

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Pharmakologische Beeinflussung der
Bronchokonstriktion durch Clenbuterol, Cilomilast
und Beclomethason-dipropionat an „Precision Cut
Lung Slices“ beim Pferd**

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

vorgelegt von
Maria Carlotta Fugazzola
aus Rom

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. B. Ohnesorge
Klinik für Pferde

Univ.-Prof. Dr. M. Kietzmann
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Ohnesorge
Univ.-Prof. Dr. M. Kietzmann

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Literaturübersicht	12
2.1	Terminologie chronischer Lungenerkrankungen bei Menschen und beim Pferd	12
2.1.1	COPD und Asthma bronchiale	12
2.1.2	Chronisch obstruktive Bronchitis	13
2.2	COB	14
2.2.1	Ätiologie der COB	14
2.3	Regulation des Bronchotonus	15
2.3.1	Vegetative Innervation	15
2.3.1.1	Parasympathisches Nervensystem	15
2.3.1.2	Muskarinerge Rezeptoren	15
2.3.2	Sympathisches Nervensystem	17
2.3.3	Nicht-adrenerge nicht-cholinerge Innervation der Atemwege (NANC)	18
2.4	Lungendiagnostik	19
2.4.1	Klinische Untersuchung	19
2.4.2	Bronchoskopie	20
2.4.3	Tracheobronchialsekret-Analyse	20
2.4.4	Bronchoalveoläre Lavage	21
2.4.5	Blutgasanalyse	22
2.5	<i>In vitro</i> Modelle der Untersuchung von Lungenfunktion	22
2.5.1	Bronchialringe, Tracheal- und subpleurale Parenchymstreifen	22
2.5.2	Precision-Cut Lung Slices (PCLS)	23
2.5.3	Leukotriene als Bronchokonstriktoren	28
2.5.3.1	Leukotriene – Wirkungsmechanismen und Entzündung	31
2.5.4	Clenbuterol als Bronchodilatator	34
2.5.5	Beclomethason-dipropionat	37

Inhaltsverzeichnis

2.5.6	Allgemeine pharmakologische Eigenschaften der Glukokortikoide	37
2.5.7	Cilomilast.....	42
3	Material und Methode.....	47
3.1	Probanden	47
3.2	Versuchsablauf.....	47
3.2.1	Klinische Allgemeinuntersuchung und spezielle Atemwegsuntersuchung	48
3.2.2	Euthanasie und Entnahme des <i>Lobus accessorius</i>	51
3.2.3	Herstellung der PCLS.....	52
3.2.4	Mikroskopie und Feststellung der Vitalität der PCLS.....	53
3.2.5	Pharmakologische Versuche.....	54
3.2.6	End-Vitalitätskontrolle.....	56
3.2.7	Fotografische Auswertung.....	57
3.3	Statistik	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Probandengut	59
4.2	Pharmakologische Versuche	61
4.2.1	Bronchokonstriktion durch Leukotrien C ₄	61
4.2.2	LTC ₄ -Reihe nach Inkubation mit Beclomethason-dipropionat	63
4.2.3	LTC ₄ -Reihe nach Inkubation mit PDE4-Hemmer.....	64
4.2.4	LTC ₄ -Reihe nach Inkubation mit Clenbuterol.....	65
4.2.5	Vergleich der ersten mit der zweiten LTC ₄ Kontraktion der Kontrollgruppe	66
5	Diskussion.....	67
5.1	Probandengut, klinische Erkrankung und Reaktivität <i>ex vivo</i>	67
5.2	Herstellung und Vitalität der PCLS	69
5.3	Pharmakologische Versuche	70
5.3.1	Effekte von Leukotrien LTC ₄	70
5.3.2	Effekte von Beclomethason-dipropionat (BDP)	71
5.3.3	Effekte von PDE4-Hemmer	73
5.3.4	Effekte von Clenbuterol	76
6	Zusammenfassung.....	78

Inhaltsverzeichnis

7	Summary.....	80
8	Literaturverzeichnis	82
9	Anhang.....	98

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BDP	Beclometason-Dipropionat
BMP	Beclomethason-Monopropionat
cAMP	Zyklisches Adenomonophosphat
COB	chronische obstructive Bronchitis
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
COX-2	Cyclooxygenase 2
CysLT1	Cystenyl-Leukotrien-Rezeptor 1
CysLT2	Cystenyl-Leukotrien-Rezeptor 2
EC ₅₀	effektive Konzentration, die zu 50%igem Effekt führt
eNANC	excitatory non-adrenergic non-cholinergic system
FLAP	Five-lipoxygenase activating protein
GK	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
iNANC	inhibitory non-adrenergic non-cholinergic system
IAD	Inflammatory airway disease
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-1R	Interleukin 1R
IL-6R	Interleukin 6R
IL-11	Interleukin 11
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄

Abkürzungsverzeichnis

MCh	Metacholin
MIP1- α	macrophage inhibitory protein 1- α
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	nicht-steroidale Antiphlogistika
$P_{(A-a)}O_2$	Alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz
p_aCO_2	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
p_aO_2	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCLS	precision-cut lung slices
PDE	Phosphodiesterase
PDE4	Phosphodiesterase 4
PDE2	Prostaglandin E2
PGD2	Prostaglandin D2
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RAD	Reactive airway disease
RAO	Recurrent airway obstruction
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute Zellkulturmedium
Tab	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VIP	Vasointestinale Peptide
5-HPETE	5-Hydroperoxy-Eicosatetraenoic-Acid

1 Einleitung

Chronische Lungenerkrankungen spielen bei Equiden wie beim Menschen eine weiterhin wichtige Rolle. Die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes weist sowohl Elemente des Asthmas des Menschen als auch der meist durch Zigarettenrauch verursachten COPD auf (ROBINSON et al. 2000). Die entzündlichen Prozesse der COB des Pferdes beruhen auf verschiedenen Mediatoren, deren Wirkungsmechanismen nicht ausreichend bekannt sind.

Eine wichtige Mediatorengruppe sind die Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels Cys-Leukotriene, die im Lungengewebe als Lokalhormone fungieren. In einer Studie von SCHWALFENBERG (2007) wurde die Antagonisierung des Leukotriens C_4 (LTC_4) durch Leukotrienrezeptorantagonisten untersucht.

Ziel dieser Studie ist es, die Wirksamkeit verschiedener, bereits klinisch angewandter Bronchodilatoren bei der Antagonisierung von LTC_4 zu untersuchen und dadurch mehr über die Rolle der Leukotriene bei der COB-Erkrankung zu erfahren.

Als Bronchodilatoren wurden der β_2 -Agonist Clenbuterol und das Glukokortikoid Beclomethason-dipropionat untersucht. Bei der dritten untersuchten Substanz handelt es sich um Cilomilast, einen selektiven Phosphodiesterase-Hemmer zweiter Generation, der sich in der Humanmedizin in der klinischen Untersuchungsphase III befindet. Da die drei Wirkstoffe verschiedene Aktionsmechanismen besitzen, würde eine erfolgreiche Antagonisierung von LTC_4 weitere Zusammenhänge in der Signalkaskade der Entzündungsmediatoren erklären.

Die in dieser Studie angewandte Methodik der Precision Cut Lung Slices (PCLS) wurde von MARTIN et al. (1996) an humanen und murinen Lungenpräzisionsschnitten etabliert und bis heute weiterentwickelt. Sie ermöglicht, mit einer geringen Anzahl von Probanden eine große Menge vitalen Lungengewebes *ex vivo* zu gewinnen. In den letzten vier Jahren wurde diese Methodik beim Pferd ebenfalls etabliert und machte eine Vielzahl an Untersuchungen bezüglich der pharmakologischen Effekte von Bronchokonstriktoren und Bronchodilatoren möglich.

2 Literaturübersicht

2.1 Terminologie chronischer Lungenerkrankungen bei Menschen und beim Pferd

2.1.1 COPD und Asthma bronchiale

Nach dem Stand der Definition der WHO von 2008 versteht man unter der humanen COPD (chronic obstructive pulmonary disease) eine allmählich fortschreitende, nicht-allergische Atemwegserkrankung vor allem älterer Menschen, die nach mehrjähriger Inhalation von Umweltnoxen (meist Zigarettenrauch) auftritt. Sie ist charakterisiert durch eine Begrenzung des Atemflusses ohne volle Rückbildungsfähigkeit und ist keine eigenständige Krankheit, sondern umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die eine ähnliche Symptomatik zeigen.

Von einer COPD wird gesprochen, wenn eine oder mehrere der folgenden Erkrankungen vorliegen:

- chronisch obstruktive Bronchitis
- Lungenemphysem
- chronische Bronchitis mit asthmatischer Komponente

Klinisch ist sie gekennzeichnet durch persistierenden Husten; lungenfunktionell lässt sich eine wenig reversible, chronische Obstruktion der Atemwege nachweisen. Das histologische Bild ist durch Parenchymzerstörung, Epithelzellmetaplasie, Becherzellhyperplasie, Muskelhypertrophie und Schleimhautödem gekennzeichnet. Unter den Entzündungszellen dominieren Makrophagen, neutrophile Granulozyten und CD8-Lymphozyten. Als Mediatoren treten vor allem Acetylcholin, IL-8, Leukotrien B₄, TNF- α und verschiedene Proteasen in Erscheinung (NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE 2003, NATIONAL COLLABORATORY CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH 2004, CELLI et al. 2004).

Die chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung Asthma bronchiale dagegen ist charakterisiert durch anfallsartige Dyspnoe- oder Hustenattacken, die häufig saisonal

oder situationsbedingt auftreten, und so mit einer allergischen Diathese in Verbindung gebracht werden. Durch bronchiale Überempfindlichkeit wird dabei eine reversible Bronchialobstruktion ausgelöst. Histologisch sind lediglich Epithelzellschädigungen nachzuweisen, jedoch keine Zerstörung des Parenchyms. Im entzündlichen Infiltrat findet man vor allem Mastzellen, eosinophile Granulozyten und CD4+-Lymphozyten. Unter den Entzündungsmediatoren dominieren Histamin, Trypsin, Leukotriene, IL-4, IL-5 sowie Proteasen (SAETTA et al. 2001; GILLISSEN u. WELTE 2002)

2.1.2 Chronisch obstruktive Bronchitis

Der Terminus der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes wird in der englischen Literatur in verschiedenen Formen wieder gefunden. Kolloquial wird die Erkrankung oft als „Heaves“ bezeichnet. Begriffe wie RAD (reactive airway disease), SAD (small airway disease), PAD (peripheral airway disease) finden ebenso noch Verwendung.

In dem internationalen Arbeitstreffen führender Pferdepleumologen von 2000 an der Michigan State University wurde der Begriff COPD in der Pferdeheilkunde als nicht mehr aktuell bezeichnet. Das bisher unter den Namen COB, COPD oder Asthma bekannte Krankheitsbild einer chronischen Lungenerkrankung beim Pferd sollte also besser als RAO (recurrent airway obstruction) bezeichnet werden. Sie wird als Atemwegsobstruktion erwachsener Pferde, die sich bei Umgebungswechsel oder nach Gabe von Bronchodilatoren als reversibel erweist, definiert (ROBINSON 2001). Der deutsche Begriff COB erscheint jedoch umfassender und schließt auch subklinische, latente und stumme Bronchitisformen beim Pferd mit ein (OHNESORGE 2004; FEY 2006).

Die COB ist hinsichtlich Ätiologie, Pathogenese und klinischer Symptome ein komplexes Krankheitsgeschehen und zählt zu den häufigsten Lungenerkrankungen des Pferdes.

Charakterisiert ist sie durch eine reversible Bronchokonstriktion, die mehr Ähnlichkeit mit humanem Asthma besitzt als mit COPD, welche normalerweise mit der Inhalation von Zigarettenrauch vergesellschaftet ist (BARNES 2000; MAGNUSSEN et al. 1998)

und im Gegensatz zum humanen Asthma nicht reversibel ist (ROBINSON 2001; MAGNUSSEN et al. 1998).

Zu unterscheiden und abzugrenzen von der COB ist die inflammatory airway disease (IAD), die vor allem bei jungen, trainierten Pferden gesehen wird. Die Ursachen für diese Erkrankung sind noch nicht ausschöpfend geklärt. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IAD und COB konnte bislang nicht nachgewiesen werden (ROBINSON et al. 2000; HODGSON 2002).

2.2 COB

2.2.1 Ätiologie der COB

Die chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung bei der eine dauerhafte Exposition mit inhalierten organischen Partikeln die auslösende Rolle zu spielen scheint. Die Komplexität der Interaktion und die Bedeutung der einzelnen Faktoren ist weiterhin Studienmaterie vieler wissenschaftlicher Untersuchungen (MCGORUM u. PIRIE 2008). Die ausgelöste Hyperreagibilität und Entzündung nach der Inhalation von Antigenen ist großteils verantwortlich für die Veränderungen der Struktur des Lungenparenchym, der glatten Atemwegsmuskulatur und dessen Funktion. Weiterhin zeichnet sie sich durch Rekrutierung und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und der T-Zellen sowie durch eine Hypersekretion (CUNNINGHAM u. DUNKEL 2008) aus. Die aktivierten polymorphkernigen Granulozyten setzen weiter vermehrt Entzündungsmediatoren frei (v.a. LTB4 spielt beim Pferd eine Rolle), die ihrerseits die Entzündung des Epithels verstärken und lokale Umbauvorgänge aktivieren.

Als Risikofaktoren werden initiale Noxen, wie virale Infektionen der Atemwege sowie chemische und physikalische Reize herangezogen. Neuere Studien bringen zusätzlich die Hypothese auf, dass auch eine genotypische Disposition der Individuen sowie das Alter (>7 Jahre), zur Entwicklung einer Allergie beitragen könnten. (EDER et al. 2001) (HOTCHKISS et al. 2007) Die Vererbbarkeit dieser Krankheit bleibt weitgehend noch zu erforschen. (MARTI et al. 1991; EWART u. ROBINSON 2007; GERBER et al. 2008).

2.3 Regulation des Bronchotonus

2.3.1 Vegetative Innervation

2.3.1.1 Parasympathisches Nervensystem

Das parasympathische Nervensystem ist der nervale Hauptmechanismus zur Regulation der Bronchialweite. Dies gilt sowohl für den Menschen als auch für die meisten bisher untersuchten Tierspezies (MINETTE u. BARNES 1990).

Die rasche Abnahme des pulmonalen Widerstandes und die Zunahme der Lungencompliance nach Blockade der muskarinergen Rezeptoren durch Atropin bei an COB erkrankten Ponies legen nahe, dass ein Großteil des Bronchospasmus auch beim Pferd durch parasympathische Mechanismen vermittelt wird (BROADSTONE et al. 1988).

2.3.1.2 Muskarinerge Rezeptoren

Acetylcholin (Ach) als Überträgerstoff des parasympathischen Nervensystems reagiert an prä- und postsynaptischen Membranen mit muskarinergen Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind nicht homogen. Sie lassen sich nach ihrem molekularen Aufbau, der Art der Signaltransduktion und der Affinität unterschiedlicher Liganden verschiedenen Subtypen zuordnen (LÜLLMANN et al. 1996). Beim Pferd sind fünf Rezeptorsubtypen bekannt, von denen vier mit Hilfe verschiedener subtypspezifischer Antagonisten nachgewiesen werden konnten (VAN NIEUWSTADT et al. 1997, TÖRNEKE et al. 2002, MATERA et al. 2002). Es ist bekannt, dass die Spezifizierung der einzelnen Subtypen schwierig ist, da für ihre Ermittlung nur semiselektive Substanzen zur Verfügung stehen (TÖRNEKE et al. 2002).

M1-Rezeptoren finden sich an Nervenzellen, wo sie an der Überleitung der Aktionspotentiale beteiligt sind (VAN NIEUWSTADT et al. 1997). Der M2-Rezeptor ist sowohl präsynaptisch an der Nervenfaser als auch postsynaptisch an der glatten Muskulatur lokalisiert. An der Nervenfaser hemmen die präsynaptischen Rezeptoren

im Sinne eines negativen Feedback die Acetylcholinausschüttung. Postsynaptisch mindern sie die Fähigkeit der α -Rezeptor-Agonisten, die Muskelfaser zu dilatieren. Zusätzlich können sie unabhängig von den α -Adreno-Rezeptoren die Bronchokonstriktion durch eine Erhöhung der Ca^{++} -Sensibilität positiv beeinflussen (TÖRNEKE et al. 2002).

Hinsichtlich der Vermittlung einer Konstriktion der glatten Muskulatur in der Trachea gilt der M3-Subtyp als wichtigster Rezeptor (YU et al. 1992, EGLIN et al. 1996). Bei Erregung des Rezeptors kommt es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels (EGLIN et al. 1996). Es wird angenommen, dass der M4-Subtyp einen präsynaptischen Rezeptor darstellt, der die Ausschüttung des Acetylcholins aus den Nervenendigungen steuert (WANG et al. 1995).

Die Bedeutung der M2- und M4-Rezeptoren der Atemwege für das Pferd ist noch nicht hinreichend geklärt. YU et al. (1992) fanden keine Anzeichen für ein Vorhandensein präsynaptischer M2 Rezeptoren beim Pferd, schlossen aber deren Existenz nicht aus.

Studien über die Verteilung muskarinergere Rezeptoren entlang der Atemwege beim Pferd zeigen, dass es keinen Gradienten von der Trachea bis zu den kleinen Bronchien gibt. Die Anzahl ist auf jedem Level etwa gleich. Die Exprimierung der einzelnen Subtypen in der glatten Muskulatur der Trachea zeigt eine Dominanz der M2- und M4-Rezeptoren (TÖRNEKE et al. 2002).

Eine Charakterisierung der Subtypen in Trachea, Bronchien und Lungenparenchym mittels Radioligandbindungsstudien wurde von ABRAHAM et al. (2003) durchgeführt. In den Membranen von Tracheal- und Bronchalepithel mit darunterliegender glatter Muskulatur ist der M2 Rezeptor höher exprimiert als der M3 Rezeptor (80%:20%, M2:M3). Dagegen wurde in den tiefen Atemwegen eine ausgewogene Verteilung von M1, M2 und M3 Rezeptoren gefunden.

2.3.2 Sympathisches Nervensystem

Zum sympathischen System gehört sowohl die direkte Innervation, bestehend aus Fasern des Ganglion cervicothoracicum und Fasern des Brustteiles des Truncus sympathicus, als auch die humorale Beeinflussung durch die Nebennierenrinde. Im nervalen System dient dabei Noradrenalin als Neurotransmitter, als zirkulierendes Hormon wird Adrenalin von der Nebennierenrinde freigesetzt. Man geht davon aus, dass der Einfluss des Sympathikus auf die equinen Atemwege geringer ist als der des Parasympathikus (MATERNA et al. 2002). Begleitet von den cholinergen bilden die adrenergen Nervenfasern ein Netzwerk um Gefäße, Drüsen und glatte Muskulatur. Dabei werden vor allem die großen Bronchien und die Blutgefäße adrenerg innerviert (SONEA et al. 1993). Die Wirkung erfolgt hier über die Aktivierung von α - und β -Adrenorezeptoren. Drei Subtypen der β -Adrenorezeptoren (β_1 - β_3) sind bekannt, von denen der β_2 -Rezeptor unter anderem auf der glatten Bronchialmuskulatur lokalisiert ist, und so für den Bronchotonus die wichtigste Rolle unter den verschiedenen Subtypen einnimmt. Durch seine Aktivierung kommt es zur Erniedrigung des intrazellulären Calciumgehaltes und zur Bronchodilatation (JOHNSON 1998). Außerdem spielt die Aktivierung der β_2 -Rezeptoren bei der adrenergen Modulation der cholinergen Innervation eine Rolle (s. unten, ZHANG et al. 1996). Auch β_1 -Rezeptoren konnten auf der glatten Muskulatur von COB-erkrankten Ponies nachgewiesen werden, deren Aktivierung jedoch nicht zur Relaxation der Muskulatur führt.

Funktionell und immunhistochemisch lassen sich die zwei Subtypen α_1 und α_2 der α -Adrenorezeptoren unterscheiden (BARNES et al. 1983). An der Bronchialmuskulatur des Meerschweinchens konnte gezeigt werden, dass über eine Aktivierung der α_1 -Rezeptoren eine Bronchokonstriktion ausgelöst wird. Die Aktivierung des gleichen Subtypes bei COB-erkrankten Ponies hat jedoch nur eine minimale Verengung des Bronchiallumens zur Folge (SCOTT et al. 1988). Der α_2 -Subtyp befindet sich, genau wie Rezeptoren vom β_2 -Subtyp, auf cholinergen Nervenfasern, wobei der α -Rezeptor weitaus häufiger vorkommt (ZHANG et al. 1996). Durch Aktivierung dieses präganglionären Adrenorezeptors kommt es zu einer Verminderung der ACh-Freisetzung und somit zur Minderung des

parasympathischen Tonus (LEBLANC et al. 1993, ZHANG et al. 1995, YU et al. 1993). Wird dagegen der equine β 2-Rezeptor angesprochen, erhöht dieser die ACh-Freisetzung, im Gegensatz zu Beobachtungen bei vielen anderen Spezies. An cholinergen Nervenfasern verstärkt er also die Wirkung des parasympathischen Systems (ZHANG et al. 1996).

2.3.3 Nicht-adrenerge nicht-cholinerge Innervation der Atemwege (NANC)

Neuronale Reaktionen der Atemwege, die weder durch Adreno-Rezeptorantagonisten noch durch Cholino-Rezeptorantagonisten blockiert werden können, bezeichnet man als nicht-adrenerg nicht-cholinerg (NANC) (MATERA et al. 2002). Hierbei gibt es das inhibitorische NANC (iNANC) mit Stickstoffmonoxid (NO) als Neurotransmitter und das exzitatorische NANC (eNANC) mit dem Überträgerstoff Substanz P und einigen Co-Transmittern.

Die Nervenfasern des eNANC bilden ein Netzwerk direkt unterhalb des respiratorischen Epithels, das sie mit einigen Fasern durchbrechen (MATERA et al. 2002). Der Hauptanteil dieser sensorischen Fasern findet sich allerdings nicht in der glatten Bronchialmuskulatur selbst, sondern in dem direkt umgebenden Gewebe (SONEA et al. 1994). Die Effekte des eNANC bestehen in Vasodilatation, erhöhter Kontraktilität der glatten Muskulatur, Aktivierung von Entzündungszellen und Schleimhautsekretion.

Die inhibitorische Innervation der glatten Muskulatur der Trachea und der Stammbronchien wird zum großen Teil durch das iNANC vermittelt (YU et al. 1994). Stickstoffmonoxid (NO) gilt als Neurotransmitter des iNANC (DERKSEN u. ROBINSON 2002, MATERA et al. 2002). Die physiologische Bedeutung des NO für das Pferd ist unklar (DERKSEN u. ROBINSON, 2002). MATERA et al. (2002) sehen die Funktion des NO in der Antagonisierung der parasympathischen Neurotransmission und der Modulation der sensorischen Nervenfasern. Bedingt durch erhöhtes Niveau freier Sauerstoffradikale, die als Folge der Entzündungsreaktion auftreten, scheint bei COB Patienten das iNANC durch einen

raschen Abbau des NO gestört zu sein. (DERKSEN u. ROBINSON, 2002; MATERA et al. 2002).

2.4 Lungendiagnostik

2.4.1 Klinische Untersuchung

Bereits aus dem Vorbericht lassen sich einige Hinweise auf eine COB entnehmen. Die Pferde fallen zumeist mit einer Leistungsschwäche auf (ROBINSON et al. 1996). Die Symptomatik verstärkt sich unter dem Einfluss verschiedener Umweltantigene, bzw. bei Verbesserung der Umweltbedingungen verbessert sich auch der Zustand des Patienten (THOMSON u. MCPHERSON 1984; DIXON et al. 1995).

Zu Beginn der Untersuchung des Atmungsapparates werden Frequenzen, Typus, Rhythmus und Qualität der Atmung festgestellt, um bereits durch diese einfachen klinischen Parameter Hinweise auf eine eventuell vorliegende Dyspnoe zu erhalten. Das COB-erkrankte Pferd zeigt bei der klinischen Untersuchung typischerweise eine erhöhte Atemfrequenz, der Atemtyp ist vermehrt abdominal und der Rhythmus eventuell doppelschlägig. Hinweise auf eine inspiratorische Dyspnoe ergeben sich aus einer verlängerten Einatmung, dem Einsinken der Intercostalräume, sowie Nüsternblähen. Auf eine expiratorische Dyspnoe lässt sich durch verlängerte Ausatmung, Doppelschlägigkeit, Dampfrippenbildung und Afteratmung schließen (DEEGEN u. ZICHNER 1970). Beim COB-Patienten liegt häufig mukopurulenter Nasenausfluss vor und die Mandibularlymphknoten sind unter Umständen vergrößert. Husten ist auslösbar oder tritt spontan auf. Auskultatorisch lässt sich oft ein Rasseln oder Giemen vernehmen, das sich nach Atemstimulation verstärkt. Bei der Perkussion stellt sich das Lungenfeld vergrößert dar, und es schließt sich eine Zone überlauten Schalls an (LEGUILLETTE 2003, BEECH 1991).

2.4.2 Bronchoskopie

Durch die Verwendung flexibler Faseroptiken in Kombination mit Video-Endoskopiertechnik ist sie ein wichtiges diagnostisches Mittel für Atemwegserkrankungen geworden (TAYLOR u. HILLYER 2001). Es lassen sich dabei die Schleimhaut (Farbe, Gefäßzeichnung, Oberflächenbeschaffenheit) und das Sekret beurteilen. Hinsichtlich Menge und Viskosität des Bronchialschleimes nehmen beide Parameter beim COB-Patienten mit steigender Krankheitsschwere zu (DIECKMANN u. DEEGEN 1990). Bei schweren Erkrankungen liegt zusätzlich eine Ödematisierung der Schleimhaut vor, was während der Bronchoskopie besonders durch eine Verbreiterung der Carina trachea deutlich wird. Für diese Untersuchung müssen die Pferde mittels einer Oberlippenbremse oder einer Sedation mit α 2-Agonisten ruhig gehalten werden.

2.4.3 Tracheobronchialsekret-Analyse

Bei Tieren, die lediglich unter einer Leistungsschwäche leiden, kann die Analyse des während der Bronchoskopie entnommene Tracheobronchialsekretes (TBS) Hinweise auf eine COB geben (BEECH 1975, MAIR 1987).

Bei einer COB bestimmen neutrophile Granulozyten das Zellbild (DERKSEN 1993). Ihre Anzahl nimmt mit der Schwere der Erkrankung zu. Auch Mastzellen und Makrophagen kommen gehäuft vor. Letztere nehmen bei mittelgradigen Erkrankungen zunehmend schaumiges Aussehen an, was sich auf vermehrte Phagozytose von nicht abtransportiertem Surfactant zurückführen lässt (DIECKMANN und DEEGEN 1988). Neben den Entzündungszellen finden sich Curschmann-Spiralen, die als Folge von Sekretstase aus Schleimausgüssen der terminalen Bronchien entstehen (DIECKMANN und DEEGEN 1990). Vermehrt abgestoßene Basalzellverbände deuten auf eine Schleimhautmetaplasie hin (DECONTO 1983), während verstärkt nachgewiesene Becherzellen einen Hinweis auf eine Dyskrinie geben (BRUNNER und DIX 1987). Eosinophile Granulozyten werden überwiegend bei parasitären Erkrankungen (*Dictyocaulus arnfieldi*)

gefunden. Bei Pferden mit Epistaxis finden sich Makrophagen mit Hämosiderin-Einschlüssen.

Quantitative Aussagen über die Ausdehnung eventueller Veränderungen sind durch die TBS-Analyse nur sehr eingeschränkt möglich. Beleg dafür ist eine Studie von DERKSEN et al. (1989) in welcher TBS-Ergebnisse von 50 an COB erkrankten Pferden mit denen einer BALF-Analyse verglichen wurden und keine Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt werden konnte. Die TBS-Analyse kann also nur einen Hinweis auf die Zusammensetzung der Zellpopulation geben; in Qualität oder Quantität repräsentiert sie jedoch nicht die Verhältnisse der tiefen Atemwege.

2.4.4 Bronchoalveoläre Lavage

Mit der bronchoalveolären Lavage ist es möglich aus den distalen Atemwegen Proben zu entnehmen. Da sie oft als diagnostisches Mittel für diffuse und/oder chronische Erkrankungen eingesetzt wird, wird die Probe als repräsentativ für die ganze Lunge bewertet, unabhängig von welcher Lungenseite sie entnommen wurde (MCGORUM et al. 1993a). Die Proben werden zytologisch untersucht, in einigen Fällen auch angezüchtet. Die Technik ermöglicht zytologische Veränderungen bei chronischen Lungenerkrankungen zu erkennen, wobei bei einer COB neutrophile Granulozyten (>25%) das Zellenbild bestimmen (MCGORUM et al. 1993b; SCHUSSER et al. 1999). In einer Studie von AINSWORTH et al. (2003) wurden COB erkrankte Pferde mit einer Kontrollgruppe verglichen. Es wurde in der lungenkranken Gruppe eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten diagnostiziert. Auch pro-inflammatorische Zytokine wie IFN-gamma und IL-8 waren 2,5 bis 3-mal erhöht in der COB Gruppe. (AINSWORTH et al. 2003). Die bronchoalveoläre Lavage bewährt sich somit als hilfreiches diagnostisches Mittel.

2.4.5 Blutgasanalyse

Die Blutgasanalyse kann sinnvoll eingesetzt werden, um Hinweise auf die Schwere der Erkrankung zu erlangen (WEIDELI 1981). Sie gibt an ob der Gasaustausch in den Lungenalveolen gestört ist. Relevante Parameter zur Beurteilung einer COB Erkrankung des Probanden sind der arterielle Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2), der arterielle Kohlendioxidpartialdruck (p_aCO_2), die alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($p_{(A-a)}O_2$) sowie zur Beurteilung des Säure-Base-Haushaltes pH, Base Excess (BE) und HCO_3 . Im Untersuchungsscore nach OHNESORGE et al. (1998) wird eine erhöhte $p_{(A-a)}O_2$ (> 7 mmHg) bei gleichzeitig ausgeglichenem Säure-Basehaushalt berücksichtigt.

2.5 *In vitro* Modelle der Untersuchung von Lungenfunktion

2.5.1 Bronchialringe, Tracheal- und subpleurale Parenchymstreifen

Die provozierte bronchiale Reaktivität kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgestellt werden. Die letztere bietet die Möglichkeit, den Ablauf der Bronchokonstriktion bis ins Detail nachzuvollziehen. Somit kann der Einfluss verschiedener Pharmaka auf das Lungengewebe und die Atemwege untersucht werden. Die Muskel- bzw. Gewebestreifen werden dabei durch elektrische Feldstimulation (EFS) zur Kontraktion angeregt. Bronchialringe und Trachealmuskelstreifen sind relativ einfach zu präparieren, die Ergebnisse können aber nicht ohne weiteres auf weiter distal gelegene Abschnitte des Atmungstraktes übertragen werden. Parenchymstreifen liefern hingegen Ergebnisse vom eigentlichen Lungengewebe, die Reaktionen verlaufen jedoch deutlich indifferenter. OLSZEWSKI et al. (1997) zeigten, dass die kontraktile Reaktion von Lungenparenchym auf applizierte Spasmogene deutlich geringer ausfiel als die Reaktion isolierter Atemwege. Sie vermuteten eine geringere Anzahl kontraktiler Elemente.

Bronchialringe und subpleurale Parenchymstreifen zeigen nach Sensibilisierung mit Ovalbumin eine Kontraktion in der Challengereaktion (NAGASE et al. 1995). ZHANG et al. (1996) untersuchten die Wirkung verschiedener Katecholamine auf die Acetylcholinfreisetzung aus parasymphatischen Nervenendigungen an equinen

Trachealstreifen. Epinephrin und Norepinephrin hemmten konzentrationsabhängig die Freisetzung von Acetylcholin (ACh). Isoproterenol, ein selektiver β -Adrenoceptor-Agonist, verstärkte dagegen die Freisetzung von ACh. Dieser Effekt konnte durch einen β_2 -Antagonisten aufgehoben werden, nicht jedoch durch einen β_1 -Antagonisten. β_2 -Agonisten hemmen bei anderen Tierarten präsynaptisch die cholinerge Neurotransmission, und führen so zur Relaxierung der glatten Muskulatur. Beim Pferd hingegen trat das Gegenteil ein (siehe auch iNANC). ZHANG et al. schlossen daraus, dass equine Atemwege von hemmenden α_2 - und erregenden β_2 -Adrenozeptoren moduliert werden, wobei erstere eine grössere Rolle spielen.

Yu et al. (1994) benutzten das Modell der Bronchialringe, um die vier Mechanismen, die beim gesunden Pferd die glatte Muskulatur der Atemwege modulieren, bei Pferden mit obstruktiven Atemwegserkrankungen zu untersuchen. Sie stellten dabei eine Dysfunktion des iNANC, eine verringerte cholinerge Aktivierung, die erhöhte Produktion des „epithelial-derived relaxing factor“ (EDRF) und eine hemmende Wirkung der Prostanoiden fest.

2.5.2 Precision-Cut Lung Slices (PCLS)

Nach den ersten Herstellungen von Lungenschnitten von DANDURAND et al. (1993), um die Bronchokonstriktion zu untersuchen, wurde die Methodik der Präzisionslungenschnitte von MARTIN et al. (1996) an Rattenlungen verbessert. Sie ermöglichte zum ersten Mal Lungenschnitte mit einer konstanten Größe von $250 \pm 20 \mu\text{m}$ zu schneiden und somit die Präzision und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über die Kontraktilität von Atemwegen verschiedener Größe zu gewährleisten. Durch einige Modifizierungen der Methodik etablierten VIETMEIER (2004), BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007) die Methode der PCLS auch für das Pferd. Dank der Möglichkeit von einem Tier bis zu 40 Lungenschnitte herzustellen bringt diese *ex vivo* Methodik den Vorteil mit sich, ein reduzierteres Probandengut zu benötigen.

Abweichend von der von MARTIN et al. (1996) beschriebenen Technik ist es aufgrund der Größe der Pferdelunge nicht möglich, diese komplett mit Agarose zu befüllen; die Entnahme und Befüllung des *Lobus accessorius* erweist sich jedoch als

praktikabel. Auch gelingt es nicht, aus Lungenlappen jeden Pferdes PCLS herzustellen. So stellten sich Proben von Tieren in Schockzuständen oder *intra operationem* gewonnene Gewebe als ungeeignet heraus (BARTON 2005). Die Autoren vermuten hier als Ursache eine Überdehnung der Bronchien während der Beatmung in Narkose, bzw. einen Energiemangel der Muskulatur aufgrund der allgemeinen metabolischen Belastung des Organismus im Schockzustand (BARTON 2005).

Als Indikatoren der Vitalitätsparameter der PCLS können, wie von MARTIN et al. (1996) gezeigt, ein visuell feststellbarer Zilienschlag, sowie eine deutlich sichtbare Kontraktion nach Methacholinapplikation (10^{-3} mol/l) benutzt werden (VIETMEIER 2004). Auch die übrigen Kriterien für die Eignung der PCLS für pharmakologische Studien (exakt horizontaler Anschnitt des Bronchus, Kontinuität der Bronchialwand, klar abgrenzbare Epithelgrenzen, keine Vorkontraktion), stimmen mit denen von MARTIN et al. (1996) bereits festgelegten Kriterien überein (SCHWALFENBERG 2007).

Das Untersuchungsmodell erweist sich auch an der Pferdelunge als geeignet, die Wirksamkeit verschiedener bronchokonstriktorischer Substanzen zu testen, so dass Dosis-Wirkungsbeziehungen für Methacholinhydrochlorid und Histaminhydrochlorid ermittelt werden konnten (VIETMEIER 2004). Der Verlauf der Kontraktionskurve für Methacholin ist dabei vergleichbar mit dem an PCLS aus humanen Lungen (WOHLSEN et al. 2003) und Mäuselungen (MARTIN et al. 1996). Der Verlauf ist hier im Vergleich zu Methacholin etwas flacher, was VIETMEIER (2004) auf die höhere Wirkungspotenz des Methacholin im Gegensatz zu Histamin und den unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Substanzen zurückführt (VIETMEIER 2004).

Die Möglichkeit, die Hemmung der Bronchokonstriktion an der Pferdelunge zu untersuchen, wurde in zwei weiterführenden Studien aufgezeigt (BARTON 2005, VIETMEIER 2004). In der ersteren wurden als Bronchokonstriktoren auch hier Metacholin und Histamin genutzt, als Antagonisten Parasympatholytika, Histamin-Rezeptorantagonisten und PDE4-Hemmer. Um die hemmende Wirkung der Antagonisten zu untersuchen, wurden die PCLS für jeweils 30 Minuten mit dem

jeweiligen Antagonisten inkubiert, anschließend wurde eine Kontraktionsreihe (10^{-8} bis 10^{-5} mol/l für Metacholin, 10^{-8} bis 10^{-4} mol/l für Histamin) mit dem entsprechenden Bronchokonstriktor gegen eine Kontrollgruppe durchgeführt. Für die Methacholinantagonisten Atropin, Tiotropium und Ipratropium ergaben sich signifikante Rechtstverschiebungen der Konzentration, die zu einer 50%igen Bronchioluslumenreduktion führte im Vergleich zur Kontrolle. Die Hemmung stellte sich bei der mit Atropin behandelten Gruppe am deutlichsten dar (BARTON 2005).

Der PDE4-Hemmer Cilomilast führte bei vier von sechs Probanden ebenfalls zu einer Hemmung der Bronchokonstriktion. Auch hier war wegen großer interindividueller Streuung der Werte keine statistische Auswertung möglich (BARTON 2005). Bei allen Versuchen stellte sich heraus, dass die Streuung zwischen den einzelnen Tieren deutlich größer war als die innerhalb eines Individuums. Hierbei bleibt zu berücksichtigen, dass es sich, im Gegensatz zu unter Standardbedingungen gehaltenen Labortieren, um ein sehr inhomogenes Probandengut handelte (BARTON 2005).

Zwischen der klinischen Lungengesundheit der Probanden (ermittelt mit Hilfe des Score-Systems nach OHNESORGE et al. 1998) und der Reagibilität der Bronchien in den PCLS konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (BARTON 2005).

Festzuhalten bleibt jedoch, dass bei mittel- bis hochgradig an COB erkrankten Probanden (n=3) eine verzögerte Bronchodilatation im Vergleich zu gesunden bis geringgradig erkrankten Tieren (n=4) nach Methacholin-Provokation beobachtet wurde (VIETMEIER 2004).

Die Rolle von Leukotrien C_4 in der Bronchokonstriktion und die Möglichkeit, diese durch einen spezifischen Rezeptorenhemmer zu inhibieren, war Ziel der Studie von SCHWALFENBERG (2007). Hier wurden zwei Serien von Lungenschnitten drei Kontraktionsreihen unterzogen, in denen die Leukotriene in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-12} bis 10^{-4} mol/l) appliziert wurden. Vor der zweiten Kontraktionsreihe wurden die Lungenschnitte einer Serie für 30 Minuten mit dem Rezeptorantagonisten MK-571 (10^{-9} mol/l) inkubiert.

Leukotrien C_4 verursachte in allen vitalen PCLS eine konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion, die sich im Vergleich zum Ausgangslumen ab der Konzentration

von 10^{-8} mol/l signifikant darstellte. An Hand der zweiten Kontraktionsreihe wurde festgestellt, dass der Rezeptorantagonist MK-571 signifikant bei einer Inkubierungskonzentration von 10^{-9} mol/l die leukotrieninduzierte Bronchokonstriktion hemmt (SCHWALFENBERG 2007) und somit von den *in vivo* durchgeführten Untersuchungen, eine Bronchokonstriktion mit Leukotrienrezeptorantagonisten vorzubeugen (MARR et al. 1998b; LAVOIE et al. 2002; KOLM et al. 2003), abweichend ist. Unterschiedlich zu den Feststellungen von BARTON (2005) wurde in den Untersuchungen weiterhin deutlich, dass die Bronchien COB-erkrankter Pferde signifikant stärker auf Leukotrien C_4 reagieren als die gesunder Probanden. Allerdings gab es zwischen der Gruppe von gesunden Pferden und der an COB erkrankten Pferde keinen Unterschied in der Reaktion der Atemwege nach Hemmung der Bronchokonstriktion durch den Rezeptorantagonisten MK- 571. Nach der Autorin sei dies der insgesamt stark gehemmten Reaktion zurückzuführen (SCHWALFENBERG 2007).

Tab. 1: Zusammenfassung der bisher an PCLS von Pferden getesteten Bronchokonstriktoren und deren Inhibitoren

Broncho- konstriktor	Inhibitor	Wirkung des Inhibitors:	Signifikanz	Autor
Leukotrien C ₄	Leukotrienrezeptor- antagonisten	vorhanden	p = 0,0010	SCHWALFEN- BERG (2007)
Acethylcholin/ Methacholin	Cilomilast	nicht vorhanden	p = 0,623	BARTON (2005)
	Atropin	vorhanden	p = 0,0031	
	Ipratropium	vorhanden	p = 0,0058	
	Tiotropium	vorhanden	p = 0,0162	
Histamin	Diphenhydramin	nicht vorhanden	nicht auswertbar	
	Azelastin	nicht vorhanden	nicht auswertbar	

2.5.3 Leukotriene als Bronchokonstriktoren

Unter den verschiedenen Mediatoren, die in entzündlichen Atemwegserkrankungen involviert sind, werden Leukotriene zu den wichtigsten gezählt (LAVOIE 2007). Sie verursachen im Tracheal- bzw. Lungengewebe verschiedener Spezies eine Kontraktion der glatten Muskulatur (MARR et al. 1998a; WENZEL 2003).

Leukotriene gehören zur Familie der Lipidmediatoren, welche in akuten und chronischen Entzündungsreaktionen und Allergien involviert sind. Als körpereigene Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels wirken sie u.a. chemotaktisch, bronchokonstriktorisch und vasoaktiv (BISGAARD 2001). Die Freisetzung der als Bestandteil der Phospholipidschicht der Zellmembran vorkommenden Arachidonsäure (AA) erfolgt durch Aktivierung des Enzyms Phospholipase A₂. Die Umsetzung der AA zu Leukotrienen wird durch Lipoxygenasen katalysiert. Die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) wird Ca⁺⁺-abhängig in die Membran des Zellkerns verlagert und damit aktiviert (GLOVER et al. 1995). AA ist eine vierfach ungesättigte essentielle Fettsäure, die sich nach Freisetzung an das 5-Lipoxygenase-aktivierende-Protein (FLAP) bindet. Dieses 18 kDa große Protein befindet sich in der Membran des Zellkerns (MILLER et al. 1990) und besitzt eine weitere Bindungsstelle für die Arachidonsäure, so dass diese über das instabile Zwischenprodukt 5-Hydroperoxy-Eicosatetraenoic-Acid (5-HPETE) zu dem ebenfalls relativ instabilen LTA₄ metabolisiert werden kann. Die Enzymaktivität ist dabei an bestimmte Zelltypen gebunden, insbesondere an neutrophile und eosinophile Granulozyten, Thrombozyten und Makrophagen.

Im Weiteren kann das LTA₄ entweder durch Hydrolyse in neutrophilen Granulozyten oder mononuklären Phagozyten in LTB₄ verwandelt werden, oder es wird durch Kopplung mit Glutathion in eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen zu LTC₄ metabolisiert. Das LTC₄ wird anschließend mit Hilfe eines spezifischen Proteins (multidrug resistance-associated protein 1, MRP-1) unter Energieverbrauch an die Zelloberfläche transportiert. Hier katalysieren die Enzyme γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und γ -Glutamylleukotrienase (γ -GL) die Abspaltung von Glycylresten und so die Entstehung des LTD₄. Durch Dipeptidaseaktivität wird aus LTD₄ schließlich LTE₄ gebildet (siehe Abb. 1). Die kurze Halbwertszeit aller Leukotriene verdeutlicht ihre

Rolle als lokal wirkende Gewebshormone. Der Abbau erfolgt über drei verschiedene Wege: die Bildung von N-Acetylderivaten aus LTE_4 , die Reaktion der Leukotriene mit hypochloriger Säure zu Leukotrien-Sulfoxid und die ω -Oxidation und β -Elimination. Die Ausscheidung der Endprodukte erfolgt über den Urin und zu einem geringeren Anteil auch über die Galle. Dabei erscheinen 10% der Gesamtleukotriene als unverändertes LTE_4 im Urin und können als Maß der endogen gebildeten Gesamtleukotriene genutzt werden (PESKAR 2001, DRAZEN 1998, STRYER 1996, KANAOKA und BOYCE 2004).

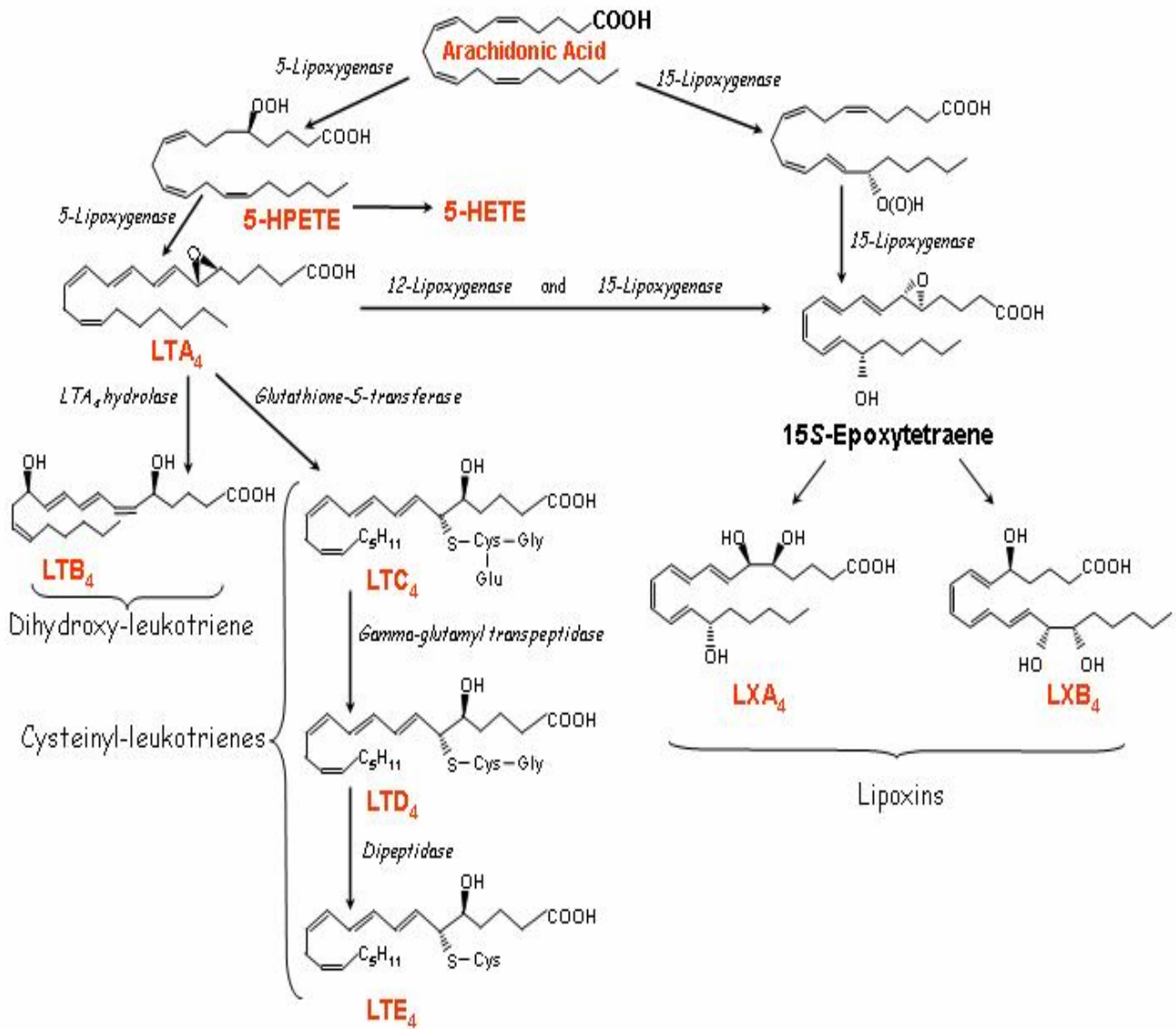


Abb. 1: Graphische Darstellung der Leukotrienkaskade bis LTB₄

Quelle : Groupe de Recherché et d'Etude des Médiateurs de l'Inflammation (www.gremi.asso.fr)

2.5.3.1 Leukotriene – Wirkungsmechanismen und Entzündung

Bisher sind zwei Oberflächenrezeptoren bekannt (CysLT₁ und CysLT₂), über welche Peptido-Leukotriene ihre Wirkung ausüben. Die Rezeptoren beider Typen gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und weisen den typischen Aufbau mit sieben Transmembran-Domänen auf. Als Ursache für die unterschiedliche Affinität verschiedener Liganden zu CysLT₁ und CysLT₂ wird ein abweichender Bau dieser Domänen vermutet, an welche die Liganden binden. Der genaue Vorgang der Leukotrienbindung an die Rezeptoren ist allerdings noch nicht bekannt. Viele Studien haben gezeigt, dass die Verteilung der Rezeptortypen in den Geweben unterschiedlich ist. CysLT₁-Rezeptoren befinden sich vor allem in der Lunge, der glatten Muskulatur und auf peripheren Blutzellen (Makrophagen, Leukozyten), wohingegen CysLT₂-Rezeptoren in Milz, Herz und zu geringeren Anteilen auch im Gehirn lokalisiert sind (DAHLEN 2000, HUI u. FUNK 2002; KANAOKA u. BOYCE 2004) .

LINDBERG et al. (2002) stellten fest, dass im equinen Lungenparenchym nur wenig LTB₄-Hydrolaseaktivität vorhanden ist und nahmen dies als Hinweis dafür, dass die Produktion der Leukotriene durch neutrophile Granulozyten stattfindet (LINDBERG et al. 2002). Auch die Feststellung dass in COB-erkrankten Pferden die LTB₄-Konzentration von BAL-Zellen nach Antigenexposition höher ist als in BAL-Zellen von lungengesunden Pferden, und dass dieser Anstieg gleichzeitig mit der Erhöhung der Neutrophilenzahl in der Lunge auftritt, würde für die Synthese der Leukotriene durch eingewanderte neutrophile Granulozyten sprechen (LINDBERG et al. 2002).

Die Rolle der Leukotriene bei der Bronchokonstriktion beim Pferd wurden von MARR et al. (1998a) untersucht. Nach 15 bis 60 Minuten Inhalation von LTB₄ (16,6 - 33,3 µg/ml) findet ein starker Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge statt. Dieser hält bis zu fünf Stunden an. Gleichzeitig stellten die Autoren durch Intrapleuraldruckmessung eine Erhöhung der maximalen Druckschwankung zwischen Ein- und Ausatmung (ΔP_{plmax}) fest, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant war. Diese Beobachtungen ließen die Autoren vermuten, dass LTB₄ am Entzündungsgeschehen der COB beteiligt ist (MARR et al. 1998a).

Auch in der Studie von SCHWALFENBERG (2007) konnte eine deutliche, konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion durch Applikation von LTC₄ ausgelöst werden. In diesem Fall fanden die Untersuchungen *ex vivo* an PCLS von 16 Pferden statt. Da die Umwandlung von LTC₄ in LTD₄, und schließlich in LTE₄ sehr schnell abläuft, lagen in diesem Versuch die Leukotriene in einem nicht näher quantifizierbaren Gemisch aus LTC₄, LTD₄ und LTE₄ vor (SCHWALFENBERG 2007). Als Begründung für eine deutlich stärkere Reaktion der Atemwege von COB-erkrankten Probanden auf Leukotrien C₄ als die der Atemwege gesunder Tiere sieht die Autorin eine unspezifische Hyperreagibilität der Atemwege als unwahrscheinlich an. Eine Erhöhung der CysLT1-Rezeptoren infolge der Zytokine und Entzündungsfaktoren kommen eher in Frage (SCHWALFENBERG, 2007).

Ex vivo zeigte SCHWALFENBERG (2007), wie Leukotrienrezeptorantagonisten in der Lage sind, die durch LTC₄ ausgelöste Bronchokonstriktion zu hemmen (SCHWALFENBERG 2007). Allerdings konnte dies *in vivo* von LAVOIE et al. (2002) nicht bestätigt werden. Vergleichsweise zu der Behandlung mit Dexamethason erbrachte die Behandlung von Pferden mit klinischen Anzeichen einer COB mit einem Leukotrienrezeptorantagonisten L-708,738 keine Besserung der Lungenfunktion. Eine unzureichende Plasmaspiegelkonzentration oder eine biologische Inaktivität des Antagonisten im Blut wurde durch Konzentrationsmessungen ausgeschlossen (LAVOIE et al. 2002).

Auch durch die Verabreichung des Leukotrienrezeptorantagonisten Montelukast an geringgradig an COB erkrankte Tiere kann keine Verbesserung der Lungenfunktion oder der arteriellen Blutgaswerte bewirkt werden. Allerdings liegt die Plasmakonzentration bei gleicher Dosierung pro kg Körpergewicht beim Pferd deutlich niedriger als die beim Menschen. Die Autoren vermuten beim Pferd eine schlechtere orale Bioverfügbarkeit (KOLM et al. 2003). Nach Feststellung der Wirksamkeit des Rezeptorantagonisten *ex vivo* an PCLS vermutet SCHWALFENBERG (2007), die Unwirksamkeit *in vivo* könne pharmakokinetisch zu begründen sein und nicht die Wirksamkeit beim Pferd ausschließen (SCHWALFENBERG 2007).

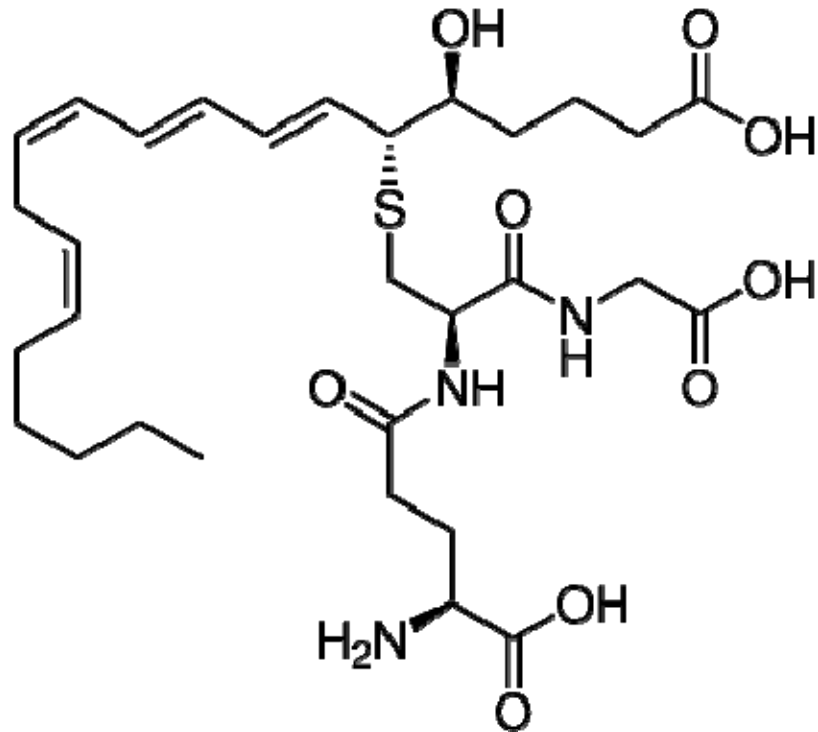


Abb. 2: Strukturformel von Leukotrien C₄.

2.5.4 Clenbuterol als Bronchodilatator

Clenbuterol ist ein β_2 -Rezeptor-spezifisches Sympathomimetikum, das als Bronchodilatator und Tokolytikum in der Tiermedizin Verwendung findet. Die therapeutische Dosis beim Pferd beträgt 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW oral oder intravenös zweimal täglich, die Halbwertszeit beträgt 20 Stunden nach i.v.-Applikation. Die Wirkungsdauer beim Pferd ist relativ lang, da die Halbwertszeit bei 20 Stunden liegt (LÖSCHER 2002). Nach einer Applikation (oral oder intravenös) von Clenbuterol in der oben genannten therapeutischen Dosierung, konnte bei Pferden mittels HPLC/ELISA im Serum bis zu 24 Stunden (i.v.) und 48 Stunden (oral) ein Nachweis erbracht werden. Im Urin gelang der Nachweis bis zu über vier Tage (Nachweisgrenze 0,04 ng/ml) (HAGEDORN et al. 1995).

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind periphere Vasodilatation und Herzfrequenzsteigerung (durch β_1 -Restwirkung, Freisetzung von Noradrenalin aus präsynaptischen β_2 -Rezeptoren und reflektorisch durch Blutdruckabfall), Muskeltremor und Schweißausbruch (direkte Anregung der Schweißdrüsen) (LÖSCHER 2002).

Neben seinem bronchodilatatorischen Effekt sind die entzündungshemmenden Eigenschaften von Clenbuterol in der Studie von LAAN et al. (2006) nachgewiesen worden. Bei sieben RAO-erkrankten Pferden wurden sowohl nach intravenöser Verabreichung von Clenbuterol als auch ohne provokative Inhalationstests mit Lipopolisacchariden, Heustaub suspensionen und Antigenen von *Aspergillus fumigatus* durchgeführt. Die Verbesserung der Lungenfunktion und eine verminderte Anzahl an eingewanderten neutrophilen Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit nach Verabreichung von Clenbuterol waren im Vergleich zu der nicht behandelten Gruppe signifikant. Auch verringerte Clenbuterol die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in den Makrophagen (LAAN et al. 2006). Dies bestätigt einen Teil der Ergebnisse von VAN DEN HOVEN et al. (2006), dass Clenbuterol die Expression von IL-10 mRNA, welche durch inhalierte Lipopolysaccharide induziert wurde, unterdrückt (VAN DEN HOVEN et al. 2006).

TÖRNEKE et al. (1998) untersuchten an isolierter equiner Trachealmuskulatur die mit Carbachol vorkontrahiert war, den bronchodilatatorischen Effekt von Clenbuterol,

Salbutamol und Terbutalin. Clenbuterol zeigt sich in seiner Wirkung fast so potent wie Isoprenalin (90%) und hatte eine höhere Affinität für vorhandene β -Adrenozeptoren im Vergleich zu Salbutamol und Terbutalin (TÖRNEKE et al. 1998). In einer früheren Studie hingegen reagierten nur 50 % der Muskelstreifen mit einer Relaxation nach einer Behandlung mit Clenbuterol (INGVAST-LARSSON 1991). In der letzteren Studie wurde jedoch eine geringere Konzentration an Carbachol verwendet, um eine Präkontraktion auszulösen. Nach den Autoren beweist dies, dass eine maximale Entspannung der Trachealmuskelstreifen durch Clenbuterol von der Konzentration des präkontrahierenden Carbachols abhängig ist (TÖRNEKE et al. 1998).

Ein weiterer Effekt der β_2 -selektiven Sympathomimetika ist es, die Flimmeraktivität und damit die Transportgeschwindigkeit des Sekrets zu erhöhen. Dies wurde zusammen mit einer stark sekretolytischen Wirkung erstmals an isolierten Atemwegspräparaten von Ratten, Hamstern und Katzen festgestellt (IRAVANI et al. 1974). TURGUT u. SASSE (1989) bestätigen die erhöhte Zilienaktivität und die Sekretolyse an gesunden und an COB erkrankten Pferden. Hinzu tritt eine Streckung und damit Dickenabnahme der Schleimschicht, was den Transport erleichtert (TURGUT u. SASSE 1989; DIXON 1992).

Clenbuterol (Ventipulmin®) ist der einzige in der Pferdemedizin zugelassene β_2 -Agonist, mit Indikation für Atemwegserkrankungen, welcher jedoch bei längerem Gebrauch zu einer reversiblen Toleranzentwicklung führt. Nach längerer Applikation von β_2 -selektiven Sympathomimetika kommt es zu einer Desensibilisierung (Down-Regulation) der β_2 -Rezeptoren. Auch Lymphozyten enthalten eine homogene Population an β_2 -Rezeptoren, die in Anzahl und Eigenschaften vergleichbar sind mit denen in anderen Geweben. Die Studien über Agonist-induzierte oder krankheitsbedingte Rezeptorveränderungen können an diesem Modell hinreichend durchgeführt werden. Bei einer Behandlung lungengesunder Pferde mit Clenbuterol in der empfohlenen therapeutischen Dosierung (0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW) kommt es innerhalb von 48 Stunden zu einer Abnahme der Dichte der lymphozytären β_2 -Rezeptoren um etwa 30-40%. Im Verlauf der Behandlung bleibt die Gesamtzahl auf diesem niedrigen Niveau. Nach dem Absetzen des Medikamentes werden die Ausgangswerte erst

nach 4 Tagen wieder erreicht (ABRAHAM et al. 2001). Dexamethason beschleunigte in dieser Studie das Ansteigen der β_2 -Adrenorezeptordichte, drei Tage nach Dexamethasongabe kam es sogar zur Verdopplung im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. Wurde Dexamethason gleichzeitig mit Clenbuterol gegeben, wurde der desensibilisierende Effekt vollständig aufgehoben.

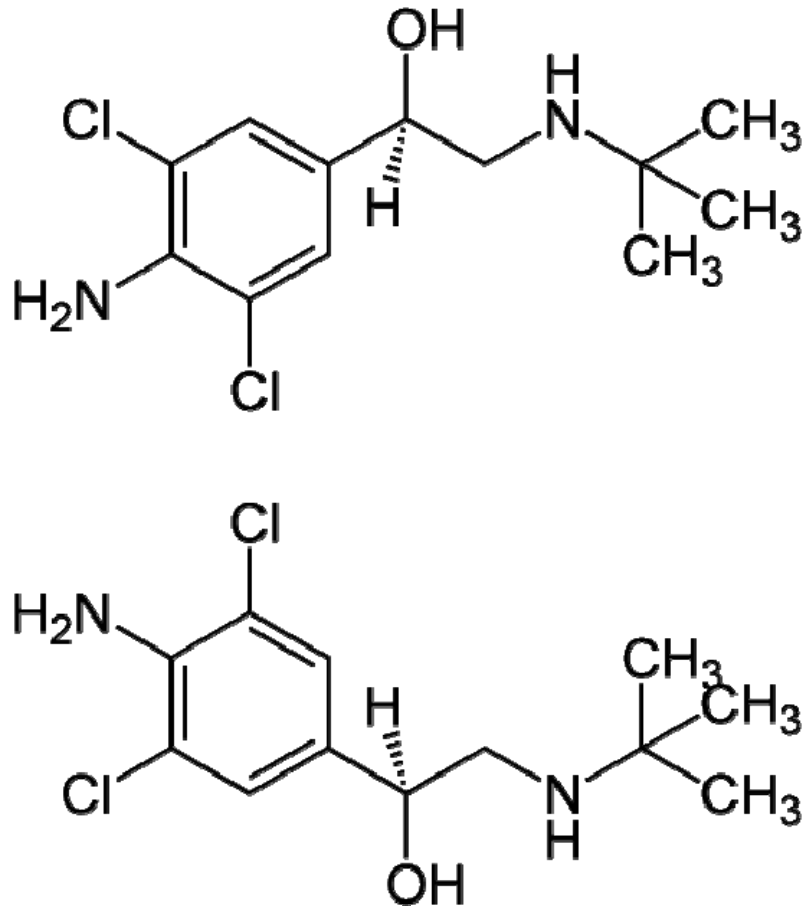


Abb. 3: Strukturformel von Clenbuterol

2.5.5 Beclomethason-dipropionat

2.5.6 Allgemeine pharmakologische Eigenschaften der Glukokortikoide

Als der Rheumatologe Hench im Jahre 1948 zum ersten Mal das Nebennierenrindenhormon Cortison einer Patientin mit chronischer Polyarthritits verabreichte entdeckte er dessen antiphlogistische Eigenschaften. Seitdem haben Glukokortikoide große therapeutische Bedeutung erlangt (BUTTGEREIT et al. 1998). Der präzise Wirkungsmechanismus der Glukokortikoide ist zur Zeit nicht völlig geklärt (WATSON et al. 2003; BARTHOLOME et al. 2004). Man unterscheidet zwischen drei grundsätzlich unterschiedlichen Wirkungsmechanismen (BUTTGEREIT et al. 2002) von welchen der klassische Mechanismus am besten charakterisiert ist:

- genomischer Mechanismus: Rezeptor-vermittelt (über zytoplasmatischen Glukokortikoid-Rezeptor) und von Proteinsynthese abhängig; dieser Mechanismus wird auch als klassischer Mechanismus bezeichnet.
- nicht-genomischer Mechanismus: Rezeptor-vermittelt und von Proteinsynthese unabhängig; kommt durch Interaktion des Glukokortikoid-Rezeptor (GR) mit verschiedenen Signal-Transduktionsmechanismen (*second messenger*) zustande. Die Mitbeteiligung eines membranständigen GR wird diskutiert.
- unspezifischer Mechanismus: es handelt sich um eine physiko-chemische Interaktion der Glukokortikoide mit der Plasmamembran.

Beim genomischen Mechanismus beeinflusst die Aktivierung eines zytoplasmatischen Glukokortikoid-Rezeptors nach Translokation in den Zellkern die Transkription Glukokortikoid-abhängiger Gene. Diese Gene, deren Transkription induziert wird (Transaktivierung), sind mit so genannten "glucocorticoid response elements" (GRE) assoziiert. Die Hemmung der Transkription (Transrepression) Glukokortikoid-abhängiger Genen kommt einerseits durch Bindung des GR an negative GRE (nGRE) zustande (SAKAI et al. 1988; MORRISON u. EISMAN 1993; SUBRAMANIAM et al. 1997), andererseits wird die Transkription durch die

Interaktion des GR mit anderen, an die DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren (wie z.B. AP-1, NF- κ B, p53 usw.), gehemmt. In Tabelle 2 sind am Beispiel von menschlichen Bronchialepithelzellen einige Funktionen, wie Produktion von Mediatoren und Expressionen von wichtigen Proteinen (VAN DER VELDEN 1998), dargestellt.

Tab. 2 : Einfluss von Glukokortikoiden auf die Produktion einiger Mediatoren, sowie der Expression einiger wichtiger Proteine am Beispiel von menschlichen Bronchialepithelzellen (VAN DER VELDEN 1998).

Protein	Beispiele	Glukokortikoid Effekt	klinischer Effekt
Zytokine	IL-1- β (IL-1 β)	↓	reduzierte Aktivierung von Leukozyten
	IL-6	↓	
	IL-11	↓	
	TNF- α	↓	
Chemokine	MIP-1- α	↓	
Rezeptoren (R)	IL-1-R	↓	
	IL-6-R	↑	
	β_2 -Rezeptor	↑	unklar
Enzyme	COX-2	↓	antiphlogistisch
	PLA ₂	↓	antiphlogistisch
Inhibitorische Proteine	Annexin	↑	reduzierte Synthese von Entzündungsmediatoren

(↑ = up-regulation; ↓ = down-regulation)

In der Therapie der COB des Pferdes haben sich systemisch verabreichte Glukokortikoide als erfolgreich erwiesen (RUSH 1998a). In der einer Dosierung von 1 mg/kg und 0,1 mg/kg jeweils für Prednisolon und Dexamethson haben sich diese am meisten verwendeten Kortikoide in vergleichenden Studien als gleich effektiv in der Behandlung der COB beim Pferden erwiesen (COUROUCE-MALBLANC et al. 2008). Auch bei pharmakokinetischen Untersuchungen von Prednisolon wurde eine hohe Plasmaproteinbindung gefunden (FREY 1987, LEW et al. 1993). Im Vergleich zur systemischen Behandlung bietet sich insbesondere die Inhalationstherapie an, da hierbei durch eine geringere Gesamtdosis die Belastung des Organismus sinkt, während lokal gute Wirkstoffspiegel erreicht werden (BUSCH 2002, LAVOIE 2003). Diese Art der Verabreichung ist in der Humanmedizin die hauptsächlich angewandte Therapie von Asthma bronchiale (BARNES 1998).

Zur Inhalationstherapie beim Pferd wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die Atomisierung der zu verabreichenden Flüssigkeiten kann durch pneumatische- oder Ultraschallnebulisatoren geschehen oder es erfolgt eine Inhalation von Aerosols mit einem metered-dose inhaler (MDI) oder dry powder inhaler (DPI) (DUVIVIER et al. 1997). Bei Pferden ist der MDI der einzig zugelassene Inhalator (MERCK 2008). In schweren Fällen kann die Inhalationstherapie auch in Kombination mit einer systemischen Verabreichung zum Einsatz kommen. Pferde tolerieren die Inhalation nach einer Gewöhnungsphase im Allgemeinen gut, haben ein großes Atemzugvolumen und atmen obligat durch die Nase (BARTON 2005). Die Effizienz, mit der ein Wirkstoff in die kleinen Atemwege gelangt (Partikelgröße), und die einfache Handhabung sind wichtige Faktoren bei dieser Therapieform.

In der Veterinärmedizin ist Beclomethason-dipropionat beim Pferd zum jetzigen Zeitpunkt nicht zugelassen. Beim Mensch konnte gezeigt werden, dass COPD-Patienten mit der Inhalation von Glukokortikoiden nicht nur wirksam sondern auch sicher behandelt werden können (TRAUB-DARGATZ et al. 1991; AMMANN et al. 1998; GIGUERE et al. 2002).

RUSH et al (1998) zeigte die Effizienz der Behandlung mit inhaliertem Beclomethason-dipropionat anhand zweier Studien. Als Kontrollgruppe wurde eine mit Dexamethason behandelte Gruppe verwendet. In der ersten Studie wurde die

klinische Funktion der Atemwege als Anhaltspunkt verwendet. Das Auswahlkriterium für die Probanden war eine induzierbare und reversible RAO. Bei allen 6 behandelten Pferden wurde eine signifikante Besserung der maximalen interpleuralen Druckdifferenz, dynamischen Compliance und mittleren Atemwegsresistance festgestellt (RUSH et al. 1998b). In ihrer fortführenden Studie untersuchten RUSH et al (1998) von denselben Pferden die zytologischen Befunde einer bronchoalveolären Lavage. Die mit Beclomethason-dipropionat behandelten Pferde zeigten eine sehr ähnliche Reduktion von neutrophilen Granulozyten im tiefen Lungengewebe wie die mit Dexamethason behandelten Pferde (RUSH et al. 1998a). Eine geringe Dosierung von 500 µg alle 12 Stunden war ausreichend, um eine klinische Besserung der Lungenfunktion zu bewirken und gleichzeitig die Suppression der Funktion der Nebenniere zu minimieren (RUSH et al. 2000). Die Anwendung und der Nutzen von inhaliertem Beclomethason-dipropionat ist auf seine hohe topische Potenz bezüglich Entzündungshemmung und seine geringe systemische Bioverfügbarkeit zurückzuführen (LIBRETTO 1995; BARNES 1998). Mögliche Wirkungen im Zusammenhang dieses Krankheitskomplexes sind also eine reduzierte Produktion von Entzündungsmediatoren und dadurch reduzierte epitheliale Schädigung, Potenzierung der bronchodilatatorischen Effekte von Katecholaminen, reduzierte Schleimproduktion sowie Reduktion der hypertrophierten glatten Muskulatur in den Bronchien.

Die chemische Grundlage für die topische glukokortikoide Potenz sind hoch lipophile Substituenten in 17 α , 16 α oder 17 β -Position im Steroidgerüst (SASTRE 1997). Diese chemischen Eigenschaften führen zu einer langen Halbwertszeit des Beclomethason-dipropionat/Rezeptor-Komplexes von 8,5 Stunden (im Vergleich zu Fluticason 8 - 12 Stunden und Triamcinolon 3,9 Stunden). Je länger ein GK an den GK-Rezeptor gebunden ist, desto potenter ist das GK. Dieser Wirkstoff gehört somit, zusammen mit Fluticason und weiteren GK zu einer Reihe äußerst potenter inhalativer Glukokortikoide (NEUMANN 1998).

Was die zeitliche Wirkung dieses Kortikosteroid betrifft, zeigte eine kürzlich erschienene Studie an humanen PCLS wie Beclomethason-Dipropionat (BDP) zu den kurzzeitwirkenden inhalativen Kortikosteroiden gehört. Die Metabolisation von vier

wichtigen inhalativen Kortikosteroiden, darunter auch Beclomethason-dipropionat wurde gemessen. Nach Applikation der Pharmaka auf die humanen Lungenschnitte wurden nach 2, 6 und 24 Stunden anhand von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie die Metaboliten und andere Restsubstanzen gemessen. Beclomethason-monopropionat und sein weiterer inaktiver Endmetabolit Beclomethason waren nach 24 Stunden am wenigsten nachweisbar (NAVE et al. 2007).

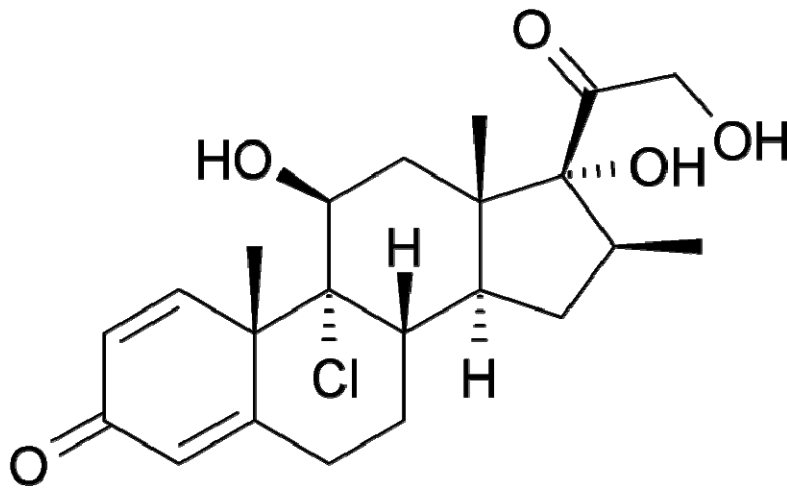


Abb. 4: Strukturformel von Beclomethason

2.5.7 Cilomilast

Cilomilast ist ein PDE4-Hemmer zweiter Generation mit antiinflammatorischer Auswirkung auf Bronchokonstriktion, Schleimhypersekretion und Gewebeumbau der Lunge im Zusammenhang mit COPD beim Menschen (MARTIN et al. 2002; KROEGEL u. FOERSTER 2007). Das Enzym Phosphodiesterase 4 spielt eine wichtige Rolle in der Modulation der cAMP-Aktivität. Dieser *second messenger* vermittelt und moduliert die Relaxierung der glatten Atemwegsmuskulatur und vermindert durch Unterdrückung der Aktivierung von Entzündungszellen die inflammatorische Antwort (KROEGEL u. FOERSTER 2007; MICHEL et al. 2007; CUNNINGHAM u. DUNKEL 2008). Es sind zurzeit 11 Isoenzyme von PDE bekannt und über 50 Isoformen, welche differenziert in fast allen Gewebe der Säugetiere exprimiert werden. Dies bietet eine gute Möglichkeit für selektive Inhibition an (BOSWELL-SMITH et al. 2006). PDE3 und PDE4 scheinen von besonderem Interesse zu sein, da PDE3 in der glatten Atemwegsmuskulatur und PDE4 zusätzlich auch in den Leukozyten zu finden ist (DEBOER et al. 1992; RABE et al. 1993). Selektive Inhibitoren der PDE4 zeigen ein breites Wirkungsspektrum in Tiermodellen von Asthma und COPD. Wegen ihres hemmenden Effekts auf die Hydrolyse von cAMP durch Inhibition der PDE4 sind diese Inhibitoren als neue entzündungshemmende Pharmaka von zunehmendem Interesse.

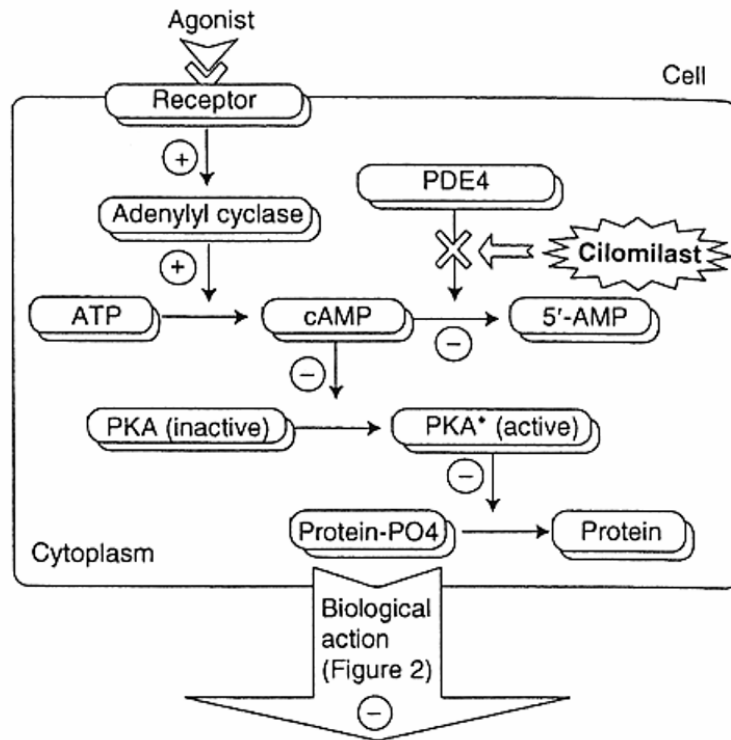


Abb. 5: Modulation des intrazellulären cAMP *second messenger* über den PDE4-Hemmer Cilomilast (KROEGEL u. FOERSTER 2007)

PKA: cAMP abhängige Proteinkinase A.

Biological action: Bronchokonstriktion

Zum jetzigen Zeitpunkt befinden sich zwei PDE4-Hemmer zweiter Generation als Therapie für humane COPD und Asthma Patienten in der klinischen Prüfungsphase (KROEGEL u. FOERSTER 2007). Das am meist fortgeschrittene Präparat ist der selektive PDE4-Hemmer Cilomilast.

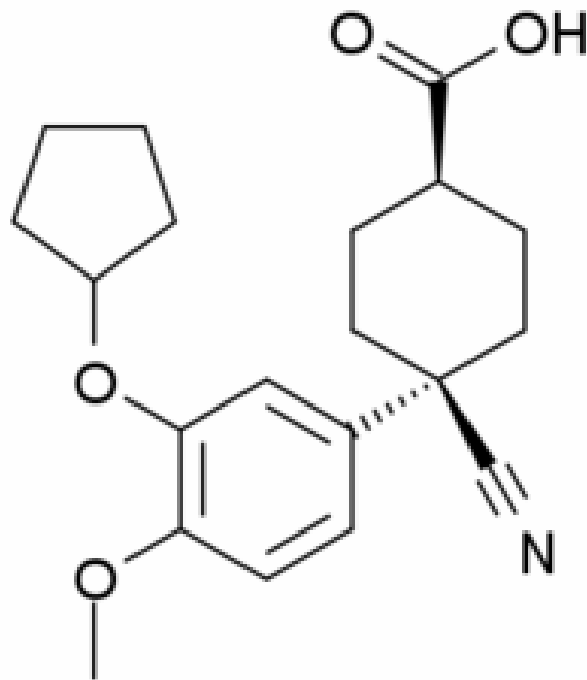


Abb. 6: Strukturformel von Cilomilast

Cilomilast zeigt eine hohe Selektivität für die cAMP-spezifische PDE4, welche als Isoenzym hauptsächlich in Entzündungs- und Immunzellen vorhanden ist. Die Selektivität der Inhibition steigert die Entzündungshemmung und minimiert die Nebenwirkungen. Diese zentralnervöse- und gastrointestinale Nebenwirkungen haben bisher die klinische Anwendung dieser Präparate limitiert (MARTIN et al. 2002). PDE4 besitzt zwei Bindungsstellen für die Inhibitoren. Die HARBS (high-affinity rolipram binding site) wird für die Nebenwirkungen verantwortlich gemacht.

In einer Studie wurde gezeigt, wie ein PDE4-Hemmer erster Generation Rolipram, Lungenresistance und dynamische Compliance in hyperreagiblen Atemwegen, ebenso wie den Gehalt an eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und der Interleukine 4 und 5 in der BAL herabsetzte (IKEMURA et al. 2000). Momentan haben 4 klinische Prüfungen die Wirksamkeit beim Menschen von Cilomilast untersucht und im Vergleich zu Placebo Behandlungen eine Verbesserung der Lungenfunktion, eine höhere Lebensqualität und ein vermindertes Auftreten von

COPD Exazerbationen erwiesen. Cilomilast wurde generell gut toleriert und negative Nebenwirkungen waren milde und selbstlimitierend (KROEGEL u. FOERSTER 2007).

Beim Pferd wurde der Effekt von PDE4-Hemmern auf die Produktion von entzündlichen Zytokinen studiert. RICKARDS et al (2003) untersuchten *in vivo* und *ex vivo* den Effekt von Rolipram auf die Produktion von Thromboxan nach Stimulation mit Lipopolysacchariden. *In vitro* wurde nach vorheriger Zugabe von Rolipram in das entnommene Blut eine signifikante Hemmung der Produktion von Prostaglandinen festgestellt. Auch nach intravenöser Infusion von Rolipram konnte eine geringere Produktion an Thromboxan bestätigt werden. Die Autoren schliessen daraus, dass eine LPS-induzierte Produktion von Thromboxan ein guter Parameter für die Wirkungseffizienz eines PDE4-Hemmers sein kann (RICKARDS et al. 2003).

Eine andere *ex vivo* Studie beschäftigte sich mit PCLS des Pferdes, an welchen der inhibitorische Effekt von Cilomilast auf Bronchokonstriktion untersucht wurde. In dieser Studie von BARTON (2005) wurden die PCLS mit dem Parasympathomimeticum Metacholin in aufsteigenden Dosierungen kontrahiert und anschließend nach 30-minütiger Inkubation mit Cilomilast ein zweites Mal einer Kontraktionsreihe unterzogen. Ziel war es, einen eventuellen inhibitorischen Effekt des PDE4-Hemmers auf die parasympathische konstriktorische Wirkung des Metacholins zu zeigen. Cilomilast zeigte eine deutliche Tendenz zur Hemmung der Bronchokonstriktion, jedoch war diese nicht signifikant. Die Autorin diskutiert, dass dies auf die starke intraindividuelle Streuung zurückzuführen sei und dass mit einer höheren Anzahl an Probanden eine Signifikanz zu erwarten sei (BARTON 2005).

Die einzige *in vivo* Studie über PDE4-Hemmern und ihre Wirkung bei Pferden mit COB wurde von LAVOIE (2006) durchgeführt. Bei 12 erwachsenen Pferden wurde durch regelmäßige Verabreichung von staubigem Heu eine Exazerbation induziert. Anschließend wurden die Probanden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine Placebo-Behandlung, die andere wurde mit dem PDE4-Hemmer zweiter Generation L-826,141 behandelt. In einem zweiten Teil der Studie wurde den mit Placebo behandelten Pferden intravenös Dexamethason verabreicht. Bei diesen Probanden verbesserte sich die klinische Lungenfunktion signifikant. Bei den mit

PDE4-Hemmer behandelten Pferden hingegen zeigte sich *ex vivo* eine Unterdrückung der Produktion von TNF- α und LTB₄ nach Stimulation mit LPS, was bewies dass ausreichende biologisch aktive Plasmakonzentrationen erreicht wurden. Es erwies sich jedoch keine klinische Besserung der COB (LAVOIE et al. 2006). Als Erklärung dafür deuten die Autoren auf die Komplexität der PDE4-Genprodukte hin und auf die daraus resultierenden unterschiedlichen Antworten aus Stimulierung je nach Gewebe, in welchem die PDE4 gehemmt werden.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

Für die Untersuchung wurden 13 Pferde verwendet, welche aus unterschiedlichen Gründen (krankheitsbedingte infauste Prognose) zwischen März 2008 und Oktober 2008 in der Klinik für Pferde der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover euthanasiert wurden.

Die Probanden sind mit Rasse, Alter, Gewicht und klinische Score Points in Tabelle 3 zusammengefasst.

3.2 Versuchsablauf

Bei 10 Pferden erfolgte eine klinische und Atemwegsuntersuchung, inklusive Tracheobronchoskopie, Analyse von Tracheobronchialsekret, bronchoalveolärer Lavage und Blutgasanalyse am Vortag der Euthanasie. Bei drei Pferden, bei welchen sich der Besitzer kurzfristig zur Euthanasie entschieden hatte, erfolgte die Voruntersuchung direkt vor der Euthanasie.

Unmittelbar *post mortem* wurde der *Lobus accessorius* nach der etablierten Methodik von VIETMEIER (2004), BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007) mit einem speziellen Gerät (siehe Abb. 6) entnommen und in einer bei 4°C gekühlten sterilen Kochsalzlösung auf Eis gelagert. Nach Befüllung des *Lobus accessorius* mit einer 3%igen Agaroselösung konnten die PCLS mit dem Krumdieck Tissue Slicer Model MD4000 (Alabama Research and Development, A Division of Alabama Specialty Products, P.O. Box 739 Munford, AL 36268), innerhalb maximal drei Stunden *post mortem* angefertigt werden. Anschließend wurde die Agarose in mehreren Durchgängen aus den PCLS ausgewaschen und die Schnitte in einem Zellkultur-Nährmedium über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die pharmakologischen Versuche erfolgten am nächsten Tag unter einem inversen Mikroskop. Nach jeder Applikation bronchokonstriktorischer und

bronchodilatatorischer Substanzen wurde jeder PCLS fotografisch aufgenommen, um eine digitale Auswertung der Daten später zu ermöglichen.

3.2.1 Klinische Allgemeinuntersuchung und spezielle Atemwegsuntersuchung

Vor der speziellen klinischen Untersuchung wurden von jedem Proband Kennzeichen (Rasse, Alter, Geschlecht, Farbe, Gewicht) erfasst und wenn möglich ein kurzer Vorbericht erhoben. Mit der Beurteilung von Ernährungs- und Pflegezustand wurde anschließend die klinische Allgemeinuntersuchung fortgesetzt und die vitalen Parameter von Puls, Atemfrequenz und Körpertemperatur im Ruhezustand sowie Schleimhautfarbe und kapillare Füllungszeit protokolliert. Das Herz wurde auskultatorisch untersucht. Bei der speziellen Untersuchung der Atemwege wurden Auskultationsgeräusche der Lunge, Lungenperkussion, Tracheobronchoskopie und arterielle Blutgaswerte beurteilt.

Zuvor wurde im Laufe einer Adspektion eventueller Nasenausfluss auf Lokalisation und Sekretcharakter, sowie der Atemtyp (kostal, kostoabdominal, abdominal) und eine eventuelle inspiratorische oder expiratorische Dyspnoe festgehalten.

Hustenauslösbarkeit wurde durch Kompression der letzten Trachealspangen geprüft sowie Grösse, Konsistenz und Schmerzhaftigkeit der Mandubularlymphknoten.

Bei der Auskultation der beiden Lungenflügel im Ruhezustand wurden eventuelle in- oder expiratorische Atemgeräusche (verschärftes vesikuläres Atemgeräusch, bronchiales Atemgeräusch, Giemen, Rasseln, Knistern) in ein Score-System für die Bewertung des Lungenzustandes eingetragen. Ebenso wurden erhobene Befunde der Lungeperkussion mit der Hammer-Pleximeter-Methode in das Protokoll integriert.

Ein automatisches Blutgasanalysegerät (AVL OMNITM, AVL Medizintechnik GmbH, Bad Homburg, Deutschland) wurde für das arterielle Blut verwendet. Dies konnten aus der rechten Arteria carotis communis durch Punktion mit einer Kanüle gewonnen und in jeweils drei Glaskapillaren befüllt werden. Es wurden Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdruck sowie die alveoloarterielle Sauerstoffdifferenz ($p_{(A-a)}O_2$) in mm Hg gemessen. Im Score System wurde allerdings nur die $p_{(A-a)}O_2$ berücksichtigt,

da sie neben p_aO_2 und p_aCO_2 den herrschenden Luftdruck, Temperatur und Ventilation mitberücksichtigt (BARTON, 2005).

Nach Sedierung mit Detomidin (Cepesedan® 0,01mg/Kg) und Levomethadon (Polamivet® 0,05-0,1mg/Kg.) wurde mit einem flexiblen Endoskop die Tracheobronchoskopie durchgeführt, wobei auf Sekretansammlung in den oberen Atemwege geachtet wurde und, wenn vorhanden, das entnommenen Sekret einer Tracheobronchalsekretanalyse unterzogen. Die Beurteilung des TBS erfolgte nach DIEKMANN (1987). Es wurde auf Farbe der Trachealschleimhaut und Breite der *Carina tracheae* geachtet.

Anschließend erfolgte über den Spülkanal des Endoskops, welches tief in die terminalen Atemwege vorgeschoben wurde, eine bronchoalveoläre Lavage. Hierbei wurden in zwei Schüben 500 ml sterile phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) eingegeben und über eine Pumpe wieder abgesaugt. Die so erhaltene BAL-Flüssigkeit wurde im Labor der Klinik für Pferde sowohl zytologisch als auch bakteriologisch untersucht.

Der klinische Gesundheitszustand der Lungen wurde anhand eines modifizierten Score System nach OHNESORGE et. al. (1998) ermittelt (siehe Anhang). Score Punkte wurden nach Auftreten von induziertem Husten (1 Punkt), Dyspnoe in Ruhezustand (1 bis 3 Punkte), verstärkte Auskultationsgeräusche (2 Punkte), vergrößertes Lungenfeld nach Perkussion des Thorax (1 bis 2 Punkte), vermehrtes zähes Bronchialsekret und Schwellung der Schleimhaut (1 bis 2 Punkte), vermehrte neutrophile Granulozyten im TBS (1 Punkt), eine erhöhte alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg : 1 Punkt, >14 mmHg: 2 Punkte), und vermehrte neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen oder eosinophile Granulozyten in der BAL (1 bis 2 Punkte) vergeben. Die beobachteten Symptome sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die Probanden wurden nach ihrem klinischen Score in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 bestand aus Pferden mit einer Punktzahl zwischen 0 und 4, Gruppe 2 aus Pferden mit 5 bis 9 Punkten. Die beiden Gruppen wurden statistisch gegeneinander verglichen um eventuelle Unterschiede in der Reagibilität auf LTC₄ zu ermitteln.

Tab. 3: Erhobene klinische und labordiagnostische Befunde einschließlich Befunde der BAL

Nr.	Rasse, Geschlecht, Alter, Gewicht	Symptome	BAL-Befund: Zellzahl in %		Score
9.	Haflinger, Wallach, 10 J., 500 kg	- vermehrtes zähes TBS - vermehrte Mø im TBS	8 n.G. 8 Mc	33 Mø 0 Eos	3
5.	Hannoveraner, Wallach, 12 J., 620 kg	- Schwellung der Bs.	44 n.G. 0 Mc	31 Mø 0 Eos	3
2.	Warmblut, Wallach, 12 J., 520 kg	- vermehrte n.G. im TBS - vermehrtes zähes TBS	42 n.G. 1,5 Mc	31 Mø 0 Eos	4
11.	Hannoveraner, Wallach, 16 J., 550 kg	- vermehrtes zähes TBS - $p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg	36 n.G. 2 Mc	44 Mø 0 Eos	4
4.	Oldenburger, Wallach, 15 J., 580 kg	- induziertes Husten - vermehrtes zähes TBS	28 n.G. 0 Mc	41 Mø 0 Eos	5
13.	Engl. Vollblut, Stute, 27 J., 580 kg	- vermehrtes zähes TBS - vermehrte n.G. im TBS	60 n.G. 0 Mc	28 Mø 0 Eos	5
7.	Hannoveraner, Hengst, 25 J., 580 kg	- vermehrte n.G. im TBS - vermehrtes zähes TBS	63 n.G. 0 M	7 Mø 0 Eos	5
8.	Hannoveraner, Stute, 19 J., 490 kg	- vergrößertes Lf. - Schwellung der Bs. - $p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg	31 n.G. 1 Mc	28 Mø 0 Eos	5
3.	Hannoveraner, Wallach, 9 J., 600 kg	- vermehrtes zähes TBS - vermehrte n.G. im TBS - Schwellung der Bs.	21 n.G. 0 Mc	13 Mø 0 Eos	5
6.	Hannoveraner, Wallach, 10 J., 610 kg	- $p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg - induziertes Husten - Schwellung der Bs. - vergrößertes Lf. - exp. Dyspnoe	21 n.G. 5 Mc	47 Mø 0 Eos	6
10.	Warmblut, Stute, 20 J., 600 kg	- vermehrtes zähes TBS - Schwellung der Bs. - $p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg	29 n.G. 2 Mc	49 Mø 0 Eos	6
1.	Hannoveraner, Stute, 11 J., 400 kg	- vermehrtes zähes TBS - vermehrte n.G. im TBS - Schwellung der Bs.	65 n.G. 1 Mc	17 Mø 4 Eos	9
12.	Trakehner, Wallach, 22 J., 490 kg	- induziertes Husten - vermehrtes zähes TBS - exp. Ruhedyspnoe - vergrößertes Lf. - vermehrte n.G. im TBS - $p_{(A-a)}O_2 > 7$ mmHg	76 n.G. 1 Mc	18 Mø 0 Eos	9

Legende: TBS: Tracheobronchialsekret

Lf.: Lungenfeld

Bs.: Bronchialschleimhaut

exp.: expiratorisch

Mø: Makrophagen

n.G.: neutrophile Granulozyten

Eos: eosinophile Granulozyten

Mc: Mastzellen

3.2.2 Euthanasie und Entnahme des *Lobus accessorius*

Die Euthanasie der Probanden (Tierversuchsanzeige Az 33.9-42502-05-08A555) wurde durch die Verabreichung von Pentobarbital (Eutha 77, 80 mg/kg/ KGW, Essex Tierarzney München) durchgeführt. Nach Herzstillstand und Erlöschen des Kornealreflexes wurde mit einem Einmalskalpell ein 30 cm langen Schnitt im 7. Interkostalraum durchgeführt und durch den Einsatz eines Rippenspreizers (Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) ausreichend Platz geschaffen, um mit beiden Armen in die Thoraxhöhle gelangen zu können. Nach manuellem Ergreifen des *L. accessorius*, konnte er mit einem fetotomähnlichen, von VIETMEIER (2005) etablierten Gerät (Abb.7) entnommen werden.

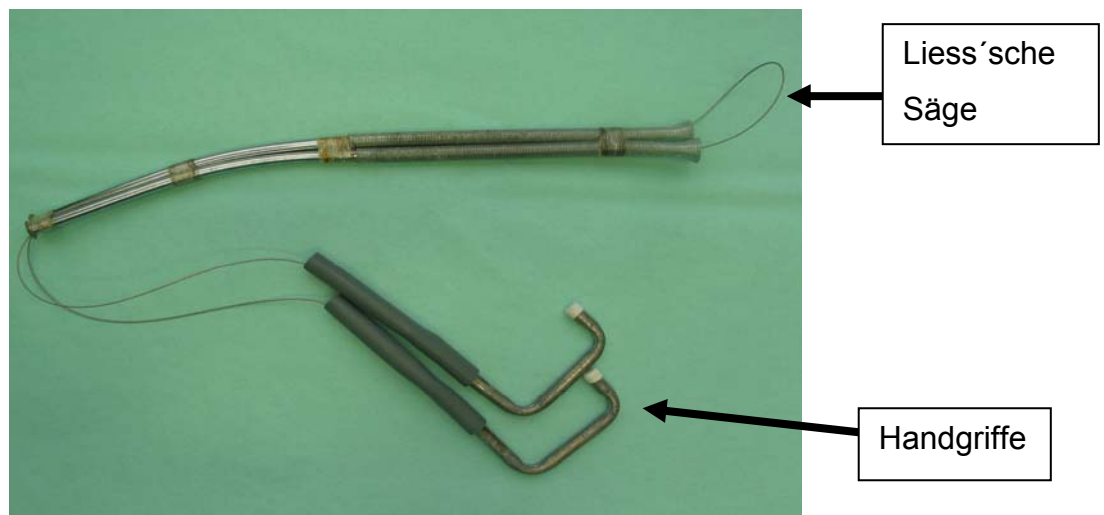


Abb. 7: Gerät zur Entnahme des *L. accessorius*.

Das Lungengewebe wurde nach kurzem Abwaschen mit steriler Kochsalzlösung eiskühlt ebenfalls in steriler Kochsalzlösung gelagert. Wie BARTON (2005) bereits feststellte, bestätigte sich die Tatsache, dass der Stoffwechsel der Zellen bei unter 4°C so stark herabgesetzt wird, dass die Vitalität des Lungengewebes über mehrere Stunden erhalten bleibt, ohne dass es an Funktionalität verliert (MARTIN et al. 2003).

3.2.3 Herstellung der PCLS

Aufgrund der Schlaffheit des Lungengewebes musste es vorerst stabilisiert werden, um eine geringe Schnittdicke zu ermöglichen. Um dies zu erreichen, wurde der *Lobus accessorius* mit 1,5%iger „low melting point“ Agarose (Typ VII, Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) gefüllt.

Diese Agarose verflüssigt sich bei Erwärmung auf eine nicht gewebsschädigende Temperatur von 37 °C, wodurch das Befüllen und das anschließende Ausspülen der Agarose aus den PCLS gelingen, ohne die Vitalität zu beeinträchtigen (VIETMEIER 2007). Die 3%ige Agarose wurde zu gleichen Teilen mit Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, Biochrom AG Berlin) versetzt, da es sonst wegen einer Hypotonie zu Gewebeschädigung kommt (BARTON, 2005). Die so erhaltene Endkonzentration der Lösung betrug 1,5% und brachte den Vorteil einer Nährlösung mit sich, welches zur Vitalitätserhaltung der Zellen beitrug.

Da der *Lobus accessorius* mit einem eigenen Bronchus accessorius versehen ist, ermöglicht diese anatomische Eigenschaft eine komplette Füllung des Lungengewebes über diesen Eingang. Hierdurch war ein Abklemmen der Anschnittfläche mit Peanklemmen ausreichend, um einen Rückfluss der Fülllösung zu vermeiden. Mit einer Knopfkanüle wurden je nach Größe des Lobus 100 bis 120 ml Agarose-Medium-Lösung instilliert und anschließend wieder auf 4°C gekühlt, um das Verfestigen der Agarose zu ermöglichen.

Die Herstellung der PCLS erfolgte mit dem Krumdieck Tissue Slicer Model MD 4000 (Alabama Research and Development, A Division of Alabama Specialty Products, P.O. Box 739 Munford, AL 36268). Der erhärtete Lobus wurde so angeschnitten, dass der Verlauf der Bronchiolen senkrecht zur Schnittfläche verlief und man vereinzelt Bronchiolen auf der Schnittfläche erkennen konnte. Aus den so erhaltenen 1 cm dicken Scheiben wurden die Bronchiolen samt umgebendem Gewebe, mit einer Stanze von 8 mm Durchmesser, in Form eines Gewebezylinders ausgestanzt und anschließend in den Tissue Slicer eingegeben. Bei 2500-5000 Oszillation pro Minute konnte ca. 40 bis 60 verwendbare PCLS mit einer Schnittdicke von ca. 400 µm geschnitten werden. Es wurde ein intermittierender Modus der Klingenoszillation

angewandt, welcher bei jedem Oszillationszyklus sich kurzzeitig unterbricht, um Schäden auf der Schnittfläche zu minimieren.

Um die Agarose aus den Lungenschnitten zu entfernen, wurden diese in 30-minütigen Abständen, bei denen sie im Wärmeschrank gelagert wurden, mehrfach in purem RPMI Zellkulturmedium gewaschen und anschließend über Nacht unter Zugabe von Penicillin und Streptomycin in einem Wärmeschrank inkubiert.



Abb. 8: Krumdieck Tissue Slicer Model MD 4000

3.2.4 Mikroskopie und Feststellung der Vitalität der PCLS

Nach Positionierung der Lungenschnitte in einzelnen Untereinheiten einer 12-Well Platte wurden sie unter einem inversen Mikroskop der Firma Karl Zeiss (Schweiz) untersucht. Um die Qualität der PCLS bestimmen zu können, wurde bei einer 50-100 facher Vergrößerung auf die Epithelgrenze der Bronchiolen, welche zirkulär und

scharf erkennbar sein sollte, geachtet. Die Vitalitätsmerkmale hingegen wurden von der Studie von BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007) übernommen, bei welchen auf Zilienschlag und deutliche Kontraktion im Rahmen einer Präkontraktion mit Metacholin (10^{-5} mol/l im Wellmedium) geachtet wurde.

Von den deutlich kontrahierenden Schnitten wurde das Metacholin anschließend mit drei Medienwechseln ausgewaschen und die PCLS im Wärmeschrank für 30 bis 40 Minuten inkubiert, um die Wiedereröffnung der Schnitte zu ermöglichen.

3.2.5 Pharmakologische Versuche

In dieser Studie wurden drei verschiedenen Bronchodilatoren bzw. Inhibitoren der Bronchokonstriktion und deren Effekt auf PCLS nach einer Behandlung mit Leukotrien C₄ untersucht. In Tabelle 4 sind sie mit der jeweiligen Anzahl der PCLS zusammengefasst.

Die verwendeten Leukotrienkonzentrationen basierten auf der vorangegangenen Studie von SCHWALFENBERG (2007), und wurden in einer ersten Kontraktionsreihe appliziert, welche den Zweck erfüllte, eine individuelle Reaktionsbereitschaft der verschiedenen Probanden festzulegen. Nach jeder Applikation von Leukotrien in aufsteigenden Konzentrationen mit und ohne vorherige Behandlung mit den Inhibitoren, wurde jeder einzelne Schnitt mit einer direkt am Mikroskop angebrachten Kamera fotografiert. So konnten später eine Auswertung und ein Vergleich der einzelnen Reaktionen stattfinden.

Nach Qualitäts- und Vitalitätsprüfung wurden 29 Präzisionslungenschnitte pro Pferd in einzelnen Wells in 1 ml RPMI Medium schwimmend verbracht. Um eine konzentrationsabhängige Kontraktionskurve zu erstellen, wurden alle Schnitte mit 8 aufsteigenden Leukotrienkonzentrationen behandelt.

Wegen der unbekanntenen Stabilität wurde das Leukotrien bei jedem Versuch neu angemischt und über die gesamte Versuchsdauer auf Eis gelagert. Aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 10^{-2} mol/l wurde mittels RPMI-Medium eine Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 10^{-13} mol/l angefertigt. Durch Zugabe von 10 µl wurde somit in den bereits mit 1 ml Medium gefüllten Wells, pro

Kontraktionsreihe eine Endkonzentrationen der Leukotriene von 10^{-15} mol/l bis zu 10^{-8} mol/l erreicht.

Zeitversetzt wurde für jeden Schnitt zwei Minuten nach jeder Applikation des Bronchokonstriktors ein Foto angefertigt. Die verwendeten Konzentrationen von Leukotrien C₄ bauten auf der Grundlage von SCHWALFENBERG'S (2007) Studie auf. Um nach Beendigung einer Kontraktionsreihe eine Dilatation der Bronchien zu ermöglichen, wurde das Leukotrien durch Mediumwechsel (3 Wechsel im direkten Anschluss an die Kontraktionsreihe und weitere 3 Wechsel alle 10 Minuten mit zwischenzeitlicher Lagerung im Inkubationsschrank) aus den PCLS ausgewaschen.

Nach einer 30 minütigen Inkubation der Schnitte mit den Bronchodilatoren im Wärmeschrank erfolgte die nächsten Kontraktionsreihe.

Für Cilomilast und Clenbuterol wurden jeweils 9 Schnitte zufällig bestimmt. Für den PDE4-Hemmer wurden davon jeweils drei mit einer Konzentration von 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} mol/l behandelt. Diese Konzentrationen erschienen aufgrund von BARTON'S (2005) Studie sinnvoll, da hier bei einer Konzentration von $10^{-5,84}$ mol/l ein deutlicher inhibitorischer Effekt festgestellt werden konnte (BARTON 2005).

Bei dem β_2 -Agonisten Clenbuterol diente die *in vitro* Studie von TÖRNEKE et al. (1998) als Grundlage. Hier besaß Clenbuterol an isolierten Trachealmuskelstreifen von Mäusen eine EC₅₀ von 2 nmol/l, was in Potenzen ausgedrückt einer Konzentration von 10^{-6} mol/l entspricht (TÖRNEKE et al. 1998). In der eigenen Studie wurden zusätzlich Konzentration von 10^{-5} mol/l und 10^{-7} mol/l getestet, um eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit festzustellen.

Der Effekt von Beclomethason-dipropionat wurde bei einer Endkonzentration in den Wells von 10^{-5} mol/l untersucht. CHANOINE et al. erstellten eine EC₅₀ bei derselben Konzentration in einer Studie von 1991 bei intratrachealer Verabreichung bei Ratten. Das Kortikosteroid wurde in unserer Studie an drei PCLS pro Pferd getestet.

Da nur Clenbuterol in dem RPMI Nährmedium lösbar war, mussten die anderen beiden Substanzen in einem Ethanol-haltigen Vehikel gelöst werden. Somit war es

erforderlich neben einer Kontrollgruppe, die in purem Medium verblieb (5 PCLS), auch eine Vehikelkontrollgruppe zu erstellen (3 PCLS).

Nach 30 minütiger Inkubation im Wärmeschrank wurden die 29 PCLS mit demselben Prinzip der ersten Kontraktionsreihen erneut acht verschiedenen konzentrierten Leukotrienlösungen unterzogen

Tab. 4: Zusammenfassung der verwendeten Inhibitoren an den PCLS

Anzahl PCLS pro Pferd	Inhibitor	Konzentration (10^{-x} mol/l)
3	Clenbuterol	5
3	Clenbuterol	6
3	Clenbuterol	7
3	Cilomilast	4
3	Cilomilast	5
3	Cilomilast	6
3	Beclomethason	5
3	Vehikelkontrolle (Ethanol)	-
5	Kontrollgruppe	-

3.2.6 End-Vitalitätskontrolle

Nach Beendigung des Versuches wurden die Schnitte nochmals dreimal gewaschen und im Inkubationsschrank 30 bis 40 Minuten gelagert. Nach Wiedereröffnung der PCLS wurden diese einer Endkontraktion mit der höchst verwendeten

Leukotrienkonzentration (10^{-8} mol/l) behandelt. Die Schnitte, welche sich nicht mehr geöffnet hatten oder nicht mehr auf die Endkontraktion reagierten, wurden wegen mangelhafter Vitalität aus dem Versuch im Nachhinein ausgeschlossen.

3.2.7 Fotografische Auswertung

Wie schon erwähnt, wurde jeder PCLS nach jeder Applikation von Leukotrien C4 sowohl in den ersten Kontraktionsreihen als auch nach Inkubation mit den Inhibitoren durchnummeriert und durch das Mikroskop abfotografiert. Die Daten wurden auf einen Laptop übertragen. Mit dem Programm „Irfan View“ wurden die Bilder zu einer auswertbaren Datei umgewandelt und mit dem Programm „Scion Image Version Beta 4.0.2“ 69 (www.scioncorp.com) ausgewertet. Hierfür wurde ein Digitalisiertablett der Firma Trust verwendet. Durch virtuelles Aufzeichnen wird die Spitze eines Stiftes auf einer Platte bewegt. Der Stift sendet Daten über Stiftdruck und gedrückte Tasten an das Tablett und die so gewonnenen Positionsdaten werden vom Grafiktablett an den Computer übermittelt. Die Bronchus-Innenfläche wurde am inneren Epithelrande ausgemessen und das Lumen somit in Prozentzahlen des Ursprunglumens ausgedrückt. Die so erhaltenen Werte wurden statistisch ausgewertet.

3.3 Statistik

Für die erste Leukotrienkontraktion wurde eine EC_{50} errechnet. Die EC_{50} wurde als die Konzentration definiert, bei welcher die PCLS zu 50% im Vergleich zum Ausgangslumen kontrahierten.

Bei nicht mindestens zu 50 % im Vergleich zum Ausgangslumen kontrahierenden Schnitten wurde der Wert der EC_{50} Konzentration als größer als 10^{-8} mol/l definiert.

Die Effekte von Clenbuterol und Cilomilast wurden auf Signifikanz hin mit dem Friedman-Test (nicht-parametrischer ANOVA für verbundene Stichproben) untersucht. Bei Signifikanz wurden die behandelten Schnitte mit der Vehikelkontrollgruppe verglichen durch den Dunns-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

Ein Vergleich zwischen den mit Beclomethason-dipropionat behandelten PCLS und der Vehikelkontrollgruppe wurde durch den nicht-parametrischen Gruppenvergleich für verbundene Stichproben des Wilcoxon- Test statistisch errechnet.

Bei zwei Pferden konnten nicht ausreichende PCLS hergestellt werden. Bei diesen wurde auf die Vehikelkontrollgruppe verzichtet und stattdessen wurde der Effekt der Inhibitoren mit dem der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Der Zusammenhang zwischen klinischen Score-Punkten und den ermittelten EC_{50} -Werten von LTC_4 wurde mittels einer zweiseitigen Korrelationsanalyse statistisch untersucht. Dabei wurde der nicht-parametrische Spearmansche Korrelationskoeffizient verwendet.

Um eine ähnliche Reaktionsbereitschaft der Schnitte während des gesamten Versuches zu garantieren, wurden die PCLS der Kontrollgruppe bei der ersten Kontraktion mit denen der zweiten Kontraktion und diese wiederum mit der Kontrollgruppe verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Probandengut

Die 13 Pferde wurden anhand des Score Systems in zwei Gruppen eingeteilt. 5 Pferden befanden sich in der Gruppe 1 mit 0 bis 4 Punkten und die übrigen 9 Probanden in der Gruppe 2 mit 5 bis 9 Punkten.

Ein Zusammenhang zwischen dem Punkte Score und der pharmakologischen Untersuchung konnte nicht gezeigt werden. Die PCLS von Probanden aus der Gruppe 1 unterschieden sich in ihrer Reagibilität auf LTC_4 nicht von denen aus Gruppe 2 (Abb. 9).

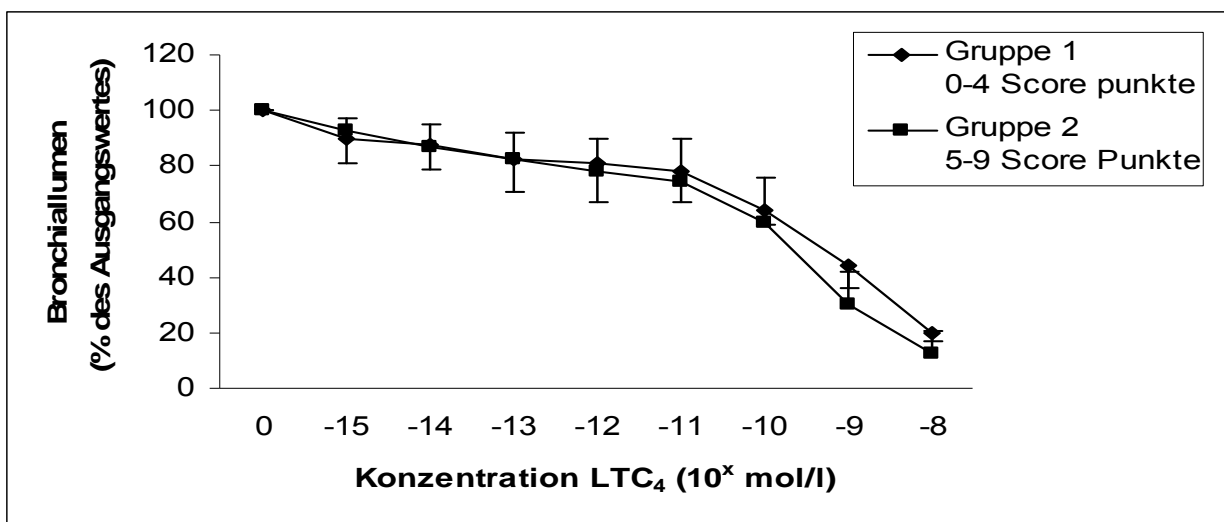


Abb. 9: Vergleich des bronchokonstriktorischen Effekts von LTC_4 auf PCLS von Gruppe 1 und Gruppe 2.

Auch die EC_{50} -Werte von LTC_4 korrelieren nicht mit dem Klinikscore ($p=0,7401$). Eine Abhängigkeit der LTC_4 -induzierten Kontraktilität der Bronchiolen vom Erkrankungsgrad ist somit nicht feststellbar.

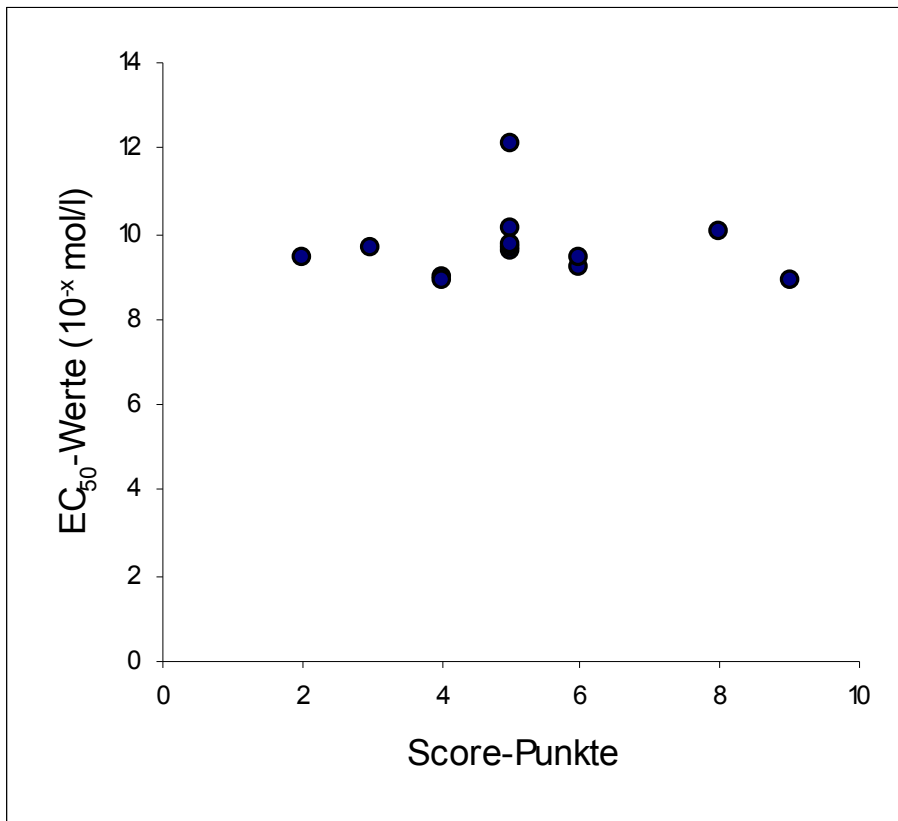


Abb. 10: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen klinischen Score Punkten und der EC_{50} -Werte von LTC_4 der einzelnen Probanden.

4.2 Pharmakologische Versuche

4.2.1 Bronchokonstriktion durch Leukotrien C₄

Wie bei SCHWALFENBERG (2007) wurde auch in dieser Studie die konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion durch LTC₄ untersucht. PCLS von 13 Probanden wurden LTC₄ Konzentrationen von 10⁻¹⁵ mol/l bis 10⁻⁸ mol/l ausgesetzt. Die einzelnen Konzentrationen wurden mit zwei Minuten Unterschied nacheinander appliziert; hierbei zeigten die PCLS eine konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion (Abb.11). Die errechnete EC₅₀ betrug $2,2 \pm 0,83 \times 10^{-10}$ mol/l.

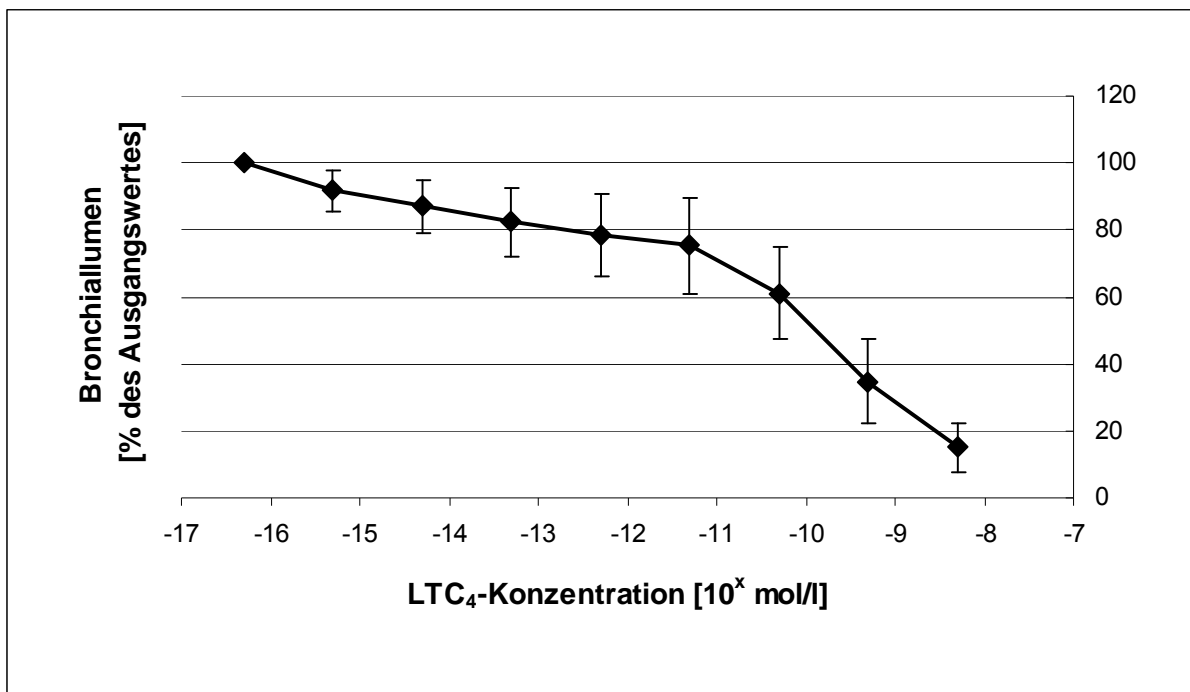
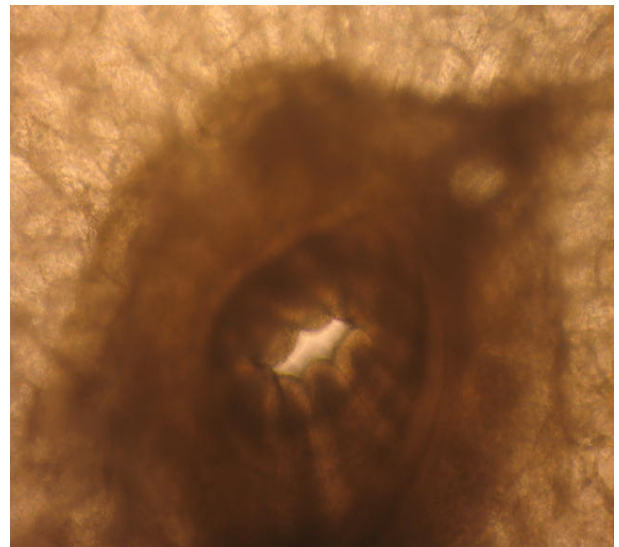
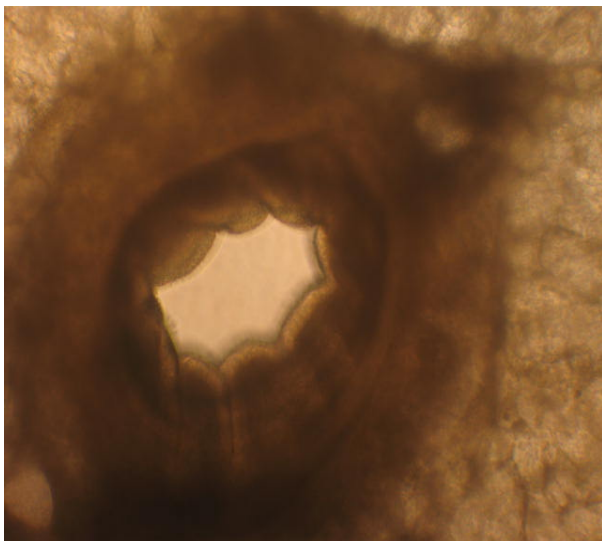
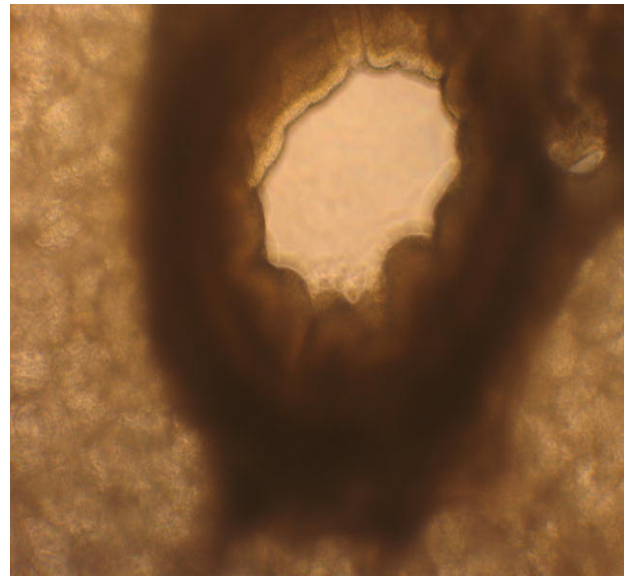
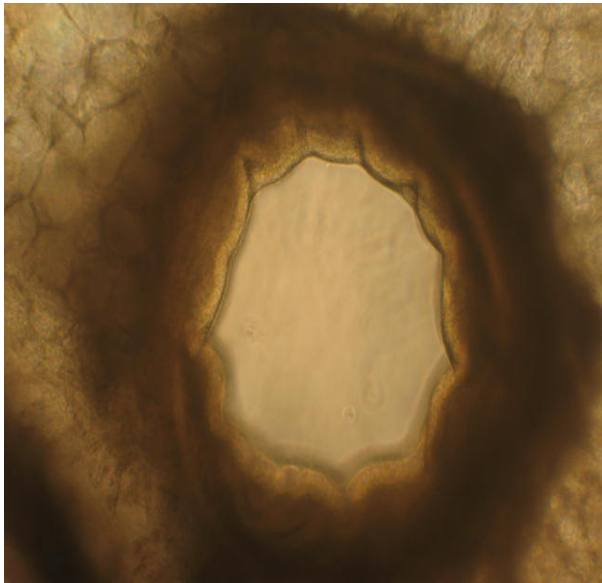


Abb.11: Effekt von LTC₄ auf PCLS. Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Leukotrien C₄ mit einer Steigerung der Konzentration in Zehnerpotenzen im Abstand von je 2 Minuten. Angabe der Bronchiolusfläche in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration (in 10^{-x} mol/l), Darstellung von Mittelwert ± Standardabweichung von 13 Pferden.

Abb. 12: PCLS nach Zugabe von LTC₄ Konzentrationen von 10⁻¹⁵, 10⁻¹³, 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ mol/l.



4.2.2 LTC₄-Reihe nach Inkubation mit Beclomethason-dipropionat

Jeweils 3 PCLS pro Pferd wurden nach Wiedereröffnung für 30 Minuten in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine neue Leukotrienkontraktion mit fotografischer Dokumentierung nach jeder Konzentrationssteigerung.

Die mit Beclomethason-dipropionat behandelten PCLS kontrahierten nach Zugabe von LTC₄ weniger als die mit Vehikel behandelten PCLS (Abb.14). Bei der statistischen Auswertung stellte sich dieser Unterschied als höchst signifikant heraus ($p = 0,002$).

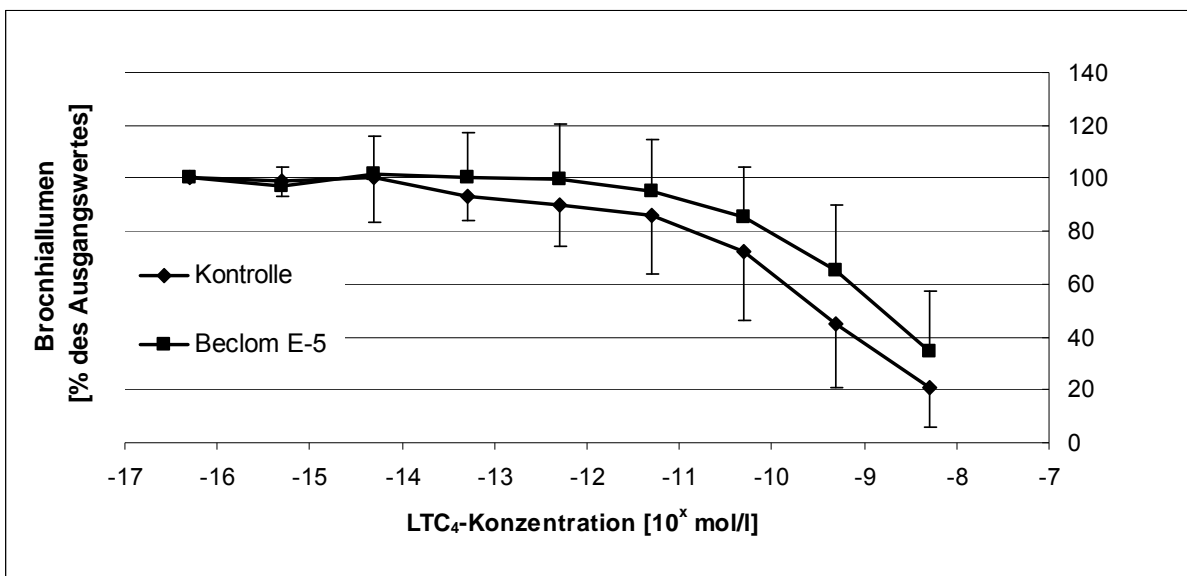


Abb. 14: Graphische Darstellung des hemmenden Effekts von Beclomethason-dipropionat auf die LTC₄-Kontraktion. Zweite Kontraktionsreihe nach Behandlung mit Beclomethason-dipropionat, durch Leukotrien C4 ausgelöste Bronchokonstriktion in equinen PCLS mit einer Steigerung der Konzentration in Zehnerpotenzen im Abstand von je 2 Minuten, Angabe der Bronchusfläche (in % des Ausgangslumens) in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration (in 10^{-x} mol/l), Darstellung des Mittelwertes der Bronchusfläche \pm Standardabweichung, Darstellung der zweiten Leukotrienkontraktionsreihe im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und drei Konzentrationen von Beclomethason-dipropionat (10^{-5} mol/l). $n = 11$.

4.2.3 LTC₄-Reihe nach Inkubation mit PDE4-Hemmer

An 12 Probanden wurden jeweils 9 PCLS mit Cilomilast bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Jeweils 3 Schnitte wurden mit einer Konzentration von 10⁻⁴ mol/l, 10⁻⁵ mol/l und 10⁻⁶ mol/l behandelt.

Nach der Inkubationszeit wurde wie bei der ersten Kontraktion LTC₄ in aufsteigenden Konzentrationen von 10⁻⁸ mol/l bis 10⁻¹⁵ mol/l appliziert.

Zwischen Kontrollgruppe und mit Cilomilast behandelten PCLS erwies sich ein höchst signifikanter Unterschied (p ≤ 0,001).

Bei einer Konzentration von 10⁻⁴ mol/l und 10⁻⁵ mol/l reduzierte sich das Lumen der Bronchien weniger als 50% im Vergleich zum den unbehandelten PCLS (Abb. 13).

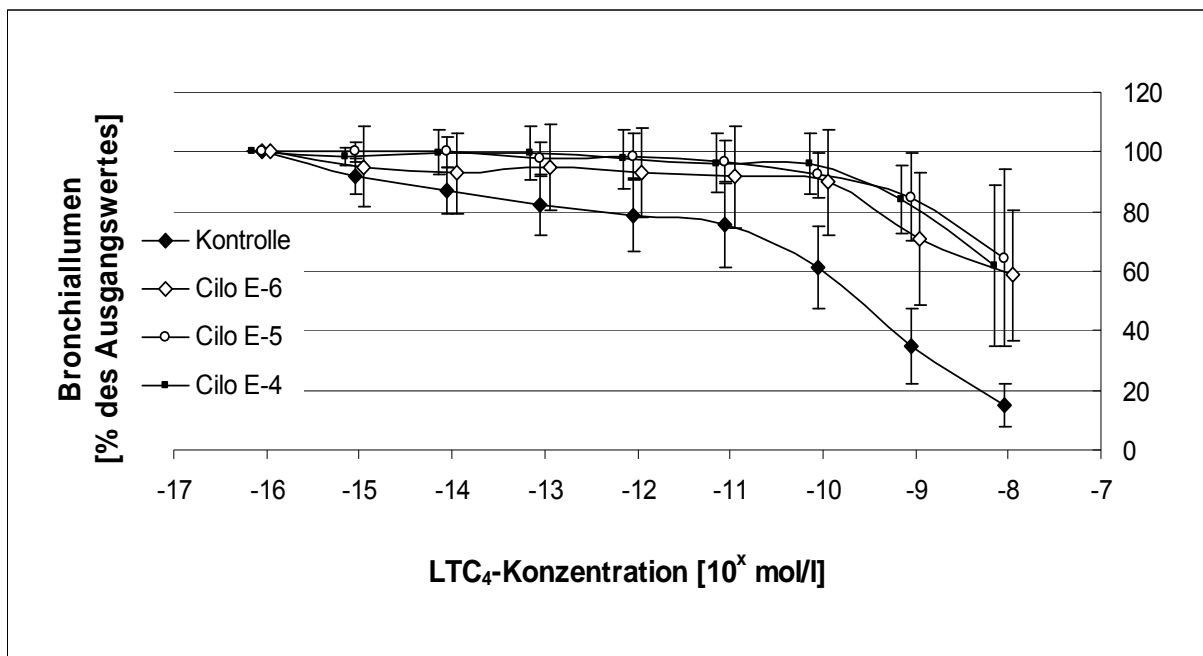


Abb. 13: Graphische Darstellung des hemmenden Effekts von Cilomilast auf die LTC₄-Kontraktion. Zweite Kontraktionsreihe nach Behandlung mit Cilomilast, durch Leukotrien C₄ ausgelöste Bronchokonstriktion in equinen PCLS mit einer Steigerung der Konzentration in Zehnerpotenzen im Abstand von je 2 Minuten, Angabe der Bronchusfläche (in % des Ausgangslumens) in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration (in 10^{-x} mol/l), Darstellung des Mittelwertes der Bronchusfläche ± Standardabweichung, Darstellung der zweiten Leukotrienkontraktionsreihe im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und drei Konzentrationen von Cilomilast (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ mol/l). n = 12.

4.2.4 LTC₄-Reihe nach Inkubation mit Clenbuterol

Nach der ersten Kontraktionsreihe mit LTC₄, Spülung und Wiedereröffnung der PCLS wurden jeweils 3 Schnitte mit einer Konzentration von 10⁻⁴ mol/l, 10⁻⁵ mol/l und 10⁻⁶ mol/l behandelt.

Nach der Inkubationszeit wurde LTC₄ in aufsteigenden Konzentrationen von 10⁻⁸ mol/l bis 10⁻¹⁵ mol/l appliziert. Eine fotografische Speicherung des Bronchuslumens erfolgte zeitversetzt zwei Minuten nach jeder neuen LTC₄-Zugabe.

Die mit Clenbuterol behandelten PCLS zeigten eine Tendenz, sich auf LTC₄ weniger zu kontrahieren als die unbehandelte Kontrollgruppe (p=0,12) (Abb. 15).

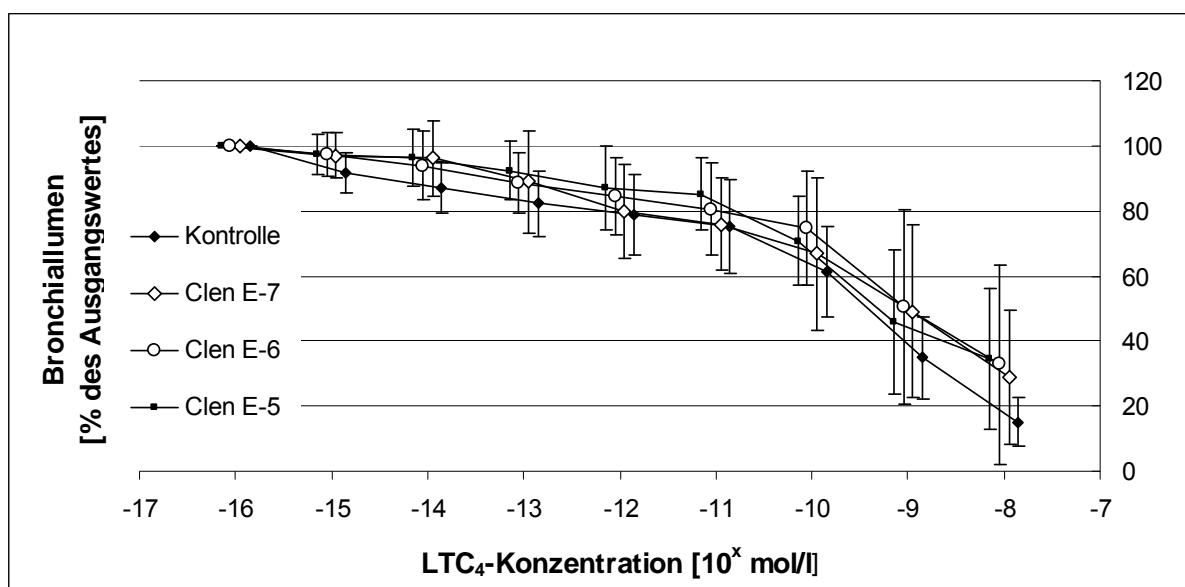


Abb. 15: Graphische Darstellung des hemmenden Effekts von Clenbuterol auf die LTC₄-Kontraktion. Zweite Kontraktionsreihe nach Behandlung mit Clenbuterol, durch Leukotrien C4 ausgelöste Bronchokonstriktion in equinen PCLS mit einer Steigerung der Konzentration in Zehnerpotenzen im Abstand von je 2 Minuten, Angabe der Bronchusfläche (in % des Ausgangslumens) in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration (in 10^{-x} mol/l), Darstellung des Mittelwertes der Bronchusfläche ± Standardabweichung, Darstellung der zweiten Leukotrienkontraktionsreihe im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und drei Konzentrationen von Clenbuterol (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ mol/l). n = 13.

4.2.5 Vergleich der ersten mit der zweiten LTC₄ Kontraktion der Kontrollgruppe

Um eine eventuelle „Ermüdung“ der PCLS im Laufe des Versuches auszuschließen, wurden die Kontrollgruppen der ersten und zweiten LTC₄-Kontraktion untereinander verglichen. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor ($p=0,73$). Ebenso erbrachte der Vergleich zwischen der zweiten Kontraktion mit der Vehikelkontrolle keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,28$).

5 Diskussion

Seit den ersten Versuchen von DANDURAND et al. (1993) hat sich das Herstellen von Präzisionsgewebeschnitte zu einer akzeptierten Methode für die *ex vivo* Untersuchung von vitalem Gewebe entwickelt. Durch das Anfertigen der PCLS ist es möglich aus dem Lungengewebe eines Tieres, eine Vielzahl von Präzisionsschnitten zu erhalten. Somit kann die Anzahl der nötigen Probanden reduziert werden und die Anzahl von Testsubstanzen gesteigert werden.

Die Methodik der PCLS konnte in drei vorangegangenen Studien von VIETMEIER (2004), BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007) beim Pferd erfolgreich etabliert werden. In den letzteren beiden wurden dabei auch pharmakologische Versuche zur Beeinflussung der Bronchokonstriktion *ex vivo* durchgeführt.

SCHWALFENBERG (2007) untersuchte Leukotrien C₄ zum ersten Mal an equinen PCLS. Die eigene Studie hatte zum Ziel, die Effekte dieses pro-inflammatorischen Bronchokonstriktor weiterführend zu untersuchen, und die Wirksamkeit der Bronchodilatoren Clenbuterol, Cilomilast und Beclomethason-dipropionat zu prüfen.

5.1 Probandengut, klinische Erkrankung und Reaktivität *ex vivo*

Die meisten Probanden (10 Pferde), deren Lungengewebe in dieser Studie untersucht wurde, waren Patienten der Klinik für Pferde, die wegen einer krankheitsbedingt infausten Prognose euthanasiert werden mussten. Hierbei galten sowohl ein akutes Geschehen, bei dem eine systemische Beeinträchtigung des Pferdes bevorstand (z.B. akute Kolik), als auch eine seit weniger als 72 Stunden vorangegangene Allgemeinanästhesie als Ausschlusskriterium. Wie BARTON (2005) in ihrer Studie feststellte, beeinflussen diese Bedingungen die Vitalität und Kontraktionsbereitschaft der PCLS und sind daher ein wichtiges Selektionskriterium (BARTON 2005). Dies konnte indirekt in der eigenen Studie bestätigt werden, da

keinem der aus 13 Probanden gewonnenen PCLS Vitalität und Kontraktionsbereitschaft fehlte.

Bei der speziellen klinischen Lungenuntersuchung wurde in das Score-System der klinischen Erkrankung nach OHNESORGE et al. (1998) in dieser Studie, anders als bei BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007), eine bronchoalveoläre Lavage integriert.

BARTON (2005) und SCHWALFENBERG (2007) untersuchten das Verhältnis zwischen dem COB-Erkrankungsgrad und der Reaktivität der PCLS durch jeweils Metacholin und Leukotrien C₄. Bei den als mittelgradig bis hochgradig an COB-erkrankt klassifizierten Probanden beobachtete SCHWALFENBERG (2007) eine höhere Reaktionsbereitschaft als bei den gesund bis geringgradig erkrankten Probanden. In einer späteren Bearbeitung der Daten wurde anhand der Errechnung der EC₅₀-Werte jedoch keine Korrelation zwischen diesen und dem COB-Erkrankungsgrad festgestellt (NIEDORF 2009). Dies wurde ebenfalls in der eigenen Studie bestätigt. Die PCLS reagierten, unabhängig von der mit dem Score-System erbrachten Punktzahl, homogen. Diese Ergebnisse stehen mit einer *in vivo* Untersuchung zur Reagibilität auf inhalierte Leukotriene im Einklang, bei der zwischen den zwei Gruppen unterschiedlichen Erkrankungsgrades kein Unterschied festgestellt werden konnte (MARR et al. 1998b).

In der vorliegenden Studie ist auffällig, dass bis auf Proband Nr. 9 mit 8% neutrophilen Granulozyten alle anderen Probanden eine zum Teil deutlich erhöhte Anzahl dieser Zellen in der BAL aufwiesen. Eine Korrelation zwischen neutrophilen Granulozyten in der BAL und der Empfindlichkeit gegenüber LTC₄ konnte daher nicht ermittelt werden. Der einzige Proband mit physiologischer Anzahl an neutrophilen Granulozyten zeigte jedoch eine nicht auffällig andere EC₅₀ als die Probanden mit deutlich erhöhter Anzahl an neutrophilen Granulozyten.

Eine mögliche Korrelation zwischen neutrophilen Granulozyten in der BAL und der Empfindlichkeit gegenüber LTC₄ könnte nur in einem Probandengut geprüft werden, in dem Pferde mit erhöhten neutrophilen Granulozyten und Pferde mit normalem BAL-Zellprofil vertreten sind.

5.2 Herstellung und Vitalität der PCLS

Unmittelbar *post mortem* wurde der *Lobus accessorius* auf der rechten Thoraxseite nach einer Technik von VIETMEIER (2004) entnommen. Die wichtigsten Kriterien, die eine korrekte Entnahme ermöglichten, waren eine Schnittlänge von mindestens 30 cm, um das Arbeiten mit beiden Armen in der Thoraxhöhle zu ermöglichen und das Absetzen des Lobus unmittelbar an seinem Ansatz. Das Umfassen des Lobus mit der Sägeschlinge sollte mit besonderer Vorsicht geschehen, um eine Verletzung der *Pleura visceralis* und somit eine verminderte Füllung des Lobus zu vermeiden. Die Füllung des *Lobus accessorius* mit 1,5%iger Agaroselösung wurde analog den vorangegangenen Studien durchgeführt.

Die Wichtigkeit einer guten Kühlung des Gewebes vor und während des gesamten Schneideprozesses, wie auch von BARTON (2007) und SCHWALFENBERG (2007) beschrieben, wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Diese ist für eine ausreichende Stabilität des Gewebes während des Schneideprozesses notwendig.

Im Gegensatz zu den drei vorangegangenen Studien wurde das Krumdieck-Schneideverfahren verwendet, wie von MARTIN et al. (1996) beschrieben. SCHWALFENBERG (2007) und BARTON (2005) signalisierten beide das Problem einer unzureichenden Stabilisation der Gewebezylinder bei dem Schneideprozess mit dem OTS Tissue Slicer 5000, was oft ein Ausreißen der Bronchialwände und die Unbrauchbarkeit der PCLS verursachte (SCHWALFENBERG 2007). In der eigenen Studie wurde der Krumdieck Tissue Slicer Model MD 4000 zum Anfertigen der PCLS erfolgreich verwendet. Der größte Vorteil hierbei war eine zusätzliche Fixierung des Gewebezylinders in einem metallenen Schaft, welcher das Verrutschen des Gewebes während des Schneidens verringert. Mit dieser Methodik konnten außerdem dank der Automatisierung des Schneideprozess eine höhere Anzahl an PCLS gewonnen werden.

MARTIN et al. (1996) verwendete bei seiner Methodik an Rattenlungen eine Gewebestanze mit einem Durchmesser von 8 mm, in dessen Mitte sich der Bronchus befand. Auch in der eigenen Studie wurde dieser Durchmesser verwendet, allerdings betrug die Schnittdicke der PCLS ca. 400 µm im Vergleich zur Studie von 1996, bei welcher ca. 250 µm ausgemessen wurden. Es handelte sich hierbei jedoch um

Rattenlungen und dies könnte die Notwendigkeit einer anderen Schnittdicke erklären, da im Vergleich die beiden Lungengewebe eine unterschiedliche Gewebedichte besitzen. Bei der Pferdelunge erhöhte diese Dicke die Schnittbeute.

Als Vitalitätsparameter erwiesen sich ein sichtbarer Zilienschlag und eine deutliche Kontraktion der PCLS nach Zugabe von Metacholin (10^{-5} mol/l) als geeignet. Allerdings war letztere ausschlaggebend, da gelegentlich PCLS mit deutlichem Zilienschlag nicht kontrahierten, und andererseits Schnitte, bei welchen keine Bewegung der Zilien erkennbar war, gut auf Metacholin reagierten.

Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte mit dem Computerprogramm, „Scion Image“ (www.scioncorp.com). In der eigenen Studie wurde, anders als bei SCHWALFENBERG (2007), das Lumen der Bronchiolen bei jedem PCLS manuell dreimal ausgemessen und gemittelt. Durch das Verwenden des Digitalisieretafells der Firma Trust war eine äußerst präzise Wiedergabe der Epithelgrenze der Bronchiolen und also der Lumenfläche möglich.

5.3 Pharmakologische Versuche

5.3.1 Effekte von Leukotrien LTC₄

Nach der Vitalitätsprüfung der PCLS wurden alle Schnitte acht aufsteigenden Konzentrationen von LTC₄ in Intervallen von zwei Minuten ausgesetzt.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion mit einem EC₅₀-Wert von $2,1 \pm 0,8 \times 10^{-10}$ mol/l (geometrischer Mittelwert \pm geometrische Standardabweichung). In einer vorangegangenen Studie (SCHWALFENBERG, 2007) wurden ebenfalls die Effekte von LTC₄ an PCLS vom Pferd untersucht. Hierbei ergab sich im Vergleich zum Ausgangslumen ein signifikanter Unterschied der Bronchiolusfläche ab einer LTC₄-Konzentration von 1×10^{-9} mol/l. Um die Werte vergleichen zu können, wurden anhand der Ergebnisse der Studie von SCHWALFENBERG (2007) ebenfalls der EC₅₀-Wert errechnet, welcher sich ähnlich der eigenen, bei $1,6 \times 10^{-9}$ mol/l befand. Der einzige direkte Vergleich des Effektes von Leukotriene an PCLS anderer Spezies ist mit humanen Lungenschnitten

möglich. Nach einer Applikation von 10^{-7} mol/l LTC₄ wurde an PCLS vom Menschen eine deutliche Bronchokonstriktion beobachtet (WOHLSEN et al. 2003).

Sowohl in der eigenen Studie als auch in der von SCHWALFENBERG (2007) zeigte sich schon bei der niedrigsten Konzentration von 10^{-15} mol/l eine Reaktion auf das Leukotrien. Die vergleichsweise höheren Konzentrationen, bei welchen sich *in vitro* sowohl isolierte Bronchien und Lungenparenchym deutlich kontrahierten (EC₅₀ von $1,6 \times 10^{-8}$ mol/l und $6,8 \times 10^{-5}$ mol/l) (DOUCET et al. 1990; LAVOIE et al. 2002), könnten für eine höhere Sensibilität der kleinen Atemwege im Vergleich zu größeren Bronchien sprechen. KANOKA und BOYCE (2002) untersuchten die Verteilung der LTC-Rezeptoren in murinem Geweben und stellten eine unterschiedliche Verteilung von CysLT1- und CysLT2-Rezeptoren fest. CysLT1-Rezeptoren befinden sich vor allem in der Lunge, der glatten Muskulatur und auf peripheren Blutzellen (Makrophagen, Leukozyten), wohingegen CysLT2-Rezeptoren in Milz, Herz und zu geringeren Anteilen auch im Gehirn lokalisiert sind (KANAKA u. BOYCE 2004). Über eine Unterteilung der CysLT1-Rezeptoren innerhalb des Bronchialbaumes gab es keine weiteren Hinweise. Man könnte also vermuten, dass PCLS, durch eine eventuelle höhere Rezeptordichte von CysLT1 in den terminalen Atemwegen, eine höhere Sensibilität besitzen und sich daher schon bei geringeren Konzentrationen von LTC₄ eine Bronchokonstriktion entwickelt.

Weiterhin findet das LTC₄ in der feinen Struktur der PCLS eine kürzere Diffusionsstrecke, wodurch höhere Konzentrationen am CysLT1-Rezeptor erreicht werden. Diese Erklärung für eine sofortige Reaktion der PCLS erscheint am wahrscheinlichsten.

5.3.2 Effekte von Beclomethason-dipropionat (BDP)

Die inhalative Kombinationstherapie von Kortikosteroiden und β_2 -Agonisten kann bei Pferden und Menschen eine gute Alternative zur systemischen Applikation darstellen, da trotz hoher lokaler Arzneistoffkonzentrationen nur wenige systemische Nebenwirkungen auftreten (LAVOIE 2003; HANANIA 2008).

In der eigenen Studie bewirkte die 30-minütige Inkubation von PCLS mit Beclomethason-dipropionat (10^{-5} mol/l) eine Rechtsverschiebung der Wirkungskurve von LTC₄. Dieser Effekt konnte durch den Vergleich der EC₅₀-Werte der behandelten und unbehandelten PCLS statistisch abgesichert werden.

Ein vollständiger Verschluss der Bronchiolen durch weitere Steigerung der Leukotrien C₄-Konzentrationen wurde nicht angestrebt, da dadurch kein zusätzlicher Befund zu erwarten war und sich der hemmende Effekt von BDP deutlich darstellte.

Zur Erklärung der bronchodilatativen Wirkung von BDP in den eigenen Untersuchungen kommen grundsätzlich die bereits erwähnten genomischen, nicht-genomischen und unspezifischen Glukokortikoidmechanismen in Betracht, wobei der nicht-genomische und der unspezifische Mechanismus noch weitgehend unbekannt sind (BUTTGEREIT u. SCHEFFOLD 2002).

Beim genomischen Mechanismus beeinflusst die Aktivierung eines zytoplasmatischen Glukokortikoid-Rezeptors nach Translokation in den Zellkern die Transkription Glukokortikoid-abhängiger Gene. Da dieser proteinsynthese-abhängige Mechanismus einige Zeit (mindestens 30 Minuten) in Anspruch nimmt, setzen die Wirkungen der Glukokortikoide nicht unmittelbar nach der Applikation ein (VAN DER VELDEN 1998; FERGUSON u. HOENIG 2001).

Die in dieser Studie verwendete Inkubationszeit von lediglich 30 Minuten erscheint somit für Transkriptionsprozesse zu kurz, so dass die beobachtete Glukokortikoid-Wirkung wahrscheinlich vor allem auf nicht-genomische oder proteinsynthese-unabhängiger Mechanismen zurückgeführt werden kann. Diese setzen nach der Applikation von Glukokortikoid innerhalb von wenigen Minuten ein. Die Bindung des Glukokortikoid an seinen Rezeptor führt dabei zur Aktivierung von verschiedenen *second-messenger*-Systemen (z.B. Ca⁺⁺-abhängige Proteinkinase, cAMP) (CROXTALL et al. 2000; MUTO et al. 2000; HARVEY et al. 2002). Der intrazelluläre Anstieg von cAMP bewirkt über Inhibition der cAMP-abhängigen Proteinkinase A eine Bronchodilatation.

Weiterhin würde ein genomischer Mechanismus auch die Bronchokonstriktion verhindern, indem die Entzündungskaskade auf frühem Niveau inhibiert wird und es zur Produktion von Endprodukten wie Leukotriene gar nicht erst kommt. Da in der

eigenen Studie das lokale Gewebehormon direkt den PCLS zugeführt wurde, wäre durch den Proteinsynthese-abhängigen Mechanismus nichts zu bewirken. Diese Feststellung spricht ebenso für einen direkteren Aktionsweg des Kortikosteroid an den PCLS.

In vivo hat sich BDP als inhalatives Kortikosteroid in der Therapie für COB bewährt (AMMANN et al. 1998; RUSH et al. 1998b). Die ersten klinischen Besserungen zeigten sich jedoch erst 4 Tage nach Beginn der Behandlung mit BDP (3750 µg zwei Mal tägl. für zwei Wochen). Dies würde zeitlich für einen komplexeren Mechanismus einer Transrepression sprechen. Allerdings konnten COUETIL et al. (2006) nicht beweisen, wie BDP anhand eines genomischen Mechanismus, durch Transrepression wichtiger proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und Proteinkinase A (AP-1), die Entzündung der Atemwege herabsetzen konnte. Die Aktivität von NF-κB und AP-1, sowie die Anzahl entzündlicher Zellen in der BAL änderte sich nach 10 Tagen Behandlung mit BDP nicht. Die klinische Lungenfunktion hingegen zeigte eine deutliche Verbesserung und der Unterschied zur Kontrollgruppe erwies sich als signifikant (COUETIL et al. 2006).

Bei *in vivo* Anwendung von inhaliertem Beclomethason ist durch die Komplexität der Entzündungsmechanismen einer COB ein gemischter Wirkungsmechanismus am wahrscheinlichsten, welcher eventuell *in vitro*, bzw. *ex vivo* durch weitere Untersuchungen klarer zu unterscheiden ist.

5.3.3 Effekte von PDE4-Hemmer

Die durch Leukotrien C₄ ausgelöste Bronchokonstriktion konnte in dieser Studie mit dem selektiven PDE₄-Hemmer Cilomilast inhibiert werden. Die Inhibition war bei einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l bereits deutlich, und konnte bei Konzentrationen von 10⁻⁶ und 10⁻⁵ mol/l statistisch abgesichert werden.

Eine bekannte Charakteristik von Cilomilast ist ihre entzündungshemmende Wirkung durch indirekte Modulation der cAMP Aktivität; einem wichtigen *second messenger* in der Entzündungskaskade (KROEGEL u. FOERSTER 2007). Die down-regulation verschiedener Entzündungsmediatoren wurde bereits anhand von *in vitro* Studien

sowohl beim Menschen als auch bei anderen Tieren gezeigt. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie von TNF- α und Leukotrien B₄ nach Stimulierung mit LPS wurden beim Menschen durch einen anderen PDE4-Hemmer (RP73401) herabgesetzt (BRIDEAU et al. 1999). Auch *in vivo* wurde die LPS-induzierte Produktion von TNF bei Versuchen an humanen Freiwilligen durch Verabreichung des PDE₄-Hemmers VII294A gehemmt (GALE et al. 2002).

Am Pferd konnte *ex vivo* nach LPS Stimulierung eine signifikante Senkung von Thromboxan im Blut von mit Rolipram behandelter Ponies festgestellt werden (RICKARDS et al. 2003).

Wie schon erwähnt, wirken PDE4-Hemmer intrazellulär, indem sie das Enzym Phosphodiesterase 4 hemmen. Dieses Enzym bewirkt im Normalfall die Hydrolyse des *second messenger* cAMP. Durch den erhaltenen hohen Konzentrationspiegel übt cAMP eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung der Proteinkinase A aus und verhindert so die Bronchokonstriktion. Cilomilast hemmt also direkt die Bronchokonstriktion, wirkt aber auch auf die Exprimierung proinflammatorischer Gene.

Im eigenen Versuch kommen die verminderte Übertragung des intrazellulären Signals und die dadurch verursachte Bronchodilatation am wahrscheinlichsten in Frage. Das Signal wird durch das Leukotrien aktiviert. LTC₄ bindet wie alle Cys-Leukotriene an spezifische Transmembran-Rezeptoren. Diese Rezeptoren, im speziellen Fall der Atemwegen CysLT-1, sind G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei ihrer Aktivierung wird über räumliche Veränderung der Struktur der G-Proteine eine Adenylatzyklase inaktiviert, welche zytoplasmatisches ATP in zyklisches AMP umwandelt. Die Aktivierung von CysLT1-Rezeptoren führt also zu einer Verminderung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Phosphodiesterasehemmer wie Cilomilast wirken diesem intrazellulären Signalweg entgegen. Somit wird die Weiterleitung des intrazellulären Signals unterbrochen und sowohl eine Exprimierung proinflammatorischer Gene verhindert als auch eine direkte Bronchodilatation verursacht.

Eine weitere Bemerkung gilt der Tatsache, dass erkrankte Pferde und gesunde Pferde nicht unterschiedlich auf LTC₄ reagierten. Eine Studie von RICKARDS et al.

(2000) zeigt, dass sich die PDE4-Aktivität in neutrophilen Granulozyten von lungengesunden und lungenkranken Pferde nicht unterscheidet (RICKARDS et al. 2000). Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in der eigenen Studie keine Zusammenhänge zwischen dem Erkrankungsgrad und der Reaktionsbereitschaft der PCLS festgestellt werden konnte.

In einer Studie von LAVOIE (2006) wurde ein PDE4-Hemmer zweiter Generation (L-86,141) über 14 Tage einer klinisch an COB erkrankten Gruppe von Pferden verabreicht und gegen eine mit Dexamethason behandelte Kontrollgruppe verglichen. Es wurde bei den mit dem PDE4-Hemmer behandelten Pferden keine klinische Besserung der Lungenfunktion festgestellt (LAVOIE et al. 2006). Dies konnte nicht auf zu niedrige Plasmakonzentrationen des Inhibitors zurückgeführt werden, da eine Produktion von TNF und LTB₄ trotz *ex vivo* Stimulation mit LPS nicht nachzuweisen und der PDE4-Hemmer somit biologisch aktiv war.

In der eigenen Studie konnte gezeigt werden, dass Cilomilast einen spasmolytischen Effekt auf equine PCLS besitzt. Während hierbei zur Bronchokonstriktion ein Leukotrien verwendet wurde, ergab sich auch mit dem Gebrauch von Metacholin, in der Studie von BARTON (2005) ein ähnlicher, nicht signifikanter, aber doch deutlicher relaxierender Effekt (BARTON 2005). Da die metacholininduzierte Bronchokonstriktion im Gegensatz zur leukotrieninduzierten nicht über cAMP, sondern über IP₃ vermittelt wird, ergibt sich der Verdacht, die Bronchodilatation durch Cilomilast könne auf einem cAMP-unabhängigen Mechanismus beruhen.

Die Diskrepanz zwischen den Wirkungen von Cilomilast *in vivo* und *ex vivo* könnte durch einen unterschiedlichen Einfluss verschiedener Systeme, welche den Bronchotonus regulieren erklärt werden. Das parasympathische Nervensystem ist der nervale Hauptmechanismus zur Regulation der Bronchialweite. Dies gilt sowohl für den Menschen als auch für die meisten bisher untersuchten Tierspezies (MINETTE u. BARNES 1990). Man könnte vermuten, dass das parasympathische System in den PCLS nicht mehr ausreichend ausgeprägt ist. Durch das Ausbleiben des parasympathischen Grundtonus wird eine Bronchodilatation durch PDE4-Hemmer möglich.

Beim Menschen ist dieser PDE₄-Hemmer klinisch angewandt, da er bei einer oft durch Zigarettenrauch verursachten Lungenerkrankung die neutrophil-induzierte Entzündung und Bronchospasmus sogar effektiver behebt als Glukokortikoide (KROEGEL u. FOERSTER 2007). Wie durch die oben erwähnte *in vivo* Studie von LAVOIE (2006) scheint eine unterschiedliche Pathogenese zwischen der humanen und equinen chronischen Lungenerkrankung, doch ein ausschlaggebendes Element für die Wirkung eines selektiven PDE4-Hemmers zu sein.

5.3.4 Effekte von Clenbuterol

Clenbuterol wirkt über eine Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren. Diese bewirken über G_s-Proteine die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Adenylatzyklase. Wie schon im vorherigen Kapitel besprochen, bewirkt ein hoher Spiegel von cAMP unter anderem die Bronchodilatation.

In der eigenen Untersuchung wurde Clenbuterol auf Grund einer Studie von CHANOINE (1991) an equinen Trachealmuskelstreifen in den Konzentrationen von 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} mol/l auf die PCLS appliziert. Ziel war es, eine eventuelle Antagonisierung der durch LTC₄ ausgelöste Bronchokonstriktion zu untersuchen.

Bei den mit 10^{-5} mol/l inkubierten PCLS wurde eine Tendenz zur Rechtsverschiebung der LTC-induzierten Bronchokonstriktion beobachtet, die jedoch statistisch nicht abgesichert werden konnte. Dieses ist erstaunlich, da Clenbuterol als Therapie bei Pferden mit chronischer Lungenerkrankung routinemäßig eingesetzt wird (SASSE 1988; ERICHSEN et al. 1994).

Ob die Dosierung des β_2 -Agonisten nicht ausreichend war, lässt sich anhand der Studien von TÖRNEKE (1998) und von INGVARSTLARSSON (1991) untersuchen. In der letzteren wurde bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-7,9}$ mol/l ein relaxierender Effekt an equinen Trachealmuskelstreifen beobachtet (INGVASTLARSSON 1991). TÖRNEKE et al. (1998) beobachteten ab der Konzentration von 1×10^{-6} mol/l eine komplette Entspannung der mit Carbachol vorkontrahierten Trachealmuskelstreifen von Pferden (TÖRNEKE et al. 1998). Es erscheint somit unwahrscheinlich, dass eine

zu niedrige Dosierung von 10^{-5} mol/l in der eigenen Studie zu einem Ausbleiben des Effektes führte.

Eine weitere Erklärung für die fehlende bronchodilatatorische Wirkung des β -Mimetikums könnte eine zu niedrige β_2 -Adrenozeptordichte sein. So zeigen zwei frühe Studien am Menschen, dass eine zunehmende Rezeptordichte bei zunehmender Generation der Atemwege erkennbar ist. Maximale Dichte wurde in den terminalen Atemwegen anhand von Computer-Tomographien festgestellt (SPINA et al. 1989; JOHNSON 1998). Im Gegensatz dazu wies beim Pferd ABRAHAM et al. (2003) über die spezifische Antwort der Adenylylzyklase auf β_2 Rezeptor-Subtypen in den verschiedenen Atemwegssegmenten des Lungengewebes beim Pferd eine vergleichsweise höhere Aktivität in der Trachea als in den Bronchien und terminalen Atemwege nach.

Somit kann vermutet werden, dass beim Pferd an terminalen Atemwegen wie in den PCLS keine ausreichende Rezeptordichte vorhanden ist, um einen signifikanten bronchodilatatorischen Effekt von Clenbuterol hervorzurufen.

In einer früheren Studie zeigten TÖRNEKE et al. (1997), dass die maximale relaxierende Wirkung von Clenbuterol von der Konzentration des verwendeten Bronchokonstriktor abhängig ist (TÖRNEKE et al. 1997). Die niedrigen Konzentrationen von LTC₄ in der eigenen Studie, machen es jedoch unwahrscheinlich, dass das Ausbleiben des bronchodilatatorischen Effektes durch eine zu hohe Konzentration von LTC₄ bedingt war.

Die Methodik der Precision Cut Lung Slices bietet die Möglichkeit in das komplexe Zusammenwirken von endogenen und exogenen Entzündungsfaktoren der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) einen Einblick zu gewinnen, in dem die Faktoren vereinzelt untersucht werden. Ohne den Einfluss des gesamten *in vivo* Pathomechanismus war es so möglich, den Einfluss dreier Inhibitoren auf LTC₄ induzierte Bronchokonstriktion *ex vivo* nachzustellen.

6 Zusammenfassung

Maria Carlotta Fugazzola

Pharmakologische Beeinflussung der Bronchokonstriktion durch Clenbuterol, Cilomilast und Beclomethason-dipropionat an „Precision Cut Lung Slices“ beim Pferd

Ziel dieser Studie war es, die Effekte des bereits in einer Studie von SCHWALFENBERG (2007) untersuchten pro-inflammatorischen Bronchokonstriktors Leukotrien C₄ weiterführend zu untersuchen und die Wirksamkeit dreier klinisch wichtiger Bronchodilatoren zu überprüfen.

Für diese Studie wurden 13 Pferde herangezogen. Nach einer klinischen Allgemeinuntersuchung und einer speziellen Lungenuntersuchung erfolgte eine Einteilung der Probanden in zwei Gruppen mit unterschiedlichen klinischen und labordiagnostischen Scorepunkten.

Nach Entnahme des *Lobus accessorius* unmittelbar *post mortem*, folgte dessen Befüllung mit 1,5%iger Agaroselösung und die Anfertigung von PCLS aus dem fixierten Gewebe mittels eines Mikrotoms. Die Vitalität des Lungengewebes wurde anhand einer Vorkontraktion mit Metacholin (10^{-5} mol/l) geprüft, bevor die erste Kontraktionsreihe mit Leukotrien C₄ erfolgte.

Leukotrien C₄ wurde in aufsteigenden Konzentrationen zu den PCLS hinzugefügt (von 10^{-15} bis 10^{-8} mol/l). Nach Ausspülen des Bronchokonstriktors erfolgte anschließend die Inkubation mit drei verschiedenen konzentrierten Cilomilast- (10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} mol/l) oder Clenbuterollösungen (10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} mol/l). Beclomethason-dipropionat wurde in der Konzentration von 10^{-5} mol/l appliziert. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die zweite Kontraktionsreihe mit LTC₄.

Die Effekte des Bronchokonstriktors LTC₄ wurden nach jeder Konzentrationssteigerung fotografisch dokumentiert und anschließend ausgewertet.

Die errechnete EC₅₀ betrug für LTC₄ $2,1 \times 10^{-10}$ mol/l.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe hemmte Cilomilast in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-5} mol/l den bronchokonstriktorisches Effekt von LTC₄. Der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten PCLS stellte sich als statistisch signifikant heraus ($p=0,0003$). Der hierfür verantwortliche Wirkungsmechanismus beruht vermutlich sowohl auf direkter Bronchodilatation als auch auf Hemmung des intrazellulären Signals.

Die mit Beclomethason-dipropionat (10^{-5} mol/l) behandelten PCLS zeigten ebenfalls eine deutlich geringere Kontraktion nach LTC₄ Zugabe, im Vergleich zu den unbehandelten PCLS ($p=0,002$). Der Wirkungsmechanismus dieses *in vitro*-Effektes zur Behebung eines Bronchospasmus in so kurzer Inkubationszeit (30 Minuten), könnte auf nicht-genomischen Wirkungsmechanismen beruhen.

Nach Behandlung mit Clenbuterol zeigten die PCLS nur eine Tendenz, sich auf LTC₄ weniger zu kontrahieren als die unbehandelte Kontrollgruppe ($p=0,12$). Zu begründen ist dies mit der geringeren spezifischen Antwort der Adenylylzyklase auf β_2 Rezeptor-Subtypen in equinen terminalen Atemwegen.

Die Reagibilität der PCLS der Probanden, die bei der speziellen Lungenuntersuchung einen niedrigeren klinischen und labordiagnostischen Score erhalten hatten, unterschied sich nicht von den Probanden mit höherem Score.

7 Summary

Maria Carlotta Fugazzola

The pharmacological influence of Clenbuterol, Cilomilast and Beclomethason-dipropionate on bronchoconstriction in precision cut lung slices of the horse.

The aim of this study was to further understand the effects of the inflammatory bronchoconstrictor Leukotriene C₄, already analyzed in a study of SCHWALFENBERG (2007), and to determine the efficacy of three clinically relevant bronchodilators.

Alltogether 16 horses were used for this study. Following a general clinical examination and a lung examination the horses were allocated in two groups with different score points which were assigned through a clinical and laboratory diagnostics score system.

Immediately *post mortem* the *Lobus accessorius* was removed and filled with 1,5% agarose solution in order to harden the otherwise instable lung tissue. Subsequently PCLS were obtained from the lung tissue with a microtome. Vitality was checked through a pre contraction with Metacholin (10⁻⁵ mol/l) before the first contraction with Leukotriene C₄ was performed.

The concentration of the bronchoconstrictor was increased at each application on PCLS beginning with 10⁻¹⁵ mol/l up to 10⁻⁸ mol/l. After rinsing, the PCLS were incubated for 30 minutes with three different concentrations of Cilomilast (10⁻⁴, 10⁻⁵ und 10⁻⁶ mol/l) or Clenbuterol (10⁻⁵, 10⁻⁶ und 10⁻⁷ mol/l) whilst Beclomethason-dipropionat was added only in one concentration (10⁻⁵ mol/l). After 30 minutes of incubation another contraction series with LTC₄ was performed.

The effects of the bronchoconstrictor LTC₄ were recorded through digital photography after every increase of concentration and were later evaluated.

The calculated EC₅₀ for LTC₄ was 2,1 x 10⁻¹⁰ mol/l.

Cilomilast inhibited the bronchoconstricting effect of LTC₄ in a significant way at concentrations of 10⁻⁴ and 10⁻⁵ mol/l if compared to the control group (p=0,0003). The mechanism of action that caused inhibition in this case probably is based on a direct bronchodilatation as well as inhibition of intracellular signals.

At the applied concentration of 10⁻⁵ mol/l also Beclomethason had a significant inhibitory effect on LTC₄-caused bronchoconstriction in comparison to the untreated lung slices (p=0,002). It appears probable that in such short incubation time (30 minutes), the bronchodilatation was mediated through a non-genomic mechanism of action.

Furthermore after treatment with Clenbuterol the PCLS showed a trend to less contraction after stimulation with LTC₄ if compared with the control group (p=0,12). A low specific response of adenylyl cyclase to β₂-receptors subtypes in equine terminal airways may explain the statistical insignificance of this effect.

The sensitivity of PCLS deriving from horses which had been allocated in the group with a moderate clinical and laboratory-diagnostic score did not differ from those placed in the second, higher scored group.

8 Literaturverzeichnis

ABRAHAM G., BRODDE O.E., UNGEMACH F.R. (2001):
Clenbuterol-vermittelte Herabregulation lymphozytärer β 2-Adrenorezeptoren bei Pferden: Dexamethason verhindert den tachyphylaktischen Effekt von Clenbuterol.
Tierärztliche Praxis 29, 366-372

ABRAHAM, G., C. KOTTKE, S. DHEIN u. F. R. UNGEMACH (2003):
Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract.
Biochemical Pharmacology 66, 1067-1081

AINSWORTH, D. M., G. GRUNIG, M. B. MATYCHAK, J. YOUNG, B. WAGNER, H. N. ERB u. D. F. ANTCZAK (2003):
Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells.
Veterinary Immunology and Immunopathology 96, 83-91

AMMANN, V. J., A. A. VRINS u. J. P. LAVOIE (1998):
Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).
Equine Veterinary Journal 30, 152-157

BARNES, P. J. BASBAUM, C. B. NADEL, J. A. ROBERTS (1983):
Pulmonary Alpha-Adrenoceptors - Autoradiographic Localization Using [H-3]-Labeled Prazosin.
European Journal of Pharmacology 88, 75-62

BARNES, P. J. (1998):
Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 102, 531-538

BARNES, P. J. (2000):
Mechanism in COPD: Difference from Asthma.
Chest Journal 117, 105-145

BARTHOLOME, B., C. M. SPIES, T. GABER, S. SCHUCHMANN, T. BERKI, D. KUNKEL, M. BIENERT, A. RADBRUCH, G. R. BURMESTER, R. LAUSTER, A. SCHEFFOLD u. F. BUTTGEREIT (2004):
Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis.
Faseb Journal 18, 70-80

- BARTON, A. (2005)
Pharmakologische Beeinflussung der Bronchokonstriktion an Precision Cut Lung Slices (PCLS) beim Pferd.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
- BEECH J. (1975):
Cytology of tracheobronchial aspirates in horses.
Veterinary Pathology 12, 157-164
- BEECH, J. (1991):
Chronic obstructive pulmonary disease
Veterinary Clinics of North American Practice 7, 79-91
- BISGAARD, H. (2001):
Leukotriene modifiers in pediatric asthma management.
Pediatrics 107, 381-390
- BOSWELL-SMITH, V., D. SPINA u. C. P. PAGE (2006):
Phosphodiesterase inhibitors.
British Journal of Pharmacology 147, S252-S257
- BRIDEAU, C., C. VAN STADEN, A. STYHLER, I. W. RODGER u. C. C. CHAN (1999):
The effects of phosphodiesterase type 4 inhibitors on tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B-4 in a novel human whole blood assay.
British Journal of Pharmacology 126, 979-988
- BROADSTONE, R. V., J. S. SCOTT, F. J. DERKSEN u. N. E. ROBINSON (1988):
Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction.
Journal of Applied Physiology 65, 2720-2725
- BRUNNER P., DIX R. (1987):
Die texturgestörte Bronchusschleimhaut des Pferdes, zugleich ein Beitrag zur Beschaffenheit der bronchialen Basalmembran.
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 101, 1-10
- BUTTGEREIT, F., M. WEHLING u. G. R. BURMESTER (1998):
A new hypothesis of modular glucocorticoid actions - Steroid treatment of rheumatic diseases revisited.
Arthritis and Rheumatism 41, 761-767
- BUTTGEREIT, F., J. A. P. DA SILVA, M. BOERS, G. R. BURMESTER, M. CUTOLO, J. JACOBS, J. KIRWAN, L. KOHLER, P. VAN RIEL, T. VISCHER u. J. W. J. BIJLSMA (2002):
Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology.
Annals of the Rheumatic Diseases 61, 718-722

BUTTGEREIT, F. u. A. SCHEFFOLD (2002):
Rapid glucocorticoid effects on immune cells.
Steroids 67, 529-534

CELLI B.R., MACNEE W. ATS/ERS TASK FORCE (2004):
Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the
ATE/ERS position paper.
European Respiratory Journal 23, 932-946

COUETIL, L. L., T. ART, B. DE MOFFARTS, M. BECKER, D. MELOTTE, F.
JASPAR, F. BUREAU u. P. LEKEUX (2006):
Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung
function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in
airways of horses with recurrent airway obstruction.
Journal of Veterinary Internal Medicine 20, 399-406

COUROUCE-MALBLANC, A., G. FORTIER, S. PRONOST, B. SILIART u. G.
BRACHET (2008):
Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of
environmental control in heaves-affected horses.
Veterinary Journal 175, 227-233

CROXTALL, J. D., Q. CHOUDHARY u. R. J. FLOWER (2000):
Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to
activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent
mechanism.
British Journal of Pharmacology 130, 289-298

CUNNINGHAM, F. M. u. B. DUNKEL (2008):
Equine recurrent airway obstruction and insect bite hypersensitivity: Understanding
the diseases and uncovering possible new therapeutic approaches.
Veterinary Journal 177, 334-344

DAHLEN, S. E. (2000):
Pharmacological characterization of leukotriene receptors.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 161, S. 41-45

DEBOER, J., A. J. PHILPOTT, R. G. M. VANAMSTERDAM, M. SHAHID, J.
ZAAGSMA u. C. D. NICHOLSON (1992):
Human Bronchial Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase Isoenzymes - Biochemical
and Pharmacological Analysis Using Selective Inhibitors.
British Journal of Pharmacology 106, 1028-1034

- DECONTO, I. (1983):
Zytologische und bakteriologische Untersuchungen des Tracheobronchialsekrets bei chronisch lungenkranken Pferden.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
- DEEGEN, E. u. M. ZICHNER (1970):
Zur klinischen Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen des Pferdes
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 77, 616-621
- DERKSEN F.J., BROWN C.M., SONEA I., DARIEN B.J., ROBINSON N.E. (1989):
Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease.
Equine Veterinary Journal 21, 23-26
- DERKSEN, F. J. (1993):
Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition.
Equine Veterinary Journal 25, 257-258
- DERKSEN, F. J., N. E. ROBINSON (2002):
Overview of the equine respiratory system.
In: Equine respiratory diseases
International Veterinary Information Service
[Internet: URL: <http://www.ivis.org>]
- DIECKMANN, M. u. E. DEEGEN (1990):
Klinische Bedeutung der Tracheobronchialsekret-Zytologie.
Pferdeheilkunde 6, 101-110
- DIXON, P. M. (1992):
Respiratory Mucociliary Clearance in the Horse in Health and Disease, and Its Pharmaceutical Modification.
Veterinary Record 131, 229-235
- DIXON, P. M., D. I. RAILTON u. B. C. MCGORUM (1995):
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses.
Equine Veterinary Journal 27, 416-421
- DOUCET, M. Y., T. R. JONES u. A. W. FORDHUTCHINSON (1990):
Responses of equine trachealis and lung parenchyma to methacholine, histamine, serotonin, prostanoids, and leukotrienes in vitro.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 68, 379-383
- DRAZEN J.F. (1998):
Leukotrienes as mediators of airway obstruction.
American Journal of Respiratory Critical Care Medicine 158, 193-200

- DUVIVIER, D. H., D. VOTION, S. VANDENPUT, T. ART u. P. LEKEUX (1997):
Technical validation of a face mask adapted for dry powder inhalation in the equine species.
Equine Veterinary Journal 29, 471-476
- EDER, C., I. CURIK, G. BREM, R. CRAMER, I. BODO, F. HABE, S. LAZARY, J. SOLKNER u. E. MARTI (2001):
Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from lipizzan horses.
Equine Veterinary Journal 33, 714-720
- EGLIN, R. M., S. S. HEGDE u. N. WATSON (1996):
Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function.
Pharmacological Reviews 48, 531-565.
- ERICHSEN, D. F., A. D. AVIAD, R. H. SCHULTZ u. T. J. KENNEDY (1994):
Clinical Efficacy and Safety of Clenbuterol Hci When Administered to Effect in Horses with Chronic Obstructive Pulmonary-Disease (COPD).
Equine Veterinary Journal 26, 331-336.
- EWART, S. L. u. N. E. ROBINSON (2007):
Genes and respiratory disease: a first step on a long journey.
Equine Veterinary Journal 39, 270-274.
- FERGUSON DC & HOENIG M (2001):
Glucocorticoids, Mineralocorticoids, and Steroid Synthesis Inhibitors
In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, H.R. ADAMS (Hrsg.).
Iowa State University Press, Ames, S. 649 – 671
- FEY, K. (2006):
COPD und Asthma in der Humanmedizin versus RAO, CB und COB beim Pferd.
Pferdespiegel 3, 118-126.
- FREY, F. J. (1987):
Kinetics and dynamics of prednisolone.
Endocrinological Review 8, 453-473
- GALE, D. D., L. J. LANDELLS, D. SPINA, A. J. MILLER, K. SMITH, T. NICHOLS, Y. ROTSHTEYN, A. TONELLI, P. LACOUTURE, R. M. BURCH, C. P. PAGE u. B. J. O'CONNOR (2002):
Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile following oral administration of the phosphodiesterase (PDE)4 inhibitor V11294A in healthy volunteers.
British Journal of Clinical Pharmacology 54, 478-484.

GERBER, V., J. E. SWINBURNE, S. C. BLOTT, P. NUSSBAUMER, A. RAMSEYER, J. KLUKOWSKA-ROTZLER, G. DOLE, E. MARTI, D. BURGER u. T. LEEB (2008):
Genetik der rezidivierenden Atemwegsobstruktion (RAO)
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 115, 271-275.

GIGUERE, S., L. VIEL, E. LEE, R. J. MACKAY, J. HERNANDEZ u. M. FRANCHINI (2002):
Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate.
Veterinary Immunology and Immunopathology 85, 147-158.

GILLISSEN, A. u. T. WELTE (2002):
State-of-the-Art der inhalativen Asthmatherapie.
Medizinische Klinik 97, 12-14.

GLOVER, S. T. BAYBURT, M. JONAS, E. CHI, M. GELB (1995):
Translokation of the 85-k-Da Phospholipase A₂ from Cytosol to the Nuclear Envelope in Rat Basophilic Leucemia Cells stimulated with Calcium Iodophore or IgE/Antigen.
Journal of Biological Chemistry 270, 15359-15367

HAGEDORN, H. W., S. ZUCK u. R. SCHULZ (1995):
Detection of clenbuterol (Ventipulmin) in the horse.
Zentralblatt Veterinärmedizin A 42, 209-219.

HANANIA, N. A. (2008):
The impact of inhaled corticosteroid and long-acting beta-agonist combination therapy on outcomes in COPD.
Pulmonary Pharmacological Therapy 21, 540-550.

HARVEY, B. J., R. ALZAMORA, V. HEALY, C. RENARD u. C. M. DOOLAN (2002):
Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing.
Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1566, 116-128.

HODGSON, J. L. (2002):
Inflammatory Airway Disease.
in: P. Lekeux (Hrsg.), Equine Respiratory Diseases
International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, www.ivis.org

HOTCHKISS, J. W., S. W. J. REID u. R. M. CHRISTLEY (2007):
A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction.
Equine Veterinary Journal 39, 301-308.

HUI, Y. Q. u. C. D. FUNK (2002):
Cysteinyl leukotriene receptors.
Biochemical Pharmacology 64, 1549-1557

IKEMURA, T., J. SCHWARZE, M. MAKELA, A. KANEHIRO, A. JOETHAM, K. OHMORI u. E. W. GELFAND (2000):

Type 4 phosphodiesterase inhibitors attenuate respiratory syncytial virus-induced airway hyper-responsiveness and lung eosinophilia.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 294, 701-706.

INGVAST-LARSSON, C. (1991):

Relaxant effects of theophylline and clenbuterol on tracheal smooth muscle from horse and rat in vitro.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 14, 310-316

IRAVANI, J. , G. N.MELVILLE (1974):

Mucociliary Function of Respiratory-Tract as Influenced by Drugs.

Respiration 31, 350-357

JOHNSON, M. (1998):

The beta-adrenoceptor.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 158, S146-S153.

KANAOKA, Y. u. A. A. BOYCE (2004):

Cysteinyl leukotrienes and their receptors: (Cellular distribution and function in immune and inflammatory responses.

Journal of Immunology 173, 1503-1510.

KOLM, G., H. ZAPPE, R. SCHMID, K. RIEDELBERGER u. R. VAN DEN HOVEN (2003):

Efficacy of montelukast in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease in five horses.

Veterinary Record 152, 804-806.

KROEGEL, C. u. M. FOERSTER (2007):

Phosphodiesterase-4 inhibitors as a novel approach for the treatment of respiratory disease: cilomilast.

Expert Opin Investig Drugs 16, 109-124.

LAAN, T. T. J. M., S. BULL, R. S. PIRIE u. J. FINK-GREMMELS (2006):

The anti-inflammatory effects of IV administered clenbuterol in horses with recurrent airway obstruction.

Veterinary Journal 171, 429-437.

LAVOIE, J. P., R. LEGUILLETTE, K. PASLOSKE, L. CHARETTE, N. SAWYER, D. GUAY, T. MURPHY u. G. J. HICKEY (2002):

Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction.

American Journal of Veterinary Research 63, 579-585.

- LAVOIE, J. P. (2003):
Heaves (Recurrent Airway Obstruction): Practical Management of Acute Episodes and Prevention of Exacerbations
In: N.E. Robinson (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine
Saunders Verlag, St. Louis, S. 417-421
- LAVOIE, J. P., K. PASLOSKE, P. JOUBERT, M. E. CORDEAU, J. MANCINI, Y. GIRARD, R. W. FRIESEN, R. FRENETTE, M. BLOUIN, R. N. YOUNG u. G. HICKEY (2006):
Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses.
Journal of Veterinary Internal Medicine 20, 175-181
- LAVOIE, J. P. (2007)
Recurrent Airway Obstruction (Heaves) and Summer-pastured-associated Obstruktive Pulmonary Disease
In: Bruce, C., McGorum, N., Edward Robinson, Schumacher, J. Dixon, M. P. (Hrsg):
Equine Respiratory Medicine and Surgery, S. 556-589
- LEGUILETTE R. (2003):
Recurrent airway obstruction - heaves.
Equine Veterinary Journal 19, 63-86
- LEW, K. H., E. A. LUDWIG, M. A. MILAD, K. DONOVAN u. E. MIDDLETON (1993):
Gender-based effects on methylprednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics.
Clinical Pharmacology and Therapy 54, 402-414
- LIBRETTO, S. E. (1995):
Review of the toxicology of beclomethasone dipropionate.
Arch Toxicol 69, 509-525
- LINDBERG, A., B. NASMAN-GLASER, J. A. LINDGREN u. N. E. ROBINSON (2002):
Evaluation of leukotriene biosynthetic capacity in lung tissues from horses with recurrent airway obstruction.
American Journal of Veterinary Research 63, 794-798.
- LÖSCHER, W. (2002):
Pharmakologie des vegetativen (autonomen) Nervensystems.
In: Frey, H.-H., Löscher, W. (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.
2. Aufl., Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 24-44
- LÜLLMANN, H., MOHR, K., A. ZIEGLER (1996):
Pharmaka zur Beeinflussung des Sympathikus/Parasympathikus.
In: Taschenatlas der Pharmakologie.
3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S. 81-10

- MAGNUSSEN, H., K. RICHTER, C. TAUBE (1998):
Are chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma different diseases?
Clinical and Experimental Allergy Journal 28, 187-194
- MAIR T.S. (1987):
Value of tracheal aspirates in the diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease
in the horse.
Equine Veterinary Journal 19, 463-465
- MARR, K., P. LEES, C. P. PAGE u. F. M. CUNNINGHAM (1998a):
Inhaled leukotrienes cause bronchoconstriction and neutrophil accumulation in
horses.
Research in Veterinary Science 64, 219-224.
- MARR, K., K. MARSH, L. HERNANDEZ, F. M. CUNNINGHAM u. P. LEES (1998b):
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fenleuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, in
ponies.
Research in Veterinary Science 64, 111-117.
- MARTI, E., H. GERBER, G. ESSICH, J. OULEHLA u. S. LAZARY (1991):
The Genetic-Basis of Equine Allergic Diseases 1. Chronic Hypersensitivity Bronchitis.
Equine Veterinary Journal 23, 457-460.
- MARTIN, C., S., UHLIG, V., ULLIRICH (1996):
Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in
precision-cut lung slices.
European Respiratory Journal 9, 2479-2487.
- MARTIN, C., R. GOGGEL, V. DAL PIAZ, C. VERGELLI, M. P. GIOVANNONI, M.
ERNST u. S. UHLIG (2002):
Airway relaxant and anti-inflammatory properties of a PDE4 inhibitor with low affinity
for the high-affinity rolipram binding site.
Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 365, 284-289.
- MARTIN, H., J. P. SARSAT, I. DE WAZIERS, C. HOUSSET, P. BALLADUR, P.
BEAUNE, V. ALBALADEJO u. C. LERCHE-LANGRAND (2003):
Induction of cytochrome P4502B6 and 3A4 expression by phenobarbital and
cyclophosphamide in cultured human liver slices.
Pharmaceutical Research 20, 557-568.
- MATERA, M. G., M. AMORENA, A. LUCISANO (2002):
Innervation of equine airways.
Pulmonary Pharmacology and Therapeutics 15, 503-511
- MCGORUM, B. C. u. P. M. DIXON (1993a):

Evaluation of Local Endobronchial Antigen Challenges in the Investigation of Equine Chronic Obstructive Pulmonary-Disease.
Equine Veterinary Journal 25, 269-272.

MCGORUM, B. C., P. M. DIXON u. R. E. W. HALLIWELL (1993b):
Responses of Horses Affected with Chronic Obstructive Pulmonary-Disease to Inhalation Challenges with Mold Antigens.
Equine Veterinary Journal 25, 261-267.

MCGORUM, B. C. u. R. S. PIRIE (2008):
A review of recurrent airway obstruction and summer pasture associated obstructive pulmonary disease.
Ippologia 19, 11-19.

MERCK (2008):
Inhalation Therapy of airways disease: Overview
In: The Merck Veterinary Manual.
Merck & Co, New York. www.merckvetmanual.com

MICHEL, O., M. DENTENER, D. CATALDO, B. CANTINIEAUX, F. VERTONGEN, C. DELVAUX u. R. D. MURDOCH (2007):
Evaluation of oral corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitor on the acute inflammation induced by inhaled lipopolysaccharide in human.
Pulm Pharmacol Ther 20, 676-683.

MINETTE, P. A. u. P. J. BARNES (1990):
Muscarinic receptor subtypes in lung. Clinical implications.
American Revue of Respiratory Diseases 141, S162-165.

MORRISON, N. u. J. EISMAN (1993):
Role of the Negative Glucocorticoid Regulatory Element in Glucocorticoid Repression of the Human Osteocalcin Promoter.
Journal of Bone and Mineral Research 8, 969-975.

MUTO, S., S. EBATA, K. OKADA, T. SAITO u. Y. ASANO (2000):
Glucocorticoid modulates Na⁺/H⁺ exchange activity in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms.
Kidney International 57, 2319-2333.

NAGASE, T., Y. FUKUCHI, M. J. DALLAIRE, J. G. MARTIN u. M. S. LUDWIG (1995):
In-Vitro Airway and Tissue-Response to Antigen in Sensitized Rats - Role of Serotonin and Leukotriene D-4.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 152, 81-86.

NATIONAL COLLABORATORY CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS (2004):
National clinical guideline on management of chronic obstructive pulmonary disease
in adults in primary and secondary care.
Thorax 59, 1-232

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD
INSTITUTE (2003):
Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive
pulmonary disease.
NHLBI/WHO workshop report. Update 2003 www.goldcopd.com

NAVE, R., R. FISHER u. N. MCCRACKEN (2007):
In vitro metabolism of beclomethasone dipropionate, budesonide, ciclesonide, and
fluticasone propionate in human lung precision-cut tissue slices.
Respiratory Research 8, 65.

NEUMANN, F. B.SCHENK, H. SCHLEUSENER, H.U. SCHWEIKERT (1998):
Endokrinpharmakologie: Pharmakotherapie mit Hormonen
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Spektrum akademischer Verlag (Hrsg.), Heidelberg, S. 581-637

NIEDORF, F. (2009)
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover, Persönliche Mitteilung

OHNESORGE, B. B. TRÖTSCHER, E. DEEGEN (1998):
Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischvolumen zur Diagnostik
chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd.
Pferdeheilkunde 14, 450-455

OHNESORGE, B. (2004):
Aktuelle, therapeutische Ansätze bei der Bekämpfung von Atemwegserkrankungen.
In: Sommersymposium - Akademie für Tiergesundheit, www.aft-online.de

OLZIEWSKI M.A., ROBINSON N.E., DERKSEN F.J. (1997):
In vitro responses of equine small airways and lung parenchyma.
Respiratory Physiology 109, 167-176

PESKAR B.A. (2001):
Derivate des Arachidonsäure-Stoffwechsels.
In: FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., FÖRSTERMANN U., STARKE K.
(Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
8., vollst. Überarbeitete Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, S. 381-391

RABE, K. F., H. TENOR, G. DENT, C. SCHUDT, S. LIEBIG u. H. MAGNUSSEN (1993):

Phosphodiesterase Isozymes Modulating Inherent Tone in Human Airways - Identification and Characterization.

American Journal of Physiology 264, L458-L464.

RICKARDS, K. J., C. P. PAGE, P. LEES u. F. M. CUNNINGHAM (2000):

Phosphodiesterase activity in neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease.

Veterinary Immunology and Immunopathology 76, 319-330.

RICKARDS, K. J., C. P. PAGE, P. LEES, G. GETTINBY u. F. M. CUNNINGHAM (2003):

In vitro and ex vivo effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor, rolipram, on thromboxane production in equine blood.

J Vet Pharmacol Ther 26, 123-130.

ROBINSON, N. E., F. J. DERKSEN, M. A. OLSZEWSKI, V. A. BUECHNER-MAXWELL (1996):

The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses.

British Veterinary Journal 152, 283-306

ROBINSON, N. E., M. A. OLSZEWSKI, D. BOEHLER, C. BERNEY, J. HAKALA, C. MATSON u. F. J. DERKSEN (2000):

Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial.

Equine Veterinary Journal 32, 393-400.

ROBINSON, N.E. (2001):

Recurrent airway obstruction (heaves)

In: P. Lekeux (Hrsg.): Equine Respiratory Disease,

International Veterinary Information Service, www.ivis.org (Hrsg.)

Itacah, New York, USA

Band: B0317.1101

RUSH, B. R., M. J. FLAMINIO, C. J. MATSON, J. E. HAKALA u. W. SHUMAN (1998a):

Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively.

American Journal of Veterinary Research 59, 1033-1038.

RUSH, B. R., E. S. RAUB, W. S. RHOADS, M. J. B. F. FLAMINIO, C. J. MATSON, J. E. HAKALA u. J. R. GILLESPIE (1998b):

Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively.

American Journal of Veterinary Research 59, 1039-1043.

RUSH, B. R., E. S. RAUB, M. M. THOMSEN, E. G. DAVIS, C. J. MATSON u. J. E. HAKALA (2000):

Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction.

Journal of American Veterinary Medical Association 217, 359-364.

SAETTA, M., G. TURATO, P. MAESTRELLI, C. E. MAPP u. L. M. FABBRI (2001):

Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 163, 1304-1309.

SAKAI, D. D., S. HELMS, J. CARLSTEDT DUKE, J. A. GUSTAFSSON, F. M. ROTTMAN u. K. R. YAMAMOTO (1988):

Hormone-Mediated Repression - a Negative Glucocorticoid Response Element from the Bovine Prolactin Gene.

Genes & Development 2, 1144-1154.

SASSE, H. H. L. (1988):

Kontrollierte Versuche zum quantitativen Wirkungsnachweis von Ventipulmin-Lösung bei COPD Pferden.

Tierärztliche Umschau 43, 550-556

SASTRE, J. (1997):

Pharmacology of fluticasone propionate.

Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology 7, 382-384.

SCHUSSER, G. F., M. WIEGAND u. A. RUHLAND (1999):

Technique and cell differential in bronchoalveolar lavage of horses with COPD.

Praktische Tierarzt 80, 601-603.

SCHWALFENBERG, B. (2007)

Untersuchung der Leukotrienwirkung am Pferdebronchus mittels "precision-cut lung slices" (PCLS).

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation

SCOTT, J. S., H. GARON, R. V. BROADSTONE, F. J. DERKSEN, N. E. ROBINSON (1988):

α 1 - Adrenergic – induced airway obstruction in ponies with recurrent pulmonary disease.

Journal of Applied Physiology 65, 687-692

SONEA, I. M., R. M. BOWKER, R. V. BROADSTONE u. N. E. ROBINSON (1993):
Adrenergic and peptidergic innervation of the trachealis muscle in the normal horse:
a preliminary report.

Research in Veterinary Science 54, 335-339.

SPINA, D., P. J. RIGBY, J. W. PATERSON u. R. G. GOLDIE (1989):
Alpha-1-Adrenoceptor Function and Autoradiographic Distribution in Human
Asthmatic Lung.

British Journal of Pharmacology 97, 701-708.

STRYER L. (1996):

Der Fettstoffwechsel.

In: STRYER L. (Hrsg): Biochemie.

4. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, S. 656-657

SUBRAMANIAM, N., W. CAIRNS u. S. OKRET (1997):

Studies on the mechanism of glucocorticoid-mediated repression from a negative
glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene.

DNA and Cell Biology 16, 153-163.

TAYLOR, F. u. M. HILLYER (2001):

Klinische Diagnostik in der Pferdepraxis.

Verlag Schlütersche, Hannover, 223-258.

THOMSON, J. R. u. E. A. MCPHERSON (1984):

Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with
chronic obstructive pulmonary disease.

Equine Veterinary Journal 16, 35-38.

TÖRNEKE, K., C. I. LARSSON u. L. E. APPELGREN (1997):

Relaxation of equine tracheal muscle in vitro by different adrenoceptor drugs.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 20, 216-219.

TÖRNEKE, K., C. I. LARSSON u. L. E. APPELGREN (1998):

A comparison between clenbuterol, salbutamol and terbutaline in relation to receptor
binding and in vitro relaxation of equine tracheal muscle.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 21, 388-392.

TÖRNEKE, K., C. INGVAST-LARRSON, A. BOSTRÖM, L. -E. APPELGREN (2002):

Muscarinic receptors in equine airways.

Veterinary Research Communications 26, 637-650

TRAUB-DARGATZ, J. L., M. D. SALMAN u. J. L. VOSS (1991):

Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners.

Journal of American Veterinary Medical Association 198, 1745-1747.

- TURGUT, K. u. H. H. L. SASSE (1989):
Influence of Clenbuterol on Mucociliary Transport in Healthy Horses and Horses with Chronic Obstructive Pulmonary-Disease.
Veterinary Record 125, 526-530.
- VAN DEN HOVEN, R., J. C. DUVIGNEAU, R. T. HARTL u. M. GEMEINER (2006):
Clenbuterol affects the expression of messenger RNA for interleukin 10 in peripheral leukocytes from horses challenged intrabronchially with lipopolysaccharides.
Veterinary Research Communications 30, 921-928.
- VAN DER VELDEN (1998):
Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma.
Mediators of Inflammation 7, 229-237.
- VAN NIEUWSTADT, R. A., P. A. J. HENRICKS, R. HAJER, W. A. M. VAN DER MEER, VAN ROOMEN, H. J. BREUKINK, F. P. NIJKAMP (1997):
Characterization of muscarinic receptors in equine tracheal smooth muscle *in vitro*.
Veterinary Quarterly 19, 54-57
- VIETMEIER, J. (2004)
Untersuchung zur Atemwegsreagibilität an Precision Cut Lung Slices (PCLS) beim Pferd.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
- WANG, Z. W., M. F. YU, N. E. ROBINSON u. F. J. DERKSEN (1995):
Acetylcholine release from airway cholinergic nerves in horses with heaves, an airway obstructive disease.
American Journal of Respiratory Critical Care Medicine 151, 830-835.
- WATSON, L., F. THOMSON, M. SHAHID, D. R. HILL u. M. W. CRAIGHEAD (2003):
Org 34517 is a potent inhibitor of the glucocorticoid receptor in a physiologically relevant in vitro system.
Journal of Psychopharmacology 17, 19-23.
- WEIDELI U. (1981):
Arterielle Blutgasanalyse bei Pferden mit chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) in Ruhe, während und nach körperlicher Belastung.
Zürich, Veterinärmedizinische Fakultät der Uni Zürich, Dissertation.
- WENZEL, S. E. (2003):
The role of leukotrienes in asthma.
Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 69, 145-155.
- WOHLSEN, A., C. MARTIN, E. VOLLMER, D. BRANSCHIED, H. MAGNUSSEN, W. M. BECKER, U. LEPP u. S. UHLIG (2003):
The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices.
European Respiratory Journal 21, 1024-1032.

YU, M., N. E. ROBINSON, Z. WANG u. F. J. DERKSEN (1992):
Muscarinic receptor subtypes in equine tracheal smooth muscle.
Veterinary Research Communications 16, 301-310.

YU M.F., WANG Z.W., ROBINSON N.E., DERKSEN F.J. (1994):
Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves.
Journal of Applied Physiology 77, 2149-2154

ZHANG, X. Y., F. X. ZHU u. N. E. ROBINSON (1996):
Excitatory prejunctional beta(2)-adrenoceptor distribution within equine airway
cholinergic nerves.
Respiration Physiology 106, 81-90

9 Anhang

Modifiziertes Score-System zur Untersuchung des Atmungsapparates beim Pferd
(OHNESORGE et. al.1998)

Untersuchungsmerkmal	Befunde	Punktzahl
Hustenauslösung (max. 1 Punkt)	nicht auslösbar	0
	mehrfach	1
	Auswurf	1
	spontaner Husten	1
Ruhedyspnoe (max. 3 Punkte)	Einsinken der IC- Räume	3
	Nüsternblähen	3
	Verlängerte Ausatmung	1
	Dampfrinne	3
	Afteratmung	3
Lungenauskultation (max. 2 Punkte)	Rassel	2
	Knistern	2
	Giemen	2
Lungenperkussion (max. 2 Punkte)	Erweiterung 3 Finger	0
	Erweiterung handbreit	1
	Dämpfung	2
Tracheobronchoskopie (max. 2 Punkte)	Sekret deutlich vermehrt u./o. mäßig viskös	1
	Sekret hochgradig vermehrt u./o. zähviskös	2
	Carina tracheae deutlich verdickt	1
TBS-Analyse (max. 1 Punkt)	Neutrophilie, Makrophagen oder Eosinophile mgr.-hgr. vermehrt	1
Blutgasanalyse (max. 2 Punkte)	$p_{(A-a)}O_2$ 7-14 mmHg	1
	$p_{(A-a)}O_2$ > 14 mmHg	2
Bronchoalveoläre Lavage (max. 2 Punkte)	Zellen in %:	
	0-8 n.G. oder 0-2 Eos. oder 0-5 Mc.	0
	8-25 n.G. oder >2 Eos. oder > 5 Mc.	1
	>25 n.G.	2
Legende: TBS: tracheobronchialsekret		IC: intercostal
n.G.: neutrophile Granulozyten		mgr.: mittelgradig
Eos: eosinophile Granulozyten		hgr.: hochgradig
Mc: Mastzelle		

Danksagung

Ein erstes herzliches Dankeschön geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. B. Ohnesorge für die Möglichkeit an der Klinik für Pferde mein Internship und meine Doktorarbeit durchführen zu dürfen, für die professionelle und menschliche Unterstützung und für die interessanten linguistischen Konversationen über deutsche und italienische Etymologien.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. M. Kietzmann für die Bereitstellung des Themas, für die freundliche Unterstützung und Beratung und für die Aufklärung über deutsche Fußballmannschaften.

Den Mitarbeitern des pharmakologischen und virologischen Instituts danke ich für die nette und unterhaltsame Unterstützung während der Arbeit. Vor allem möchte ich mich bei Frank Niedorf herzlich für die freundliche all-around Unterstützung, für die vielen Zwischenbesprechungen und für die essentielle Hilfe im statistischen Teil bedanken.

Aki Barton danke ich für viele gute Ratschläge, für die jederzeit freundschaftliche Unterstützung und für die Einarbeitung in die Methodik. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen!

Ohne die anderen Interns wäre meine Zeit in und außerhalb der Klinik nur halb so schön gewesen. Ich möchte mich bei Euch bedanken für nette kleine (alternative) Reisen nach Berlin, für eine lustige und lehrreiche Zeit in der Ortho, für 20 Schwimmbahnen in der Woche, für blaue Flecken, für Aperitivos, für das Teilen der Tatsache doch ein Immigrant zu sein und für eine unersätzbliche Begleitung in allen Situationen.

Ein wirklich besonderer Dank geht an Hasi und Maus... dafür dass es Euch gibt! Ci vediamo a Roma☺

Ich möchte mich bei meinen drei Mitbewohnerinnen Lara, Uta und Manu bedanken für eine lustige und „abwechslungsreiche“ Zeit in der Grossen Düwelstrasse 47, in welcher wir viel geteilt haben.

Last but not least (actually even most!) danke ich herzlich meinen Eltern, meinem Onkel und Tante Eberlein für die immer sehr konkrete, hilfreiche und lebenswürdige Unterstützung in meiner hannoveraner Zeit.