
 158. **Silley, P., B. Stephan, H. A. Greife, and A. Pridmore.** 2007. Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *J.Antimicrob.Chemother.* **60**:999-1003.
 159. **Simon, C., V. Malerczyk, and M. Klaus.** 1978. Absorption of bacampicillin and ampicillin and penetration into body fluids (skin blister fluid, saliva, tears) in healthy volunteers. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl*228-232.
 160. **Singh, S. B. and J. F. Barrett.** 2006. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem.Pharmacol.* **71**:1006-1015.
 161. **Southwood, L. L.** 2006. Principles of antimicrobial therapy: what should we be using? *Vet Clin.North Am.Equine Pract.* **22**:279-96, vii.
 162. **Stahlmann, R.** 2002. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol.Lett.* **127**:269-277.
 163. **Stegemann, M. R., J. Sherington, and S. Blanchflower.** 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **29**:501-511.
 164. **Stegemann, M. R., J. Sherington, N. Coati, S. A. Brown, and S. Blanchflower.** 2006. Pharmacokinetics of cefovecin in cats. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **29**:513-524.
 165. **Stephan, B., H. A. Greife, A. Pridmore, and P. Silley.** 2007. Mutant prevention concentration of pradofloxacin against *Porphyromonas gingivalis*. *Vet Microbiol.* **121**:194-195.
 166. **Stephan, B., H. A. Greife, A. Pridmore, and P. Silley.** 2008. Activity of pradofloxacin against *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. Implicated in periodontal disease in dogs: susceptibility test data from a European multicenter study. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2149-2155.
 167. **Stephan, B., K. Hellmann, P. Liège, S. Granier, H. A. Greife, T. N. Knoppe, and E. Heinen.** 2003. Clinical efficacy and safety of pradofloxacin in the treatment of canine pyoderma and wound infections under field conditions. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **26 (Suppl. 1)**:217-218.

-
168. **Stephan, B., A. Pridmore, and P. Silley.** 2003. In vitro activity of pradofloxacin and metronidazole against anaerobic bacteria from dogs and cats. Abstract F-420. Abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Chicago.
 169. **Stephan, B., O. Roy, V. Skowronski, M. Edingloh, and H. A. Greife.** 2004. Clinical efficacy of pradofloxacin in the treatment of canine urinary tract infections. Second International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine, Ottawa, Canada, June 13-17, 2004.
 170. **Takano, M.** 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: where are they going? *Drug Metab Pharmacokinet.* **23**:85-86.
 171. **Toutain, P. L.** 2008. Plasma vs. tissue concentration to predict antibiotic efficacy. Fourth International Conference on AAVM, Prague 2008.
 172. **Toutain, P. L. and A. Bousquet-Melou.** 2004. Bioavailability and its assessment. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:455-466.
 173. **Toutain, P. L. and A. Bousquet-Melou.** 2004. Plasma clearance. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:415-425.
 174. **Toutain, P. L. and A. Bousquet-Melou.** 2004. Plasma terminal half-life. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:427-439.
 175. **Toutain, P. L. and A. Bousquet-Melou.** 2004. Volumes of distribution. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:441-453.
 176. **Toutain, P. L. and P. Lees.** 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **27**:467-477.
 177. **Trampuz, A., C. K. Murphy, D. M. Rothstein, A. F. Widmer, R. Landmann, and W. Zimmerli.** 2007. Efficacy of a novel rifamycin derivative, ABI-0043, against *Staphylococcus aureus* in an experimental model of foreign-body infection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**:2540-2545.
 178. **Turnidge, J. and D. L. Paterson.** 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**:391-408, table.
 179. **Ubukata, K., N. Itoh-Yamashita, and M. Konno.** 1989. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:1535-1539.
 180. **Van Bambeke, F., J. M. Michot, E. J. Van, and P. M. Tulkens.** 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin.Microbiol.Infect.* **11**:256-280.

-
181. **Van Bambeke, F. and P. M. Tulkens.** 2001. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int.J.Antimicrob.Agents* **18 Suppl 1**:S17-S23.
 182. **Vancutsem, P. M., J. G. Babish, and W. S. Schwark.** 1990. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* **80**:173-186.
 183. **Voermans, M., J. M. van Soest, D. E. van, and J. M. Ensink.** 2006. Clinical efficacy of intravenous administration of marbofloxacin in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J.Vet Pharmacol.Ther.* **29**:555-560.
 184. **Vogelman, B., S. Gudmundsson, J. Turnidge, J. Leggett, and W. A. Craig.** 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J.Infect.Dis.* **157**:287-98.
 185. **Wagner, D. S., S. J. Salstrom, T. M. File, and J. S. Tan.** 1986. Canine model for the simultaneous measurement of antibiotic levels in tissues and bacterial killing rate. *Antimicrob.Agents Chemother.* **29**:965-968.
 186. **Walker, R. D., G. E. Stein, S. C. Budsberg, E. J. Rosser, Jr., and K. H. MacDonald.** 1989. Serum and tissue fluid norfloxacin concentrations after oral administration of the drug to healthy dogs. *Am.J.Vet Res.* **50**:154-157.
 187. **Walker, R. D., G. E. Stein, J. G. Hauptman, and K. H. MacDonald.** 1992. Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. *Am.J.Vet Res.* **53**:2315-2319.
 188. **Walker, R. D., G. E. Stein, J. G. Hauptman, K. H. MacDonald, S. C. Budsberg, and E. J. Rosser, Jr.** 1990. Serum and tissue cage fluid concentrations of ciprofloxacin after oral administration of the drug to healthy dogs. *Am.J.Vet Res.* **51**:896-900.
 189. **Walsh, C.** 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat.Rev.Microbiol.* **1**:65-70.
 190. **Wang, Z.-Q., Z.-L. Chen, B.-H. Fang, and D.-X. Tan.** 2003. The postantibiotic effects of fluoroquinolones for veterinary use in vitro and in vivo. B-03 (0024), p. 146. Abstracts from the 9th International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Lisbon 2003. *J.vet.Pharmacol.Therap.* **26 (Suppl. 1)**:82-307.
 191. **Waterman, N. G. and L. B. Kastan.** 1972. Interstitial fluid and serum antibiotic concentrations. *Arch.Surg.* **105**:192-196.
 192. **Wattrang, E., P. Wallgren, L. Fuxler, M. Lindersson, and C. Fossum.** 1997. Tissue chambers-a useful model for in vivo studies of cytokine production in the pig. *Vet Immunol.Immunopathol.* **56**:133-150.

193. **Weimann, H.-J.** 2003. Drug concentrations and directly derived parameters, p. 23-38. *In: W. Cawello (ed.), Parameters for Compartment-free Pharmacokinetics.*
194. **Weiss, E.** 1990. Entzündung, p. 230-273. *In: H. Stünzi and E. Weiss (eds.), Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin.* 8. Auflage. Parey Verlag Berlin, Hamburg.
195. **Wetzstein, H. G.** 2005. Comparative mutant prevention concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:4166-4173.
196. **Wetzstein, H.-G.** 2003. Comparative mutant prevention concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones. Abstract Z-010. Abstracts of the 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology.American Society for Microbiology, Washington, D.C.
197. **Wetzstein, H.-G.** 2003. In vitro postantibiotic effects of pradofloxacin in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are greatly exceeded at sub-MIC drug concentrations. Abstract F-421. Abstracts of the 43nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.American Society for Microbiology, Chicago, IL.
198. **Wetzstein, H.-G.** 2008. Pradofloxacin causes a pronounced postantibiotic sub-MIC effect in high-density bacterial populations. Abstract Z-033. Abstracts of the 108th General Meeting of the American Society for Microbiology.American Society for Microbiology, Boston, MA.
199. **Wetzstein, H.-G. and W. Hallenbach.** 2004. Relative contributions of the C-7 amine and C-8 cyano substituents to the antibacterial potency of pradofloxacin. Abstract Z-026. Abstracts of the 104th General Meeting of the American Society for Microbiology.American Society for Microbiology, Washington, D.C.672.
200. **Wetzstein, H.-G. and S. Ochtrop.** 2002. Bactericidal activity of pradofloxacin at concentrations ranging from minimum bactericidal up to selected mutant prevention concentrations and serum levels. Abstract F-569. Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.American Society for Microbiology, San Diego, C.A.
201. **Wright, D. H., G. H. Brown, M. L. Peterson, and J. C. Rotschafer.** 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J.Antimicrob.Chemother.* **46**:669-683.
202. **Xuan, D., M. Zhong, H. Mattoes, K. Q. Bui, J. McNabb, D. P. Nicolau, R. Quintiliani, and C. H. Nightingale.** 2001. Streptococcus pneumoniae response to repeated moxifloxacin or levofloxacin exposure in a rabbit tissue cage model. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:794-799.

-
203. **Zech, R., R. Scherkl, A. Hashem, and H. H. Frey.** 1993. Plasma and tissue kinetics of phenylbutazone and naproxen in dogs. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **325**:113-128.
 204. **Zhao, X. and K. Drlica.** 2001. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin.Infect.Dis.* **33 Suppl 3**:S147-S156.
 205. **Zhao, X. and K. Drlica.** 2008. A unified anti-mutant dosing strategy. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**:434-436.

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für seine Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten sowie für die schnelle Durchsicht der Arbeit; der Firma Bayer Animal Health GmbH besonders Herrn Prof. Dr. Norbert Schmeer für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Forschungsmittel und die guten Arbeitsbedingungen, Herrn Prof. Dr. Heinrich Greife für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Antiinfectives, Herrn Dr. Gert Daube für seine fachliche Hilfe beim pharmakokinetischen Teil dieser Arbeit, die Motivation und moralische Unterstützung, Herrn Dr. Heinz-Georg Wetzstein für die konstruktiven Vorschläge, die Anleitung, Betreuung und das Korrekturlesen des mikrobiologischen Teils der Arbeit.

Ebenso herzlich danke ich: Dr. Sandra Mangold-Gehring und Dr. Stefan Auer, Angelika Seitz für die Hilfe bei den mikrobiologischen Studien und der Erstellung der Abbildungen; Angela Schulten, die mir nicht nur bei der Formatierung der Arbeit immer hilfreich zur Seite stand, Sandra Lindemann (u. a. für zahlreiche ADVIA-Messungen) und Klaus Pommer für die Unterstützung bei der Durchführung der pharmakokinetischen Studien, Christiane Smetonat, Dr. Ralf Krebber und Mitarbeiter/-innen, Dr. Matthias Rinke und Mitarbeiter/-innen; der Arbeitsgruppe Biomathematik und Statistik der JLU-Gießen, insbesondere Dr. Klaus Failing; Dr. Natali Bauer; Dr. Joy Olsen für die Durchsicht der englischen Zusammenfassung und allen Kolleginnen und Kollegen, die nicht namentlich aufgeführt sind, aber dennoch zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für ihre großzügige und nie nachlassende Unterstützung und dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Meiner Schwester Nicole für ihre unendliche Geduld und ihre Freundschaft sowie meiner Oma und meinen Freunden.



ISBN 978-3-941703-61-2



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvf.net · Homepage: <http://www.dvf.de>**