

# Kapitel 6 Zusammenfassung

Die Bedeutung des respiratorischen Epithels für die physiologischen Funktionen der Atemwege ist unumstritten. Neuere Studien weisen darauf hin, daß der Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur beim Menschen und bei zahlreichen Säugetieren ebenfalls durch epitheliale Mechanismen beeinflußt wird. Im Literaturteil der vorliegenden Arbeit werden die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse und Theorien über die Einflußnahme epithelialer Mechanismen auf die Tonusregulation zusammengefaßt.

Das Schrifttum befaßt sich im wesentlichen mit der Charakterisierung der epithelabhängigen Tonussteuerung, und insbesondere mit der Beantwortung der Frage, ob das respiratorische Epithel durch die Freisetzung tonusaktiver Faktoren die Reaktivität der subepithelialen Muskelschicht beeinflussen kann. Außerdem werden die epithelialen Fähigkeiten, bronchoaktive Substanzen enzymatisch zu inaktivieren oder die intramuralen Ionenverhältnisse zu verändern, dargestellt.

Im Zusammenhang mit den protektiven Eigenschaften der Epithelschicht wird auch auf die Folgen der Epithelschädigung bei chronischen Atemwegsobstruktionen (COB) von Pferden eingegangen, ein Krankheitsbild, das deutliche Parallelen zum Asthma bronchiale des Menschen aufweist.

In den eigenen Untersuchungen wurden ringförmige Bronchialpräparate 3. und 4. Ordnung von Schlachtpferden verwendet. Mit Hilfe von isometrischen Kraftmessungen konnte der Einfluß der mechanischen Epithelentfernung auf das Kontraktions - bzw. Relaxationsverhalten der Bronchialpräparate überprüft werden.

Ziel der Versuche war, die epithelabhängigen Regulationsmechanismen in den Bronchien von Pferden weiter zu charakterisieren, und die Existenz des postulierten relaxierenden Epithelfaktors (EpDRF) nachzuweisen. Außerdem war der Einfluß von COB auf die epithelabhängige Steuerung des Bronchotonus zu berücksichtigen. Daher wurden die Pferde in Gruppen mit und ohne COB aufgeteilt. Das entscheidende Kriterium für diese Einteilung war die histologische Beurteilung der Lungenpräparate.

Die Bronchialringe wurden mit  $\beta$ -Methylcholin und Arachidonsäure stimuliert, um den Effekt der Epithelentfernung und den Einfluß von COB auf diesen Effekt zu untersuchen. Aus den Organbadüberständen der Kontraktionsversuche mit  $\beta$ -Methylcholin wurde zusätzlich die Konzentration der freigesetzten Prostanoiden gemessen. Zur weiteren Charakterisierung der Epitheleffekte wurde die Wirkung von Bradykinin und Adenosintriphosphat überprüft. Außerdem war abzuklären, ob eine Veränderung der Natrium/Kalium - Transporte epithelabhängige Effekte beeinflussen (Furosemid-Natrium) oder induzieren (Amiloridhydrochlorid-NN-dimethyl, Benzamilhydrochlorid und BRL39226 ) kann. - Im weiteren sollte in Inkubationsversuchen mit Naloxon (Opioidantagonist), Flumazenil und PK11195 (zentraler und peripherer Benzodiazepinantagonist), sowie  $\omega$ -Nitro-L-Arginin und D-Arginin (Inhibitor des endothelialen, relaxierenden Faktors mit inaktivem, rechtsdrehenden Stereoisomer) der epitheliale Faktor pharmakologisch identifiziert werden. Schließlich wurde mit vier verschiedenen Methoden versucht, die Übertragung von relaxierenden Epithelfaktoren nachzuweisen.

Die Versuchsergebnisse lassen eindeutig eine epithelabhängige Tonusregulation nach Stimulation mit  $\beta$ -Methylcholin, Bradykinin und Arachidonsäure erkennen. Die Messung der Prostanoidkonzentrationen läßt die Vermutung zu, daß die gesteigerte Kontraktilität der Bronchialringe ohne Epithel nach cholinergem Stimulation mit  $\beta$ -Methylcholin nicht mit der Freisetzung epithelialer Prostanoiden zusammenhängt.

Als Mechanismus für die epithelabhängige Relaxation durch exogen zugesetzte Arachidonsäure kann die Freisetzung des relaxierenden Prostaglandins E<sub>2</sub> aus dem Epithel nicht ausgeschlossen werden.

Der Deepithelisierungseffekt war durch die Beeinflussung des Natrium/Kalium-Transportes nicht beeinträchtigt. Auch die Inkubation mit den Inhibitoren verschiedener Mechanismen konnte den Effekt der Epithelentfernung im Versuch mit  $\beta$ -Methylcholin nicht hemmen. Demnach sind an der Tonusregulation von Bronchien der 3. und 4. Ordnung wahrscheinlich weder Opioiden, noch Benzodiazepine, noch Nitrooxide (EDRF) beteiligt. Die Wirkung purinergem P<sub>2</sub>-Rezeptoren an der epithelabhängigen Tonusregulation ist in den Bronchien der 3. und 4. Ordnung ebenfalls nicht anzunehmen.

Der Nachweis für die erfolgreiche Übertragung von relaxierenden Faktoren aus Epithelzellen war nicht möglich

Der Deepithelisierungseffekt nach  $\beta$ -Methylcholin - oder Arachidonsäurestimulation, sowie die Prostanoidzusammensetzung waren in der Gruppe von Pferden mit COB nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den lungengesunden Kontrolltieren.

An der Regulation des Bronchotonus bei Pferden sind verschiedene Mechanismen beteiligt, die vermutlich nur teilweise epithelabhängig sind. - Das respiratorische Epithel ist möglicherweise aktiv an der Tonusregulation beteiligt, indem es kontraktile Agonisten, wie Bradykinin, enzymatisch inaktiviert oder relaxierenden Faktoren produziert. - Es kann gleichzeitig nicht ausgeschlossen werden, daß im Respirationstrakt von Pferden mehrere inhibitorische Faktoren aus den Epithelzellen freigesetzt werden, die den Tonus der glatten Bronchialmuskulatur beeinflussen können. In Abhängigkeit von den jeweiligen Agonisten wird sowohl der Einfluß von relaxierenden Prostaglandinen als auch die Wirkung nicht-prostanoider Faktoren angenommen. Erstere sind von den Prostanoiden aus nicht-epithelialen Zellen abzugrenzen.

Da auch chronische Atemwegsobstruktionen den Deepithelisierungseffekt nicht beeinflussen konnten, ist anzunehmen, daß die Epithelschäden in der Gruppe mit COB in ihrer Gesamtheit zu geringfügig waren, um die aktive, inhibitorische Epithelwirkung signifikant zu beeinflussen. Andererseits ist es ebenso vorstellbar, daß zumindest in den unteren Bronchialwegen von Pferden die aktive, epithelabhängige Tonusregulation im komplexen Zusammenspiel der tonussteuernden Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

# Summary

**Elke Löschner : Epithelial mechanisms for regulation of bronchial tone in healthy horses and horses with chronic obstructive lung disease**

There is no doubt about the importance of the respiratory epithelium in regulating the physiological functions of respiratory airways. In addition, recent studies provides evidence, that the respiratory epithelium exerts a modulatory influence on the responsiveness of mammalian airway smooth muscle. In vitro evidence exists that mechanical removal of the epithelium modifies the reactivity of the underlying smooth muscle to various stimuli. This altered reactivity is not only due to a loss of a diffusion barrier, but may, in addition, involve an enzymatic breakdown of bronchoactive agents or alternatively, the release of epithelium derived bronchoactive factor (s). Finally ion exchanges have been implicated in epithelium dependent tone regulation.

The loss or damage of the epithelium is one of the cardinal diagnostic symptoms in horses with chronic obstructive bronchitis (COB) and human asthma. Thus, effects of COB on the epithelial mechanisms should have been investigated.

The object of our experiments was to determine the influence of chronic airway obstruction on epithelium dependent phenomena. In addition, mechanisms by which epithelium interactions influence bronchial smooth muscle tone had to be clarified.

Therefore the effects of removing the epithelium was investigated with equine bronchial ring preparations taken from third or fourth generation bronchi. The tissue was collected from horses 30 minutes after slaughter. The distinction between healthy horses and horses with COB and the success of epithelium removal were confirmed histologically after each experiment. For isometric tension recording the bronchial rings were mounted in organ chambers .

In order to study the influence of COB on epithelium removal bronchial preparations were stimulated with  $\beta$ -methycholin and arachidonic acid. After stimulation with  $\beta$ -methycholin the

supernatant of the organ baths were analysed to investigate the prostanoid release from the bronchial preparations. Characteristics of the epithelial mechanisms were investigated by stimulating the ring preparations with bradykinin or ATP. Furthermore the effect of preincubation with naloxone (opoid-antagonist), flumazenil and PK11195 (central and peripheral benzodiazepine antagonists),  $\omega$ -nitro-L-arginine and D-arginine (inhibitor of nitrooxide/EDRF and inactive stereoisomer) on the  $\beta$ -methylcholin induced responsiveness were studied. - To determine the epithelium dependent influence of sodium/potassium exchange, we studied the responsiveness of precontracted ring preparations to BRL 39226 (potassium channel opener) and two different derivatives of K<sup>+</sup> sparing diuretic amiloride (amiloridehydrochlorid-NN-dimethyl and benzamil-hydrochloride). Finally we investigated the influence of furosemide (inhibition of potassium uptake) on  $\beta$ -methylcholin induced contractions.

The results of our investigations showed, that the removal of epithelium significantly increased the sensitivity of underlying smooth muscle to  $\beta$ -methylcholin and bradykinine. Arachidonic acid only causes relaxation in preparations with epithelium intact. COB did not either influence the epithelium dependent effects due to  $\beta$ -methylcholin and arachidonic acid nor the release of prostanoids. Additionally, prostanoid concentrations were not significantly different after epithelium removal.

The epithelium dependent effects after stimulation with  $\beta$ -methylcholin were not inhibited by incubating with mentioned inhibitors, suggesting, that opiod receptors, benzodiazepine dependent mechanisms or nitrooxide (assumed to be a relaxant factor released from endothelial cells in the vascular system) are not involved in epithelium dependent relaxation of horses. Likewise, modification of sodium/potassium exchange could not influence effects of  $\beta$ -methylcholin. Otherwise, the addition of BRL39226 and the derivatives of amiloride did not affect precontracted bronchial preparations in an epithelium dependent manner.

The observed lack of effects on ATP addition to precontracted bronchial rings could probably be explained with the absence of purinergic receptors in this localisation of the equine bronchial tree (3rd and 4th generation bronchi).

Transfer assays employing supernatant fluids or cultured cells of human, equine or hamster epithelium failed to relax equine bronchial preparations denuded of epithelium.

Discussing our results with the observations of other investigators, we conclude, that airway epithelium of horses has a modulatory effect on smooth muscle tone. The active mechanisms underlying are ,probably, enzymatic degradation or release of relaxant factor(s) from the epithelium in response to  $\beta$ -methylcholin , arachidonic acid or bradykinine.

The release of prostanoids was unaffected by the removal of epithelium indicating that relaxant effects of the epithelial cells are not only due to the release of relaxing prostanoids (i.e. Prostaglandin E<sub>2</sub>), a mechanism which is supposed to be stimulated by the addition of exogen arachidonic acid or bradykinine. It is very likely, that  $\beta$ -methylcholin induced effects are caused by the release of a non-prostanoid relaxant factor from the epithelium.

In view of the fact, that epithelial responsivness was not altered significantly in horses with COB, we concluded, that the loss of epithelium-dependent modulatory effects may not primarily contribute to airway smooth muscle hyperreactivity occuring in horses with chronic airway disease. Finally it could not be ruled out, that in 3rd and 4th generation bronchi from horses, regulation of smooth muscle tone depends on mechanisms, which act mostly independent of epithelial involvement.