

En farmakokinetisk pilotstudie av olika beredningar av bencylpenicillin intramuskulärt till häst

Julia Lindberg

**Handledare: Carina Ingvast Larsson
Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Biträdande handledare: Johan Bröjer
Inst. för Kliniska vetenskaper**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	2
Syfte	3
Litteraturoversikt	3
Bensylpenicillinprokain	3
Bensylpenicillinnatrium	3
Prokain	4
Hoignés syndrom	4
Hästars känslighet mot prokain	5
Riskfaktorer	5
Etiologi – flera teorier	6
Material och metoder	7
Försökets upplägg	7
Hästarna	8
Läkemedel	8
Provtagningen	9
Analys av bensylpenicillin i hästplasma	9
Farmakokinetisk analys	10
Resultat	10
Bensylpenicillinprokain	11
Bensylpenicillinnatrium	12
Diskussion	14
Slutsats	16
Litteraturförteckning	17

SAMMANFATTNING

Bensylpenicillin är idag den mest använda antimikrobiella substansen inom hästmedicinen. Till häst finns bensylpenicillin tillgängligt i två olika beredningsformer, dels i form av svårlösligt bensylpenicillinprokain och dels som lösligt natriumsalt. Även om penicillin har en bred säkerhetsmarginal och anses ha god tolerans ses ibland biverkningsreaktioner som i dagligt tal brukar kallas penicillinchock. Etiologin bakom penicillinchock på häst är inte helt klarlagd, men den vanligaste orsaken anses vara prokaintoxicitet. För att undvika risken för toxiska reaktioner mot prokain kan bensylpenicillinnatrium användas. I litteraturen finns dock motstridiga uppgifter om möjligheten att använda bensylpenicillinnatrium intramuskulärt. Det är därför angeläget att undersöka farmakokinetiken för bensylpenicillinnatrium efter intramuskulär administrering till häst. Denna pilotstudie är en jämförelse mellan de farmakokinetiska parametrarna för bensylpenicillinprokain och bensylpenicillinnatrium vid intramuskulär administrering till häst.

Försöket var en pilotstudie av ”cross-over” design med två hästar. Hästarna var kliniskt friska varmblodiga travare. Den ena hästen injicerades med bensylpenicillinnatrium och den andra med bensylpenicillinprokain. Substanserna injicerades intramuskulärt. Val av vilken häst som fick vilket preparat första gången valdes slumpmässigt. Dosen bensylpenicillin var 11 mg/kg. Analysen av bensylpenicillin i hästplasma gjordes med hjälp av LCMSMS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). De farmakokinetiska analyserna utfördes i datorprogrammet Win Nonlin enligt ”non-compartment”-metoden.

Halveringstiden för bensylpenicillinnatrium hos de två hästarna var 2,55 respektive 2,38 timmar och för bensylpenicillinprokain 9,29 och 10,76 timmar.

Tiden över MEC (minsta effektiva koncentrationen *in vivo*) för *Streptococcus equi* och *Streptococcus zooepidemicus* varade för båda hästarna i studien i åtminstone 8 timmar efter att bensylpenicillinnatrium injicerats. Resultaten i studien antyder därmed att det eventuellt skulle vara möjligt att ge bensylpenicillinnatrium intramuskulärt två gånger per dygn till häst. För att undersöka denna möjlighet bör dock ytterligare studier utföras.

SUMMARY

Penicillin G (bensylpenicillin) is the most commonly used antimicrobial substance used in equine medicine today. Two forms of penicillin G are available for equine use; one form is the poorly soluble penicillin G procaine and the other is the very soluble sodium salt. Although penicillin has a wide safety margin and is considered to possess a good tolerance, reactions due to side effects are sometimes encountered, which commonly is named “penicillin-shock”. The etiology behind penicillin shock in horses is not completely understood, but the most common reason is believed to be procaine toxicity. In order to avoid the risk of toxic reactions against procaine, penicillin G sodium can be used. In the literature contradictory information on the possibility of the usage of penicillin G sodium intramuscularly have been found. It is therefore essential to investigate the pharmacokinetics for penicillin G sodium following intramuscular injection in

horse. The aim of the present study was to examine the pharmacokinetics of penicillin G following intramuscular administration of penicillin G sodium and penicillin G procaine, respectively.

The investigation was a pilot study in two clinically healthy Standard bred trotters with a cross-over design and therefore each horse was given both penicillin G sodium and penicillin G procaine intramuscularly. The penicillin G dose was 11 mg/kg. The analysis of penicillin G in the horse plasma was performed by LCMSMS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). WinNonlin was used as a tool for the pharmacological analyses, using the non-compartment method.

The half-life for penicillin G sodium in the two horses was 2.55 and 2.38 respectively and for the penicillin G procain the half-life was 9.29 and 10.76

The time over MEC (minimal effective concentration *in vivo*) for *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* lasted for both the horses in the study for at least 8 hours after penicillin G sodium were injected. The results from this study then imply that it would be possible to administer penicillin G sodium intramuscularly to horses twice a day. In order to investigate this further tests are required.

INLEDNING

I Sverige är bensylpenicillin idag den mest använda antimikrobiella substansen inom såväl veterinärmedicin som hästmedicin (SVARM, 2007). Substansen är aktiv mot ett stort antal av de patogena mikroorganismer som drabbar hästar, samtidigt som den har en god säkerhetsmarginal, är lätt att administrera och är ett förhållandevis billigt läkemedel. Bensylpenicillin till häst finns tillgängligt i två olika beredningsformer, dels i form av svårösligt bensylpenicillinprokain och dels som lösligt natriumsalt (Fass vet, 2008). Till häst är bensylpenicillinnatrium endast godkänt för intravenös administrering och bör då ges minst två gånger dagligen emedan bensylpenicillinprokain är godkänt för intramuskulärt injektion en gång dagligen. Minsta inhiberande koncentration *in vitro* (MIC) för bensylpenicillin hos både *Streptococcus equi* och *Streptococcus zooepidemicus* (vanliga patogena mikroorganismer hos häst) har rapporterats ligga mellan 2-80 ng/ml (Stover *et al*, 1981; SVARM, 2007). Med en plasmaprotein-bindningsgrad på cirka 50 % hos häst (Firth *et al*, 1986) kan den minsta effektiva koncentrationen *in vivo* (MEC) för streptokockinfektion på häst då grovt beräknas till 4-160 ng/ml.

Biverkningar

Även om penicillin har en bred säkerhetsmarginal och anses ha god tolerans ses ibland biverkningsreaktioner som i dagligt tal brukar kallas penicillinchock (Tjälve, 2005). Mellan år 2000 och 2006 rapporterades 22 fall av penicillinchock på häst till Läkemedelsverket, varav 8 av fallen var dödsfall. Det är troligtvis endast de allvarligare fallen som rapporteras, eftersom det i en studie från 2007 finns 57 olika fall mellan 2003 och 2006 beskrivna (Olsén *et al*, 2007). Tecken på biverkningar ses oftast direkt i samband med injektionen, antingen under själva

injektionen eller inom en minut efter att injektionen avslutats (Olsén *et al*, 2007). Biverkningarna kan vara allt från lokala reaktioner i huden till allvarliga centralnervösa störningar. Exempel på reaktioner som har observerats är beteendeförändringar, rörelsestörningar så som ataxi, balansrubbingar, svettningar, kramper, stegringar och backande (Olsén *et al*, 2007; Tjälve, 2007). I allvarligare fall kan hästen skada sig allvarligt eller dö, men vanligen återhämtar de sig inom 30 minuter. Det är framför allt vid behandling med bensylpenicillinprokain som biverkningsreaktioner har setts. Men det finns även hästar som reagerat mot mera lösliga bensylpenicillinsalt. Den eller de bakomliggande orsakerna till biverkningarna är inte helt klarlagda, men det finns flera teorier. Den vanligaste orsaken anses vara prokaintoxicitet (Nielsen *et al*, 1988; Olsén *et al*, 2007).

Syfte

Syftet med denna pilotstudie var att undersöka de farmakokinetiska parametrarna för bensylpenicillinnatrium efter intramuskulär administrering till häst och därmed värdera om det är möjligt att använda bensylpenicillinnatrium istället för bensylpenicillinprokain intramuskulärt till häst. Detta eftersom det är önskvärt att undvika bensylpenicillinprokainet på grund av biverkningsrisken. Denna studie kommer senare att eventuellt vara underlag till en utvidgad studie av bensylpenicillinnatrium intramuskulärt till häst.

LITTERATURÖVERSIKT

Bensylpenicillinprokain

Bensylpenicillinprokain är ett svårlösligt salt mellan bensylpenicillin och prokain (Plumb, 2002). Då bensylpenicillinprokain injiceras intramuskulärt löses det långsamt upp så att fritt bensylpenicillin och prokain erhålls. Saltet mellan bensylpenicillin och prokain fungerar därmed som ett depåpreparat och absorptionen av bensylpenicillin från injektionssället fördröjs, vilket ger läkemedlet en längre duration. Detta medför att den högsta plasmakoncentrationen bensylpenicillin som erhålls då bensylpenicillinprokain ges intramuskulärt är betydligt lägre än den koncentration som erhålls då man parenteralt ger ett lösligt salt av bensylpenicillin, men i gengäld blir halveringstiden betydligt längre, vilket medför att substansen endast behöver injiceras en gång per dygn (Tobin *et al*, 1977a; Uboh *et al*, 2000; Plumb, 2002). Prokain har en lokalanestetisk effekt och minskar därmed obehag i samband med injektion av en större mängd penicillinsalt i muskeln. Fördelen med bensylpenicillinprokain är en lätt administration vilket medför att djurägare kan själva, utan veterinär närvaro, fullfölja en insatt behandling. Dessutom behöver bensylpenicillinprokain endast ges en gång per dygn (Fass vet, 2008), vilket är fördelaktigt för både hästen och dess ägare.

Bensylpenicillinnatrium

För att undvika risken för toxiska reaktioner mot prokain kan bensylpenicillinnatrium användas. Bensylpenicillinnatrium är ett lösligt salt mellan bensylpenicillin och natrium (Plumb, 2002). Efter intramuskulär injektion med bensylpenicillinnatrium absorberas bensylpenicillin snabbt och koncentrationen i blodet blir därmed snabbt hög. Bensylpenicillinnatrium finns

dock endast godkänt för intravenöst bruk till häst, vilket medför att djurägare inte själva kan fullfölja en insatt behandling med denna form av bensylpenicillin. Halveringstiden efter intravenös giva med bensylpenicillinnatrium till häst är dessutom kort, cirka 30 till 40 minuter (Horspool & McKellar, 1995), vilket medför att läkemedlet måste ges flera gånger per dygn för optimal effekt (Walker & Giguère, 2006). I litteraturen finns motstridiga uppgifter om hur snabbt koncentrationen bensylpenicillin i plasma sjunker efter intramuskulär injektion av mera lösliga bensylpenicillinberedningar till häst (Allen & Clarke, 1978; Uboh *et al*, 2000). I Allen och Clarkes studie från 1978 var plasmakoncentrationen bensylpenicillin 6 timmar efter administrationen 160 ± 12 ng/ml. I Uboh *et als* studie (2000) var koncentrationen bensylpenicillin i plasma 6 timmar efter administrationstillfället cirka 2000 ng/ml (avläsning från diagram). I båda studierna användes dosen 14 mg/kg.

Prokain

Prokainets lokalanestetiska effekt fås då prokainet hämmar de spänningsberoende Na^+ -jonkanalerna i perifera nerver (Sugimoto *et al*, 2000). Prokain är en ester som snabbt bryts ner i blodet med hjälp av plasmaesteraser, framför allt pseudokolinesteras, till metaboliterna paraaminobenzoesyra (PABA) och dietylaminöetanol (Tobin *et al*, 1976; Uboh, 2000). Prokainoxicitet fås när absorptions hastigheten efter intramuskulär injektion överskrider plasmaesterasernas förmåga att hydrolysera prokainet (Nielsen *et al*, 1988). Detta kan till exempel ske om bensylpenicillinprokainet intarmuskulärt snabbt löses upp vilket leder till stora mängder fritt prokain i blodet (Tjälve, 2005). Prokaintoxicitet inträffar även om man av misstag injicerar bensylpenicillinprokain intravaskulärt istället för intramuskulärt, varvid bensylpenicillinprokainet snabbt löses upp och höga halter prokain frigörs (Tobin *et al*, 1977a).

Prokain och andra lokalanestetikum passerar med lätthet blod-hjärnbarriären (Sugimoto *et al*, 2000). GABA (gamma-amino-smörtsyra), som kan binda till både GABA_A och GABA_B receptorer, är en aminosyra som fungerar som inhibitorisk signalsubstans i det centrala nervsystemet (CNS) (Blood *et al*, 2007). Höga halter prokain i CNS antas kunna hämma neuronens spänningsberoende Na^+ -jonkanalerna samt inhibera GABA-inducerade spänningsskillnader via GABA_A receptorer (Sugimoto *et al*, 2000). Prokainets blockering av GABA-receptorerna skulle kunna vara den huvudsakliga mekanismen bakom den ökade krampbenägenheten som fås vid höga prokainkoncentrationer i blodet. Höga halter prokain i blodet har visat sig kunna ge samma typ av biverkningar som de som setts vid penicillinchock (Chapman *et al*, 1992).

Hoignés syndrom

Bensylpenicillinprokain har tidigare använts mycket inom humanmedicinen och även där har biverkningar rapporterats. Dessa biverkningsreaktioner har uppstått under tiden eller inom några sekunder efter att bensylpenicillinprokain injicerats intramuskulärt (Araszkiewicz & Rybakowski, 1996-1997). Biverkningarna, som kallas Hoignés syndrom, anses vara en akut ickeallergisk reaktion mot bensylpenicillinprokain, med framför allt psykiska symtom. Exempel på symtom är olika plötsliga CNS-reaktioner, så som extrem rädsla, panikartad oro, förvirring, hallucinationer, muskeltremor och medvetlöshet (Chapman *et al*,

1992; Schraiber & Krieg, 2001). Då man systemiskt tillfört prokain till frivilliga försökspersoner har de symtom som setts liknat de som fås vid Hoignés syndrom (Servan-Schreiber *et al*, 1998). Liknande försök med att systemiskt tillföra prokain har även utförts på häst (Tobin *et al*, 1977b; Nielsen *et al*, 1988; Chapman *et al*, 1992). Vid försöken gavs hästar prokain intravenöst och intramuskulärt och de symtom och centralnervösa beteenden som utvecklades studerades. De symtom som sågs liknade dem som setts som biverkningsreaktion vid behandling med bensylpenicillinprokain.

Hästars känslighet mot prokain

Tobin *et al* (1977b) visade i en studie att hästar utvecklar centralvenösa symtom vid prokainkoncentrationer i plasma som är cirka 20 gånger lägre än den koncentration som ger liknande symtom hos människa. Efter att intravenöst ha injicerat prokain visade det sig att hästar började excitera vid prokainkoncentrationer i plasma på 600 ng/ml eller högre. De första tecknen på påverkan var oftast snabb, djup utandning. I studien tilltog graden av symtom vartefter koncentrationen prokain i plasma ökade. Hos människa har de första symtomen på centralnervös påverkan setts vid plasmaprokainkoncentrationer på 16 000 ng/ml. De första symtomen var då övergående skakningar, oro eller rädsla och mental förvirring. Orsaken till varför hästar är så mycket känsligare för prokainets centralnervösa effekter än människan är inte helt klarlagd. En teori är att prokainet har en högre grad av plasmaproteinbindning hos människa jämfört med häst. Om denna teori stämmer skulle det innebära att mängden fritt prokain i plasma är mycket högre än hos häst än hos människa. En annan möjlighet är att prokainet har en högre affinitet för receptorer i CNS på hästar än hos människa. Den rekommenderade dosen bensylpenicillinprokain till häst är 20 mg/kg kroppsvikt, vilket motsvarar en prokaindos på 8,3 mg/kg kroppsvikt (Olsén *et al*, 2007). Reaktionen som liknar penicillinchock på häst har setts vid intravenösa injektioner med 2,5-10 mg prokain per kilogram kroppsvikt.

Risikfaktorer

Kindlingfenomenet

Det finns flera teorier om faktorer som kan öka risken för biverkningsreaktion mot bensylpenicillinprokain. Prokain har visats sig ha en selektivt aktiverande effekt på det limbiska systemet (en del av storhjärnan) (Chapman *et al*, 1992). Detta har visats i studier där prokain har getts intravenöst till katter, råttor och människor. Kindlingfenomenet har definierats som uppkomsten av beteenden och fysiologiska svar på ett upprepat stimuli som initialt inte gett någon effekt (Araszkiwicz & Rybakowski, 1996-1997). Det limbiska systemet anses vara det områden i hjärnan som framför allt ligger bakom utvecklingen av detta fenomen. Vissa läkemedel anses kunna fungera som stimuli för att utveckla kindling, t.ex. lokalanestetika så som lidokain och prokain. Det finns teorier om att känsligheten för prokain kan öka genom kindling-effekten, vilket skulle kunna inträffa om hästar tidigare har varit behandlad med ett lokalanestetikum.

Ökad lokal vaskularisering

Upprepade intramuskulära injektioner med bensylpenicillinprokain skulle eventuellt kunna ge en ökad vaskularisering i den aktuella muskeln på grund av de

inflammatoriska reaktioner som uppstår (Chapman *et al*, 1992). En sådan ökad vaskularisering skulle kunna öka mängden prokain som snabbt når cirkulationen. En annan teori är att risken för att av misstag injicera intravaskulärt i stället för intramuskulärt skulle öka vartefter en behandling pågår om en sådan vaskularisering sker (Olsén *et al*, 2007).

Plasmaesteraskoncentrationen

Inom humanmedicinen har plasmaesterasaktiviteten hos en grupp patienter som drabbats av biverkningar under behandling med bensylpenicillinprokain jämförts med en grupp patienter som inte reagerat på bensylpenicillinprokain (Downham *et al*, 1978). Den grupp av patienter som hade drabbats av biverkningar hade en signifikant lägre plasmaesterasaktivitet och därmed långsammare nedbrytning av prokain. En motsvarande undersökning av aktiviteten av plasmaesteraser hos hästar gjordes därför av Olsén *et al* (2007). Studien visade att även hästar som drabbats av akuta reaktioner mot bensylpenicillinprokain hade en signifikant lägre plasmaesteraskoncentration jämfört med hästar som inte reagerat vid bensylpenicillinprokainbehandling.

Etiologi – flera teorier

Etiologin bakom penicillinchock på häst är inte helt fastställd. Förutom prokaintoxicitet finns det även ett antal andra mer eller mindre betrodda teorier. Exempel på andra teorier är anafylaktiska eller toxiska reaktioner mot penicillin, toxiska reaktioner mot olika nedbrytningsprodukter, bildning av vaskulära embolier samt reaktioner mot tillsatta hjälpämnen i de olika läkemedelsprodukterna (Chapman *et al*, 1992). Vissa tillverkningsserier av bensylpenicillinprokain har kopplats samman med ökad mängd biverkningar, vilket till exempel skulle kunna bero på skillnader i tillverkning och förvaring. En studie har visat att vissa av de veterinärmedicinska preparaten av bensylpenicillinprokain innehåller mer än 2 gånger så hög koncentration fritt prokain jämfört med vissa motsvarande preparat inom humanmedicinen (Chapman *et al*, 1992).

Allergi

Allergiska reaktioner mot penicillin är troligtvis den teori, frånsett prokaintoxicitet, som är mest trolig. Akuta, systemiska och livshotande allergiska reaktioner (anafylaktiska reaktioner/anafylaxi) mot penicillin har länge varit ett känt fenomen inom humanmedicinen (Nielsen *et al*, 1988). Dessa reaktioner har skett i samband med att patienter som tidigare behandlats med penicillin ånyo behandlats med penicillin. Reaktionerna har då uppstått inom några minuter till en timme efter injektionen. Allergin uppstår troligen genom att nedbrytningsprodukter av penicillin eller bensylpenicillin snabbt binder till proteiner och bildar så kallade haptener. Haptener fungerar sedan som allergiframkallande antigen.

Allergiska reaktioner mot penicillin inom veterinärmedicinen har rapporterats vara ovanliga (Davis, 1984). För att en allergisk skall uppstå krävs att patienten utsatts för ämnet tidigare. Hos hästarna som deltog i Nielsen *et als* studie från 1988 ansågs behandlingstiden längd, tidigare exponering, hur snabbt symtomen

uppkom efter injektion samt symtomens karaktär skilja mellan misstänkt allergisk reaktion mot penicillin och misstänkt prokaintoxicitet.

Det finns rapporter om hästar som drabbats av penicillinchock vid behandling med vattenlösliga salter av bensylpenicillin, i dessa fall kan man anta att det är frågan om allergiska, inte toxiska, reaktioner (Tjälve, 2007). Reaktioner mot bensylpenicillinprokain tycks dock vara betydligt vanligare än reaktioner mot vattenlösliga salter av bensylpenicillin (Nielsen *et al*, 1992; Tjälve, 2005; Olsén *et al*, 2007). Det bör dock noteras att bensylpenicillinprokain troligen används i betydligt större utsträckning inom hästmedicinen i Sverige jämfört med bensylpenicillinnatrium (Olsén *et al*, 2007). Antalet reaktioner relaterat till antalet behandlade hästar är oklart och därmed kan den relativa incidensen inte räknas ut.

Mikroembolier

En av de första teorierna om uppkomsten av Hoignés syndrom hos människa var att reaktionerna uppkom på grund av bildning av mikroembolier i små kärlen i lungorna och hjärnan (Araszkiwicz & Rybakowski, 1996-1997). I en studie från 1954 gavs höga doser penicillinprokain till katter. Hos de katter som dog i samband med studien hittade man embolier med penicillinprokain i lungornas kärl. Embolier i lungorna har även hittats hos humanpatienter som dött i samband med bensylpenicillinbehandling. Bildandet av vaskulära embolier har även ansetts kunna vara orsaken till de akuta reaktionerna som setts vid behandling med bensylpenicillinprokain hos häst (Olsén *et al*, 2007). De vaskulära embolierna har ansetts kunna uppstå då stora mängder bensylpenicillinprokain injiceras och anses då kunna ge upphov till chock på grund av pulmonära embolier. Bildandet av embolier i lungkärlen borde dock ge akuta andningsbesvär, vilket inte varit de huvudsakliga symtomen hos vare sig häst eller människa (Araszkiwicz & Rybakowski, 1996-1997; Olsén *et al*, 2007). Resultaten från Tobin *et al*s studie (1977a) indikerar dessutom att bensylpenicillinprokain intarvaskulärt snabbt löses upp till bensylpenicillin och prokain. I en studie på hästar där man injicerat bensylpenicillinprokain intravenöst obducerades en häst som dog i samband med studien (Chapman *et al*, 1992). Vid obduktionen hittades inga fynd av mikroembolier i lungorna. Avsaknaden av fynd stämde väl överens med att hästen inte heller visat symtom från andningsvägarna. Om biverkningsreaktionerna vid behandling med bensylpenicillinprokain orsakas av mikroembolier borde de hästar som drabbas ha kvardröjande respiratoriska problem ett tag efter själva reaktionen. Inga kvardröjande respiratoriska problem noterades hos de hästar som deltog i studien av Olsén *et al* (2007).

MATERIAL OCH METODER

Försökets upplägg

Försöket var en pilotstudie med *cross-over* design. Under försökets första del injicerades en häst med bensylpenicillinnatrium och en annan med bensylpenicillinprokain intramuskulärt. Vilken häst som fick vilket preparat första gången valdes slumpmässigt. Blodprover togs efter ett bestämt protokoll under 47 timmar. Försöket upprepades efter en 7 dygns *washout* period. Den häst som tidigare fick bensylpenicillinnatrium fick då bensylpenicillinprokain och vice versa.

Hästarna

I studien användes två stycken varmlodiga travare tillhörande Institutionen för kliniska vetenskaper vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Den ena hästen (häst 1) var ett sto född 1991 och vägde vid det första tillfället 484 kg och vid det andra tillfället 470 kg. Den andra hästen (häst 2) var en valack född 2000 och vägde 464 kg respektive 457 kg vid de två tillfällena. Båda hästarna var under försökets gång till vår kännedom friska och fick inte någon annan medicinering. Under försöket stod hästarna uppstallade i sina ordinarie boxar samt vistades i paddockar utomhus. Hästarna hade fri tillgång till vatten och de utfodrades enligt sina vanliga rutiner. Studien var godkänt av Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd.

Läkemedel

I försöket användes bensylpenicillinnatrium (Geepenil vet.; Orion, Animal Health, Sollentuna, Sverige; 300 mg/ml) samt bensylpenicillinprokain (Penovet vet.; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Köpenhamn, Danmark; 300mg/ml).

Dosering

De båda hästarna injicerades med samma dos bensylpenicillin oberoende om de fick bensylpenicillinprokain eller bensylpenicillinnatrium.

Den rekommenderade dosen bensylpenicillinprokain till häst intramuskulärt är 20 mg/kg (Fass vet, 2008). Molekylvikten för bensylpenicillinprokain är 589 g/mol och för bensylpenicillin 334 g/mol. Det innebär att bensylpenicillin utgör 56,7 % av bensylpenicillinprokainets molekylvikt ($334 \text{ g/mol} / 589 \text{ g/mol} = 0,567$). Med den rekommenderade dosen för bensylpenicillinprokain som utgångspunkt kan då mängden bensylpenicillin beräknas: $0,567 \times 20 \text{ mg/kg} \approx 11 \text{ mg/kg}$.

Detta innebär att även då bensylpenicillinnatrium injicerades skulle dosen bensylpenicillin vara 11 mg/kg. Bensylpenicillinnatrium har en molekylvikt på 356 g/mol. Bensylpenicillin utgör alltså 93,8 % av bensylpenicillinnatriumets molekylvikt ($334 \text{ g/mol} / 356 \text{ g/mol} = 0,938$). Alltså utgör 11 mg/kg 93,8 % av bensylpenicillinnatriumdosen. Därmed blir dosen bensylpenicillinnatrium ca 12 mg/kg ($11 \text{ mg/kg} / 0,938 \approx 12 \text{ mg/kg}$).

Dosen bensylpenicillinprokain som gavs var 20 mg/kg och dosen bensylpenicillinnatrium var 12 mg/kg, vilket för de båda beredningarna motsvarar 11 mg bensylpenicillin per kilogram. Häst 1 fick därmed 31 ml Penovet vet (bensylpenicillinprokain) och 19 ml Geepenil vet (bensylpenicillinnatrium) emedan häst 2 fick 32 ml Penovet vet (bensylpenicillinprokain) och 20 ml Geepenil vet (bensylpenicillinnatrium).

Administrering

Penicillinet injicerades i halsmuskulaturen på de båda hästarna. Vid det första tillfället fick häst 1 bensylpenicillinnatrium emedan häst 2 fick bensylpenicillinprokain och vid det andra tillfället fick häst 1 bensylpenicillinprokain och häst 2 bensylpenicillinnatrium. Vid försökets andra del injicerades bensylpenicillinet i den kontralaterala muskeln. Under de båda tillfällena gavs bensylpenicillinet i form av en singeldos.

Provtagningen

För att enkelt och regelbundet kunna samla in blodprover försågs hästarna med en permanentkanyl i en av jugularvenerna. Innan permanentkanylerna infördes rakades området över *vena jugularis* och en lokalbedövningskräm (Emla®; Astra Zeneca, Södertälje, Sverige; 25 mg/g + 25 mg/g) innehållande de aktiva substanserna lidokain och prilokain applicerades över det rakade området. Efter att lokalbedövningen fått verka i en timme tvättades området noggrant med ett antiseptiskt hudrengöringsmedel innehållande klorhexidin (Hibiscrub; Regent Medical Overseas Limited, Irlam, Storbritannien; 4 % kutan lösning). Sedan desinfekterades områdena genom att bomullstussar med spritlösning (M sprit; Kemetyl, Haninge, Sverige; 70 % etanol denaturerad med Bitrex) drogs över området. Blodproven togs via permanentkanylerna under hela försöket, med undantag av de två sista proverna som togs med hjälp av vacutainer eftersom permanentkanylerna togs bort efter ett dygn så att hästarna kunde vistas utomhus. Vid försökets andra del användes den kontralaterala jugularvenen på respektive häst. Några minuter innan bensylpenicillin injicerades togs ett ”noll-prov”. Blodprov togs sedan 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 14 h, 24 h, 31 h samt 47 h efter att bensylpenicillin injicerats. Vid varje provtagnings tillfälle samlades ca 10 ml blod i ett hepariniserat och på förhand märkt blodprovsrör. Före varje provtagningsstillfälle drogs ca 10 ml blod upp ur permanentkanylen som slängdes, detta för att säkerställa att det blod som samlades in verkligen togs från det cirkulerande blodet. Efter varje provtagning spolades permanentkanylen med fysiologisk natriumkloridlösning (Natriumklorid Fresenius Kabi; Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige; injektionsvätska, lösning 9 mg/ml).

Hantering av blodproven

Direkt efter att blodproven tagits placerades proven i ett isbad. Proven centrifugerades därefter i en kylcentrifug inställd på 2-4°C och 1500g i ca 15 minuter. Efter centrifugeringen pipetterades plasman över till mindre plaströr som också var placerade i isbad. Plaströren med plasman förvarades sedan i en -80°C frysbbox tills analysen av bensylpenicillin. Proven hölls kyllda på is under hela hanteringen av dem.

Analys av bensylpenicillin i hästplasma

Analysen av bensylpenicillin i hästplasma gjordes vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) i Uppsala. Analyserna gjordes med hjälp av LCMSMS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) vilket är ett instrument där vätskekromatografi kopplats till masspektrometri. Bensylpenicillin analyserades efter utfällning av plasmaproteinerna med ett organiskt lösningsmedel. Efter centrifugering, indunstning och upplösning i den mobila fasen utfördes analysen med hjälp av LCMSMS. Då specifika joner för penicillin och dess internstandard valts ut kunde analysen ske med hjälp av negativ elektropray jonisering. Detta masspektrometriska analyssätt kallas SRM (*Selected Reaction Monitoring*).

Analysmetod

Till 1,0 ml plasma sattes 100 µl intern standard (5000 ng benzylopenicillin-d₇ /ml), 200 µl milliQ-vatten och 3,0 ml acetonitril. Efter omblandning och centrifugering

avskiljdes acetonitrilfasen och indunstades sedan med kvävgas vid 40°C till ca 500 µl. Lösningen filtrerades därefter och 10 µl av filtratet injicerades direkt i LCMSMS-instrumentet. De extraherade proven kromatograferades i en analytisk kolonn av märket Phenomenex® Luna (5 µ C18 100R, 50 x 2.0 mm) och den mobila fasen pumpades med en LC Surveyor MS Pump 2.3. Mobilfasen bestod av två lösningar; 0,1 % ättiksyra i milliQ-vatten (A) samt 0,1 % ättiksyra i acetonitril (B). Flödes hastigheten för den mobila fasen var 200 µl/min. Gradientprogrammet visas i tabell 1 nedan. Jonernas masstal analyserades med en masspektrometer (TSQ Quantum Ultra). De joner och övergångar som analyserades var: penicillin G: precursor m/z 333[M-H]⁻ → produkt m/z 192 och penicillin G-d₇: precursor m/z 340[M-H]⁻ → produkt m/z 199.

Tabell 1: Gradientprogram

Tid (min)	Flöde (µLmin)	A %	B %
0.00	200	80	20
1.00	200	30	70
6.50	200	30	70
6.60	200	80	20
10.0	200	80	20

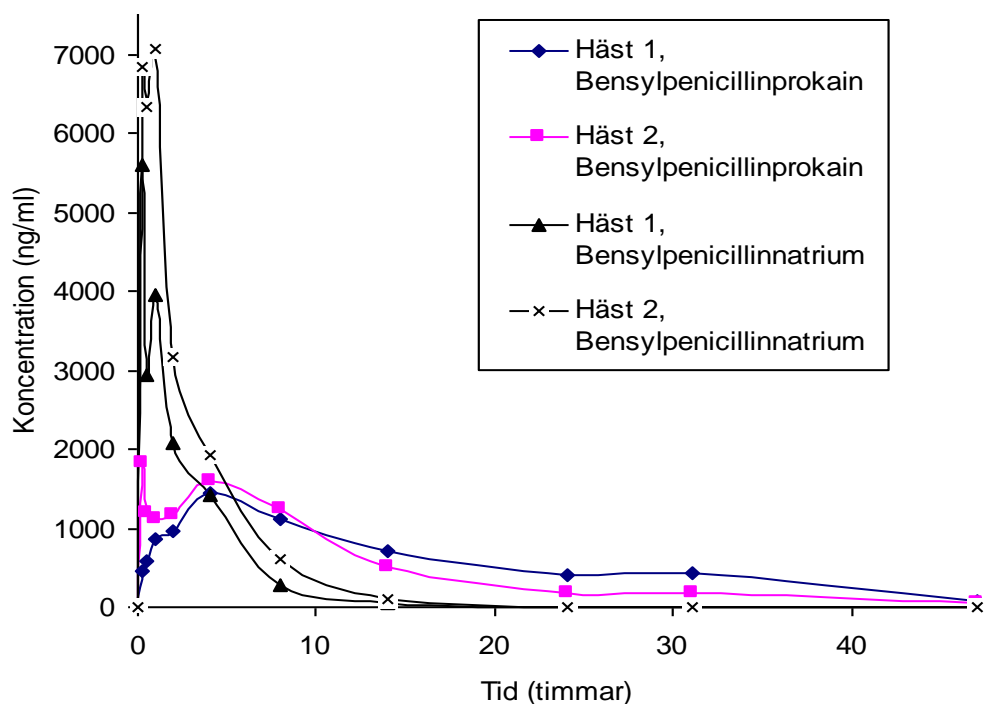
För beräkning av koncentrationer i plasmaprover upprättades en standardkurva inom det aktuella koncentrationsområdet 1 – 4000 ng/ml plasma. Detta gjordes genom att bensylpenicillin i olika koncentrationer tillsattes blankplasma och sedan analyserades de olika beredningarna enligt ovan beskrivna metod. Kvalitetskontrollprover (QC, n=3) analyserades vid tre nivåer med följande resultat 15 ng/mL (12%); 105 ng/mL (8%) och 1508 ng/mL (3%). (Enligt Ulf Bondesson, Avdelningen för Kemi vid Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt).

Farmakokinetisk analys

De farmakokinetiska analyserna utfördes med hjälp av datorprogrammet WinNonlin (WinNonlin 5.0.1® Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). Analyserna gjordes individuellt och den så kallade "non-compartment"-metoden var den modell som passade bäst. Med hjälp av linjära trapetsmetoden beräknades arean under kurvan extrapolerat till oändligheten (AUC_{inf}). För att kunna extrapolera AUC från tiden noll till oändlighet användes den terminala fasens hastighetskonstant (λ). Halveringstiden (t_{1/2}) beräknades med hjälp av formeln $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda$. Eftersom biotillgängligheten (F) är okänd har clearance (Cl) angetts som Cl/F. C_{max} står för den maximala koncentrationen bensylpenicillin i plasma. (C_{max}).

RESULTAT

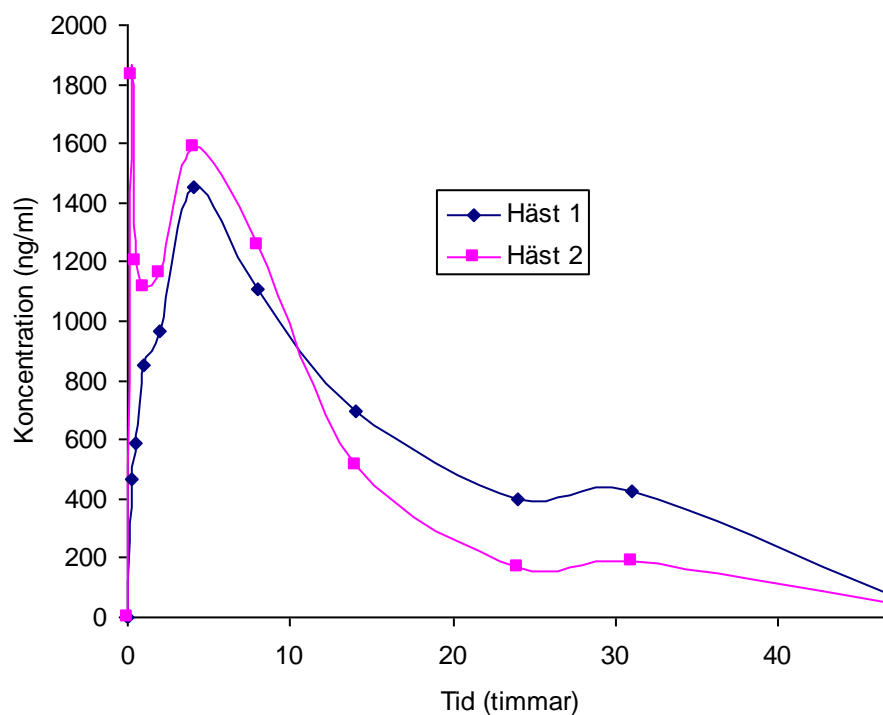
Tidsförloppet av bensylpenicillinkoncentrationen i plasma skiljer mellan tillförsel av bensylpenicillinprokain och bensylpenicillinnatrium (Figur 1). Bensylpenicillinnatrium når snabbt en hög koncentration och halveringstiden är kort. Bensylpenicillinprokainet når inte lika höga koncentrationer och har en längre halveringstid än bensylpenicillinnatrium. De olika farmakokinetiska parametrarna redovisas i tabell 3



Figur 1. Plasmakoncentrationen bensylpenicillin över tiden efter intramuskulär injektion av bensylpenicillinprokain och bensylpenicillinnatrium (dos bensylpenicillin 11 mg/kg) till häst.

Bensylpenicillinprokain

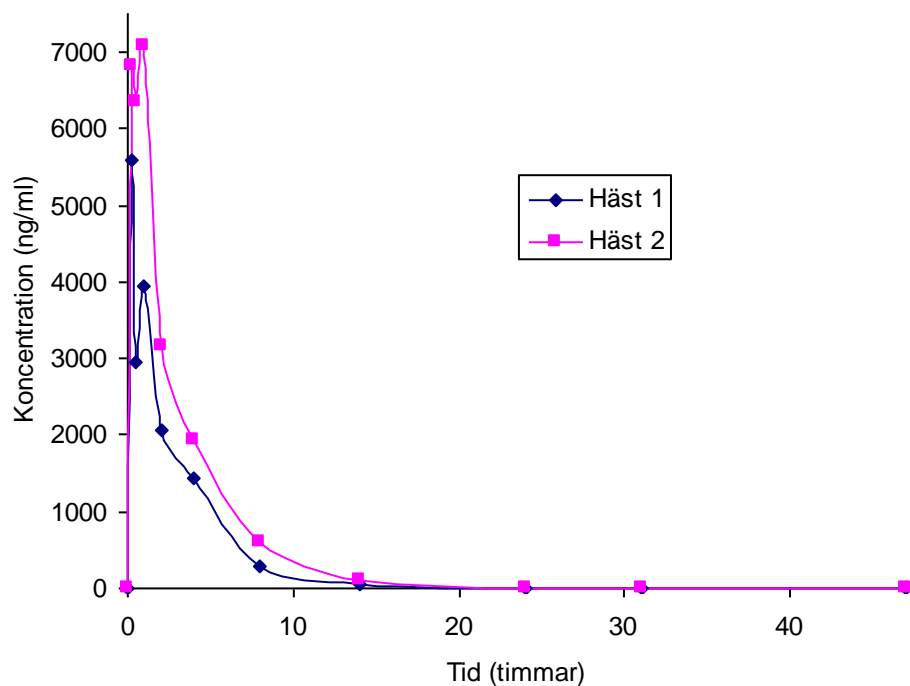
Ingen av hästarna reagerade med obehag vid tillförsele av bensylpenicillinprokain. Koncentrationen bensylpenicillin i plasma, 24 timmar efter administrationen av bensylpenicillinprokain, var 169 ng/ml respektive 401 ng/ml för häst 1 och häst 2. Häst 1 hade initialt höga koncentrationer av bensylpenicillin (Tabell 2, Fig 2).



Figur 2. Plasmakoncentrationen bensylpenicillin över tiden efter intramuskulär injektion av bensylpenicillinprokain (dos bensylpenicillin 11 mg/kg) till häst.

Bensylpenicillinnatrium

Vid den intramuskulära injektionen av bensylpenicillinnatrium reagerade en av hästarna (häst 2) med oro cirka 1 minut efter injektionen. Oron, som varade i cirka 2 minuter, yttrade sig genom att hästen skakade på huvud och hals samt uttryckte oro i blicken. Koncentrationen bensylpenicillin i plasma, 24 timmar efter att bensylpenicillinnatrium injicerats, var 11,7 ng/ml och 1,1 ng/ml för häst 1 respektive häst 2 (Figur 3, tabell 2).



Figur 3. Plasmakoncentrationen bensylpenicillin över tiden efterintramuskulär injektion av bensylpenicillinnatrium (dos bensylpenicillin 11 mg/kg) till häst (n=2).

Tabell 2. Bensylpenicillinkoncentrationen i plasma vid de olika provtagningstillfällena efter intramuskulär injektion av bensylpenicillinprokain och bensylpenicillinnatrium till häst (dos bensylpenicillin 11 mg/kg).

Tid (timmar)	Bensylpenicillinkoncentration (ng/ml)			
	Bensylpenicillinprokain		Bensylpenicillinnatrium	
	Häst 1	Häst 2	Häst 1	Häst 2
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	468	1834	5596	6830
0,50	587	1203	2943	6338
1,00	853	1112	3955	7080
2,00	969	1164	2067	3167
4,00	1456	1589	1427	1932
8,00	1107	1254	277	599
14,0	699	512	63	102
24,0	401	169	1,1	11,7
31,0	424	188	0,9	2,5
47,0	73	48	0,7	0,5

Tabell 3. Farmakokinetiska parametrar efter intramuskulär administration av bensylpenicillinprokain respektive bensylpenicillinnatrium (dos bensylpenicillin 11 mg/kg) hos häst (n=2)

	Bensylpenicillinprokain		Bensylpenicillinnatrium	
	Häst 1	Häst 2	Häst 1	Häst 2
C_{max} (ng/ml)	1456	1834	5596	7080
t_{max} (timmar)	< 0,4	< 0,25	< 0,25	< 1,0
$t_{1/2}$ (timmar)	10,76	9,29	2,38	2,55
Cl/F (ml/kg)	0,47	0,39	0,74	0,46
AUC_{inf} (ng·timmar/ml)	27928	23249	14767	23886

C_{max} , maximal plasma koncentrationen vid intramuskulär injektion. t_{max} , tiden till C_{max} . $t_{1/2}$, terminala halveringstiden. Cl/F, clearance genom biotillgängligheten. AUC_{inf} ytan under kurvan från tiden noll till oändligheten.

DISKUSSION

I studien framkom att tidsförloppet för bensylpenicillinkoncentrationen i plasma efter intramuskulär administrering skiljde avsevärt mellan de olika beredningsformerna. För bensylpenicillinprokain steg plasmakoncentrationen bensylpenicillin successivt och nådde C_{max} efter cirka 4 timmar. C_{max} för bensylpenicillinprokainet var då cirka 1400 ng/ml. För bensylpenicillinnatrium steg koncentrationen bensylpenicillin i plasman snabbare och nådde högre C_{max} än bensylpenicillinprokainet. C_{max} för bensylpenicillinnatriumet var ca 5600 och 7100 ng/ml och erhöles inom 1 timme efter administreringen. Halveringstiden för bensylpenicillinnatrium beräknades till cirka 2,5 timmar och för bensylpenicillinprokain till cirka 10 timmar. Den långa halveringstiden för bensylpenicillinprokain beror på att saltet mellan bensylpenicillin och prokain först måste lösas upp innan bensylpenicillinet absorberas till blodet. AUC_{inf} överensstämde mellan de båda bensylpenicillinberedningarna, vilket tyder på att även biotillgängligheten är relativt lika. Dock skiljer AUC_{inf} för bensylpenicillinnatrium hos häst 1 från de övriga AUC_{inf} -värdena. Orsaken till denna avvikelse är oklar.

Horspool & McKellar erhöles i studien från 1995 ett clearance för bensylpenicillinnatrium för häst på cirka 510 ml/h,kg. I denna studie beräknades Cl/F till 500-700 ml/h,kg. De två värdena överensstämmer i stort vilket antyder att biotillgängligheten (F) är fullständig efter intramuskulär tillförsel. I Horspool & McKellars studie beräknades halveringstiden för bensylpenicillinnatrium efter intravenös administrering till häst till cirka 30 minuter. Halveringstiden efter intravenös administrering är alltså betydligt kortare än halveringstiden efter intramuskulär administrering (cirka 2,5 timmar). Detta indikerar att absorptionsfasen påverkar halveringstiden även vid intramuskulär injektion av det lösliga saltet.

Plasmakoncentrationerna och halveringstiden för bensylpenicillin i föreliggande studie skiljde avsevärt från de resultat som framkom i Uboh *et als* studie från 2000. Median bensylpenicillinkoncentrationen i plasma i Uboh *et als* studie var 770 ng/ml 24 timmar efter att bensylpenicillinkalium injicerats samt 860 ng/ml 24 timmar efter att bensylpenicillinprokain injicerats. Dessa koncentrationer är betydligt högre än de erhållna bensylpenicillinkoncentrationerna vid motsvarande tidpunkt för bensylpenicillinnatrium (11,7 ng/ml och 1,1 ng/ml) samt bensylpenicillinprokain (401 ng/ml och 169 ng/ml) i denna studie. Även halveringstiderna för både bensylpenicillinkalium och bensylpenicillinprokain i Uboh *et als* studie skiljde från de halveringstider som framkom i den här studien. Uboh *et al* fick en halveringstid på cirka 25 timmar för bensylpenicillinprokain intramuskulärt vilket är mer än dubbelt så högt jämfört med resultatet i den här studien (cirka 10 timmar). För bensylpenicillinkalium fick Uboh *et al* en halveringstid på cirka 13 timmar vilket är flera gånger högre än den halveringstid som beräknades för bensylpenicillinnatrium i den här studien (cirka 2,5 timmar).

Vad den stora skillnaden i resultaten mellan denna studie och Uboh *et als* studie beror på är oklart. En möjlig orsak till den stora skillnaden i resultaten kan vara att det i studierna har använts olika analysmetoder för bensylpenicillin. En annan möjlighet är att upptaget eller utsöndringen av bensylpenicillin i Uboh *et als* studie (2000) påverkats av att även prokainhydroklorid injicerades samtidigt med bensylpenicillinkalium. (I Uboh *et als* studie framgår det inte var prokainhydroklorid injicerats i förhållande till bensylpenicillinkalium.) Men en sådan eventuell påverkan på upptaget eller utsöndringen förklarar inte varför Uboh *et al* även fått en längre halveringstid för bensylpenicillinprokainet. Eftersom både bensylpenicillinnatrium och bensylpenicillinkalium är lösliga salt är det mindre troligt att skillnaden i halveringstid beror på att Uboh *et al* använde bensylpenicillinkalium emedan bensylpenicillinnatrium användes i denna studie.

Proteinbindningsgraden för bensylpenicillin på häst har inte beaktats i aktuell studie. Detta innebär att mängden fritt, aktivt verkande bensylpenicillin är lägre än vad som angetts i resultaten. Firth *et al* bestämde i sin studie från 1986 medelproteinbindningsgraden för bensylpenicillin i plasma efter intramuskulär administrering till $57,3 \pm 7,3$ %.

Hos häst har minsta inhiberande koncentration *in vitro* (MIC) för bensylpenicillin hos både *Streptococcus equi* och *Streptococcus zooepidemicus* rapporterats ligga mellan 2,0 - 80 ng/ml (Stover *et al*, 1981; SVARM, 2007). Med en plasmaproteinbindningsgrad på cirka 50 % kan den minsta effektiva koncentrationen *in vivo* (MEC) då grovt beräknas till 4,0 -160 ng/ml. Tiden över MEC för de ovan nämnda bakterierna varade därmed för båda hästarna i åtminstone 8 timmar efter att bensylpenicillinnatrium injicerats (se tabell 2). Detta antyder att det skulle kunna vara möjligt att använda bensylpenicillinnatrium intramuskulärt om det ges två gånger per dygn. Men för att vidare undersöka denna möjlighet behövs ytterligare studier med ett större antal hästar. Bensylpenicillinnatrium finns godkänt för intramuskulärt bruk till nöt, och rekommenderad dosering är två gånger per dygn. Fördelen med att kunna använda bensylpenicillinnatrium intramuskulärt är, som tidigare nämnt, att man

skulle kunna utesluta risken för prokaintoxicitet samtidigt som djurägare själva kan uppfölja en insatt behandling. Om bensylpenicillinnatrium skulle kunna användas genom att det ges två gånger per dag betyder det dock att man utsätter hästen för dubbelt så många stick som då bensylpenicillinprokain används, vilket är en nackdel. Dessutom skulle prokainets lokalanestetiska effekt gå förlorad.

Häst 1 uppvisade initialt mycket höga koncentrationer av bensylpenicillin efter injektion med bensylpenicillinprokain (figur 2). Den höga initialkoncentrationen bensylpenicillin indikerar att en del av dosen kan ha hamnat intravaskulärt eller att delar av saltet upplöstes mycket snabbt och var därmed tillgängligt för absorption. Detta antyder att intravaskulär injektion kan inträffa oförmärkt, trots noggrann kontroll via aspiration. Inga tecken på biverkningsreaktion sågs dock under studien.

Häst 2 reagerade med oro cirka en minut efter att bensylpenicillinnatriumet injicerats. Oron, som varade i cirka 2 minuter, skulle kunna tolkas som att bensylpenicillinet gav upphov till någon form av lokal smärta, t.ex. sveda, intramuskulärt. Om det är så att bensylpenicillinnatriumet ger upphov till lokal smärta betyder det att prokainets lokalanestetiska effekt i bensylpenicillinprokainberedningar kan vara viktig. En häst som upprepade gånger skall injiceras med ett ämne som ger lokal smärta kan bli mycket svårbehandlad vartefter behandlingen fortgår och det är dessutom etiskt tveksamt med sådan behandling. Volymen bensylpenicillinprokainsuspension som injicerades var för häst 1 31 ml och för häst 2 32 ml emedan volymen bensylpenicillinnatriumlösning som gavs var 19 ml (häst 1) respektive 20 ml (häst 2).

Även om bensylpenicillinnatrium skulle kunna användas intramuskulärt på häst skulle risken för anafylaktiska reaktioner mot penicillin inte kunna undvikas. Det vill säga det finns fortfarande risk för biverkningar, men anafylaktiska reaktioner mot penicillin anses mindre vanligt än prokaintoxicitet (Tjälve, 2007).

Möjligheten att använda något annat depåpreparat än prokain bör inte heller frånses. Det vill säga finns det något annat ämne som kan ersätta prokainets funktion hos bensylpenicillinprokain? Inom human medicinen finns substansen probenecid som hämmar den tubulära utsöndringen av penicillin via njurarna (Fass). Detta innebär att då probenecid ges tillsammans med penicillin blir koncentrationen penicillin högre och durationen längre. Detta medför att penicillin i kombination med probenecid kan doseras med längre mellanrum. Tyvärr har inga uppgifter på probenecid tillsammans med bensylpenicillin till häst kunnat hittas i litteraturen.

Slutsats

I studien framkom att halveringstiden för bensylpenicillinprokain och bensylpenicillinnatrium skiljer. Trots detta antyder de uppmätta plasmakoncentrationerna efter intramuskulär injektion av bensylpenicillinnatrium att det eventuellt skulle vara möjligt att ge bensylpenicillinnatrium intramuskulärt två gånger per dygn till häst med bibehållna terapeutiska koncentrationer. Men ytterligare studier med flera hästar behövs. En eventuell smärtreaktion i samband med injektion av bensylpenicillinnatrium behöver också utvärderas.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Allen Edward W., Clarke Anne R. (1978). Absorption of sodium benzylpenicillin from the equine uterus after local Lugol's iodine treatment, compared with absorption after intramuscular injection. *Equine Vet J* 10, 174-175.
- Araszkiwicz A., Rybakowski J.K. (1996-1997). Hoigne's syndrome, kindling, and panic disorder. *Depression and anxiety* 4, 139-143.
- Bengtsson B., Greko C., Grönlund Andersson U. 2007. SVARM, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. Västerås, Sverige: Edita Västra Aros.
- Blood D.C., Studdert V.P. Gay C.C. 2007. *Saunders comprehensive veterinary dictionary*. Third edition. 765. London, Saunders Elsevier.
- Chapman C.B., Courage P., Nielsen I.L., Sitaram B.R., Huntington P.J. (1992). The role of procaine in adverse reactions to procaine penicillin in horses. *Aust Vet J* 69, 129-133.
- Davis L.E. (1984). Hypersensitivity reactions induced by antimicrobial drugs. *J Am Vet Med Assoc* 185, 1131-1136.
- Downham T., Cawley R.A., Salley S.O., Dal Santo G. (1978). Systemic toxic reaction to procaine penicillin G. *Sexually transmitted diseases* 5, 4-9
- Firth E. C., Nouws J. F. M., Driessens F., Schmaetz P., Peperkamp K., Klein W.R. (1986). Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicillin G in horses. *Am J Vet Res* 47, 2380-2384.
- Giguère Steeve, Prescott John F., Baggot J. Desmond, Walker Robert D., Dowling Patricia M. 2006. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4th edition. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Horspool L.J.I., McKellar Q.A. (1995). Disposition of penicillin G sodium following intravenous and oral administration to *equiade*. *Br vet J* 151, 401-412.
- Läkemedelsindustriföreningen, LIF. 2008. *Fass*. Stockholm: LIF
- Läkemedelsindustriföreningen, LIF. 2008. *Fass vet*. Stockholm: LIF
- Nielsen I.L., Jacobs K.A., Huntington P.J., Chapman C.B., Lloyd K.C. (1988). Adverse reaction to procaine penicillin G in horses. *Aust Vet J* 65, 181-185.
- Olsén L., Ingvast-Larsson C., Broström H., Larsson P., Tjälve H. (2007). Clinical signs and etiology of adverse reactions to procaine benzylpenicillin and sodium/potassium benzylpenicillin in the horse. *J vet Pharmacol Ther* 30, 201-207.
- Plumb D.C. 2002. *Veterinary drug handbook*. 4th edition. 633-639. Ames, Iowa: Iowa state press.
- Schreiber W., Krieg J.C. (2001) Das Hoigné-Syndrom. Case report and review of the literature. *Der Nervenarzt* 72, 546-548.
- Servan-Schreiber D., Perlstein W.M., Cohen J.D., Mintun M. (1998). Selective pharmacological activation of limbic structures in human volunteers: a positron emission tomography study. *The journal of neuropsychiatry and clinical neuroscience* 10, 148-159.
- Stover S. M., Brown M. P., Kelly R. H., Farver T. B., Knight H. D. (1981). Aqueous procaine penicillin G in the horse: serum, synovial, peritoneal, and urine concentrations after single-dose intramuscular administration. *Am J Vet Res* 42, 629-631.

- Sugimoto M., Uchida I., Fukami S., Takenoshita M., Mashimo T., Yoshiya I. (2000). The α and γ subunit-dependent effects of local anesthetics on recombinant GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology* 401, 329-337.
- Sullins Kenneth E., Messer Nat T., Nelson Larry. (1984). Serum concentration of penicillin in the horse after repeated intramuscular injections of procaine penicillin G alone or in combination with benzathine penicillin and/or phenylbutazone. *Am J Vet Res* 45, 1003-1007.
- Tobin T., Blake J.W., Tai C.Y., Sturman L., Arnett S. (1976). Pharmacology of the procaine in the horse: Procaine esterase properties of equine plasma and synovial fluid. *Am J Vet Res* 37, 1165-1170
- Tobin T., Tai C.Y., O'Leary J., Sturma L., Arnette S. (1977a). Pharmacology of procain in the horse: Evidence against the existence of a "procaine-penicillin" complex. *Am J Vet Res* 38, 437-442.
- Tobin T., Blake J.W., Sturman L., Arnette S., Truelove J. (1977b). Pharmacology of procaine in the horse: Pharmacokinetics and behavioural effects. *Am J Vet Res* 38, 637-647.
- Tjälve H. (2005). Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 2004, del 1. *Svensk VetTid*, 57, 23-29.
- Tjälve H. (2007). Läkemedelsbiverkningar hos djur 2005 och 2006, del 1. *Svensk VetTid*, 59, 23-30.
- Uboh Cornelius E., Soma Lawrence R., McNamara Elisabeth, FennelMary A., May Laura, Teleis Donna C., Rudy Jeffrey A., Watson Anthony O. (2000). Pharmacokinetics of penicillin G procaine versus penicillin G potassium and procaine hydrochloride in horses. *Am J Vet Res* 61, 811-815.