

Proteaseaktivität im Tracheobronchialekret von Pferden mit COPD: Pathophysiologische Bedeutung

Gabriele Grünig, M. Hermann, Sophie Jorisch,
Cornelia Schärer und R. von Fellenberg

Abteilung für angewandte Veterinär-Physiologie (Leiter: Prof. Dr. R. von Fellenberg) des Instituts für Veterinär-Physiologie (Leiter: Prof. Dr. E. Scharrer) und Klinik für Innere Medizin (Leiter: Prof. Dr. P. F. Suter) der Universität Zürich

Einleitung

Die chronisch obstruktiven Pneumopathien (COPD) des Pferdes sind schon sehr lange bekannt (Aristoteles, 333 v. Chr.) und auch heute noch häufig Grund für die Unbrauchbarkeit von Pferden (Gerber, 1973, *Gutekunst*, 1977, *British Equine Veterinary Association*, 1965, Boulton et al., 1983, Butler und Armbruster, 1984). Das klinische Bild wird meistens durch eine chronische Bronchitis und Bronchiolitis (Hall und Stark, 1983, Thurlbeck und Lowell, 1964, Gerber, 1973) geprägt. Seltener findet man ein alveoläres Emphysem, meistens im Zusammenhang mit einer Bronchitis/Bronchiolitis (Hall und Stark, 1983, Thurlbeck und Lowell, 1964, Alexander, 1959), aber auch alleine auftretend (Gillespie et al., 1964). Schließlich können auch interstitielle Pneumopathien, ähnlich der menschlichen „farmer's lung“ (Pauli et al., 1972, Thurlbeck und Lowell, 1964), zusammen mit einer Bronchitis/Bronchiolitis vorkommen (Pauli et al., 1972).

Die Tracheobronchoskopie hat seit ihrer Einführung durch Cook (1974) und Fischer (1980) neue Dimensionen in der klinischen Erfassung und Beurteilung von Atemwegserkrankungen der Pferde eröffnet. Einen anderen sich daraus ergebender Aspekt stellt die Analyse von auf diese Art und Weise einfach und sicher gewinnbarem Tracheobronchialekret dar. Am häufigsten und am genauesten untersucht sind bisher die zelluläre Zusammensetzung und der Gehalt an Mikroorganismen. Weniger bekannt sind biochemische Parameter im Tracheobronchialekret von Pferden.

Bei Pferden mit COPD findet man eine Ansammlung von Entzündungszellen im Tracheobronchialekret; in erster Linie sind Neutrophile (Schatzmann et al., 1972, Hajer, 1979, Nuytten et al., 1983, Beech, 1975, Deconto, 1983), eventuell Eosinophile und Basophile (Schatzmann et al., 1972, Beech, 1975) zu nennen. Weiterhin wäre eine Zunahme der Makrophagen, analog zur Raucherbronchitis des Menschen (Reynolds und Merrill, 1980), denkbar.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Proteaseaktivität in Tracheobronchialekreten von Pferden mit COPD bestimmt und dem Schweregrad der Erkrankung und der zytologischen Zusammensetzung der Sekrete gegenübergestellt. Weiterhin wurden die Sekrete bakteriologisch untersucht. Proteaseaktivität war in Tracheobronchialekreten von Pferden mit mittel- und mit hochgradiger COPD häufiger nachzuweisen als in denen von Pferden mit leichtgradiger COPD. Elastaseaktivität dagegen konnte nicht gefunden werden. Proteaseaktivität korrelierte außerdem mit den Mengen der Neutrophilen in den Sekreten. Auch diese waren bei Pferden mit mittel- und hochgradiger COPD erhöht. Diese Anhäufung von Neutrophilen stand in den meisten Fällen aber nicht mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang. Die Proteaseaktivität scheint zwar endogenen Ursprungs zu sein, da keine Beziehung zu Mikroorganismen hergestellt werden konnte. Sie stammt aber höchstwahrscheinlich nicht aus den Neutrophilen. In vielen Sekreten waren nämlich gleichzeitig Proteaseaktivität und Aktivitäten von Inhibitoren, die die Protease aus Neutrophilen neutralisieren, vorhanden.

Die Neutrophilen könnten vielleicht als Effektorzellen immunologischer Reaktionen fungieren. Als eine der möglichen, denkbaren Bedeutungen der Proteaseaktivität in bezug auf Pathomechanismen der COPD wäre die Ausübung oder Produktion chemotaktischer Aktivität für Neutrophile zu nennen.

Protease activity in tracheobronchial secretions of horses with COPD and its relevance for pathogenesis

Protease activity was determined in tracheobronchial secretions of horses with COPD. The results were compared with the severity of the clinical symptoms and with the cell content of the secretions. Protease activity was found more frequently in aspirates of horses with severe COPD. Protease activity was also correlated with the amount of neutrophils in the secretions. The increased number of neutrophils in aspirates of severely affected horses was in most cases not related to bacterial infections. Elastase activity, however, could never be demonstrated in tracheobronchial secretions. No interdependency between protease activity and the content of protease producing microorganisms in tracheobronchial secretions could be observed. Therefore it is assumed that the protease activity is of endogenous origin. However, it is unlikely that the protease(s) originates from neutrophils, since inhibitory activity for neutrophil proteases was found simultaneously with protease activity in bronchial secretions. It is conceivable that the protease(s) produces chemotactic activity for neutrophils and that neutrophils could represent effector cells of immune reactions.

Neutrophilenansammlungen werden vor allem mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang gebracht; Neutrophile sind aber z. B. auch die Effektorzellen der Typ III Überempfindlichkeitsreaktionen (Hanna et al., 1982). Anhäufungen von Basophilen und Eosinophilen sind Kennzeichen von lokalisierten Typ I Überempfindlichkeitsreaktionen – die Eosinophilen sind an der Steuerung der Funktionen der Basophilen beteiligt (Hanna et al., 1982). Lymphozyten bilden Antikörper, sind verantwortlich für die zellvermittelte Immunität und sind die Effektorzellen der Typ IV Überempfindlichkeit (Spätreaktion) (Hanna et al., 1982). Alveolarmakrophagen sind in den Luftwegen bei starker Staubbelastung, z. B. beim Zigarettenrauchen, vermehrt (Reynolds und Merrill, 1980).

Die Ansammlung von Entzündungszellen wird durch Chemotaxine gesteuert. Proteasen können hier z. B. über die Komplementaktivierung (Larsen et al., 1983) beteiligt sein.

COPD	leichtgradig	mittelgradig	hochgradig
Vorbericht	Nasenausfluß, (ev.) Husten bei Belastung und/oder im Stall, ev. Leistungsabfall		
Ruheatemfrequenz	normal	ev. erhöht	erhöht
Atemtyp	leicht betonte Expiration	abdominal betonte Expiration	deutlich abdominal betonte Expiration
Auskultation unter Lobelin ^R	rasseln	rasseln, giemen, krepitieren	rasseln, giemen, krepitieren
Husten	rauh und produktiv	mehr oder weniger rauh	eher trocken, kraftlos
pO ₂	um 90	85 oder darunter	80 und darunter
Lungengrenzen	normal	normal oder leicht erweitert	meist erweitert
Endoskopie:			
— Schleimmenge	wenig — mäßig	mäßig — viel	mäßig — viel
— Schleimkonsistenz	flüssig	entweder flüssig und im See angeordnet oder zäh	zäh, klebend
— Sonstiges			Schleimhautknötchen
Arbeitsprobe:			
— Nasenausfluß	wenig	mittel	viel
— Husten	eventuell	meist	immer
— Erholungswerte	ev. normal	ev. verzögert	verzögert

Tab. 1: Kriterien für die Gruppierung der Pferde mit COPD (modifiziert nach Fischer 1980)

Weiterhin wird der Wirkung von Proteasen bei den chronischen Lungenleiden des Menschen eine bedeutende pathophysiologische Rolle beigemessen. Hauptstütze dieser Annahme ist einmal der genetisch determinierte, homozygote α_1 -Antitrypsinmangel des Menschen — α_1 -Antitrypsin ist einer der wichtigsten Plasma-Proteaseinhibitoren (Janoff, 1983). Patienten mit diesem Mangel leiden sehr häufig an einem panlobulären, alveolären Lungenemphysem (Laurerell und Eriksson, 1964). Hierbei, so nimmt man an, ist die Regulierung besonderer Proteasen, nämlich Elastasen, durch Proteaseinhibitoren nicht mehr gewährleistet. Somit können die Elastasen das elastische Bindegewebe der Lunge angreifen (Janoff, 1983). Zum anderen ist es möglich, ein alveoläres Lungenemphysem experimentell durch intratracheale Applikation von elastolytischen Enzymen zu erzeugen (Gross et al., 1965). Als drittes Beispiel der pathophysiologischen Bedeutung von Proteaseaktivität in der Entwicklung von chronischen Pneumopathien wird das Rauchen angeführt. Zigarettenrauch bewirkt die Ansammlung protease-(elastase-) produzierender Zellen, insbesondere von Makrophagen und Neutrophilen, in den Luftwegen und Alveolen (Janoff, 1983). So entstandene freie Proteasen könnten im Bereich der Bronchien und Bronchiolen entzündliche Veränderungen und im Bereich der Alveolen Lungenemphysem mitbewirken (Thurlbeck, 1982).

Das Ziel unserer Arbeit war es, das Auftreten von Proteaseaktivität im Tracheobronchialsekret von Pferden mit COPD dem klinischen Zustand und den zytologischen Ergebnissen gegenüberzustellen. Wir erhofften uns, auf diese Art und Weise Faktoren zu finden, die in bezug auf die Pathomechanismen der COPD relevant sein könnten.

Methodik

Tracheobronchialsekretuntersuchung:

Tracheobronchialsekret wurde anlässlich der Bronchoskopie (Cook, 1974, Fischer, 1980) von 104 Patienten mit der klinischen Diagnose „COPD“ entnommen. Die Broncho-

skopie fand im Rahmen des Untersuchungsganges für Atemwegserkrankungen statt, der von der Klinik für Innere Medizin durchgeführt wurde. Dabei wurde bei allen Pferden nach einem gleichen Schema vorgegangen und die Tiere, wenn das möglich war, in Gruppen nach dem Schweregrad der Erkrankung eingeteilt. Die wichtigsten Kriterien dafür sind in Tabelle 1 stichwortartig zusammengefaßt. Nicht alle Tracheobronchialsekrete wurden mit jedem einzelnen der im folgenden beschriebenen Tests geprüft, da die Tests zum Teil erst eingeführt wurden, als die Untersuchung schon angelaufen war.

Sekretentnahme:

Das Tracheobronchialsekret wurde mittels einer sterilen Sonde mit aufgesetzter steriler Spritze entnommen. Die Sonde wurde durch den Instrumentierkanal des Bronchoskops unter Sichtkontrolle in einen Schleimsee in der Trachea getaucht und das Sekret abgesaugt. Bei Pferden ohne Sekret in der Trachea oder wenn nur sehr wenig oder nur extrem zähes Sekret vorhanden war, wurde keine Spülung vorgenommen, weil dieses Material mit dem direkt entnommenen Sekret nicht vergleichbar ist. Das Bronchoskop wurde nach jedem Gebrauch mit Alkohol gereinigt und dann für 20 Min. in Desinfektionslösung getaucht. Der Instrumentierkanal wurde zusätzlich mit Desinfektionslösung behandelt.

Sekretaufarbeitung:

Ein Teil der Untersuchungen (Zytologie und Bakteriologie) wurde mit nicht behandeltem (nativem) Sekret ausgeführt. Für die übrigen Untersuchungen wurde das Tracheobronchialsekret zentrifugiert (50 000 × g für 45 Min.) (Rasche und Ulmer, 1971) und der Überstand (Solphase) verwendet. Einzelne Bestimmungen (Proteasenachweis) wurden auch mit Sedimenten (Gelphasen) durchgeführt. Sol und Gel wurden entweder sofort verwendet oder bis zur Bearbeitung eingefroren (− 20° C). Mit Ausnahme von einer Untersuchung, bei der das Sol von 2 Tracheo-

bronchialsekreten mit einer Amicon^R UM 2 Membran ca. 5 × konzentriert wurde, wurden die Überstände ohne vorherige Behandlung getestet. Die Sedimente wurden vor den Untersuchungen zu gleichen Teilen mit 0,6 Prozent CTAB-Lösung (in phys. NaCl) vermischt und während ca. 2 Minuten homogenisiert, bis eine gut durchmischte, zähflüssige Suspension entstand (Ohlsson und Tegner, 1975).

Zytologische Untersuchung:

Die zytologischen Untersuchungen wurden immer von der gleichen Person im Labor der medizinischen Klinik durchgeführt. Es wurden Direktausstriche von Tracheobronchialsekreten angefertigt und nach May-Grünwald-Giemsa angefärbt. Beurteilt wurden: Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Lymphozyten, Makrophagen und Epithelzellen. Die Zellmengen wurden in 8 Abstufungen angegeben: + + + + massenhaft, + + + viel, + + mäßig viel, + mäßig, (+) wenig, ((+)) selten, (((+))) sehr selten, – keine.

Bakteriologische Untersuchung:

Diese wurde vom veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Zürich durchgeführt und hatte die Erfassung von pathogenen und bedingt pathogenen Bakterien (Hajer, 1979) zum Ziel.

Bestimmung der Proteaseaktivität mit „Hide powder azure^R“ als Substrat:

„Hide powder azure^R“ (Calbiochem-Behring) ist ein natürliches wasserunlösliches Proteasesubstrat, das mit einem blauen Farbstoff markiert ist. Durch Proteaseeinwirkung wird das Substrat solubilisiert. Nach Zentrifugation kann man die Menge Farbstoff im Überstand mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm messen. Das Vorgehen ist von Barrett et al. (1979) beschrieben worden. Kurz zusammengefasst: Der Ansatz enthielt 180 µl Tris/HCl Puffer, pH 8,1 (0,1 M Tris, 20 mM CaCl₂, 0,1 Prozent Brij 35); 30 µl Tracheobronchialsekret-Probe; 120 µl Aqua dest., 240 µl Substrat-Suspension (12,5 mg Hide powder azure^R pro ml in 0,6 M Sucrose, 0,1 Prozent Brij 35, 0,03 Prozent Toluol). In der Kontrolle war im Testansatz anstelle von Tracheobronchialsekret 30 µl Aqua dest. vorhanden. Ansatz und Kontrolle wurden im Doppel geführt. Die Röhrchen wurden auf einem Roller Rack 6 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl kaltem Aqua dest. pro Röhrchen gestoppt und sofort zentrifugiert (waren die Proben Solphasen: 1600 × g während 5 Min., waren sie Gelphasen: 50 000 × g während 20 Min.). Die Extinktion des Überstandes wurde bei 595 nm gegen Aqua dest. abgelesen.

Bei der Auswertung des Tests wurden die Werte der Blanks von denen der Proben abgezogen und die Proteaseaktivität in ΔE_{595} ausgedrückt. Alle Werte von Tracheobronchialsekretproben, die unter $\Delta E_{595} = 0,100$ lagen (das entspricht ungefähr dem doppelten bis dreifachen Wert der Blanks), wurden als fragliche Proteaseaktivität beurteilt.

Elastasenachweis mit dem „Plate assay“:

Wir verwendeten einen modifizierten (v. Fellenberg et al., 1985) Assay nach Sbarra et al. (1960). Es wurden doppel-

schichtige Agaroseplatten hergestellt. (Untere Schicht: 1,5 Prozent Agarose in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 8,8; 12 ml pro Petrischale. Obere Schicht: 0,25 Prozent Elastin (Sigma No E-1625) in 1,5 Prozent Agarose/Tris Puffer, 7 ml pro Platte.) Für den Elastaseassay wurden Löcher von 8 mm Durchmesser in die Platten gestanzt und mit je 130 µl Probematerial (Tracheobronchialsekret-Sol oder -Sediment) gefüllt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platten wurden bei 37° C inkubiert und nach 6, 24, 48, 72 h abgelesen. Elastaseaktivität zeigt sich an einem durchsichtigen Hof um die Löcher.

Statistische Auswertung:

Alle Ergebnisse, bis auf diejenigen Resultate, die nur in einer statistisch nicht auswertbaren Form ausgedrückt werden konnten (z. B. die Resultate der zytologischen Untersuchung), wurden mit dem Wilcoxon Test geprüft.

Ergebnisse:

Proteaseaktivität in den Tracheobronchialsekreten

Proteaseaktivität ließ sich in einer recht großen Anzahl von Tracheobronchialsekreten mit Hide powder azure^R als Substrat nachweisen.

In einem ersten Versuch ging es darum, festzustellen, ob in einer der beiden Phasen Proteaseaktivität besonders stark angereichert ist und ob in der Gelphase die Proteaseaktivität durch Zerstörung aller Zellen mittels Detergens (CTAB, s. Methodik) erhöht würde. Tabelle 2 zeigt, daß die Aktivität in der resuspendierten Gelfraktion ungefähr in der gleichen Größenordnung lag wie in der Solfraktion. Da also die Proteaseaktivität in der Gelphase durch CTAB nicht erhöht wurde, verwendeten wir für die weiteren Proteasebestimmungen die Solphase des Tracheobronchialsekretes.

Weiterhin interessierte uns, mit welchen Faktoren das Auftreten von Proteaseaktivität gekoppelt war. Wie Abbildung 1 zeigt, konnte eine eindeutige Beziehung mit dem klinisch festgestellten Schweregrad der COPD gefunden

Tab. 2: Proteaseaktivität in der Sol- und Gelphase von Tracheobronchialsekreten

Pferd Nr.	Proteaseaktivität (ΔE_{595})		
	Solphase	Gelphase (1:2 vermischt mit CTAB-Lösung)	Gelphase (1:2 vermischt mit 0,9 % NaCl)
40	0,624	0,515	0,643
45	0,728	0,721	0,553
51	0,191	0,166	0,077
53	0,130	0,333	0,392
22	0,594	0,763	
30	0,775	0,883	
31	0,734	0,355	
39	0,235	0,518	
47	0,080	0,066	0,040

Beurteilung: Werte von ΔE_{595} , die über 0,100 lagen, wurden als Proteaseaktivität, alle Werte, die darunter lagen, wurden als fragliche Proteaseaktivität bezeichnet.

werden. Pferde mit mittelgradiger und mit hochgradiger COPD wiesen viel häufiger Proteaseaktivität im Tracheobronchialsekret auf als Pferde mit leichtgradiger COPD. Dieses Ergebnis war hochsignifikant ($p < 0,001$).

Als nächstes suchten wir nach Zusammenhängen zwischen Proteaseaktivität und der zellulären Zusammensetzung der Tracheobronchialsekrete. Es ergab sich, daß zwischen Proteaseaktivität und der Menge Neutrophiler eine schwellenartige Beziehung bestand (Abbildung 2): Erst, wenn +++ (= sehr viele) und mehr Neutrophile in den Tracheobronchialsekreten vorhanden waren, konnte Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen den Sekreten mit +++ und mehr Neutrophilen und den Sekreten mit ++ und weniger Neutrophilen war hochsignifikant ($p < 0,001$). Die Proteaseaktivitäten der Gruppe von Sekreten mit +++ Neutrophilen und der Gruppe von Sekreten mit ++++ Neutrophilen konnten wir nicht miteinander vergleichen, da zuwenig Sekrete mit ++++ Neutrophilen untersucht wurden.

Bei der Zusammenstellung der Resultate (Abbildung 2) fiel auf, daß einige Sekrete mit +++ und mehr Neutrophilen keine oder nur fragliche Proteaseaktivität aufwiesen. Zur weiteren Abklärung dieses Befundes wurden die Pferde, deren Sekrete +++ und mehr Neutrophile enthielten, nach dem Schweregrad der COPD gruppiert und die Proteaseaktivität ihrer Sekrete aufgezeichnet (Abbildung 3). Aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Beziehung zwischen Proteaseaktivität und Neutrophilen scheinbar vor allem für Sekrete von Pferden mit mittelgradiger und mit hochgradiger COPD galt und in geringerem Ausmaß für Sekrete von Pferden mit leichtgradiger COPD. Die Proteaseaktivität korrelierte nicht mit dem Auftreten der übrigen Zellen im Tracheobronchialsekret.

Elastaseaktivität

Es wurden Solphasen von 5 und Gelphasen von 9 Tracheobronchialsekreten mit dem Plate assay für Elastase geprüft. Drei der Solphasen wurden vor dem Test auf das ca. 5fache konzentriert. Alle Tracheobronchialsekrete waren proteolytisch gegen Hide powder azure^R aktiv. In keinem Sekret konnten wir elastolytische Aktivität nachweisen.

Zytologische Resultate und Ergebnisse der bakteriellen Untersuchung

Zytologisch unterschieden sich im allgemeinen die Tracheobronchialsekrete von Pferden mit mittel- und mit hochgradiger COPD in typischer Weise von den Sekreten der Pferde mit leichtgradiger COPD (Abbildungen 4–9). Tracheobronchialsekrete von Pferden mit mittelgradiger und mit hochgradiger COPD enthielten viel bis massenhaft Neutrophile, wenig Makrophagen und Epithelzellen und sehr wenig Lymphozyten, Eosinophile und Basophile. Pferde mit leichtgradiger COPD dagegen hatten wenig Neutrophile, viel Makrophagen und Epithelzellen und sehr wenig Lymphozyten, Eosinophile und Basophile in ihren Sekreten. Unsere Untersuchungen ergaben, daß nur 6 (6,1 Prozent) von 97 Tracheobronchialsekreten mäßig viel (= +) und mehr Eosinophile enthielten. Die klinischen Diagnosen und die Mengen Eosinophiler und Basophiler dieser 6 Pferde sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Aus dieser Tabelle und aus den Abbildungen 8 und 9 geht hervor, daß sich bei den von uns untersuchten Pferden keine Korrelation zwischen der Menge Eosinophiler und Basophiler im Tracheobronchialsekret und dem Schweregrad der COPD nachweisen ließ. Durch die Beobachtung der teilweise erheblichen Mengen von Neutrophilen (Abbil-

Neutrophile: +++ und mehr

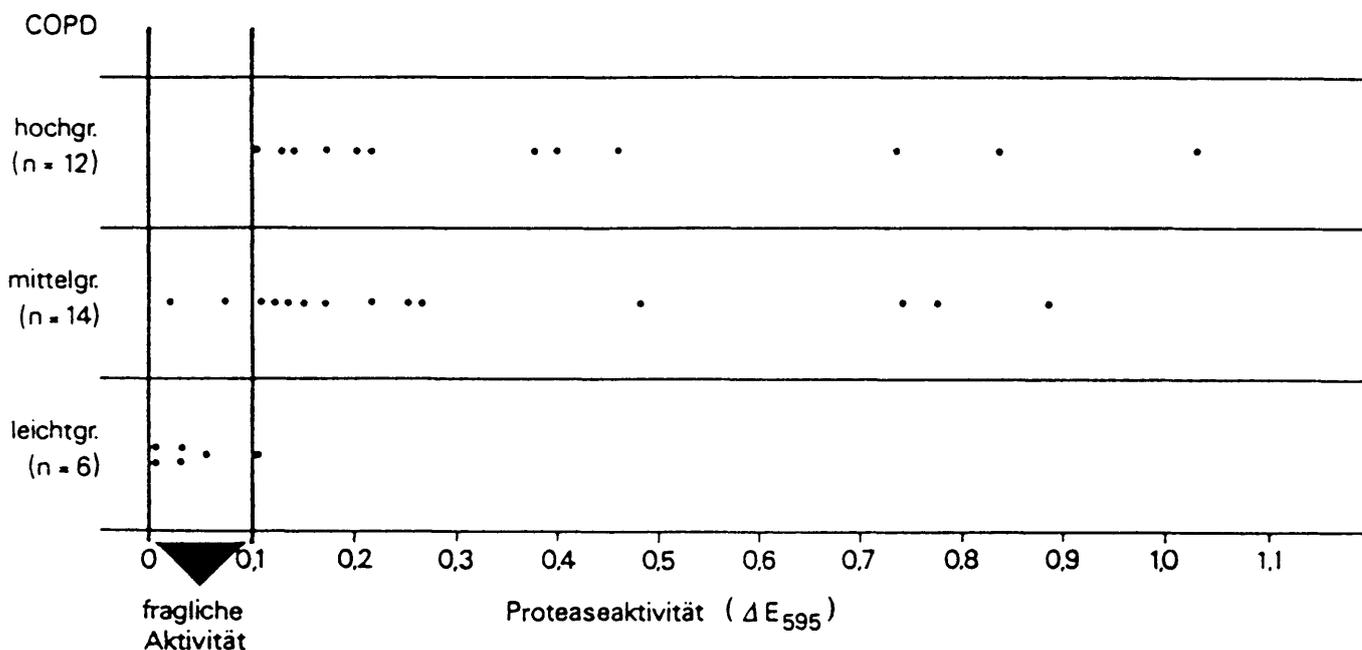


Abb. 3: Proteaseaktivität in Tracheobronchialsekreten mit +++ und mehr Neutrophilen: Vergleich mit den Schweregraden der COPD. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Pferdes. Werte, die kleiner als 0,100 waren, wurden als fragliche Proteaseaktivität beurteilt.

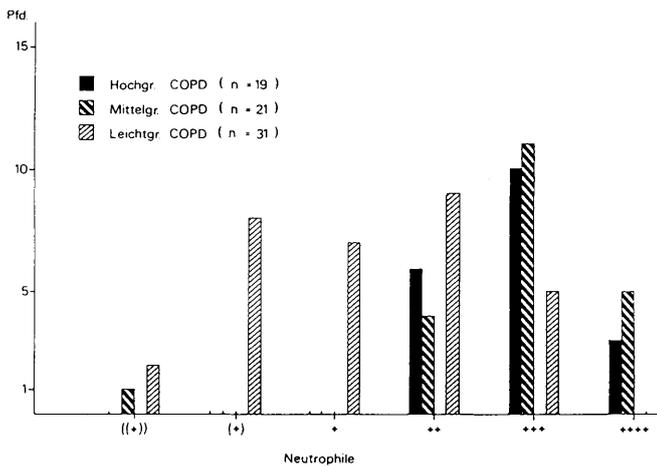


Abb. 4: Neutrophile im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

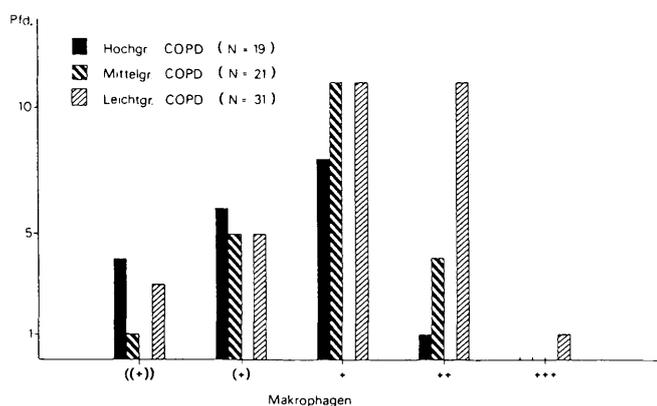


Abb. 5: Makrophagen im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

dung 10) drängte sich die Frage nach einem Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen auf.

In 11 von 104 Sekreten (10,6 Prozent) konnten wir bedingt pathogene oder pathogene Bakterien (Hajer, 1979) teilweise in Mischkultur nachweisen. Die klinischen Diagnosen und die zugehörigen bakteriologischen Befunde sind in Tabelle 4 im einzelnen aufgeführt. Die übrigen Sekrete enthielten eine mehr oder weniger große Anzahl von Schimmelpilzen und nichtpathogenen Bakterien in Mischkultur. Unsere Untersuchungen zeigten also keine Korrelation zwischen dem Krankheitsgrad der Pferde und bakteriellen Infektionen. Außerdem waren in den Tracheobronchialsekreten bakterielle Infektionen viel seltener nachweisbar als große Mengen von Neutrophilen.

Diskussion

Proteaseaktivität konnte bei Pferden mit mittelgradiger und mit hochgradiger COPD in den Bronchialsekreten viel häufiger nachgewiesen werden als bei Pferden mit leichtgradiger COPD. Dieser Unterschied war hochsignifikant. Außerdem korrelierte die Proteaseaktivität mit der Anzahl

der Neutrophilen im Tracheobronchialsekret. Wir konnten jedoch keine Elastaseaktivität in den Bronchialsekreten nachweisen. Zytologisch gesehen waren die Neutrophilen die dominierende Zellart in den Sekreten der stärker erkrankten Pferde.

Vergleichbare Untersuchungen über Proteaseaktivität in Bronchialsekreten sind bisher nur beim Menschen durchgeführt worden. Daraus ergab sich, daß Protease- bzw. Elastaseaktivität in den Sekreten der unteren Atemwege nicht unbedingt an eine bestimmte Krankheit, sondern an das Auftreten großer Mengen von Neutrophilen gekoppelt ist. So ließ sich freie elastolytische Aktivität nur in purulenten, infizierten Sputen, nicht aber in mucoiden Sputen nachweisen (Stockley und Burnett, 1979; Ohlsson und Tegner, 1975; Hochstrasser, 1980). Auch Bronchoalveolärlavage-Flüssigkeit von Patienten mit Schocklunge oder mit Bronchopneumonien enthielt Elastaseaktivität (Cochrane et al., 1983). Dagegen fand man in Bronchoalveolärlavage-Flüssigkeit von Rauchern keine Elastaseaktivität (Hunninghake et al., 1979).

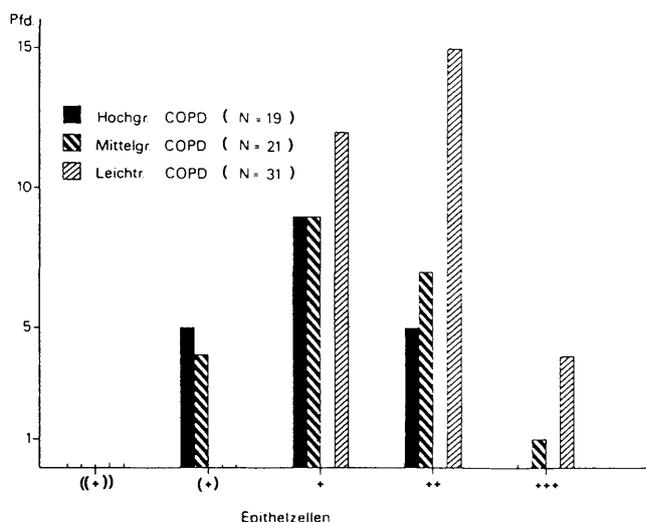


Abb. 6: Epithelzellen im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

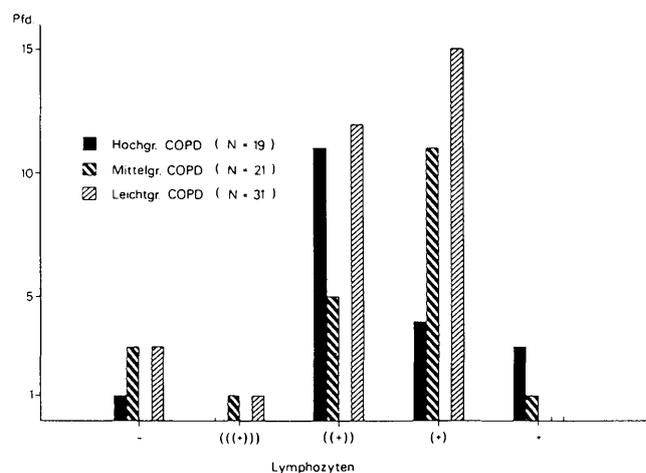


Abb. 7: Lymphozyten im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

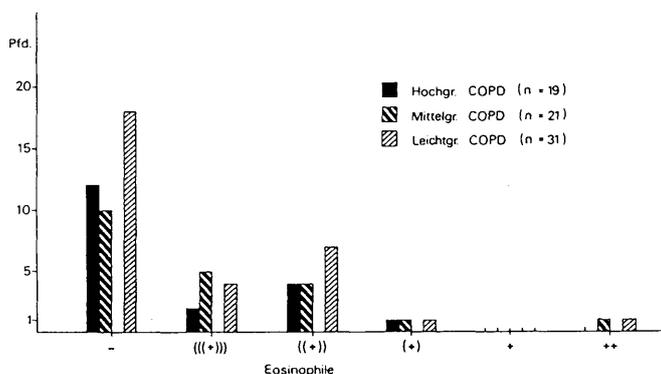


Abb. 8: Eosinophile im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

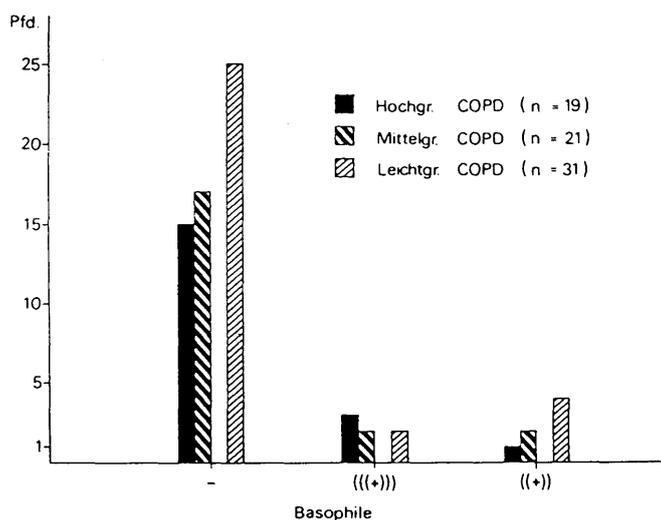


Abb. 9: Basophile im Tracheobronchialsekret: Vergleich mit den Schweregraden der COPD.

Beziehungen zwischen Zellmengen und Proteaseaktivität geben einen ersten Hinweis auf die Herkunft der gemessenen Protease. Diese zu bestimmen ist wichtig für das Verständnis der pathogenetisch wirksamen Mechanismen und im Hinblick auf eventuell sich daraus ergebende Therapiemöglichkeiten. Beim Menschen weisen viele Befunde darauf hin, daß die Protease- bzw. Elastaseaktivität der Bronchialsekrete aus den Neutrophilen stammt. Zusätzlich zum schon oben erwähnten korrelierten Auftreten von Proteaseaktivität und Neutrophilen hat man beim Menschen festgestellt, daß die Neutrophilen in vitro relativ große Mengen von Proteasen und Elastasen bilden (Janoff, 1983). Außerdem kann die Proteaseaktivität der Bronchialsekrete nicht mit Infektionen bestimmter, proteasesetzender Mikroorganismen – als Quelle exogener Proteasen – in Zusammenhang gebracht werden (Oblsson und Tegner, 1975). Schließlich ist in nicht purulenten Sputen ohne Protease- bzw. Elastaseaktivität die trypsininhibitorische Kapazität – als Maß für vorhandene, aktive Proteaseinhibitoren – viel höher als in purulenten Sputen mit Protease- bzw. Elastaseaktivität (Burnett und Stockley, 1980).

Wendet man diese Kriterien auf unsere Ergebnisse beim Pferd an, ergibt sich, daß Proteaseaktivität erst ab einer be-

stimmten Anzahl Neutrophiler im Bronchialsekret auftrat. Dagegen war, wie weitere Untersuchungen von uns (Grünig, 1984) zeigten, keine Korrelation zwischen Proteaseaktivität und der Anzahl Mikroorganismen im Tracheobronchialsekret nachweisbar. Dafür berücksichtigt wurden elastaseproduzierende Mikroorganismen und pathogene bzw. bedingt pathogene Bakterien. Die Granula der Neutrophilen des Pferdes enthalten ungefähr gleichviel Protease wie menschliche Neutrophile, jedoch viel weniger Elastase (v. Fellenberg et al., 1985). Daraus folgt, daß die Proteaseaktivität beim Pferd – analog zum Menschen – höchstwahrscheinlich endogenen Ursprungs ist. Im Gegensatz zur Situation beim Menschen glauben wir allerdings nicht, daß diese aus den Neutrophilen stammt. Man weiß nämlich, daß die Proteasen der Neutrophilen des Pferdes vollständig durch den α_1 -Proteaseinhibitor des Pferdeserums und

Tab. 3: Zytologische Tracheobronchialsekretanalyse: Eosinophile und Basophile – Vergleich mit den klinischen Diagnosen

Pferd Nr.	Eosinophile	Basophile	Klinische Diagnose
88	++ - ++ + ¹	(+)	Schub einer chronischen Bronchitis
71	++	—	COPD
107	++	(((+)))	leichtgr. COPD
117	++	—	mittelgr. COPD
62	+	—	leicht- bis mittelgr. COPD
100	+	—	leicht- bis mittelgr. COPD

¹ Die Abstufungen sind im methodischen Teil erklärt.

durch die Eigeninhibitoren der Pferdeneutrophilen – aufbewahrt im Zytosol – gehemmt werden (v. Fellenberg und Pellegrini, 1979a und 1979b, Dubin, 1977). In weiterführenden Untersuchungen konnten wir diese Inhibitoren in der aktiven Form zusammen mit Proteaseaktivität in den Tracheobronchialsekreten nachweisen (Grünig, 1984).

Nach unseren Ergebnissen sind die Neutrophilen die am deutlichsten hervortretende Zellart im Tracheobronchialsekret von Pferden mit COPD. Dies bestätigt die Arbeiten anderer Autoren (Beech, 1975, Deconto, 1983, Fischer, 1980, Hajer, 1979, Nuytten et al., 1983, Schatzmann et al., 1972,

Tab. 4: Tracheobronchialsekretuntersuchung: Pferde mit bakterieller Sekundärinfektion

Pferd Nr.	Bakteriologische Diagnose	Klinische Diagnose
7	Bordetella bronchiseptica	mittelgr. COPD
20	Coliforme; C. pyogenes	hochgr. COPD
48	Pasteurellen;	hochgr. COPD
	Actinobacillus equuli	
50	Actinobacillus equuli	leichtgr. COPD
63	Actinobacillus equuli	leichtgr. COPD
74	Pasteurellen	mittelgr. COPD
77	Streptococcen mit beta-Hämolyse (Gruppe S. zooepidemicus); Actinobacillus equuli	leichtgr. COPD
	Pasteurellen	
80		hochgr. COPD
86	Actinobacillus equuli	leichtgr. COPD
111	Streptococcus zooepidemicus	mittelgr. COPD
114	Pasteurellen spp.	leichtgr. COPD

Raidt, 1980). Wir erklären uns den Abfall der Zahlen der Makrophagen und Epithelzellen in den Bronchialsekreten von Pferden mit mittelgradiger und hochgradiger COPD damit, daß der Anteil dieser Zellen durch die starke Zunahme der Neutrophilen überdeckt wird. Ähnliches könnte auch für die Eosinophilen und Basophilen gelten.

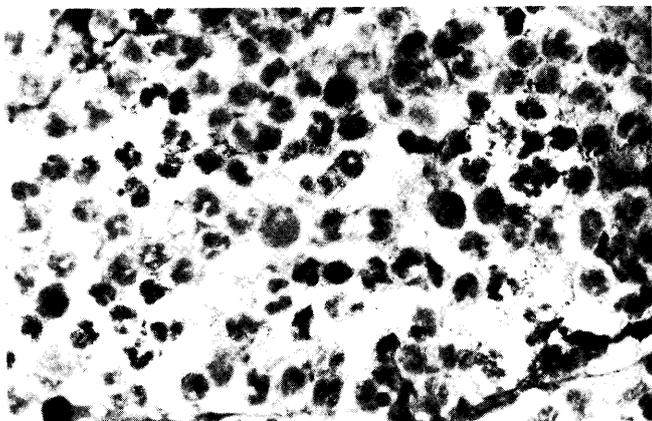


Abb. 10: Tracheobronchialsekretausstrich – die Menge der Neutrophilen wurde mit ++++ (= massenhaft) beurteilt.

Es stellte sich nun die Frage, warum sich so große Mengen von Neutrophilen in den Bronchialsekreten ansammelten. Bei Menschen mit chronischer Bronchitis sind solche zytologischen Bilder meistens mit bakteriellen Sekundärinfektionen (Stockley und Burnett, 1979) verbunden. Bei Pferden mit COPD dagegen sind gleichzeitig bestehende bakterielle Infektionen eher die Ausnahme als die Regel, wie unsere Untersuchungen und die anderer Autoren (Steck und Roost, 1949, Schatzmann et al., 1972, Hajer, 1979, Fischer, 1980, Nuytten et al., 1983, Deconto, 1983) zeigen.

Die Ursache der Anhäufung von Neutrophilen ist deshalb nicht offensichtlich und nur durch wenige Arbeiten untersucht worden. Raidt (1980) meinte, daß die Neutrophilen

durch chemotaktische Faktoren aus den Mastzellen angelockt würden. Die Neutrophilen wiederum könnten einen inhibiting factor für Eosinophile besitzen. So könnte eine massive Neutrophilie, bedingt durch eine primäre Infektion, eine allergische Komponente der Erkrankung überdecken. Nuytten et al. (1983) nahmen an, daß Virusinfektionen mit bakteriellen Sekundärinfektionen sowie nicht-infektiöse Irritantien, z. B. Staub und Gase, über die Freisetzung von Leukotaxinen zur Ansammlung von Neutrophilen führten. Beim Fortschreiten der Erkrankung würden die Neutrophilen durch Staub stimuliert, was deren Lebenszeit verkürze, und aus zerfallenden Neutrophilen würden wieder Leukotaxine frei werden. Daraus würde dann ein Circulus vitiosus entstehen. Deconto (1983) vermutet, daß die überschießende Einwanderung von Neutrophilen in das Tracheobronchiallumen eine Folge von Mediatorwirkungen ist, welche von zerstörten Epithelzellen und anderen im Sekret enthaltenen Zellen ausgehen können. Möglicherweise kommt es deshalb zu solchen Immunvorgängen, weil eingedrungene Partikel wegen der Störung der mukoziliären Clearance nicht schnell genug nach außen transportiert werden.

Eine andere Erklärung könnte aus der Vorstellung hervorgehen, daß Proteaseaktivität eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen spielt. Proteasen können nämlich z. B. als Mediatoren wirken oder Chemotaxine für Neutrophile durch Spaltung und Aktivierung von Komplementfaktoren produzieren (Larsen et al., 1983). Weiterhin wäre es denkbar, daß Neutrophile im Bronchialsekret als Effektorzellen immunologischer Reaktionen fungieren. Somit stellt freie, aktive Protease beim Pferd wie beim Menschen höchstwahrscheinlich einen wichtigen Faktor bei der Pathogenese der COPD oder vielleicht auch bei anderen entzündlichen Vorgängen im Bereich der unteren Atemwege dar. Die Situation beim Pferd ist gegenüber der des Menschen aber insofern anders, als daß Elastaseaktivität nicht oder nur in sehr viel geringeren Mengen, die unterhalb der Nachweisgrenze unserer Methodik liegen, in Tracheobronchialsekreten vorkommt.

Literatur

- Alexander, A. F.: Chronic alveolar emphysema in the horse. *Amer. Rev. resp. Dis.* 80 (1959), 141–146.
- Aristoteles (333 v. Chr.): In: Smith, F.: The early history of veterinary literature and its British development, Vol. 1. (1976), Hrsg. J. A. Allen & Co, London.
- Barrett, A. J., Brown, M. A., and Sayers, C. A.: The electrophoretically „slow“ and „fast“ forms of the α_2 macroglobulin molecule. *Biochem. J.* 181 (1979), 401–418.
- Beech, Jill: Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Vet. Path.* 12 (1975), 157–164.
- Boulton, C. H., Hahn, A. H., and Garner, H. E.: Veterinary medical data program as a source of equine epidemiology: Equine respiratory disease. *Newsletter, Amer. Ass. Equine Practitioners*, July 1983, No. 2, 55–59.
- British Equine Veterinary Association: Survey of equine disease, 1962–63. *Vet. Rec.* 77 (1965), 528–539.
- Burnett, D., and Stockley, R. A.: The electrophoretic mobility of α_1 -Antitrypsin in sputum and its relationship to protease inhibitory capacity, leucocyte elastase concentrations and acute respiratory infection. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 361 (1980), 781–789.
- Butler, Ines v., und Armbruster, Britta: Struktur und Abgangsursachen bei Schlachtpferden. (Kurzmitteilung) *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 91 (1984), 330–331.
- Cochrane, C. G., Spragg, R. G., Revak, Susan D., Cohen, A. B., and McGuire, W. W.: The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidative activity in broncho-alveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Amer. Rev. resp. Dis.* 127 (Suppl., 1983), 25–28.
- Cook, W. R.: Some observations on diseases of the ear, nose and throat in the horse, and endoscopy using a flexible fiberoptic endoscope. *Vet. Rec.* 94 (1974), 533–541.
- Deconto, I.: Zytologische und bakteriologische Untersuchungen des Tracheobronchialsekrets bei chronisch lungenkranken Pferden. *Diss. Hannover* (1983).
- Dubin, A.: A polyvalent proteinase inhibitor from horse-blood-leucocyte cytosol. Isolation, purification and some molecular parameters. *Europ. J. Biochem.* 73 (1977), 429–435.

- Fischer, J.: Bronchoskopische Untersuchungen als Beitrag zur klinischen und ätiologischen Diagnostik beim Pferd mit Atemwegserkrankungen. Diss. Hannover (1980).
- Gerber, H.: Chronic pulmonary disease in the horse. *Equine vet. J.* 5 (1973), 26–33.
- Gillespie, J. R., Tyler, W. S., and Eberly, V. E.: Evaluation of the respiratory dysfunction of the emphysematous horse. *Fed. Proc. Abstr.* 24 (1964), 204.
- Gross, P., Pfitzer, E. A., Tolker, E., Babyak, M. A., and Kaschak, M.: Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch. environm. Health* 11 (1965), 50–58.
- Grünig, Gabriele: Zur Aetiologie und Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenkrankheiten (COPD) des Pferdes. Diss. Zürich (1984).
- Gutekunst, H. P.: Zur Schadenursachenstatistik von entschädigten Reitpferden in den Jahren 1971–1974 innerhalb der BRD einschließlich West-Berlin. Diss. Gießen (1977).
- Hajer, R.: Enkele aspecten van het sputumonderzoek van paarden met aandoeningen van de voorste luchtwegen. Diss. Utrecht (1979).
- Hall, L. W., and Stark, J. E.: COPD – Or is it? *Equine vet. J.* 15 (1983), 185–187.
- Hanna, C. J., Eyre, P., Wells, P. W., and McBeath, D. G.: Equine immunology 2: Immunopharmacology – Biochemical basis of hypersensitivity. *Equine vet. J.* 14 (1982), 16–24.
- Hochstrasser, K.: The acid stable proteinase inhibitors of the respiratory tract. Chemistry and function. *Bull. europ. Physiopath. resp.* 16 (Suppl., 1980), 223–228.
- Hunningbake, G. W., Gadek, J. E., Kawanami, O., Ferrans, V. J., and Crystal, R. G.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Amer. J. Path.* 97 (1979), 149–198.
- Janoff, A.: Proteases and lung injury; a state-of-the-art minireview. *Chest* 83 (Suppl., 1983), 54–58.
- Larsen, G. L., Parrish Debra, A., and Henson, P. M.: Lung defense; the paradox of inflammation. *Chest* 83 (Suppl., 1983), 1–5.
- Laurell, C. B., and Eriksson, S.: Hypo- α_1 -Antitrypsinämie. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 70 (1964), 537–539.
- Nuytten, J., Muylle, E., Oyaert, W., Hende, C. v. d., Vlamincck, K., and Keersmaecker, F. d.: Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheobronchial aspirates in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Zbl. Vet. Med. A*, 30 (1983), 114–120.
- Ohlsson, K., und Tegner, H.: Granulocyte collagenase, elastase and plasma protease inhibitors in purulent sputum. *Europ. J. clin. Invest.* 5 (1975), 221–227.
- Pauli, B., Gerber, H., und Schatzmann, U.: „Farmer's lung“ beim Pferd. *Path. Microbiol.* 38 (1972), 200–214.
- Raidt, J.: Ein verbesserter Nachweis von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen im Bronchialsekret von Pferden als Beitrag zur allergologischen Diagnostik bei Atemwegserkrankungen. Diss. Hannover (1980).
- Rasche, B., und Ulmer, W. T.: Untersuchungen über die Zusammensetzung des Bronchialschleimes bei chronisch obstruktiver Bronchitis. *Pneumologie* 144 (1971), 10–32.
- Reynolds, H. Y., and Merrill, W. W.: Lung immunology: The inflammatory response in lung parenchyma. *Curr. Pulmonol.* 2 (1980), 299–323.
- Sbarra, A. J., Gilfillan, R. F., and Bardawil, W. A.: A plate assay for elastase. *Nature* 188 (1960), 322–323.
- Schatzmann, U., Straub, R., und Gerber, H.: Bronchialsekretrespiration beim Pferd. *Schweiz. Arch. Tierheilk* 114, (1972), 395–403.
- Steck, W., und Roost, E.: Zur Pathogenese der chronischen Bronchiolitis beim Pferde. *Schweiz. Arch. Tierheilk*. XCI (1949), 427–436.
- Stockley, R. A., and Burnett, D.: Alpha₁-Antitrypsin and leukocyte elastase in infected and noninfected sputum. *Amer. Rev. resp. Dis.* 120 (1979), 1081–1086.
- Thurlbeck, W. M.: The pathology of small airways in chronic airflow limitation. *Europ. J. resp. Dis.* 63 (Suppl. 121, 1982), 9–18.
- Thurlbeck, W. M., and Lowell, F. C.: Heaves in horses. *Amer. Rev. resp. Dis.* 89 (1964), 82–88.
- Von Fellenberg, R., und Pellegrini, A.: Die Hemmung neutraler Leukozytenproteasen durch Proteaseinhibitoren des Pferdes. *Schweiz. Arch. Tierheilk*. 121 (1979a), 405–412.
- Von Fellenberg, R., und Pellegrini, A.: Die Charakterisierung des zytoplasmatischen Proteaseinhibitors aus Pferdeleukozyten mit der Fibrinogenplattenelektrophorese: Wanderung, Enzym- und Organspezifität. *Schweiz. Arch. Tierheilk*. 121 (1979b), 593–601.
- Von Fellenberg, R., Kobler, Lucia, Grünig, Gabriele, and Pellegrini, A.: Comparison of neutrophil elastases and of neutrophil protease inhibitors in horse and man. – An approach to the understanding of emphysema pathogenesis. *Amer. J. vet. Res.* (1985). Im Druck.

Dr. Gabriele Grünig
 Institut für Veterinär-Physiologie
 Universität Zürich
 Winterthurer Straße 260
 8057 Zürich

Die Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (3.877-1.83) unterstützt.
 Teilweise vorgetragen am 6. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft (22.–24. 3. 84 in Hannover).