Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie im Zentrum für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Das Equine Cushing-Syndrom: Entwicklung eines ACTH-Bioassays für die Ermittlung des biologisch-immunreaktiven Verhältnisses von endogenem ACTH in equinen Blutproben

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer

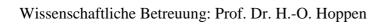
Doktorin der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von **Katja Sommer** aus Osnabrück

Hannover 2003



Gutachter: Prof. Dr. H.-O. Hoppen
 Gutachterin: Prof. Dr. Dr. N. Parvizi

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2003



Inhaltsverzeichnis

1.	Einl	eitung_		11
2.	Schi	rifttum _.		12
	2.1.	Neuro	endokrines Regelsystem	12
		2.1.1.	Hypothalamus und seine Neuropeptide (CRH und AVP)	12
		2.1.2.	Hypophyse und ihre Hormone (ACTH und andere pro-OLMC)	13
		2.1.3.	Nebenniere und ihre Hormone (Glucocorticoide)	18
	2.2.	Equin	es Cushing-Syndrom (ECS)	20
		2.2.1.	Einleitung und Definition	20
		2.2.2.	Ätiologie und Pathogenese	21
		2.2.3.	Klinische Symptomatik und pathologische Laborwerte	24
			2.2.3.1. Klinische Symptomatik	24
			2.2.3.2. Pathologische Laborwerte	26
		2.2.4.	Diagnostik	27
			2.2.4.1. Blutentnahmetechnik und Probeumgang	27
			2.2.4.2. Basalwerte, endokrinologische Funktionstests, radiologische Methoden und Autopsie	28
		2.2.5.	Differentialdiagnosen	36
		2.2.6.	Therapie	36
		2.2.7.	Prognose	37

	2.3.	Biolog	gische und immunologische Nachweisverfahren (experimentelle Studie)	38
		2.3.1.	ACTH-Bioassay	38
		2.3.2.	Analysemethoden	39
3.	Mat	erial uı	nd Methoden	40
	3.1.	Mater	ial und Tiere	40
	3.2.	ACTI	I-Bioassay	41
		3.2.1.	Herstellung der Lösungen	41
		3.2.2	Präparation der Nebennieren vom Schwein	43
		3.2.3.	ACTH-Bioassay	44
		3.2.4.	ACTH-Verdünnungsreihe zur Erstellung der ACTH-Eichkurve	45
		3.2.5.	Kontrollproben und zu untersuchende Plasmaproben	46
	3.3.	Analy	semethoden	46
		3.3.1.	Cortisol-Radioimmunoassay (Cortisol-RIA)	46
			3.3.1.1. Herstellung der Lösungen	46
			3.3.1.2. Durchführung	47
			3.3.1.3. Herstellung der Standardlösung zur Erstellung der Cortisol-Eichkurve	48
			3.3.1.4. Verdünnung der nativen Serum- und Plasmaproben	48
		3.3.2.	Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay (IMMULITE®)	49

4.	Erge	ebnisse		51
	4.1.	ACTH	I-Bioassay	51
		4.1.1.	Entwicklung des Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen	51
		4.1.2.	Zellkonzentration	52
		4.1.3.	ACTH-Eichkurve	52
		4.1.4.	Bioassayproben	55
			4.1.4.1. Bioassay-Kontrollproben	55
			4.1.4.2. Blutproben-Aufbereitung	56
			4.1.4.3. Serum und Blutproben-Zusätze	60
			4.1.4.4. Kontrollserum	62
	4.2.	Cortis	ol-Radioimmunoassay (Cortisol-RIA)	63
		4.2.1.	Probemenge	63
		4.2.2.	Extraktion der Proben im Cortisol-RIA	63
	4.3.	Biolog	gisch-immunreaktives Verhältnis von ACTH (ACTH-BI-Ratio)	64
		4.3.1.	Cortisol- und ACTH-Gehalte der equinen Plasmaproben	64
		4.3.2.	Stabilitätsstudie	66
5.	Disk	cussion_		68
	5.1.	ACTH	I-Bioassay	68
		5.1.1.	Entwicklung des Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen	68
		512	Zellkonzentration und ACTH-Eichkurve	69

		5.1.3.	Bioassay	proben	70
			5.1.3.1.	Bioassay-Kontrollproben	70
			5.1.3.2.	Blutproben-Aufbereitung sowie Serumbestandteile und Blutproben-Zusätze	70
			5.1.3.3.	Kontrollserum und Blank-Probe	71
	5.2.	Biolog	gisch-imm	unreaktives Verhältnis von ACTH (ACTH-BI-Ratio)	71
	5.3.	Entwi	cklung der	klinischen ECS-Symptomatik	74
6.	Zusa	mmen	fassung		77
7.	Sum	mary			79
8.	Liter	aturve	rzeichnis		81
Ta	bellen	anhang	j 		97
Ta	bellen	verzeic	hnis		101
Ab	bildur	igsverz	zeichnis_		103

Abkürzungsverzeichnis

ACTH Adrenocorticotropes Hormon (Corticotropin)
ACTH-BI-Ratio biologisch-immunreaktives Verhältnis von ACTH

AVP Arginin-Vasopressin

BSA Bovines Serumalbumin

CLIP Corticotropin-like intermediate lobe peptide

CRH Corticotropin-Releasing-Hormon

DPI Dysfunktion der Pars intermedia

ECS Equines Cushing-Syndrom EDTA Ethylendiamintetraazetat

END Endorphin

FBS Fötales Bovines Serum

HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure

HHL Hypophysenhinterlappen HVL Hypophysenvorderlappen HZL Hypophysenzwischenlappen

i.m. intramuskulär i.v. intravenös

LPH Lipotropes Hormon (Lipotropin)

MSH Melanozyten-stimulierendes-Hormon (Melanotropin)

NN Nebenniere
NNM Nebennierenmark
NNR Nebennierenrinde

PBS Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

PD Pars distalis
PI Pars intermedia
PN Pars nervosa

pro-OLMC Pro-Opiolipomelanocortin

RIA Radioimmunoassay

ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Im Laufe der Jahre wurde das Equine Cushing-Syndrom (ECS), auch bekannt als Equiner Hyperadrenocortizismus oder Dysfunktion der Pars intermedia (DPI) der Hypophyse des Pferdes, durch die Vielzahl an wissenschaftlichen Abhandlungen und dadurch neu gewonnenen Erkenntnissen immer häufiger diagnostiziert. Früher wurde angenommen, dass das ECS eine seltene Erkrankung sei, die nur bei älteren Pferden und Ponys auftritt. Heutzutage wird das Syndrom immer häufiger als solches erkannt, vorwiegend bei älteren und mittelalten Pferden und Ponys, aber durchaus auch bei jüngeren Equiden.

Das ECS ist fast ausnahmslos hypophysär (sekundär) bedingt, dabei handelt es sich in den überwiegenden Fällen um ein Adenom der Pars intermedia der Hypophyse. Die tumoröse Pars intermedia schüttet übermäßige Mengen an Corticotropin (ACTH) aus, welches die Nebennierenrindenzellen stimuliert und so im Allgemeinen zu einer erhöhten Cortisol-Sekretion führt. Cortisol wiederum ist verantwortlich für die Entwicklung der klinischen ECS-Symptome.

Aufgrund der großen Vielfalt der Symptome, die diese Erkrankung hervorruft, versuchen Pferdepraktiker ihre vorläufige Verdachtsdiagnose mittels Basalwertmessungen und/oder endokrinologischen Funktionstests abzusichern. Dabei stellte sich heraus, dass die alleinige Bestimmung des Cortisol-Basalwertes nicht aussagekräftig ist, da cushingoide Pferde, trotz hoher ACTH-Basalwerte im Plasma, häufig physiologische oder sogar erniedrigte Cortisol-Plasmagehalte aufweisen. Erhöhte ACTH-Konzentrationen führen beim Pferd nach dem heutigen Erkenntnisstand selten zu einem adäquaten Anstieg der Cortisol-Produktion. Diese Tatsache legt nahe, dass das im Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay gemessene Plasma-ACTH zwar immunologisch erfaßt wird, jedoch nicht vollständig biologisch aktiv sein kann. Möglicherweise üben auch andere Pro-Opiolipomelanocortin-(pro-OLMC-)Peptide der Pars intermedia der Hypophyse einen antagonistischen Effekt auf das ACTH aus oder andere Faktoren wirken inhibitorisch auf die Cortisol-Ausschüttung der Nebennierenrindenzellen.

Zudem stellt sich die Frage, warum sich bei erkrankten Pferden mit physiologischen Cortisol-Plasmakonzentrationen klinisch sichtbare ECS-Symptome manifestieren. Demnach müssen noch andere biologisch aktive Substanzen, wie pro-OLMC-Peptide oder ACTH-Fragmente, die qualitativ und/oder quantitativ verändert aus dem tumorösen Hypophysenzwischenlappen sezerniert werden, an der Entwicklung der klinischen Symptomatik beteiligt sein.

Ziel dieser Studie ist die Entwicklung eines ACTH-Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen für die Ermittlung des biologisch-immunreaktiven Verhältnisses von endogenem ACTH (ACTH-BI-Ratio) in equinen Blutproben. Des weiteren soll in dieser Arbeit erläutert werden, warum sich bei erkrankten Pferden trotz niedriger Cortisol-Basalwerte klinische ECS-Symptome manifestieren. ______

2. Schrifttum

2.1. Neuroendokrines Regelsystem

2.1.1. Hypothalamus und seine Neuropeptide (CRH und AVP)

Der *Hypothalamus* ist ein Teil des Zwischenhirns (Diencephalon) und der wichtigste Gehirnabschnitt für die Regulation und Kontrolle der meisten autonomen Funktionen, u.a. auch des endokrinen Systems (Nickel et al., 1992).

Die Sekretion des im Hypothalamus synthetisierten und aus 41 Aminosäuren (AS) bestehenden Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, durch Neurotransmitter und -peptide beeinflußt. Der Neurotransmitter Serotonin beispielsweise stimuliert die CRH-Freisetzung (Orth und Kovacs, 1998). Über das hypothalamischhypophysäre Portalsystem gelangt das CRH zum Hypophysenvorderlappen (HVL), wo es an spezifische CRH-Rezeptoren der corticotropen Zellen der Pars distalis bindet. Durch die Bindung des Hormons an die Zellmembran kommt es zur Aktivierung des Adenylatzyklase-Systems, dies wiederum führt zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, zu einem vermehrten Einstrom von extrazellulärem Kalzium, zur Aktivierung der cAMPabhängigen Proteinkinase-A und dadurch zur Phosphorylierung einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen. Hieraus resultiert schließlich die Ausschüttung von Corticotropin (ACTH) und anderen Pro-Opiolipomelanocortin-Derivaten. Zudem kommt es zu einer vermehrten Transkriptionsrate von mRNA, wodurch die Biosyntheserate des Vorläufermoleküls Pro-Opiolipomelanocortin (pro-OLMC) der Hypophysen-Hormone erhöht wird (Engler et al., 1999). ACTH bewirkt eine Stimulation der Nebennierenrindenzellen, folglich wird Cortisol freigesetzt. Ein Anstieg des Cortisols führt zur Hemmung, ein Abfall hingegen zur Anregung der CRH-Sekretion (negativer Feedbackmechanismus).

Neben der Steuerung durch die Rückkopplung wird der Corticoidgehalt im Blut durch die circadiane Rhythmik beeinflußt, die mittels Oszillatoren (Kerngebiete) im Hypothalamus kontrolliert wird. Sowohl intensiver psychischer Streß als auch die chronische Sekretion (Equines Cushing-Syndrom) oder exogene Zufuhr von Glucocorticoiden kann die Feedback-Regulation wie auch den circadianen Rhythmus überspielen, wodurch es zu einem deutlichen Anstieg des Cortisolgehaltes im Blut kommt.

Neben dem CRH besitzen auch *Arginin-Vasopressin (AVP)* und andere Neurotransmitter die Fähigkeit über spezifische Rezeptoren ACTH aus dem HVL freizusetzen. Den vorübergehenden ACTH-Anstieg bei physischem Streß (übermäßiges Training), erhöhter Blutosmolarität und akuter Hypoglykämie schreiben Alexander et al. (1996, 1997) AVP zu. Welches Hypothalamus-Hormon ausgeschüttet wird ist somit von dem auslösenden Stimulus abhängig. Das CRH ist das effektivere Freisetzungshormon, welches den größten Anteil der ACTH-Sekretion aus der Hypophyse bedingt. AVP hingegen ist im Ruhezustand und bei bestimmten Störungen das unmittelbare, aber schwächere Neuropeptid für die ACTH-Ausschüttung aus der Pars distalis und kann durch das CRH verstärkt werden (Evans et al., 1993).

Alexander et al. (1996, 2000) vermuten, dass es einen *Corticotropin-inhibitory-factor (CIF)* geben muß, da bei chronischem sozialen Streß der ACTH-Basalwert im Blut trotz erhöhter CRH-Konzentrationen niedrig ist. Dieser Inhibitor konnte jedoch bis heute noch nicht sicher bewiesen werden und spielt eher eine untergeordnete Rolle.

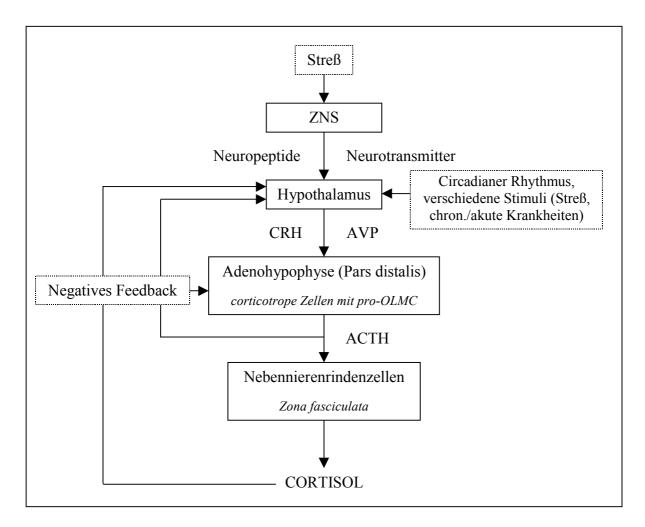


Abb. 1: Die neuroendokrine Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

2.1.2. Hypophyse und ihre Hormone (ACTH und andere pro-OLMC-Peptide)

Die Hypophyse (Glandula pituitaria, Hirnanhangsdrüse) steht mit dem Hypothalamus sowohl morphologisch als auch funktionell in direkter Verbindung, was als "Hypothalamus-Hypophysen-System" bezeichnet wird. Dieses endokrine Organ liegt in der beim Pferd sehr seichten Fossa hypophysialis des Türkensattels (Sella turcica) des Os sphenoidale und besteht aus der erheblich umfangreicheren Adenohypophyse (Lobus anterior) und der kleineren

Neurohypophyse (Lobus posterior). Die Adenohypophyse umschließt beim Pferd die Neurohypophyse vollständig und ist zusammengesetzt aus der Pars infundibularis, dem Hypophysenvorderlappen (HVL; Pars distalis, PD) und dem Hypophysenzwischenlappen (HZL; Pars intermedia, PI). Die PD stellt dabei den vorderen, größten Abschnitt der Adenohypophyse dar und enthält corticotrope Zellen. Die PI befindet sich zwischen der Neurohypophyse und der PD und wird von melanotropen Zellen gebildet. Die Neurohypophyse besteht aus dem Trichter (Infundibulum) und dem Hypophysenhinterlappen (HHL; Pars nervosa, PN) (Nickel et al., 1992). Ihre Hormone entfalten eine antidiuretische (ADH), blutdrucksteigernde (Vasopressin) und uteruskontrahierende (Oxytozin) Wirkung (Wintzer, 1999). Die räumliche Nähe der Hypophyse zum Hypothalamus und zum Chiasma opticum kann bei einem raumgreifenden Prozeß (z.B. Neoplasie) unter Umständen zu einer Druckatrophie führen.

Die Sekretion der Hypophysen-Hormone aus den corticotropen Zellen der PD wird durch die hypothalamischen Freisetzungshormone CRH und AVP stimuliert. Bei den hypophysären Hormonen handelt es sich um ACTH und andere pro-OLMC-Derivate. ACTH hemmt über das negative Feedback die Ausschüttung und Synthese von CRH und AVP. Am Erfolgsorgan bindet ACTH an spezifischen Rezeptoren an der adrenalen Zellmembran und aktiviert dadurch das Adenylatzyklase-System, was zur intrazellulären Anreicherung von cAMP führt. Die Transduktion der Information zwischen dem Hormonrezeptor und der Adenylatzyklase steht unter der Kontrolle von Kalzium. cAMP aktiviert die Proteinkinase-A, wodurch es zur Phosphorylierung eines intrazellulären Proteins kommt, welches den Einstrom des zytoplasmatischen Cholesterins in das Mitochondrium reguliert. Aus Cholesterin entsteht schließlich Cortisol, welches aus den Nebennierenrindenzellen der Zona fasciculata freigesetzt wird (McDonald, 1980 und Thorner, 1998).

Die corticotropen Zellen besitzen Glucocorticoidrezeptoren, worüber das Cortisol bei erhöhter Konzentration im Blut ein negatives Feedback auslöst und so die ACTH-Ausschüttung reduziert. Die melanotropen Zellen der PI besitzen keine Glucocorticoidrezeptoren, so dass Cortisol die Transkription der pro-OLMC-Gene dort nicht beeinflußt und dementsprechend auch die ACTH-Synthese und -Ausschüttung nicht hemmt. Die neuroendokrinologische Kontrolle der PI ist von der Stärke des Hemmungsmechanismus der hypothalamischen Dopamine abhängig (Froin, 1998a). Orth et al. (1982, 1998) und Froin et al. (1997, 1998) sprechen von einer tonisch inhibitorischen Kontrolle durch Dopamin, welches an dopaminergen Rezeptoren der melanotropen Zellen bindet, die PD jedoch unbeeinflußt läßt.

In den Zellen der PD und PI der Hypophyse des Pferdes führt die enzymatische Spaltung des 241 AS großen 33 kDa Glykoproteins *Pro-Opiolipomelanocortin (pro-OLMC)* über Hauptund Nebensynthesewegen zu einer Vielzahl von pro-OLMC-Derivaten sowie unterschiedlichen Intermediärprodukten (Wilson et al., 1982):

Abbildung 2 zeigt die Spaltung des pro-OLMC in der *Pars distalis*. Hierbei entsteht β -LPH und das 24 kDa N-terminale Fragment pro- γ -MSH, welches die AS-Sequenz von ACTH und γ_3 -MSH beinhaltet. Die Abspaltung von ACTH führt zur Bildung von 21,5 kDa pro- γ -MSH.

Durch weitere Prozessierung wird das 17 kDa pro- γ -MSH, mit dem γ_3 -MSH als C-terminales Ende, gebildet. Schließlich wird γ_3 -MSH abgetrennt. β-LPH wird in der PD nur teilweise in γ -LPH und β-END gespalten. Das 21,5 und 17 kDa pro- γ -MSH kumulieren in signifikanten Mengen in der PD und werden möglicherweise in die Blutzirkulation abgegeben.

Es sind jedoch noch zwei weitere Nebenwege der Biosynthese bekannt. Hierbei entsteht durch die Spaltung des pro-OLMC ein 27 kDa pro-γ-MSH/ACTH sowie das dazugehörige 6 kDa C-terminale Fragment β-MSH/β-END. Der zweite Weg ist gekennzeichnet durch die Bildung von 17 kDa pro-γ-MSH und von 17 kDa pro-ACTH/γ-LPH. Durch weitere Prozessierung des 27 kDa pro-γ-MSH/ACTH und des 17 kDa pro-ACTH/γ-LPH entsteht wiederum ACTH. Daneben werden einige weitere Intermediärprodukte synthetisiert.

Die finalen Hauptprodukte der PD sind somit ACTH, β -LPH, γ_3 -MSH und in geringeren Konzentrationen γ -LPH und β -END. Nach Orth und Kovacs (1998) wird auch das "joining peptide", welches aus dem N-terminalen Fragment pro- γ -MSH entsteht, in der PD gebildet.

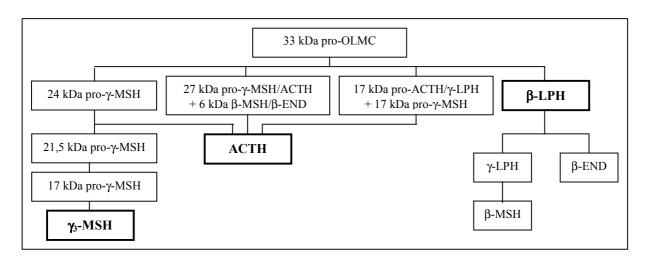


Abb. 2: Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese in der Pars distalis gesunder Pferde (nach Froin et al., 1998)

Eine ähnliche Spaltung des Precursors pro-OLMC kommt auch in der *Pars intermedia* vor (Abbildung 3). Als Intermediärprodukte entstehen wieder β-LPH und das 24 kDa pro- γ -MSH, welches die AS-Sequenz von ACTH und γ_3 -MSH beinhaltet. Durch die Abspaltung von ACTH und weiterer Prozessierung wird wieder das 17 kDa pro- γ -MSH, mit dem C-terminalen Fragment γ_3 -MSH, gebildet. Durch Abspaltung entsteht schließlich γ_3 -MSH als Endprodukt.

Durch einen Nebensyntheseweg wird ein kleiner Anteil des 14,7 kDa C-terminalen Fragments gebildet, welches die AS-Sequenz von ACTH und β -LPH enthält, sowie das dazugehörige komplementäre 24,5 kDa N-terminale Fragment pro- γ -MSH. Aus beiden Fragmenten entsteht durch Abspaltung ACTH. Das gesamte, in der PI synthetisierte ACTH wird jedoch bis zu 98% weiter in α -MSH und CLIP gespalten, weshalb es nicht die Cortisolproduktion der Nebennierenrindenzellen stimuliert (Wilson et al., 1982; Froin et al., 1997, 1998a). Sowohl

aus β -LPH als auch aus dem 14,7 kDa C-terminalen Fragment entsteht γ -LPH und β -END. γ -LPH wird weiter zu β -MSH prozessiert. Ein geringer Anteil an γ -LPH kann jedoch auch in der PI gefunden werden. β -LPH konnte hingegen in der PI bislang nicht nachgewiesen werden.

Die finalen Hauptprodukte der PI sind somit CLIP, α-MSH, β-MSH, γ₃-MSH, β-END und nach Orth und Kovacs (1998) das "joining peptide". Nebenprodukte sind ACTH und γ-LPH.

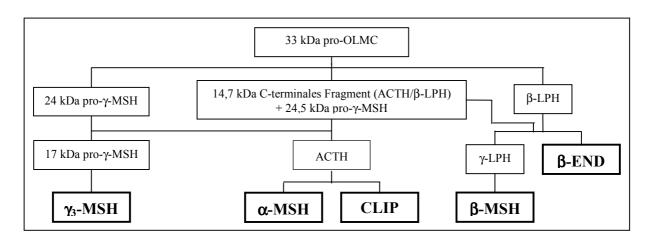


Abb. 3: Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese in der Pars intermedia gesunder Pferde (nach Froin et al., 1998)

Das *Adrenocorticotrope Hormon (Corticotropin, ACTH*₁₋₃₉) hat ein Molekulargewicht von 4540 Da und ist ein aus 39 AS bestehendes Polypeptid, welches nur in der AS-Sequenz 25-33 tierartliche Unterschiede aufweist. Die biologische Aktivität von ACTH ist an das N-terminale Ende (ACTH₁₋₂₄) gebunden. Peptide mit weniger als 16 AS verlieren ihre corticotrope Aktivität, besitzen jedoch nach Labhart und Müller (1978) eine erhöhte melanotrope Aktivität.

Orth und Nicholson (1982) fanden bei 4 gesunden Pferden heraus, dass sich das meiste bioaktive ACTH in der PD (90,3-97,5%), wesentlich weniger in der PI (1,8-8,6%) und nur in geringer Menge in der PN (<0,3-1,0%) befindet. Das Verteilungsmuster des immunreaktiven ACTHs ähnelt dem des bioaktiven ACTHs (78% immunreaktives ACTH in der PD), die Konzentrationen sind jedoch insgesamt etwas niedriger als die des bioaktiven ACTHs.

Die Hauptaufgabe des ACTHs ist die Aufrechterhaltung des morphologischen und funktionellen Zustandes der Nebennierenrinde. Dabei stimuliert es nach Orth und Kovacs (1998) die Sekretion der Glucocorticoide, der androgenen Corticoide und, im geringeren Umfang, der Mineralocorticoide aus der Nebennierenrinde. Eine übermäßige Freisetzung von ACTH führt an der Zona fasciculata der Nebennierenrinde zur Hyperplasie (Morbus Cushing), ein Ausfall hingegen zur Atrophie (Morbus Addison).

Als extraadrenale Wirkung hat ACTH einen lipolytischen Effekt auf das Fettgewebe. Es stimuliert schon in kleinsten Konzentrationen die Hydrolyse der Triglyceride und erhöht dabei die Konzentration der freien Fettsäuren (FS) im Blut sowie den Fettgehalt in der Leber (Ketosegefahr).

Weiterhin vermindert es die Permeabilität von Kapillaren und serösen Membranen. Es dämpft, ähnlich wie Cortison, Entzündungsreaktionen. Da die AS-Sequenz von ACTH und MSH teilweise identisch sind, hat ACTH auch eine melanotrope Wirkung.

α-Melanotropin (α-MSH [ACTH₁₋₁₃]) ist ein Hauptprodukt der PI und nach Orth (1979) das bekanntlich wirkungsvollste MSH. Es besteht aus den ersten 13 AS des ACTHs und ist demnach bei allen bislang dokumentierten Spezies identisch. β-Melanotropin (β-MSH [β-LPH₄₁₋₅₈]) wird hauptsächlich in der PI gefunden und entsteht durch enzymatische Abspaltung aus γ-Lipotropin. Im Gegensatz zu α-MSH ist es von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Es besteht aus 18 AS, wobei die Sequenz einiger AS derjenigen des ACTHs entspricht. γ_3 -Melanotropin (γ_3 -MSH) entspringt dem N-terminalen Glykopeptidfragment, nämlich dem Pro-γ-MSH bzw. "16K-Fragment", und wird sowohl in der PD als auch in der PI gefunden. Freestone und Melrose (1995) sagen, dass auch andere pro-OLMC-Peptide, insbesondere γ_3 -MSH, an spezifischen Rezeptoren der NNR binden und so die Glucocorticoidsynthese stimulieren können.

 γ -Lipotropin (γ -LPH [β -LPH₁₋₅₈]) besteht aus 58 AS und entstammt dem 91 AS großen β -Lipotropin (β -LPH₁₋₉₁). Beide Peptide werden nach Wilson et al. (1982) in der PD in gleichen Konzentrationen wie α - und β -MSH in der PI gefunden.

Das 31 AS große β-Endorphin (β-END [β-LPH₆₁₋₉₁]) entsteht aus β-LPH. Die β-END-immunpositiven Zellen sind nach Amann et al. (1987) in der PI gesunder Pferde in geringerer Anzahl und auf den Randbereich der PI zur angrenzenden PN begrenzt vorhanden, im Gegensatz zu den ACTH-immunpositiven Zellen, welche in der PI zahlreich und großflächig verteilt vorkommen. Dennoch zählt β-END nach Wilson et al. (1982) zu dem Hauptprodukt der PI, es läßt sich jedoch auch in bedeutsamer Konzentration in der PD finden. Engler et al. (1999) berichten in ihrer Studie darüber, dass β-END die Hypophysen-Nebennieren-Achse hemmt, wodurch der basale Cortisolgehalt im Plasma erniedrigt wird. Da die ACTH-Ausschüttung aus der PI der Hypophyse in vitro nicht beeinflußt wird, geht dieser Effekt von der suprahypophysärer Ebene aus, indem die CRH-Freisetzung in das hypothalamischhypophysäre Portalsystem gehemmt wird. Seger und Bennett (1986), Shanker und Sharma (1979) sowie Vinson et al. (1985) sagen hingegen, dass β-END die Wirkung von ACTH potenzieren kann und so die Cortisol-Produktion weiter stimuliert.

Das *Corticotropin like intermediate lobe peptide (CLIP [ACTH₁₈₋₃₉])* besteht aus 22 AS und ist ein Spaltprodukt von ACTH. Nach Wilson et al. (1982) findet man den größten Anteil des CLIPs in der PI.

In Abbildung 4 sind die unterschiedlichen pro-OLMC-Derivate mit den entsprechenden AS-Sequenzen dargestellt:

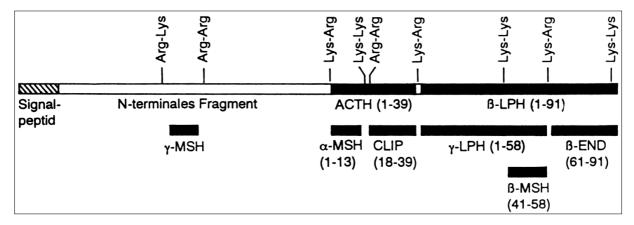


Abb. 4: Schematische Darstellung des Proopiolipomelanocortin-Moleküls und seine Aufspaltung in verschiedene Fragmente (nach Nakanishi et al., 1979). Die Zahlen in Klammern entsprechen der Numerierung der Aminosäuren des jeweiligen Peptids.

2.1.3. Nebenniere und ihre Hormone (Glucocorticoide)

Die *Nebenniere (NN, Glandula suprarenalis)* ist, ihrem Namen entsprechend, in unmittelbarer Nachbarschaft der Niere lokalisiert. Es handelt sich um ein paariges Doppelorgan, da es aus zwei, morphologisch zwar eng verbundenen, aber funktionell völlig selbständigen Drüsen besteht, nämlich dem zentral gelegenen Nebennierenmark (NNM) und der peripher gelegenen Nebennierenrinde (NNR).

Bei der *Nebennierenrinde (NNR)* lassen sich eine oberflächliche Zona arcuata (Pferd, Hund), eine mittlere, breite Zona fasciculata und eine tiefe Zona reticularis unterscheiden (Nickel et al., 1992). Sie produziert verschiedene als Corticoide bezeichnete Hormone (Steroide, Corticosteroide), wobei die Mineralocorticoide (u.a. Aldosteron, essentiell für die Elektrolytund Wasserhomöostase) von der Zona arcuata, die Glucocorticoide von der Zona fasciculata und die androgenen Corticoide (Sexualsteroide) von der Zona reticularis gebildet werden.

Die Ausgangssubstanz aller NNR-Steroide ist Cholesterin, welches für die Glucocorticoidsynthese in der Zona fasciculata durch verschiedene Enzyme über die Zwischenstufe
Pregnenolon zu Cortisol umgewandelt wird. Diese Umwandlung in der Zona fasciculata wird
durch ACTH stimuliert. Im Gegensatz zum NNM ist die NNR nicht imstande, ihre
Sekretionsprodukte zu speichern und erst bei Bedarf auszuschütten. Hormon-Bildung und
-Freisetzung fallen demnach hier zusammen, was die unmittelbar aufeinander folgenden,
teilweise episodisch sezernierten ACTH- und Cortisol-Peaks im Blut erklärt. Diesem
Sekretionstyp ist ein circadianer Rhythmus überlagert (Labhart und Müller, 1978 sowie
Herrtage, 1996).

Bei erhöhtem Bedarf haben neben ACTH auch ACTH-unabhängige Mechanismen die Fähigkeit, die Glucocorticoidsynthese zu stimulieren. Dies hängt mit den besonderen Innervationsverhältnissen der NNR zusammen. Die Stimulation des N. splanchnicus verstärkt die

(Thorner, 1998).

Sekretion von Glucocorticoiden, wobei als Neurotransmitter das Vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Katecholamine, das Neuropeptid Y sowie CRH in Frage kommen (Seidel, 1994). Hohe Cortisolspiegel im Plasma üben auf hypothalamischer sowie hypophysärer Ebene mittels Rückkopplung einen Hemmeffekt auf die CRH- und AVP- bzw. ACTH-Sekretion aus

Glucocorticoide (Cortisol) beeinflussen den Intermediärstoffwechsel sämtlicher Körperzellen, insbesondere den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel. Durch den hemmenden Effekt auf die periphere Glukoseverwertung und die Stimulation der Glukoseproduktion in der Leber kommt es zu einem erhöhten Glukoseumsatz bei gleichzeitiger Abnahme der Glukosetoleranz und Insulinempfindlichkeit. Die neugebildete Glukose wird z.T. als Glykogen in der Leber gespeichert (Gefahr der Entstehung einer Hepatopathie) oder direkt in die Blutzirkulation abgegeben. Dies führt bei übermäßigem Glucocorticoidgehalt im Plasma zu einer Steigerung des Blutzuckerspiegels (Hyperglykämie, Gefahr des Steroiddiabetes), zu einem erhöhten Insulingehalt im Blut (Hyperinsulinämie) und zu einer vermehrten Ausscheidung der Glukose im Urin (Glukosurie). Walker et al. (1994) fanden heraus, dass umgekehrt hohe Insulinlevel die Cortisol-Freisetzung senken. Da die ACTH-Ausschüttung unbeeinflußt

Neben der diabetogene Wirkung üben Glucocorticoide auch einen katabolen Effekt auf den Proteinstoffwechsel aus, d.h. sie fördern den Proteinabbau im peripheren Gewebe. Dies führt im Übermaß zu einer Schädigung der Muskulatur (Muskelschwäche bis Muskelatrophie [Steroidmyopathie] und dadurch schnellere Ermüdung bei körperlicher Belastung), der Knochensubstanz (Hemmung der Osteoblasten, Stimulation der Osteoklasten, Osteoporese, Spontanfrakturen insbesondere bei Rennpferden) sowie der Haut (dünn, "pergamentartig" und leicht lädierbar).

blieb, schlossen sie daraus, dass Insulin an der NNR und nicht an der Hypophyse wirkt.

Außerdem besitzen Glucocorticoide einen lipolytischen Effekt auf das Fettgewebe. Durch die zusätzliche Hemmung der Veresterung freier Fettsäuren zu Triglyceriden in den Fettzellen kommt es zu einer Erhöhung der zirkulierenden Fettsäuren im Blut (lipämisches Serum), die in der Leber als Neutralfette bzw. Phospholipiden angereichert werden. Wird der Glucocorticoideinfluß durch eine vermehrte Insulinausschüttung überkompensiert, kann Fett angesetzt bzw. im Körper umverteilt werden ("Stammfettsucht", beim Pferd allerdings weniger deutlich ausgeprägt). Die proteolytische und lipolytische Wirkung der Glucocorticoide dienen letztendlich der Glukoneogenese.

Des weiteren vermindern Glucocorticoide die Binde- und Granulationsgewebsbildung, wodurch es zur verzögerten Wundheilung und Narbenbildung kommt. Sie entfalten zudem eine antiphlogistische Wirkung durch Hemmung der Vaskularisation, Senkung der Kapillarpermeabilität und dadurch Verhinderung der Ödembildung sowie Herabsetzung der Migration von Leukozyten und Makrophagen ins Entzündungsgebiet. Durch die Suppression von Synthese, Sekretion oder Wirkung zahlreicher Mediatoren (insbesondere Histamin) werden auch allergische Reaktionen unterdrückt.

Glucocorticoide bewirken eine Rückbildung der lymphatischen Organe und Degeneration bzw. Lysis von Immunzellen, insbesondere der Lymphozyten. Die Antikörperbildung wird ebenfalls durch Herabsetzung der Interaktionen zwischen den verschiedenen immunkompetenten Zellen reduziert. Diese immunsuppressive Wirkung verursacht im Gesamtorganismus ein erhöhtes Infektionsrisiko und eine Verminderung der Resistenz.

Im weißen Blutbild nimmt die Gesamtzahl der Leukozyten zu (Leukozytose), insbesondere der neutrophilen Granulozyten (Neutrophilie), wobei jedoch die Zahl der Lymphozyten und besonders der eosinophilen Granulozyten abnimmt (Lymphozytopenie, Eosinopenie). Im roten Blutbild kann es zu einem Anstieg der Thrombozyten- und Erythrozytenzahl (Thrombozytose, Erythrozytose) kommen.

Weitere Folgen durch übermäßige Glucocorticoid-Einwirkung auf folgende Organe bzw. Organsystem (Seidel, 1994):

- ZNS (erhöhte Erregbarkeit, Verhaltensänderungen, Trägheit, Polyphagie)
- Niere (Störung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes durch erhöhte glomeruläre Filtration, Herabsetzung der Vasopressin- und ADH-Wirkung (Polyurie und die damit verbundene Polydipsie), Na-Retention sowie K- und Ca-Exkretion)
- Herz-Kreislauf-System (positiv inotrop, d.h. verstärkte Kontraktionsbereitschaft am Herzen, Tachykardie, Hypertonie)
- Magen-Darm-Trakt (vermehrte Salzsäure- und Pepsinsekretion bei vermindertem Schleimhautschutz (Ulkusgefahr), verminderte Ca-Resorption im Darm)
- Endokrine Drüsen (Suppression der Hypothalamus- und Hypophysen-Hormone, Senkung der Schilddrüsenhormone T4 und T3, Erhöhung der peripheren Insulinresistenz)
- Reproduktionsorgane (Hemmung der GnRH-Sekretion und der Gonadenfunktion)

2.2. Equines Cushing-Syndrom (ECS)

2.2.1. Einleitung und Definition

Das Equine Cushing-Syndrom (ECS), auch bekannt als Equiner Hyperadrenocortizismus oder Dysfunktion der Pars intermedia (DPI) der Hypophyse des Pferdes, ist eine langsam fortschreitende Funktionsstörung, der ein Überangebot an endogenem Cortisol (hypophysärer sowie adrenaler Cushing) oder exogen zugeführtem Glucocorticoid (iatrogener Cushing) zugrunde liegt. Evans (1972) schätzt die Inzidenz dieses Syndroms auf 0,075-0,15%, das sind bei 4000 untersuchten Pferden 3-6 Fälle pro Jahr. Durch neu gewonnene Erkenntnisse und eine verbesserte Aufklärung der Tierärzteschaft wird das ECS beim Pferd jedoch immer häufiger als solches erkannt. Van der Kolk et al. (1993a,b, 1994b) berichten über 21 bzw. 40 an ECS erkrankte Pferde zwischen 1990-1992 bzw. 1990-1993, Couëtil (1996) diagnostizierte in 2 Jahren bei 16 Pferden und 13 Ponys ECS, Brüns (2001) berichtet über 71 bestätigte Fälle, Schott et al. (2001) untersuchten 67 Pferde mit einem hypophysären Hyperadrenocortizismus, Heinrichs et al. (1990) weisen 19 Fälle mit einem PI-Adenom vor und bei Feige et al. (2000) waren es 13 betroffene Pferde.

In der Literatur wird die Krankheit vorwiegend bei älteren und mittelalten Pferden und Ponys beschrieben, das Durchschnittsalter wird von van der Kolk (1995) mit 20 Jahren angegeben. In jüngsten Studien wird jedoch über das Auftreten des ECS auch bei jüngeren Tieren

berichtet. In der Untersuchungsreihe von Brüns (2001) waren von 63 untersuchten Pferden 37 ältere Pferde zwischen 20-40 Jahren (59%), 21 mittelalte Pferde zwischen 10-20 Jahren (33%) und 5 jüngere Pferde bis zu 10 Jahren (8%) an ECS erkrankt. Die Altersstruktur der Patienten in der Studie von Assmann et al. (1997) und Froin et al. (1998) zeigten eine deutliche Konzentration der Erkrankung ab dem 18. bzw. 20. Lebensjahr. Allerdings traten auch einige Fälle in einem relativ frühen Alter von 8-12 Jahren auf, die sich durch ihren sehr progressiven Krankheitsverlauf unterschieden. Bei Couëtil et al. (1996) war ein Pferd im Alter von 8 Jahren und zwei Pferde zwischen 11-15 Jahre betroffen. Orth et al. (1982) diagnostizierten bei einer 7jährigen Stute ECS. Heinrichs et al. (1990) und Evans (1972) geben als Mindestalter ebenfalls 7 Jahre an. Damit stellen auch jüngere Pferde eine ernstzunehmende Patientengruppe dar, für die das ECS bislang als unwahrscheinlich galt.

Mair et al. (1995) konnten keine offensichtliche Rassendisposition beobachten, van der Kolk et al. (1993a, 1995a) und Hillyer et al. (1992) gaben jedoch eine höhere Inzidenz bei Ponys an. Mair et al. (1995), Heinrichs et al. (1990) und Beech (1987) sind der Meinung, dass das Syndrom häufiger bei weiblichen Tieren vorkommt. Döcke (1999) und Gribble (1972) berichten von etwa doppelt so viel erkrankten Stuten als Hengste. Bei van der Kolk et al. (1993a) und Hillyer et al. (1992) zeigte sich hingegen deutlich eine männliche Prädisposition.

2.2.2. Ätiologie und Pathogenese

Ursachen des erhöhten Glucocorticoidspiegels könnten sein:

- 1. NNR-Adenome und -Karzinome (adrenaler / primärer Cushing)
- 2. Hypophysenadenome, -Karzinome und noduläre Hyperplasien sowie ektopische ACTH-produzierende Tumore (hypophysärer / sekundärer Cushing)
- 3. Verabreichung hoher Dosen von synthetischem ACTH sowie exogene Zufuhr von Glucocorticoiden (iatrogener / tertiärer Cushing)

Der *adrenale Cushing* beruht auf einer Funktionsstörung der NNR. Tumore der Zona fasciculata sind gewöhnlich einseitig und sezernieren unabhängig von der Stimulation durch ACTH große Glucocorticoidmengen, die ihrerseits die ACTH-Freisetzung hemmen. Die Folge ist eine kontralaterale Atrophie der Zonae fasciculata et arcuata. Adenome und Karzinome der NNR sind jedoch beim Pferd sehr selten. Bislang wurden erst 5 primäre NNR-Neoplasien beim Pferd dokumentiert, vier davon waren funktionell inaktiv. Dabei handelte es sich um 3 metastasierende NNR-Karzinome und einem NNR-Adenom (van der Kolk et al., 1994b; Fix und Miller, 1987; Evans et al., 1968 sowie Raker und Fegley, 1965). Das von van der Kolk et al. (2001a) einzigartig beschriebene funktionelle NNR-Adenom verursachte typische ECS-Symptome.

Beim ECS handelt es sich fast ausnahmslos um einen *hypophysären Cushing*. Eine vermehrte ACTH-Sekretion der Hypophyse geht in den überwiegenden Fällen von Makro- und Mikroadenomen der PI aus. Noduläre Hyperplasien der PI können jedoch ebenfalls Ursache für das Syndrom sein (Boujon et al., 1993; Orth et al., 1982 und Moore et al., 1979). Bösartige Karzinome der PI konnten beim Pferd bislang nicht nachgewiesen werden und eine Entartung der PD wurde beim Pferd erst in 3 Fällen dokumentiert (Überreiter, 1957). Ektopische ACTH-produzierende Tumoren sind bislang nur bei Mensch und Hund nachgewiesen worden. Bei allen Formen der sekundären Überfunktion sind beide Nebennieren hyperplastisch, was mit einer vermehrten Cortisol-Produktion einhergeht.

1932 schrieb Pallaske erstmals über ein Adenom der PI beim Pferd, dabei handelt es sich meist um eine gutartige Geschwulst. Der Syntheseweg der pro-OLMC-Peptide in der adenomatösen PI ist dem in der gesunden PI ähnlich. Trotzdem liegen, wie aus Abbildung 5 ersichtlich, einige signifikante Veränderungen vor. So wird ein deutlich größerer Anteil an 24,5 kDa pro- γ -MSH gebildet. Möglicherweise ist die Abspaltung von ACTH von diesem Intermediärprodukt im Vergleich zur gesunden PI vermindert. Durch eine weitere Prozessierung entsteht ferner ein 20,5 und ein 15-16 kDa pro- γ -MSH. Dabei kann das 15-16 kDa pro- γ -MSH dem 17 kDa pro- γ -MSH der gesunden PI entsprechen, bedingt durch das Adenom aber Unterschiede in der Glykolisierung aufweisen. Durch weitere Abspaltung entsteht γ_3 -MSH und γ_1 -MSH.

Aus β -LPH sowie einem 16 und 18 kDa C-terminalen Fragment wird γ -LPH und β -END gebildet. Durch eine weitere Prozessierung von γ -LPH entsteht zusätzlich β -MSH.

Die Herkunft des ACTHs ist auf die drei Vorläufermoleküle 24,5 kDa pro- γ -MSH, 16 und 18 kDa C-terminales Fragment zurückzuführen. Die finalen Hauptprodukte der adenomatösen PI sind demnach ACTH, α -MSH, β -MSH, CLIP, β -LPH, γ -LPH und β -END (Froin et al., 1998).

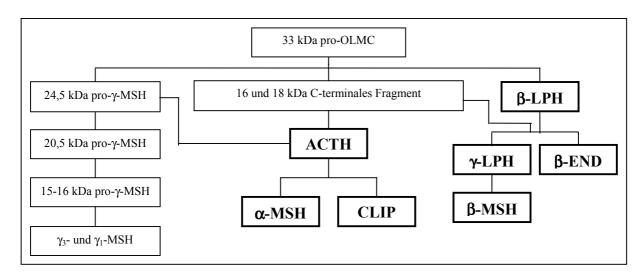


Abb. 5: Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese bei einer Dysfunktion der Pars intermedia bei cushingoider Pferde (nach Froin et al., 1998)

biologisch aktives ACTH (Froin, 1997, 1998a).

Nach Okada et al. (1997a,b) sind hauptsächlich ACTH und β -END in der hypertrophen und tumorösen PI zu finden und die typischen Symptome des ECS sprechen dafür, dass das Adenom vorwiegend ACTH produziert, ohne es, wie in der gesunden PI, fast vollständig in α -MSH und CLIP zu spalten. Dabei entsteht jedoch mehr immunreaktives ACTH als

Daneben wurden aber auch hohe α -MSH-, β -MSH-, β -END-, β -LPH-, γ -LPH und CLIP-Gehalte im Plasma gefunden (Froin et al., 1998, 1998a; Couëtil et al., 1996; Mair et al., 1995,1998; van der Kolk et al., 1995a; Heinrichs et al., 1990; Wilson et al., 1982; Orth et al., 1982; Moore et al., 1979 und Gribble, 1972). Qualitativ sind α -MSH, β -MSH, β -END, γ -LPH und CLIP vergleichbar mit denen der gesunden PI. Somit scheinen die vorliegenden Veränderungen der Synthese der pro-OLMC-Peptide beim ECS vorwiegend quantitativ als qualitativ zu sein. Eine qualitative Veränderung der pro-OLMC-Peptide ist jedoch nicht auszuschließen.

Die beschriebenen Abweichungen der posttranslatorischen pro-OLMC-Peptidsynthese führen zu einer Störung der adrenocorticalen Steroidproduktion. Durch die fehlende negative Rückkopplung der melanotropen Zellen der adenomatösen PI, die wie die gesunde PI nur unter einer inhibitorischen dopaminergen Kontrolle seitens des Hypothalamus steht, kommt es zum Anstieg des Plasma-Cortisols und zum Verlust der diurnalen Rhythmik der Cortisol-Sekretion. Nach Millington et al. (1988) ist bei einem Adenom der Dopamin-Gehalt in der PI merklich herabgesetzt. Unklar ist jedoch, ob dies durch eine Reduzierung der hypothalamischen dopaminergen Neuronen hervorgerufen wird oder dadurch, dass die adenomatöse PI aus ihrer Innervation "herauswächst", d.h. dass sich die Innervation durch das Wachstum der tumorösen PI verhältnismäßig verkleinert. In jedem Fall ist aber der dopaminerge Kontrollmechanismus der melanotropen Zellen zusätzlich vermindert. Zudem können α-MSH und β-END die ACTH-Wirkung potenzieren und die Cortisol-Produktion weiter stimulieren (Seger und Bennett, 1986; Shanker und Sharma, 1979 sowie Vinson et al., 1985). Des weiteren modulieren sie, wie auch andere vom Tumor gebildeten Peptide wie β-MSH und CLIP und nach Orth et al. (1998) auch γ₃-MSH, β-LPH und N-terminale Peptide, den Effekt des ACTHs an der NNR (Froin et al. 1998, Froin 1998a).

Ferner werden einige klinische Symptome nicht allein durch die erhöhten Cortisolwerte, sondern möglicherweise durch die qualitativ und quantitativ veränderten pro-OLMC-Peptide verursacht (Froin et al., 1997, 1998; Boujon et al. 1993; Heinrichs et al., 1990; Orth und Nicholson, 1982 sowie Moore et al., 1979).

Auch beim *iatrogenen Cushing* durch übermäßige ACTH-Zufuhr entsteht eine bilaterale Hyperplasie der NNR. Dagegen führt eine Langzeittherapie von hohen Dosen eines Glucocorticoids über den Hemmungsmechanismus der ACTH-Sekretion zur NNR-Atrophie, es entwickelt sich eine sekundäre NNR-Insuffizienz. In beiden Fällen verursacht der erhöhte Glucocorticoid-Blutspiegel die klinischen Symptome des ECS. Der iatrogene Cushing kommt nach Cohen und Carter (1992) beim Pferd hauptsächlich im Zusammenhang mit einer übermäßigen intramuskulären Applikation des Prednisolon-Abkömmlings Triamcinolon-Acetonid (Volon A®, Parkesteron®) vor.

2.2.3. Klinische Symptomatik und pathologische Laborwerte

2.2.3.1. Klinische Symptomatik

Die klinischen Symptome und pathologischen Laborwerte, die sich zunächst langsam, aber fortschreitend entwickeln, hängen von der Dauer und Intensität der unphysiologisch verstärkten Sekretion von pro-OLMC-Peptiden und Cortisol sowie von der Antwort der Zellen bzw. Organe auf das erhöhte Angebot ab (Abbildung 6). Sie können individuell in Anzahl und Ausprägung stark variieren. Zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung können Monate bis Jahre vergehen. Die Überlebenszeit cushingoider Pferde, d.h. vom Ausbruch der Krankheit bis zum Auftreten von Komplikationen, die eine Euthanasie notwendig machen, geben Hillyer et al. (1992) mit durchschnittlich 10 Monaten (2-24 Monate) und van der Kolk et al. (1993a) mit 192 ± 59 Tagen (120-368 Tage) an.

Die wesentlichsten Symptome des ECS sind *Muskelschwäche bis hin zur Muskelatrophie* (*Steroidmyophatie*). Als deren Folge treten der Tuber coxae sowie der Tuber sacrum weit hervor und es entsteht ein Senkrücken. Derartig erkrankte Tiere ermüden schnell bei körperlicher Belastung und zeigen einen ataktischen Gang.

Auffällig ist ferner das lange, meist wellig-zottige Fell, das im Frühjahr nicht vollständig bzw. verzögert abgestoßen wird oder schnell in übermäßiger Länge nachwächst (Hirsutismus) und eine vermehrte Schweißabsonderung (Hyperhidrosis) bedingt. Die Pathogenese dieser beiden Symptome ist unklar. Es könnten physikalische Auswirkungen durch die Expansion des Tumors und des so entstehenden Druckes auf den angrenzenden Hypothalamus sein, wodurch die thermoregulatorischen Zentren beeinträchtigt werden (Froin et al., 1997 und Heinrichs et al., 1990). Beech (1999) beobachtete in diesem Zusammenhang auch eine Tachypnoe. Van der Kolk et al. (1993a) vermuten, dass die übermäßige Ausschüttung von MSH bei der Entwicklung des Hirsutismus eine wichtige Rolle spielen könnte. Bevier (1991) konnte diese Fellabnormalität nur im Zusammenhang mit einem PI-Adenom beobachten. Mair et al. (1995, 1998) stellten Hirsutismus bei über 90% der erkrankten Pferde fest, so dass er in der Literatur als Kardinalsymptom angesehen wird. Laut van der Kolk et al. (2001a) ist Hirsutismus aber nicht immer pathognomisch für ein PI-Adenom, da er auch durch ein von der Arachnoidea ausgehendes und in der Hypophyse lokalisiertes Meningiom (Johansson und Segall, 1994) sowie durch ein funktionelles, auch wenn selten vorkommendes, NNR-Adenom bedingt sein kann. In der Studie von Brüns (2001) zeigten ein Drittel der 63 Pferdepatienten keinen Hirsutismus, so dass auch Pferde, denen das lange lockige Fell fehlt, potentiell als verdächtig angesehen werden müssen. Beim Auftreten anderer Cushing-Symptome müssen somit unbedingt weiterführende Untersuchungen zur Abklärung eines ECS durchgeführt werden. Gelegentlich kommt es beim ECS auch zur Alopezie und ausgeprägten Schuppenbildung.

Infolge der *Immunsuppression* sind *Pyodermien*, *Pilzinfektionen der Haut* und die Häufung von *chronisch rezidivierenden Infektionskrankheiten* (u.a. Konjunktivitis, Zystitis, Gelenksund Sehnenscheidenentzündungen sowie Pneumonie, einschließlich einer sekundären
Sinusitis mit eitrigem Nasenausfluß) zu beobachten. Bei der Untersuchung anderer Spezies
fand man heraus, dass POMC-Peptide die Immunfunktion und Resistenz gegenüber

Krankheiten beeinflussen können. Beim Pferd werden pro-OLMC-Peptide als Ursache für die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen ebenfalls diskutiert (Millington et al., 1988).

Häufig ist eine *verzögerte Wundheilung und Narbenbildung* zu beobachten, da Glucocorticoide die Binde- und Granulationsgewebsbildung vermindern.

Auftretende Gewichtsverluste sind in erster Linie diabetisch bedingt, können aber auch im Zusammenhang mit rezidivierenden Infekten stehen, die beim Pferd besonders häufig sind. Da Pferde auf die diabetogene Wirkung der Glucocorticoide besonders empfindlich reagieren, entwickelt sich bei ihnen meist ein manifester *sekundärer Diabetes mellitus* (Döcke, 1999).

Häufig entsteht beim ECS eine *chronisch rezidivierende Hufrehe*, d.h. einer Entzündung der Huflederhaut im Bereich der Wand- und Sohlenlederhaut. Vermutlich rufen Glucocorticoide eine digitale Vasokonstriktion durch Katecholamine hervor, wodurch die Blutversorgung in diesem Bereich herabgesetzt wird. Auch die erhöhte Thromboxan-A₂-Aktivität kann Hufrehe verursachen. Bei diesem Cyclooxygenasemetaboliten der Arachidonsäure handelt es sich ebenfalls um einen Vasokonstriktor und zudem um einen Stimulator der Thrombozytenaggregation bzw. -sekretion, was zum Verschluß kleinerer digitaler Gefäße führen kann. Freestone und Melrose (1995) glauben, dass auch die Insulin-Dysfunktion eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Hufrehe spielt.

Die häufig erwähnte *Polydipsie* wird durch eine *Polyurie* verursacht. Letztere entsteht durch die Cortisol-induzierte Hyperglykämie und Glukosurie, durch die erhöhte glomeruläre Filtrationsrate aufgrund der Glucocorticoid-Wirkung auf die Nieren sowie durch die Herabsetzung der ADH-Freisetzung aus der PN. Nach Fey et al. (1998), Assmann et al. (1997) und van der Kolk et al. (1995a) sind dies eher selten vorkommende Symptome. Sie werden meist in Verbindung mit einem sekundären Diabetes mellitus gesehen. Die erhöhten Trinkwassermengen pro Tag werden von Fey et al. (1998) sowie Cohen und Carter (1992) mit 50-90 Litern angegeben (Referenzbereich nach Auer et al. (1987): 10-15 Liter/ Tag).

Auf der Grundlage eines ständig erhöhten Glucocorticoid-Blutspiegels entsteht eine Umverteilung des Körperfettes an unphysiologischen Körperstellen ("Stammfettsucht"), die allerdings beim Pferd weniger ausgeprägt ist als beim Menschen und Hund. Der in diesem Zusammenhang entstandene Hängebauch mit einer dünnen abdominalen Bauchwand wird beim Pferd auch als "Weidebauch" bezeichnet. Auffällig ist auch eine supraorbitale subkutane Fetteinlagerung, die als Umfangsvermehrung deutlich zu erkennen ist. Nach Beech (1999), van der Kolk et al. (1993a) und Hillyer et al. (1992) weisen 12-19% der erkrankten Pferde ausgeprägte supraorbitalen Fettpolsser auf.

Die *Polyphagie*, die beim Hund extrem ausgeprägt sein kann, wird beim Pferd nur selten erwähnt. Sie könnte auf einen direkten Glucocorticoid-Effekt auf das ZNS, aber auch auf eine ungenügende zelluläre Glukoseaufnahme zurückgehen (Seidel, 1994).

zurückzuführen ist.

Seltener werden in Verbindung mit dem ECS zentralnervale Anfälle, Krämpfe, Kreislaufkollaps und Blindheit aufgeführt, was nach Assmann et al. (1997), Froin et al. (1997, 1998) und Mair et al. (1995) vermutlich auf eine Druckatrophie des raumgreifenden Adenoms der PI auf das ZNS bzw. Chiasma opticum sowie auf dessen Blutversorgung bzw. Innervation

Weitere Symptome sind *Trägheit, Apathie, Somnolenz* bis hin zur *Lethargie* sowie *sonstige Verhaltensänderungen* (z.B. *Unterwürfigkeit*), die durch die erhöhten β-END-Gehalte im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF; Liquor) bedingt sein könnten (Mair et al., 1995, 1998; Assmann et al., 1997; Millington et al., 1988 und Orth et al., 1982).

Seltener werden beim ECS ein *anomaler Östrus* bzw. ein *gänzlicher Verlust des Zyklus* sowie eine *Pseudolaktation* beobachtet. Neben einer allgemeinen *Infertilität*, die laut Assmann et al. (1997) durch eine Störung der Hypophysen-Gonaden-Achse bedingt ist, sind Stuten des weiteren für *Infektionen des Urogenitaltraktes* prädisponiert.

2.2.3.2. Pathologische Laborwerte

Die häufigsten Laborbefunde sind eine Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, was auf den diabetogenen Effekt der Glucocorticoide zurückzuführen ist. Van der Kolk et al. (1995b) vermuten, dass neben Cortisol auch MSH und β-END für die Insulinresistenz verantwortlich sind und so zur Entstehung der Hyperglykämie beitragen. Durch eine hochgradige Hyperglykämie entsteht sekundär eine Glukosurie. Bei raschem Abbau von Körpermasse kann es laut Döcke (1999) darüber hinaus zu einer Ketonurie kommen. Durch die erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren (Hyperlipidämie) und den vermehrten Cholesterin-Gehalt (Hypercholesterolämie) ist das Blut häufig lipämisch.

Wegen der immunsuppressiven Glucocorticoidwirkung entsteht eine Lymphopenie, ausgeprägte Eosinopenie und relative oder absolute Neutrophilie im weißen Blutbild. Beech (1983) stellte in einigen Fällen eine leichte Anämie fest.

Das ECS kann zudem mit einer Fettinfiltration in die Leber (Glucocorticoid-Hepatopathie) einher gehen, die sich durch erhöhte Leberwerte im Plasma bemerkbar macht. Aufgrund der hepatozellulären Dysfunktion steigt die Alkalische Phosphatase (AP), die γ-Glutamyl-Transferase (GGT) sowie die Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Plasma merklich. Die AP ist ein lysosomales Enzym mit unspezifischer Stoffwechselwirkung und wird, genauso wie γ-GGT, u.a. bei einer Gallenstauung in den Hepatozyten vermehrt synthetisiert. AST ist in der Leber hochaktiv und als Screening-Enzym geeignet (Bickhardt, 1992). Da Steroid-Hepatopathien beim Pferd meist reversibel sind und nicht oft im Zusammenhang mit ECS gesehen werden, scheint nach Cohen und Carter (1992) die Leber bei Pferden auf die Auswirkungen der Corticosteroide weniger empfindlich zu reagieren als bei Hunden, bei denen häufig eine ausgeprägte Glucocorticoid-Hepatopathie als Symptom des caninen Cushing-Syndroms auftritt.

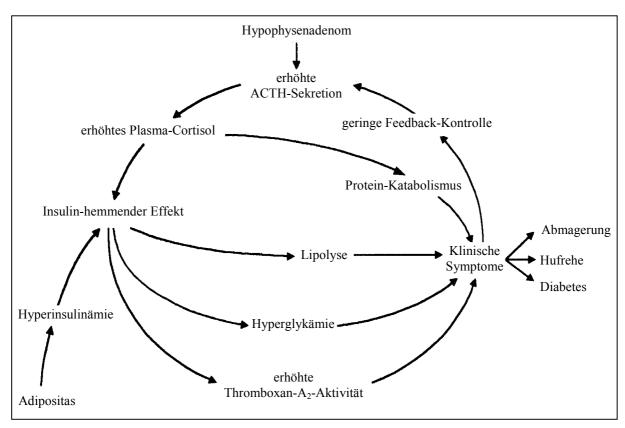


Abb. 6: Circulus vitiosus als Antwort auf einen erhöhten ACTH-Plasmaspiegel (nach Field und Wolf, 1988)

2.2.4. Diagnostik

Die anamnestische und klinische Befundserhebung sowie die Laboruntersuchungen ergeben bereits erste Hinweise für die Diagnose. Durch ACTH- und Cortisol-Basalwertmessungen im Plasma in Verbindung mit endokrinologischen Funktionstests kann die Diagnose ECS schließlich abgesichert werden.

2.2.4.1. Blutentnahmetechnik und Probeumgang

Beim Pferd werden die Blutproben für die Bestimmung des ACTH- und Cortisol-Gehaltes aus der Vena jugularis externa entnommen. Nach Knol et al. (1992) führen die Venenpunktion, ein Verweilkatheter oder die Gewöhnung an den Ort der Blutabnahme als mögliche Stressoren zu keinem Anstieg des Cortisol-Gehaltes im Plasma.

Hegstad et al. (1990) berichten jedoch von Unterschieden in der Behandlung der Blutproben, die der ACTH-Quantifizierung vorausgehen und die Meßergebnisse beeinflussen können. ACTH wird von Glasoberflächen absorbiert und durch proteolytische Enzyme im Vollblut sowie Plasma abgebaut. Die Halbwertzeit von ACTH beträgt nur 4-8 Minuten (Froin et al.,

1998). Beim Zerfall entstehen ACTH-ähnliche Fragmente, die bei der Analyse erfaßt werden können und solche, die nicht gemessen werden (Dopouy et al., 1985). Des weiteren ähnelt die AS-Sequenz von α-MSH und CLIP der von ACTH, so dass auch diese Peptide zum Teil mitgemessen werden (Couëtil et al., 1996). Hieraus resultieren falsch hohe bzw. falsch niedrige ACTH-Konzentrationen. Die Temperatur beim Transport der Proben sowie die anschließende Lagerungstemperatur sind bezüglich des enzymatischen Abbaus des ACTHs ebenfalls von großer Bedeutung. Eine niedrige Temperatur (-22 °C) wirkt sich stabilisierend auf das ACTH aus, die Abbaurate liegt hierbei unter 10% (Brüns, 2001). Der Zusatz des Gerinnungshemmer Ethylendiamintetraazetat (EDTA) hat laut Vague et al. (1971) keinen Einfluß auf den ACTH-Plasmagehalt. Mutschler (1991), Ehrlich und Styvala (1973) sowie Dopouy et al. (1985) beschreiben die Bindung von dem Antikoagulans Lithium-Heparin an das ACTH. Derartige heparinvernetzte ACTH-Molekülaggregationen bewirken laut Hegstad et al. (1990) eine Herabsetzung der Antigen-Antikörper-Bindung im Radioligandenassay, wodurch zu hoch berechnete ACTH-Konzentrationen entstehen.

Um den enzymatischen Abbau des ACTHs so gering wie möglich zu halten, empfiehlt Brüns (2001) folgende Vorgehensweise beim Probeumgang und -transport unter Feldbedingungen: Das Blut sollte in Polypropylen-Röhrchen, die mit 1,2-2,0 mg EDTA/ml Probevolumen versetzt sind, aufgenommen werden. Unmittelbar nach der Blutabnahme sollte der Zusatz von 500 KIE Aprotinin/ml Blut (entsprechend 25 µl Aprotinin/0,5 ml Blut) erfolgen. Da Aprotinin (Trasylol® 500.000 KIE, Bayer Vital GmbH, Leverkrusen) ein Proteasenhemmer ist, wird der ACTH-Abbau verhindert. Das Abzentrifugieren und Einfrieren des Plasmas sollte innerhalb 30-60 Minuten vollzogen sein. Wenn kein Aprotinin zur Verfügung steht, sollte entsprechend mehr Wert auf die schnellstmögliche Zentrifugation und das Einfrieren des Plasma gelegt werden. Der Versand zum Untersuchungslabor muß in einem Kühlkontainer unter Beilage eines Kühlmittels vorgenommen werden, während dies bei Aprotinin-Zusatz nicht nötig ist.

2.2.4.2. Basalwerte, endokrinologische Funktionstests, radiologische Methoden und Autopsie

Cortisol-Basalwertmessung

Die episodische Cortisol-Sekretion wird beim gesunden Pferd von einem circadianen Rhythmus überlagert, welcher eng mit dem Licht-Dunkel-Wechsel korreliert. Durch die diurnalen Unterschiede in den Konzentrationen des Cortisol-Plasmagehaltes läßt sich beim Pferd morgens eine deutlich höhere durchschnittliche Cortisol-Konzentration messen als abends. Die Cortisol-Plasmakonzentration gesunder Pferde ist nach Alexander et al. (1991) und Hoffsis et al. (1970) auch vom Trainingszustand abhängig. Nach Klein et al. (1989) sind die Angaben von Cortisol-Referenzwerten je nach Bestimmungsmethode unterschiedlich. Aber auch eine Vielzahl anderer Faktoren wie Spezies, Geschlecht, Alter, Fortpflanzungsstadium (Gravidität, Laktation, Östrus), Fütterung und Aufstallungsart beeinflussen den Cortisol-Plasmagehalt. Nach Hoffsis et al. (1970) besteht keine Altersabhängigkeit der Cortisol-Plasmakonzentration, dagegen lagen bei Klein et al. (1989) die Basalwerte bei Jungtieren deutlich unter den Basalwerten adulter Tiere. Jede Art von Streß kann zur akuten Erhöhung des Plasma-Cortisols führen.

In der Literatur lassen sich sehr unterschiedliche Angaben zu den Cortisol-Referenzwerten finden (Tabelle 1; die in abweichenden Einheiten angegebenen Werte wurde in ng/ml umgerechnet):

Autor/Jahr	Durchschnittlicher Cortisol- Plasmagehalt bzw. Cortisol- Referenzbereich (ng/ml)	Anzahl der Pferde
	6.4 ± 1.6 (Wallache)	7
Baker et al. (1982)	$9.1 \pm 1.1 \text{ (Stuten)}$	8
	23.8 ± 4.2 (Hengste)	11
Nathanielsz et al. (1975)	$15,9 \pm 1,7$	6
Fey et al. (1998)	30,0-67,0	Routinelabor
Couëtil et al. (1006)	$38.4 \pm 13.1 \text{ (Ponys)}$	9
Couëtil et al. (1996)	50.2 ± 20.7 (Pferde)	18
Erain et al. (1009, 1009h)	$39,1 \pm 2,4$	55
Froin et al. (1998, 1998b)	(16,0-100,0)	33
Eiler et al. (1980)	$43,3 \pm 9,3$	15
Eller et al. (1980)	(29,5-66,6)	13
Beech und Garcia (1985)	$48,4 \pm 13,9$	12
Zentrumsabteilung für Chemische	50,0-60,0 (8.00 Uhr)	Routinelabor
Analytik und Endokrinologie (2003)	30,0-40,0 (17.00 Uhr)	Koutiliciaooi
Hoffsis et al. (1970)	$51,2 \pm 16,7$	92
Orth et al. (1982)	$53.0 \pm 8.0 \ (9.00 \ \text{Uhr})$	10
Schierz (1988)	$58,2 \pm 21,6$	50
Hagedorn und Schulz (1997)	61,0	100
Glardon und Schatzmann (1982)	$63,4 \pm 23,0$	51
Alexander et al. (1991)	67.9 ± 12.6	9
I	71.5 ± 16.0 (Pferde)	20
James et al. (1970)	$71.6 \pm 20.0 \text{ (Ponys)}$	60
Caloni et al. (1999)	90.1 ± 41.7	103
V 4 V-114-1 (20011)	$90.9 \pm 41.7 (6.00 \text{ Uhr})$	7
Van der Kolk et al. (2001b)	$51.5 \pm 19.2 (18.00 \text{Uhr})$	7
Elizinala Daizaranla et al. (1074)	$112,0 \pm 18,0 \text{ (Stuten)}$	6
Flisinska-Bojanowska et al. (1974)	126.0 ± 21.0 (Hengste)	6
MacHarg et al. (1985)	144,0*	12

Tab. 1: Cortisol-Referenzwerte (ng/ml) im Plasma gesunder Pferde

Mit den heutzutage verwendeten Assays läßt sich jedoch ein Cortisol-Referenzbereich von 50,0-60,0 ng/ml (8.00 Uhr) bzw. 30,0-40,0 ng/ml (17.00 Uhr) festlegen.

Die alleinige Cortisol-Basalwertmessung ist aber nicht aussagekräftig, da der Cortisol-Blutspiegel beim ECS nicht immer deutlich erhöht ist (Feige et al., 2000, Froin et al., 1997,

^{*} Die Autoren haben keine Werte angeben, so dass sie anhand der Abbildungen geschätzt wurden

1998, 1998a), nach Fey et al. (1998), Assmann et al. (1997), Eiler et al. (1997), Couëtil et al. (1996), Mair et al. (1995), Freestone und Melrose (1995), van der Kolk et al. (1991, 1993a, 1995a), Dybdal et al. (1994), Hillyer et al. (1992), Horvath et al. (1988), Auer et al. (1987), Beech (1987) und Gribble (1972) befindet er sich häufig im Referenzbereich oder ist sogar erniedrigt (Tabelle 2; die in abweichenden Einheiten angegebenen Werte wurde in ng/ml umgerechnet). Der physiologische Tagesrhythmus der Cortisol-Sekretion ist aber in jedem Fall aufgehoben.

Autor/Jahr	Durchschnittlicher Cortisol-Plasmagehalt bzw. Cortisolbereich (ng/ml)	Anzahl der Pferde
Auer et al. (1987)	22,8 (8.00-11.00 Uhr) (19,9-36,6)	1
Field und Wolf (1988)	23,0	1
Thompson et al. (1995)	23,2	2
Fey et al. (1998)	26,0	1
Couëtil et al. (1996)	$38,4 \pm 13,1 \text{ (Ponys)}$	11
Munoz et al. (1996)	40,0* (9.00 Uhr)	1
Van der Kolk et al. (1991)	41,3	1
Froin (1997)	$55.8 \pm 6.0 (17.00 \text{ Uhr})$	35
Hillyer et al. (1992)	> 56,2	8
Couëtil et al. (1996)	$57.8 \pm 43.0 \text{ (Pferde)}$	11
Van der Kolk et al. (1993a)	61,2 ± 5,4 (9.00 Uhr) (26,8-89,9)	13
Orth et al. (1982)	62,0 ± 2,5 (9.00 Uhr)	2
Froin et al. (1998)	$68,3 \pm 8,2$ (20,0-260,0)	45
Van der Kolk et al. (1993c)	65,2 (Pony)	1
Van der Kolk et al. (1995a)	81.5 ± 13.9 (26,8-313,0)	20
Van der Kolk et al. (1995b)	$122,5 \pm 94,6$	21

Tab. 2: Cortisol-Gehalte (ng/ml) im Plasma cushingoider Pferde

ACTH-Basalwertmessung

ACTH wird von der Hypophyse pulsatil in mind. 2-4 Pulsen/Stunde ausgeschüttet (episodische ACTH-Sekretion). Wegen des Verdünnungseffektes in der Vena jugularis externa (Punktionsstelle) ist die ACTH-Konzentration im Plasma jedoch 50x niedriger als die im venösen Hypophysenblut. Deshalb sind die meisten hypophysären ACTH-Pulsspitzen im Jugularblut nicht mehr meßbar. Folglich ist bei gesunden Tieren nur eine circadiane Rhythmik mit stündlicher Fluktuation feststellbar, die laut Thorner et al. (1998) und Orth et

^{*} Die Autoren haben keine Werte angeben, so dass sie anhand der Abbildungen geschätzt wurden

al. (1982) durch Licht und andere Faktoren beeinflußt wird. Eine einzelne Probe spiegelt jedoch die Sekretionsaktivität der Hypophyse mit ausreichender Genauigkeit wieder (Froin, 1998a und Couëtil et al., 1996). Moore et al. (1979) beobachteten eine Abhängigkeit der Plasma-ACTH-Konzentration von der Tageszeit. McFarlane et al. (1998) haben den ACTH-Plasmagehalt bei 30 gesunden Pferden zwischen 5-12 Jahren sowie 30 gesunden Pferden, die älter als 20 Jahre waren, gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass es keine Unterschiede in den ACTH-Basalwerten gab. Das Alter hat demnach keine Auswirkung auf die ACTH-Basalkonzentration. Für die ACTH-Referenzwerte wurden in der Literatur zum Teil abweichende Angaben gemacht (Tabelle 3):

Autor/Jahr	Durchschnittlicher ACTH- Plasmagehalt bzw. ACTH- Referenzbereich (pg/ml)	Anzahl der Pferde
Couëtil et al. (1996)	8,4 ± 2,9 (Ponys) (4,9-13,6)	9
Coucin et al. (1990)	18.7 ± 6.8 (Pferde) (6.5-30.9)	18
Froin (1998a)	17.6 ± 1.6 $(10.0-59.0)$	42
Brüns (2001)	$20,7 \pm 11,3$	21
Cudd et al. (1995)	25,0-130,0	Keine Angaben
Orth et al. (1982) Orth und Nicholson (1982)	32.0 ± 5.0 (10.0-50.0)	10
Hodson et al. (1986)	$32,5 \pm 8,0$ (10,0-50,0)	Keine Angaben
Moore et al. (1979)	35,0 ± 11,8 (8.00 Uhr) 21,4 ± 9,6 (22.00 Uhr)	18
Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie (2003)	< 40,0	Routinelabor
Van der Kolk et al. (2001a,b)	< 55,0 (9.00 Uhr)	7

Tab. 3: ACTH-Referenzwerte (pg/ml) im Plasma gesunder Pferde

Die ACTH-Konzentrationen der erkrankten Tiere (Tabelle 4) sind nach Auer et al. (1987) bis zu 300-600fach gegenüber denen gesunder Tiere erhöht. Van der Kolk (1995a) hat bei 16 Pferden mit ECS erhöhte ACTH-Konzentrationen gemessen und gibt die Aussagekraft der ACTH-Basalwertmessung mit 100% an. Bei Couëtil et al. (1996) lag die Aussagekraft bei 91% für Pferde und bei 82% für Ponys. Ein einzelner ACTH-Basalwert ist demnach bei der Diagnosestellung von ECS ein zuverlässiger Indikator. Da die Cortisol-Konzentrationen nicht adäquat erhöht sind, wird vermutet, dass beim Pferd mehr immunreaktives als biologisch aktives ACTH ausgeschüttet wird. Unabhängig von der biologischen Wirkung können nach Froin et al. (1997, 1998, 1998a) und Orth et al. (1982) aber beide Formen gleichermaßen bei den Messungen mit den Antiseren immunreaktiv reagieren.

Durchschnittlicher Autor/Jahr **ACTH-Plasmagehalt** Anzahl der Pferde bzw. ACTH-Bereich (pg/ml) 110,0-4500,0 2 Orth et al. (1982) 635,9 (9.00 Uhr) 10 Van der Kolk et al. (1993a) (191,0 - > 1000,0) 199.2 ± 182.8 (Pferde) 11 (40.8-669.9)Couëtil et al. (1996) 206.2 ± 319.6 (Ponys) 11 (23,0-1018,0)Mazan (1997) 286 1 286.0 ± 55.4 Froin (1998a) 46 (72,0-846,0) 314.3 ± 93.2 9 Froin et al. (1997) (Maximum: 846,0) 489.0 ± 84.8 Van der Kolk et al. (1995a) 16 (104,0-1000,0)Van der Kolk et al. (1991) 815 Van der Kolk et al. (1993c) > 960 (Pony) Seidel (1994) > 1000,0 Keine Angaben 1935.0 5 Orth und Nicholson (1982) (470,0-4350,0)10200 (8.00 Uhr) Moore et al. (1979) 1 13000 (22.00 Uhr)

Tab. 4: ACTH-Gehalt (pg/ml) im Plasma cushingoider Pferde

Dexamethason-(Low-Dose-)Suppressionstest

Das Wirkungsprinzip des Dexamethason-Hemmtestes beruht darauf, dass das synthetische Glucocorticoid Dexamethason in niedrigen Dosen durch das negative Feedback die ACTH-Sekretion der corticotropen Zellen der PD beim gesunden Tier sehr effektiv hemmt, ohne bei der Bestimmung von Cortisol im Plasma miterfaßt zu werden. Da die melanotropen Zellen keine Glucocorticoidrezeptoren exprimieren, ist bei cushingoiden Pferden die Suppression unzureichend oder bleibt vollständig aus. Es werden 40 µg Dexamethason (kein Depotpräparat) / kg KGW i.m. injiziert. Die Blutentnahmen für die Cortisol-Messungen erfolgt unmittelbar vor der Dexamethason-Gabe um 17.00 Uhr (0-Wert) und nach der Dexamethason-Applikation um 8 Uhr (post 15h) und 12 Uhr (post 19h) des folgenden Tages (Froin et al., 1997, 1998, Dybdal et al., 1994). Nach Dybdal et al. (1994) wird bei diesem zeitlichen Durchführungsprotokoll bei gesunden Pferden der diurnale Rhythmus des endogenen Cortisolspiegels einbezogen. Die Autoren empfehlen die Probeentnahme für den Cortisol-Basalwert und die unmittelbar folgende Dexamethason-Gabe um 17.00 Uhr, damit

die Probeentnahme nach Injektion in die Zeit des physiologischer Weise höchsten endogenen Cortisolspiegels (gegen 8.00 Uhr am nächsten Tag) fällt. Dieses Vorgehen wird auch als "Über-Nacht"-Dexamethason-Suppressionstest bezeichnet.

In der Studie von Froin et al. (1997, 1998) fielen die Cortisol-Plasmakonzentrationen bei den gesunden Pferden (n = 51) nach 15 Stunden auf $3,95 \pm 0,37$ bzw. $4,3 \pm 0,4$ ng/ml und nach 19 Stunden auf $4,21 \pm 0,44$ bzw. $4,1 \pm 0,4$ ng/ml ab (Referenz: < 10 ng/ml). Bei den Cushing-Pferden (n = 26 bzw. 35) kam es nach 15 Stunden zu einem Cortisol-Abfall auf $39,4 \pm 4,26$ bzw. $40,0 \pm 4,39$ ng/ml und nach 19 Stunden auf $42,85 \pm 4,44$ bzw. $42,8 \pm 4,0$ ng/ml. Der Dexamethason-Suppressionstest hat für Beech (1999) und Froin et al. (1997) von allen endokrinologischen Funktionstests für die Diagnostik von ECS die höchste Sensitivität und Spezifität. Die häufig propagierte Dexamethason-induzierte Hufrehe oder die Verschlimmerung einer bereits vorliegenden Hufrehe durch Dexamethason konnte laut Beech (1999), Froin et al. (1998), Assmann et al. (1997), Freestone und Melrose (1995), Dybdal et al. (1994), van der Kolk et al. (1993a) und Hillyer et al. (1992) nicht bestätigt werden.

ACTH-Stimulationstest

Für die Stimulation der adrenalen Cortisol-Sekretion werden 0,2-1 IE/kg KGW bzw. 100-500 IE/Tier synthetisches ACTH (Synacthen[®], Cosyntropin[®]) i.v. injiziert (Klein et al., 1989). Die Cortisol-Messungen erfolgen vor sowie 1 Stunde nach der ACTH-Applikation. Laut Freestone und Melrose (1995) kommt es bei gesunden Pferden zu einem 2-3fachen und bei cushingoiden Pferden zu einem 4fachen Anstieg der Cortisol-Konzentration im Plasma. Nach Beech (1999) und Dybdal et al. (1994) ist der ACTH-Stimulationstest kein sicheres diagnostisches Verfahren, da es bei gesunden und erkrankten Pferden zu einer ähnlich hohen Stimulation der Nebennierenrindenzellen hinsichtlich der Cortisol-Freisetzung kommen kann. Laut Freestone und Melrose (1995) ist die Interpretation der Testergebnisse schwierig, sobald die Cortisol-Basalwerte bei den betroffenen Pferden von vornherein erhöht sind. Mair et al. (1998) begründen den diagnostisch geringen Wert des Testes damit, dass die NNR beim den meisten cushingoiden Pferd durch das endogene ACTH bereits maximal stimuliert ist.

Kombinierter Dexamethason-Suppressions- und ACTH-Stimulationstest

Es werden 10 mg Dexamethason i.m. gespritzt. Die Blutprobenentnahme erfolgt vor sowie 3 Stunden nach der Dexamethason-Gabe. Danach werden 100 IE bzw. 1,0 mg synthetisches ACTH (Synacthen®, Cosyntropin®) i.v. verabreicht und 2 Stunden später wird noch einmal eine Blutprobe entnommen. Bei gesunden Pferden kommt es durch das Dexamethason zu einem Cortisol-Abfall von 27% ausgehend vom Basalwert und dann zu einem zweifachen Anstieg der Cortisol-Konzentration nach der ACTH-Gabe (Eiler et al., 1980). Für Beech (1999) sowie Freestone und Melrose (1995) ist dieser Test für die ECS-Diagnose nicht hilfreich, da häufig keine Unterschiede in den Cortisol-Plasmagehalten zwischen gesunden und erkrankten Tieren zu beobachten sind.

Glukose-Toleranztest

0,5 g/kg KGW Glukose in einer 50%igen Lösung wird intravenös injiziert, wodurch der Glukosegehalt bei gesunden Tieren nach 15 Minuten um 300% des Ausgangswertes steigt. Dadurch erhöht sich auch der Insulingehalt im Plasma, wodurch der Glukosewert innerhalb von einer Stunde wieder in den Normbereich zurückfällt. Die Blutentnahmen erfolgen vor sowie 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden nach der Glukose-Infusion. Bei cushingoiden Pferden bleibt die Glukose- und Insulin-Konzentration im Blut nahezu unbeeinflußt, das Glukose-Insulin-Verhältnis ist erniedrigt, was für ein sekretorisches Defizit auf die akute intravenöse Glukosezufuhr spricht (Beech, 1999 sowie Garcia und Beech, 1986). Aufgrund der geringen Anzahl beschriebener Ergebnisse ist jedoch laut Froin et al. (1998) keine sichere Interpretation möglich.

Insulin-Toleranztest

Im Gegensatz zum Diabetes mellitus bewirkt die Verabreichung von 0,05 IE/kg KGW kristallinen Insulin i.v. bei Pferden mit ECS keinen wesentlichen Abfall des Blutzuckerspiegels. Die Tiere sind insulinresistent. Die Blutproben für die Glukose-Messung werden vor der Insulin-Verabreichung sowie 15 min., 30 min., 1h, 2h und 4h nach der Insulin-Gabe entnommen. Gesunde Pferde reagieren mit einem Abfall des Glukose-Plasmagehaltes von 30-40% nach 15 Minuten und 60% nach 30 Minuten. Nach 2 Stunden befindet sich der Glukosewert schließlich wieder im Referenzbereich (Beech, 1999 und Mair et al., 1995).

Thyreotropin-releasing-hormone (TRH)-Stimulationstest

Die Blutproben für die Cortisol-Messung werden vor sowie 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten nach der Gabe von 1 mg TRH/Pferd i.v. entnommen. Durch TRH werden physiologischer Weise Thyronin (T₃), Thyroxin (T₄), Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH, Thyreotropin) und Prolactin freigesetzt. Bei Pferden mit ECS kommt es zudem zu einer ACTH-Ausschüttung der PI und einem damit verbundenen Cortisol-Anstieg im Plasma zwischen 15-90 Minuten post injectionem, welcher bis zu 1,5 Stunden erhöht bleibt (Mair et al., 1995 sowie Beech und Garcia, 1985). Nach Beech (1999), Froin et al. (1997) und Thompson et al. (1995) zeigen auch gesunde Pferde nach TRH-Gabe einen Cortisol-Anstieg (74 ± 47% vom Cortisol-Basalwert ausgehend), zwar nicht so gravierend wie bei erkrankten Pferde (116 ± 36% vom Cortisol-Basalwert ausgehend), aber ausreichend, um den Test für die Diagnostik unbrauchbar zu machen. Das Wirkungsprinzip von TRH auf die Cortisol-Ausschüttung ist ungeklärt. Hillyer et al. (1992) sehen eine Abhängigkeit des Cortisol-Anstiegs von dem Cortisol-Basalwert, d.h. umso höher der Cortisol-Basalwert ist, desto geringer ist der Cortisol-Anstieg und umgekehrt. Für eine genauere Interpretation des TRH-Stimulationstestes sind somit viele Basalwertwessungen vor der Stimulation notwendig, um die episodische Cortisol-Sekretion berücksichtigen zu können.

Corticoid-Kreatinin-Quotient im Urin

Hierbei wird das freie Corticoid im Verhältnis zum Kreatinin im Morgenurin vor und nach der Verabreichung von 0,1 mg/kg KGW Dexamethason (3x täglich) gemessen. Ein Quotient von > 10 x 10⁻⁶ vor und eine > 50%ige Quotientenreduktion nach der Dexamethason-Applikation spricht für das Vorliegen eines ECS (Seidel, 1994). Bei cushingoiden Pferden liegen die Corticoid-Konzentration und das Corticoid-Kreatinin-Verhältnis höher als bei gesunden Tieren. Da jedoch auch falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse gemessen werden können, ist diese Meßmethode sehr unzuverlässig (van der Kolk et al. 1994a, 1995a).

Cortisol-Konzentration im Speichel

Van der Kolk et al. (2001b) haben in ihrer Studie für die Cortisol-Messungen Speichelproben unter Anwendung des Dexamethason-Suppressionstest entnommen. Sie konnten einerseits keinen diurnalen Rhythmus des Speichel-Cortisols feststellen und andererseits keine eindeutigen Ergebnisse für die Diagnostik des ECS ermitteln. Demnach sind erst weitere Untersuchungen bezüglich dieser Methodik erforderlich.

Ventrodorsale Radiologie und Computertomographie

Weitere diagnostische Möglichkeiten sind die ventrodorsale Radiologie mit vorheriger Kontrastmittelgabe ins Blutgefäßsystem sowie die Computertomographie. Da diese Methoden mit einer Vollnarkose verbunden sind und lediglich eine vergrößerte und tumoröse Hypophyse erkennen lassen, jedoch keinen Aufschluß über eine sekretorische Dysfunktion geben, sind sie nicht praktikabel (Allen et al., 1998; Levy, 1993 und Heinrichs et al., 1990).

Autopsie

Die Autopsie erbringt durch die pathologischen Befunde in der PI der Hypophyse (makroskopisch deutlich vergrößerte Hypophyse mit einem gut abgegrenzten Adenom) und an den Nebennierenrinden (Hyperplasie) die definitive Diagnose ECS. Des weiteren findet man in einigen Fällen eine Hepatopathie, Hufrehe und Entzündungsherde in den verschiedenen Organen (Mair et al., 1995).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die meisten Testverfahren eine zum Teil nur geringe Aussagekraft haben, da es häufig zu einer Überlappung der Werte gesunder und erkrankter Tiere kommt. Unter Berücksichtigung der Pathophysiologie der Dysfunktion der PI stehen jedoch mit dem Dexamethason-Suppressionstest und der basalen ACTH-Bestimmung zwei geeignete Testverfahren für die Diagnostik zur Verfügung. Während mit der Bestimmung des ACTH-Basalwertes eine eindeutige Aussage über die Funktion der PI der Hypophyse gemacht werden kann, ist durch den Dexamethason-Suppressionstest zusätzlich eine Differenzierung zwischen dem hypophysären und dem, wenn auch selten vorkommenden, adrenalen

Hyperadrenocortizismus gegeben. Bei einer NNR-Neoplasie befindet sich der ACTH-Basalwert im Referenzbereich, wobei die Suppression des Cortisol-Wertes jedoch unzureichend ist (Froin et al., 1998, 1998a).

2.2.5. Differentialdiagnosen

Ein ähnliches äußeres Erscheinungsbild wie beim ECS kann bei *Unterernährung, Nierenerkrankungen, chronischer Debilitation, Kaustörungen* oder *Parasitenbefall* auftreten (Field und Wolf, 1988). Das lange Sommerfell, die Polyurie/Polydipsie und die Veränderungen im Blutbild und Urin weisen jedoch deutlich auf eine NNR-Überfunktion hin. In diesem Zusammenhang muß auch ein *iatrogener Hyperadrenocortizismus* bedacht werden, der jedoch durch den Vorbericht (medikamentelle Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden) abgeklärt werden kann.

Beim *Diabetes mellitus*, der auf einen Hypoinsulinismus basiert, treten ebenfalls Hyperglykämie, Polyurie/Polydipsie sowie Abmagerung auf. Hier erfolgt die Abgrenzung durch die Durchführung des Insulin-Toleranztestes. Ferner kann es auch durch ein *Phäochromozytom*, d.h. einer meist gutartigen Geschwulst des NNM, zu einer übermäßigen Adrenalin- und Noradrenalinausschüttung kommen, wodurch eine Hyperglykämie, eine Hypertonie und ein erhöhter Grundumsatz verursacht wird. Eine derartige Neoplasie ist jedoch beim Pferd selten und kann durch oben genannte endokrinologische Funktionstests vom ECS unterschieden werden (van der Kolk et al., 2001a).

Sofern Pferde rezidivierend und ohne ersichtlichen Grund (z.B. Überfütterung) an einer *Hufrehe* erkranken, muß ein eventuell vorliegendes ECS ebenfalls durch die endokrinologischen Funktionstests ausgeschlossen werden (Assmann et al., 1997).

2.2.6. Therapie

Beim Vorliegen einer hochgradig schmerzhaften Hufrehe oder fortschreitender Schwäche aufgrund der Muskelatrophie sollte die Euthanasie des Tieres in Erwägung gezogen werden. Ansonsten kommt es beim Pferd zum Einsatz sogenannter "Adrenostatika". Hierbei handelt es sich um die Dopamin-Agonisten Pergolid und Bromocriptin. Aufgrund der tonisch inhibitorischen dopaminergen Kontrolle der melanotropen und adenomatösen Zellen der PI bewirken diese Präparate eine Hemmung der pro-OLMC-Peptid-Synthese sowie -Sekretion und somit einen Therapieerfolg. Pergolid (Permax®, Parkotil®) wird initial in einer Tagesdosis von 0,5 mg/400-500 kg KGW täglich per os verabreicht, als Erhaltungsdosis werden 2-3 mg beim Pferd bzw. 1 mg beim Pony täglich angegeben. In empfohlener Dosierung treten keinerlei Nebenwirkungen auf (Beech, 1999). Pergolid besitzt gegenüber Bromocriptin eine bessere Verträglichkeit und eine höhere gastrointestinale Resorption, so dass geringere Dosen verwendet werden können (Froin et al., 1998). Bromocriptin (Pravidel®) wird in einer Dosierung von 0,02 mg/kg KGW täglich oral oder parenteral verabreicht. Durch eine höhere Dosierung können die Nebenwirkungen deutlich zunehmen.

Die Behandlungserfolge beider Arzneimittel werden schon innerhalb der ersten 4 Wochen sichtbar. Allerdings ist die Therapie sehr teuer und führt nicht zur Regression der PI-Neoplasie, weshalb eine lebenslange Behandlung angezeigt ist (Mair et al., 1995).

Cyproheptadin (Nuran®, Periactinol®), ein Serotonin-Antagonist, reduziert durch die Suppression der CRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus die ACTH-Ausschüttung aus der PD. Beim Menschen wird der Hyperadrenocortizismus fast ausschließlich durch Tumoren der PD ausgelöst, weshalb Cyproheptadin hier bevorzugt und mit großem Erfolg eingesetzt wird. Beim Pferd ist der Wirkungsmechanismus weitgehend ungeklärt, da die autonome ACTH-Produktion des PI-Adenoms wahrscheinlich unbeeinflußt bleibt (Froin et al., 1998). Die Wirksamkeit dieses Präparates wird in der Literatur bei der Behandlung von ECS sehr unterschiedlich bewertet. Mair et al. (1998) sprechen von einem 35%igen, Couëtil (1996) von einem 69%igen Therapieerfolg. Es wird nach Beech (1999) in der Dosierung von 0,13-0,26 mg/kg KGW/Tag per os verabreicht. Bei vorschriftsmäßiger Anwendung kommt es zu keinerlei Nebenwirkungen. Aufgrund der Wirksamkeit, des Fehlens von Nebenwirkungen und der geringen Kosten stellt Cyproheptadin für Couëtil (1996) eine vernünftige Alternative zum Pergolid in der Behandlung von ECS dar. Eine Besserung der klinischen Symptome ist jedoch erst nach 6-8 Wochen ersichtlich (Mair et al., 1998).

Das selektiv auf die NNR wirkende Adrenocorticolyticum *o,p'-DDD (ortho-para-Dichlordiphenyldichlorethan, Mitotane, Lysodren®)*, das insbesondere beim cushingoiden Hund mit großem Erfolg eingesetzt wird, ist beim Pferd ineffektiv (Mair et al., 1998 sowie Freestone und Melrose, 1995).

Die Begleiterscheinungen, insbesondere Infektionen der Lunge oder Haut, sollten durch die Gabe von Antibiotika unterstützend behandelt werden. Die Abheilung der Hufrehe kann nach Harman und Ward (2001) durch eine verbesserte Hufpflege und ein angepaßtes nutritives Management beschleunigt werden. Bei schmerzhaften Prozessen müssen allerdings Analgetika verabreicht werden. Der sekundäre Diabetes mellitus kann nach Mair et al. (1998) und Love (1993) durch die Gabe von Insulin behandelt werden, allerdings muß die Dosierung während der Behandlung mit Adrenostatika fortwährend angepaßt werden. Van der Kolk (1997) hingegen rät von einer Insulin-Behandlung ab, da aufgrund der Hyperinsulinämie und der verminderten Insulin-Empfindlichkeit der Gewebe das Risiko der Bildung von Anti-Insulin-Antikörpern besteht. Bei Hirsutismus wird das Scheren und je nach Jahreszeit Eindecken des Pferdes nahegelegt.

2.2.7. Prognose

Die Prognose ist dann ungünstig, wenn eine deutliche Hyperglykämie besteht. Ohne diese könnten die Tiere bei guter Ernährung und Vermeidung zusätzlicher Komplikationen noch mehrere Jahre leben und bedingt arbeitsfähig sein. Bei Makroadenomen der PI muß allerdings mit deren Expansion des Tumors ins Gehirn und dadurch bedingten zentralnervalen Störungen gerechnet werden.

2.3. Biologische und immmunologische Nachweisverfahren (experimentelle Studie)

2.3.1. ACTH-Bioassay

Mit diesem biologischen Nachweisverfahren kann die biologische Wirksamkeit von ACTH und ACTH-Fragmenten anhand der Cortisol-Biosynthese gemessen werden. Nach Rohde (1994) ist in der Endokrinologie der Bioassay auch heute noch, trotz seines großen Aufwandes, unverzichtbar zur Definition und Isolierung unbekannter Hormone, zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen und zur Entwicklung von Hormonanalogen und -antagonisten. Prinzipiell kann jede biologische Aktivität, die eine hormonal aktive Substanz hervorruft, mit Hilfe eines Bioassays ermittelt werden, somit auch die biologische Aktivität von ACTH bezüglich der Cortisol-Ausschüttung aus den Nebennierenrindenzellen.

Um die biologische Wirkung eines Hormons in einem Bioassay verwenden zu können, müssen jedoch bestimmte Bedingungen erfüllt werden:

- Es muß eine eindeutige Beziehung zwischen Hormon und biologischer Wirkung bestehen.
- Die biologische Reaktion muß dosisabhängig sein.
- Das Testmaterial muß homogen sein.

Bioassays werden, wie in Abbildung 7 dargestellt, durch eine Dosis-Wirkungs-Kurve (ACTH-Eichkurve) quantifiziert. Dazu wird die biologische ACTH-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Diese Kurve zeigt einen S-förmigen (sigmoiden) Verlauf und wird in vier Parameter unterteilt:

- A. Die minimale Aktivität.
- B. Die Konzentration, bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht werden.
- C. Die Steigerung der Kurve im 50%-Wert
- D. Die maximale Aktivität

Biologische Aktivität

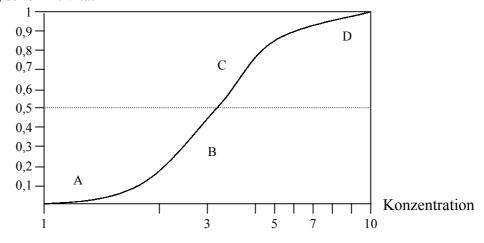


Abb. 7: Die sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve des Bioassays (modifiziert nach Rohde, 1994)

2.3.2. Analysemethoden

Immunoassays sind Meßverfahren, bei denen Antikörper als spezifisch bindendes Agens für Proteine und andere komplexe Biomoleküle benutzt werden. Aufgrund der außergewöhnlichen Affinität, Spezifität und Vielzahl von Antikörper-Antigen-Bindungsreaktionen werden Immunoassays für Routineanalysen und zum Zwecke der Forschung überall im Bereich der biologischen und medizinischen Wissenschaften angewandt.

Der gebräuchlichste Immunoassay ist der Radioimmunoassay (RIA). Er wird insbesondere für die Messung von kleineren Analyten, wie beispielsweise von Steroidhormonen genutzt. Das Prinzip des RIAs beruht auf der kompetetive Hemmung zwischen dem radioaktiv markierten Antigen und dem nicht markierten Hormon im Plasma, sonstigen Körperflüssigkeiten oder auch Standardlösung (zur Erstellung einer Standardkurve) an der Bindungsstelle (Epitop) eines im Unterschuß vorliegenden spezifischen Antikörpers. Aufgrund dieser Hemmung, wird der RIA auch "kompetetive Analyse" genannt. Die später im Analysegerät gemessene Radioaktivität steht im umgekehrten Verhältnis zur eigentlichen Hormonkonzentration im Untersuchungsmaterial (Gosling, 2000; Singh et al., 1997 sowie Orth, 1979).

Der Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay wird als automatisiertes System (IMMULITE®, Firma Biermann der DPC – Diagnostic Products Corporation, Bad Nauheim) für die Messung von Hormonen im Plasma benutzt. Die Festphase wird von einem spezifischen, monoklonalen Antikörper gebildet. Der Analyt wird an diesen Festphasenantikörper gebunden, woraufhin ein zweiter, mit einem Enzym markierter, polyklonaler Antikörper an den Analyten bindet. Es entsteht ein sog. "Sandwichkomplex". Ungebundene Komponenten werden anschließend durch Waschung entfernt. Das zugegebene Chemilumineszenz-Substrat wird vom gebundenen Enzym umgesetzt und löst dadurch eine Lichtemission aus, die der Analyten-Konzentration im Untersuchungsmaterial direkt proportional ist (Babson, 1991).

3. Material und Methoden

3.1. Material und Tiere

Die biologische Aktivität des ACTHs wurde mit Hilfe eines im Rahmen dieser Studie entwickelten ACTH-Bioassays untersucht. Die dafür verwendeten Nebennierenrindenzellen stammten von Schlachtschweinen des Schlachthofes Hannover.

Für die Ermittlung des biologisch-immunreaktiven Verhältnisses von endogenem ACTH (ACTH-BI-Ratio) wurden EDTA-Plasmaproben verwendet. Das Untersuchungsgut stammte von zu diagnostischen Zwecken eingesandten Blutproben an ECS erkrankter sowie bereits therapierter Pferde und von gesammelten Blutproben gesunder Tiere. Aus jeder Gruppe wurden jeweils 5 Plasmaproben für den experimentellen Teil dieser Arbeit verwendet.

Zusätzlich wurden das Serum eines cushingoiden Pferdes als Kontrollserum (KS) für den Bioassay und das Plasma eines gesunden Pferdes im Rahmen einer Stabilitätsstudie (PS) mitgemessen. Bei beiden Pferden wurden die Blutproben nach Reinigung und Desinfektion der Punktionsstelle aus der Vena jugularis externa entnommen. Das Blut wurde in einem Serum- bzw. EDTA-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden beide Proberöhrchen bei Raumtemperatur und 3000 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert und danach der Serum- bzw. Plasmaüberstand abpipettiert. Bei den Proben wurden unmittelbar durch den Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay der ACTH- und Cortisol-Gehalt ermittelt.

Das Serum wurde danach als Kontrollserum bis zur Verwendung im Bioassay aliquotiert bei -20°C eingefroren. Das Plasma, welches der Stabilitätsstudie diente, wurde ebenfalls in Aliquote aufgeteilt. Um zu ermitteln, ob Unterschiede in der Cortisol-Sekretion der Nebennierenrindenzellen aufgrund des ACTH-Zerfalls zu beobachten sind, wurden diese jedoch bei verschiedenen Lagerungszeiten und -temperaturen aufbewahrt:

- Natives Plasma, unmittelbar nach der Blutentnahme (0-Wert).
- 1, 2 und 3 Tage Lagerung bei 20°C.
- 1, 2 und 3 Tage Lagerung bei 4°C.

Nach der Bestimmung der ACTH- und Cortisolwerte wurden die Aliquote dann bis zur Verwendung im Bioassay bei -20°C eingefroren.

Bei den an ECS erkrankten (Pferd I-V sowie KS) sowie bereits behandelten Pferden (Pferd A-E) handelte es sich um Patienten umliegender Pferdekliniken, die unabhängig von Rasse, Geschlecht und Alter zusammengestellt wurden. Zur Auswahl kamen ausschließlich Pferde, die nicht mit Glucocorticoiden vorbehandelt waren und bei denen eindeutig ECS diagnostiziert wurde.

Die Tiere wiesen die klinische ECS-Symptomatik (u.a. Hirsutismus, Hufrehe, Muskelatrophie, Abmagerung, Senkrücken, supraorbitale Fettpolster und Apathie) auf und/oder der Cortisolgehalt im Plasma ließ sich durch den Dexamethason-Suppressionstest nicht ausreichend supprimieren. Der Test wurde nach dem von Froin et al. (1997, 1998) und Dybdal et al. (1994) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Es wurden 40 µg Dexamethason / kg KGW i.m. injiziert. Die Blutentnahmen für die Cortisol-Messungen erfolgte unmittelbar vor der

Dexamethason-Gabe um 17.00 Uhr (0-Wert) und nach der Dexamethason-Applikation um 8 Uhr (post 15h) und 12 Uhr (post 19h) des folgenden Tages. Alle erkrankten Pferde wiesen außerdem einen erhöhten Plasma-ACTH-Basalgehalt (68,8-471,0 pg/ml Plasma) auf. Die Cortisol-Basalwerte lagen hingegen im Referenzbereich (32,0-50,0 ng/ml Plasma).

Die mit 0,01 mg Pergolidmesilat (Parkotil®) / kg KGW per os täglich behandelten Pferde zeigten im Verlaufe der Therapie eine deutliche Besserung der klinischen Symptome. Drei der therapierten Pferde (Pferd A, B und C) wiesen zwar noch erhöhte ACTH-Basalwerte auf, aber insgesamt konnten die ACTH-Plasmaspiegel, im Vergleich mit den Werten vor Behandlungsbeginn, durch die Therapie gesenkt werden (14,3-182,0 pg/ml Plasma). Auch hier befanden sich die Cortisol-Basalwerte im Normbereich (29,0-57,0 ng/ml Plasma).

Die gesunden Pferde (Pferd 1-5 sowie PS) stammten aus dem Patientengut der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Sie wurden ebenfalls unabhängig von Rasse, Geschlecht und Alter ausgesucht. Alle Tiere waren im Bezug auf das ECS klinisch unauffällig. Zudem befanden sich bei allen Pferden der ACTH-Plasmagehalt (5,6-28,9 pg/ml Plasma) sowie der Cortisol-Basalwert (21,0-40,0 ng/ml Plasma) im Referenzbereich.

3.2. ACTH-Bioassay

Für die Entwicklung des ACTH-Bioassays mit Nebennierenrindenzellen vom Schwein diente als Vorlage das Protokoll von Robertson und Bidey (1990), die einen Bioassay mit Nebennierenrindenzellen vom Meerschweinchen durchführten. Dieses Protokoll mußte wegen der unterschiedlichen Anforderungen der Zellen an ihr Umgebungsmilieu und der Praktikabilität im hiesigen Labor der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover weitestgehend modifiziert werden.

3.2.1. Herstellung der Lösungen

Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS-Puffer)

Zu 500 ml Aqua dest. wurden 4,09 g Natriumchlorid (NaCl; Merck: 106404) sowie 0,69 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄; Merck: 6348) gegeben. Das Phosphat diente hierbei als Puffer. Der PBS-Puffer wird mit 2M Natronlauge (NaOH; Merck: 6498) auf pH 7,2-7,4 eingestellt und danach kühl und verschlossen gelagert (bis zu einer Woche haltbar).

RPMI-1640-Medium

Zu 500 ml Aqua dest. wurden 5,21 g RPMI-1640-Trockenmedium (Biochrom AG, Seromed[®]: T 121-01), 3,0 g Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure; Biochrom AG, Seromed[®]: L 1603) und 0,5 g Natriumbicarbonat (NaHCO₃; Biochrom AG, Seromed[®]: L 1703) gegeben. Das RPMI-1640-Trockenmedium enthält neben verschiedenen Salzen, Aminosäuren und Vitaminen als Hauptbestandteile D-Glukose und L-Glutamin. Das RPMI-1640-Medium wurde mit 2M Natronlauge (NaOH; Merck: 6498) auf pH 7,3 eingestellt und danach kühl und verschlossen gelagert (bis zu zwei Tage haltbar).

RPMI-1640-Medium + Kollagenase

Zu 100 ml RPMI-1640-Medium wurden 0,2% bzw. 0,2 g Kollagenase (Typ CLS, 187 U/mg; Biochrom AG, Seromed[®]: CI-22) gegeben. Die Kollagenase löst die Zellverbindungen des Nebennierenrindengewebes auf.

Kulturmedium A

Zu 50 ml RPMI-1640-Medium wurden 0,08% bzw. 0,04 g Calciumchlorid (CaCl₂; Merck: 102083), 0,5% bzw. 0,25 g Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V, lyophilisiertes Pulver; Paesel + Lorei GmbH & Co.: 102565) und 0,6% bzw. 0,3 ml Fötales Bovines Serum (FBS; Biochrom AG, Seromed[®]: S-0115) gegeben.

Kulturmedium B

Zu 100 ml RPMI-1640-Medium wurden 0,08% bzw. 0,08 g Calciumchlorid (CaCl₂; Merck: 102083), 0,5% bzw. 0,5 g Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V, lyophilisiertes Pulver; Paesel + Lorei GmbH & Co.: 102565) und 0,6% bzw. 0,6 ml Fötales Bovines Serum (FBS; Biochrom AG, Seromed[®]: S-0115) gegeben.

EDTA-Puffer

Zu 1 Liter Aqua dest. wurden 3,72 g Titriplex[®] III (EDTA; Merck: 8418) und 1,37 g Natrium-dihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄; Merck: 6348) gegeben. Der EDTA-Puffer wurde mit 2M Natronlauge (NaOH; Merck: 6498) auf pH 7,2 eingestellt und danach kühl und verschlossen gelagert (bis zu einem Monat haltbar).

3.2.2. Präparation der Nebennieren vom Schwein

Für die ACTH-Bioassays wurden jeweils 2 Nebennieren benötigt, welche von jungen Schlachtschweinen entnommen und vom umgebenden Fett freipräpariert wurden. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Nebennieren in einen Probebehälter mit PBS-Puffer verbracht und während des Transportes zum Labor in einem Kühlkontainer auf Eis gelagert.

Im Labor wurden die Nebennieren vom restlichen Fett, der Kapsel und dem Nebennierenmark befreit und in eine mit RPMI-1640-Medium gefüllte Petrischale gelegt, damit sie während der Präparation nicht austrockneten. Dort wurden sie in ca. 1 x 1 mm große Gewebsstücke zerkleinert. Bei diesem Vorgang wurde auf einen möglichst schonenden Umgang mit den Zellen geachtet, das Gewebe wurde behutsam mit Skalpell und Pinzette klein geschnitten.

Die Gewebsstücke wurden mit jeweils ca. 10 ml RPMI-1640-Medium dreimal gewaschen und danach in einen, im Institut selbst angefertigten, Gewebszerkleinerer (Abbildung 8) verbracht. Je Ansatz wurden ca. 20 ml RPMI-1640-Medium + Kollagenase zu den Zellen geben. Der Gewebszerkleinerer wurde in eine mit 37°C warmen Wasser gefüllte Plastikschale gestellt, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Apparatur wurde dann für 10 Minuten bei 60-100 U/min. auf einen Magnetrührer gestellt, der sich in einem 37°C warmen Inkubator befand.

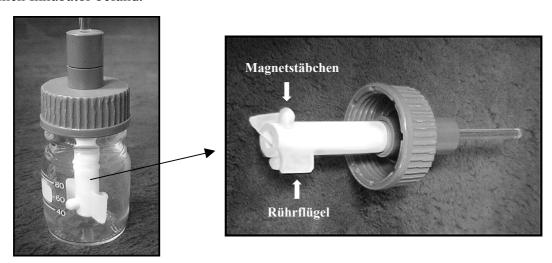


Abb. 8: Gewebszerkleinerer (angefertigt in der Tierärztlichen Hochschule Hannover)

Anschließend wurde die Zellsuspension für 5-10 Minuten stehengelassen, damit sich die Zellverbände absetzen konnten. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Danach wurden die Zellen in ca. 20 ml RPMI-1640-Medium + Kollagenase resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 25 Minuten unter den oben genannten Bedingungen erneut in den Inkubator gestellt. Wieder wurde die Suspension für 5-10 Minuten stehengelassen und auch der zweite Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei der dritte und vierte Überstand dieses Mal in 50 ml konischen Polypropylen-Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde.

Jeweils 25 μl dieser beiden Überstände wurden mit 25 μl Trypan-Blau (1:9 verdünnte Lösung; Biochrom AG, Seromed[®]: L 6323) angefärbt und mittels Neubauer-Zählkammer (bestehend aus 4 Großquadraten mit jeweils 16 Kleinquadraten) unter dem Mikroskop nach lebenden Fasciculata-Zellen abgesucht. Lebende Zellen blieben ungefärbt. Sie besaßen eine dunkle Zellwand und eine deutlich zu erkennende Lipidgranula.

Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen von zwei sich gegenüberliegenden Großquadraten ausgezählt und die Zellzahlen beider Quadrate addiert. Dabei wurde jedes einzelne zugehörige Kleinquadrat nach der "L-Regel" abgesucht, d.h. Zellen, die sich auf einer Trennlinie befanden, wurden zu dem Kleinquadrat gezählt, auf dessen linken oder unteren Rand sie lagen. Die Zellkonzentration wurde wie folgt angegeben:

Gesamtzellzahl x 10⁶ Zellen / ml Zellsuspension 100

Sofern die einzelnen Überstände eine ausreichende Zellqualität und -zahl (mindestens 40 Zellen / 2 Großquadrate) aufwiesen, konnten sie zusammengeschüttet und zur Weiterverarbeitung verwendet werden. Die zusammengeschütteten Überstände wurden für 5 Minuten bei 20°C und 1000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mittels Pasteurpipette abgesogen und verworfen. Die Zellen wurden sodann in ca. 5 ml frischem Kulturmedium A resuspendiert. Für die Resuspension und gleichzeitige Aufwirbelung des abgesetzten Zellpfropfens wurde eine Pasteurpipette verwendet, deren Spitze vorher abgebrochen wurde und die scharfen Ränder unter Hitzeeinwirkung abgerundet wurden. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in ca. 40 ml Medium A aufgenommen.

Für die Prä-Inkubation (primäre Cortisolausschüttung) wurde die Zellsuspension in eine Petrischale umgeschüttet und diese mit Deckel in eine Plastikschale gestellt. Beides wurde abschließend in ein Schüttelwasserbad, welches eine hohe Luftfeuchtigkeit gewährleistete, für 1 Stunde bei 37°C verbracht. Die Schüttelbewegung des Wasserbades betrug 20%.

3.2.3. ACTH-Bioassay

Die prä-inkubierte Zellsuspension wurde wieder in ein 50 ml konisches Polypropylen-Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 5 Minuten bei 20°C und 1000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig abgesogen und verworfen. Die Resuspension der Zellen erfolgte in 30 ml frisch angesetztem Kulturmedium B. Anschließend wurde die Suspension durch Glaswolle, die sich locker gestopft und mit Kulturmedium B durchtränkt in einem Glastrichter befand, filtriert. Weitere 10 ml Kulturmedium B wurden zum Nachspülen verwendet, so dass das Endvolumen der Zellsuspension 40 ml betrug.

25 μl der filtrierten Zellsuspension wurden mit 25 μl Trypan-Blau (1:9 verdünnte Lösung; Biochrom AG, Seromed[®]: L 6323) angefärbt und abermals mittels Neubauer-Zählkammer

unter dem Mikroskop nach lebenden Fasziculata-Zellen abgesucht. Die Zellsuspension wurde schließlich auf 1,2 x 10⁶ Zellen / ml Medium konzentriert, d.h. die Suspension wurde 5 Minuten bei 20°C und 1000 U/min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die entsprechend errechnete Menge an Kulturmedium B aufgefüllt.

Je 100 µl der Zellsuspension wurden in nummerierte Glasröhrchen pipettiert, wobei zwischen den Pipettierschritten die Suspension immer wieder auf dem Schüttler (Vibrax®) aufgeschüttelt wurde. Danach wurden im Doppelansatz je 100 µl folgender Proben zur Zellsuspension zugegeben:

- ACTH-Eichkurve.
- Kontrollserum und Kulturmedium B.
- Die zu untersuchenden, größtenteils 1:3 verdünnten Plasma- und Serumproben.

Die Inkubation der Zellsuspension erfolgte im Schüttelwasserbad für 90 Minuten bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit. Die Schüttelbewegungen des Wasserbades betrug 20%. Nach der Inkubation wurden die Proben in den Glasröhrchen mit 4°C kaltem 10 mM EDTA-Puffer 1:9 verdünnt (200 µl Probe + 1800 µl Puffer). Die Proben wurden mit Alufolie abgedeckt und bei -20°C eingefroren. Die Cortisolgehalte der Bioassay-Doppelproben wurden später dann mit dem Cortisol-RIA (siehe Kapitel 3.3.1.) gemessen.

3.2.4. ACTH-Verdünnungsreihe zur Erstellung der ACTH-Eichkurve

Für die Herstellung der ACTH-Verdünnungsreihe zur Erstellung der ACTH-Eichkurve wurde 0,25 mg Synacthen[®] / 1 ml Lösung (Novartis Pharma) und Kulturmedium B verwendet (Tabelle 5):

Verdünnungstufe	Herstellung	ACTH-Gehalt/ml
Ausgar	ngslösung (A)	0,25 mg
1. Verdünnung (B)	10 μl A + 990 μl Medium B	2500000 pg
2. Verdünnung (C)	10 μl B + 990 μl Medium B	25000 pg
3. Verdünnung (D)	100 μl C + 900 μl Medium B	2500 pg
4. Verdünnung (E)	500 μl D + 500 μl Medium B	1250 pg
5. Verdünnung (F)	100 μl D + 900 μl Medium B	250 pg
6. Verdünnung (G)	500 μl F + 500 μl Medium B	125 pg
7. Verdünnung (H)	100 μl F + 900 μl Medium B	25 pg
8. Verdünnung (I)	500 μl H + 500 μl Medium B	12,5 pg
9. Verdünnung (J)	100 μl H + 900 μl Medium B	2,5 pg

Tab. 5: Herstellung der ACTH-Verdünnungsreihe

Die ACTH-Eichkurve wird aus dem 0-Wert (Zellsuspension ohne ACTH-Zusatz) und den Verdünnungen J (2,5 pg/ml Medium), I (12,5 pg/ml Medium), H (25 pg/ml Medium), G (125 pg/ml Medium), F (250 pg/ml Medium) und E (1250 pg/ml Medium) gebildet.

3.2.5. Kontrollproben und zu untersuchende Plasmaproben

Als Kontrollserum wurde in jedem Bioassay das Serum eines cushingoiden Pferdes eingesetzt und als Blank-Probe wurde das Kulturmedium B (ohne Zellen und ACTH) mitgemessen.

Die zu untersuchenden Plasmaproben stammen von jeweils 5 an ECS erkrankten, bereits therapierten und gesunden Pferde. Bis auf die drei Plasmaproben der erkrankten Pferde II, IV und V mußten die Proben vor ihrem Einsatz im Bioassay 1:3 verdünnt werden (25 μ l Plasma + 75 μ l EDTA-Puffer), da ihre Werte sonst außerhalb der Eichkurve lagen.

Im Rahmen einer Stabilitätsstudie wurde zudem das Plasma eines weiteren gesunden Pferdes (PS) verwendet, indem Aliquote mit unterschiedlicher Lagerungszeit und -temperatur auf ihre biologische Aktivität überprüft wurden. Die Aliquote wurde ebenfalls kurz vor ihrem Einsatz im Bioassay 1:3 verdünnt (25µl Plasma + 75 µl EDTA-Puffer).

3.3. Analysemethoden

3.3.1. Cortisol-Radioimmunoassay (Cortisol-RIA)

Für die Cortisol-Messung der Bioassay-Proben sowie zum Vergleich der entsprechenden nativen Blutproben wurde der von Klein et al. (1989) beschriebene Cortisol-RIA verwendet.

3.3.1.1. Herstellung der Lösungen

EDTA-Puffer

Zu 1 Liter Aqua dest. wurden 3,72 g Titriplex® III (EDTA; Merck: 8418) und 1,37 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄; Merck: 6348) gegeben. Der EDTA-Puffer wurde mit 2M Natronlauge (NaOH; Merck: 6498) auf pH 7,2 eingestellt und danach kühl und verschlossen gelagert (bis zu einem Monat haltbar).

EDTA-Puffer + Lysozym

Zur benötigten Menge EDTA-Puffer wurde 0,1% Lysozym (Boehringer: 107255) gegeben.

Natriumchlorid-Lösung

Zu 500ml Aqua dest. wurden 4,5 g Natriumchlorid-Pulver (NaCl; Riedel-de Haën AG: 31434) zugegeben. Die Lösung wurde danach kühl und verschlossen gelagert.

Aktivkohle-Suspension

Zu 100 ml EDTA-Puffer wurden 0,65 g Aktivkohle (Dextran coated charcoal; Sigma:C-6197) gegeben. Die Suspension wurde kühl, dunkel und verschlossen gelagert (zwei Tage haltbar).

Szintillator-Gemisch

Zu 400 ml Szintillatorflüssigkeit (Beckmann Instruments: Ready Organic Cocktail) wurden 140 ml Triton-X-100 (Serva: 37240) und 210 ml Ethanol (EtOH; Merck: 983) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur dunkel und verschlossen gelagert.

3.3.1.2. Durchführung

Die Bioassay-Proben wurden nach dem Auftauen auf dem Schüttler (Vibrax[®]) geschüttelt und für 10 Minuten bei 20°C und 6000 U/min. zentrifugiert, damit der zu messende Überstand frei von Zellen ist. Dann wurden 10 μl des Überstandes im Doppelansatz mit 90 μl Natrium-chlorid-Lösung verdünnt. Für die Extraktion wurden die Proben mit 1,5 ml Ethylacetat (Merck: 868) versetzt und für 30 Minuten auf dem Schüttler (Vibrax[®]) geschüttelt.

Anschließend wurden die abgedeckten Proben bei -20°C eingefroren. Die nicht gefrorene organische, obere Phase (Ethylacetat mit dem extrahiertem Cortisol) wurde dekantiert und in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Trockenrückstand wurde in 100 µl EDTA-Puffer + Lysozym aufgenommen und mit 100 µl Antiserum (Anti-Cortisol-3-[CMO-]BSA aus Kaninchen, Endverdünnung im RIA 1:9000) und 100 µl ³H-Cortisol (10 nCi [1,2,6,7-³H]-Cortisol, 80,4 Ci/mmol; DuPont de Nemours: NET-396) für 18 Stunden bei 4°C inkubiert.

Freies Hormon wurde während einer Reaktionszeit von 10 Minuten mit 500 µl gekühlter Aktivkohle-Suspension (2 mg Dextran coated charcoal in EDTA-Puffer) abgetrennt. Der für 10 Minuten bei 4°C und 3000 U/min. abzentrifugierte antikörpergebundene Hormon-Überstand wurde in Pico-vails dekantiert und mit 4 ml Szintillator-Gemisch versetzt.

Anschließend wurde die Radioaktivität der Proben im Flüssigszintillationszähler (β-Counter; LKB 1209, Pharmacia Freiburg) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der RiaCalc Software (LKB). Die untere Nachweisgrenze betrug 0,5 ng/ml und der Intra- und Interassay Variationskoeffizient lagen bei 9,2% bzw. 10,9% (Froin et al., 1998 und Klein et al., 1989).

Die Spezifität des Antiserums ist in Tabelle 6 aufgelistet:

Cortisol	100 %
Cortison	71 %
11-Desoxycortisol	39 %
Corticosteron	5 %
17 α-Hydroxyprogesteron	1,3 %
11-Desoxycorticosteron	0,6 %
Progesteron	0,2 %
Aldosteron	0,04 %
Testosteron	0,03 %
Andostendion	0,03 %
Pregnenolon	0,03 %
Östradiol	< 0,01 %
Östron	< 0,01 %

Tab. 6: Kreuzreaktion des Cortisol-Antikörpers im RIA (nach Klein et al., 1989)

3.3.1.3. Herstellung der Standardlösung zur Erstellung der Cortisol-Eichkurve

Für die Herstellung der Standardlösung wurde Cortisol (Merck: 24608), Ethanol (EtOH; Merck: 983) und EDTA-Puffer + Lysozym verwendet.

Lösung I:	1 mg Cortisol/10 ml EtOH,	d.h. 1 μg Cortisol/10 μl EtOH
Lösung II:	100 ng Cortisol/100 μl EtOH,	d.h. 100 µl Lösung I/10 ml EtOH
Lösung III:	800 pg Cortisol/100 µl Puffer,	d.h. 8 µl Lösung II/1 ml Puffer

Die Lösung III wurde für die Cortisol-Eichkurve jeweils 1:1 weiterverdünnt, so dass die Verdünnungsstufen 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 pg/100 μl Puffer entstanden.

3.3.1.4. Verdünnung der nativen Serum- und Plasmaproben

Für einen präziseren Vergleich der Cortisol-Werte mußten die nativen Serum- und Plasmaproben entprechend der Bioassay-Proben vor der Cortisol-Messung verdünnt werden. Im
Bioassay wurden 100 μl Plasma bzw. Serum mit 100 μl Zellsuspension 1:1 verdünnt. Am
Ende des Bioassays wurden diese Proben noch einmal mit EDTA-Puffer 1:9 verdünnt.
Demzufolge wurden das native Kontrollserum und die drei nativen Plasmaproben der
erkrankten Pferde II, IV und V vor der Cortisol-Messung 1:19 verdünnt (10 μl Serum bzw.
Plasma + 190 μl EDTA-Puffer). Die übrigen Plasmaproben mußten vor Einsatz im Bioassay
zusätzlich 1:3 verdünnt werden, damit ihre Werte innerhalb der Eichkurve zu liegen kamen.
Demzufolge wurden die entsprechenden nativen Plasmaproben vor der Cortisol-Messung
1:79 verdünnt (10 μl Plasma + 790 μl EDTA-Puffer).

3.3.2. Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay (IMMULITE®)

Für die Bestimmung des immunreaktiven ACTHs und des Cortisol-Basalwertes der nativen Blutproben wurde ein Analyseautomat (IMMULITE® des Unternehmens Biermann der DPC – Diagnostic Products Corporation, Bad Nauheim) verwendet.

Dabei handelte es sich bei der ACTH-Messung um einen Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay, der gegen humanes ACTH gerichtete Antiseren enthält. Nach entsprechender Validierung des Testsystems für das Pferd, konnte dieser Assay auch für die Messung von equinem ACTH eingesetzt werden. Als Festphase wurde eine mit spezifischen, monoklonalen ACTH-Antikörpern von der Maus beschichtete Polystyrolkugel verwendet. ACTH aus der Blutprobe wurde während einer 30-minütigen Inkubation an diesen Festphasenantikörper gebunden. In der darauffolgenden 30-minütigen Inkubation band sich ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase markierter, polyklonaler Antikörper vom Kaninchen an das gebundene ACTH. Es entstand ein sog. "Sandwichkomplex". Ungebundene Komponenten wurden anschließend mittels einer speziellen Zentrifugal-Waschtechnik entfernt. Zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat wurde vom gebundenen Enzym umgesetzt und löste dadurch eine Lichtemission aus, die der ACTH-Konzentration in den Proben direkt proportional war (DPC Biermann GmbH, 2000).

Der IMMULITE[®]-ACTH-Assay ist hochspezifisch für intaktes ACTH₁₋₃₉ mit vernachlässigbar niedriger Kreuzreaktivität zu anderen im Serum vorkommenden ACTH-Fragmenten (Tabelle 7):

ACTH-Fragmente	Kreuzreaktivität (%)
ACTH (1-18)	0,003
ACTH (1-24)	0,01-0,05
ACTH (18-39)	13-15
ACTH (22-39)	-
Alpha MSH /	
ACTH (1-13)	-

Tab. 7: Spezifität des Antiserums zu ACTH-Fragmenten (nach DPC Biermann GmbH, 2000)

Die Cortisol-Messung wurde mit einem Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay durchgeführt. Als Festphase wurde eine mit spezifischen polyklonalen Cortisol-Antikörpern vom Kaninchen berschichtete Polystyrolkugel verwendet. Cortisol aus den Blutproben und mit alkalischer Phosphatase markiertes Cortisol konkurrierten während einer 30-minütigen Inkubation um die limitierte Zahl der Bindungsstellen dieser Antikörper. Ungebundene Komponenten wurden anschließend mittels einer speziellen Zentrifugal-Waschtechnik entfernt. Zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat wurde vom gebundenen Enzym umgesetzt. Die dabei ausgelöste Lichtemission war der Cortisol-Konzentration in den Proben umgekehrt proportional (DPC Biermann GmbH, 2000).

Die Spezifität des Antiserums für andere im Blut vorkommende Hormone ist in Tabelle 8 aufgelistet:

Hormone	Kreuzreaktivität (%)
Aldosteron	-
Corticosteron	8,6
Cortison	-
11-Desoxycorticosteron	-
11-Desoxycortisol	-
21-Desoxycortison	-
Dexamethason	-
Östradiol	-
Östron	-
Fludrocortison	0,20
17 α-Hydroxyprogesteron	-
Methotrexat	-
Prednisolon	49
Prednison	5,9
Pregnenolon	-
Progesteron	-
Spironolacton	-
Tetrahydrocortisol	0,9
Tetrahydrocortison	-

Tab. 8: Kreuzreaktion des Cortisol-Antikörpers im IMMULITE® (nach DPC Biermann GmbH, 2000)

Die ACTH- und Cortisol-IMMULITE $^{\text{@}}$ -Assays wiesen folgende Qualitätskriterien auf (Tabelle 9):

Howmon	Voteles Nu	Nachwe	isgrenze	Variationsko	effizient (%)
Hormon	Katalog-Nr.	untere	Obere	Intraassay-	Interassay-
ACTH	LAC1	5 pg/ml	1250 pg/ml	3,1-9,6	5,1-9,4
Cortisol	LKCO1	2 ng/ml	500 ng/ml	6,8-9,0	9,9-10,3

Tab. 9: Qualitätskriterien der ACTH- und Cortisol-IMMULITE®-Assays (nach Brüns, 2001)

Nach der Validierung des Testsystems für das Pferd ergab sich ein Intraassay-Variationskoeffizient zwischen 3,9-13,5% (Froin, 1998b). 4. Ergebnisse

4.1. ACTH-Bioassay

4.1.1. Entwicklung des Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen

Für die Entwicklung des Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen diente als Vorlage das Protokoll von Robertson und Bidey (1990) über einen Bioassay mit Nebennierenrindenzellen vom Meerschweinchen, welches jedoch in vielen Bereichen abgeändert werden mußte.

Die Nebennierenrindenzellen von Sauen, die erst im adulten Alter geschlachtet werden, wiesen unter dem Mikroskop eine schlechte Qualität auf, was sich in einer deutlich herabgesetzten Cortisol-Ausschüttung der Zellen bemerkbar machte.

In den ersten Versuchen wurden die Zellen der Gewebsstücke in einem Becherglas mit Magnetstäbehen auf einem Magnetrührer unter Zugabe von RPMI-1640-Medium + 0,2% Kollagenase vereinzelt. Bei der anschließenden mikroskopischen Untersuchung waren jedoch neben vielen Zelltrümmern kaum noch lebende Zellen zu finden und wenn, wiesen diese stark zerklüftete Zellränder auf. Folglich wirkten zu hohe mechanische Kräfte auf die Zellen ein.

Des weiteren wurden, wie in dem Protokoll von Robertson und Bidey (1990) beschrieben, die Zellen während der Inkubation mit 100%igem Sauerstoff im "Flush on"-Verfahren begast. Diese Vorgehensweise wirkte sich jedoch schädigend auf die Zellen aus.

Anfänglich enthielten die Kulturmedien A und B als Oxidationsschutz Vitamin C, welches in dem Protokoll von Robertson und Bidey (1990) empfohlen wird. Für die Meerschweinchen-Zellkultur ist Vitamin C zur Erhaltung der Zellen notwendig, dies gilt jedoch nicht für die Zellen vom Schwein. Aufgrund dessen wurde es durch Fötales Bovines Serum (FBS) ersetzt.

Die nach der mikroskopischen Begutachtung zusammengeschütteten Überstände wurden nach der Zentrifugation in Kulturmedium A resuspendiert. Für die Resuspension und gleichzeitige Aufwirbelung des abgesetzten Zellpfropfens wurde erst eine herkömmliche Pasteurpipette verwendet. Durch den kleinen Durchmesser der Pipettenspitze wurden die Zellen jedoch stark geschädigt. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die Spitze vorher abgebrochen und die scharfen Ränder unter Hitzeeinwirkung abgerundet. Durch den so entstandenen größeren Durchmesser der Pipettenspitze wurden die Zellen weniger mechanisch belastet.

Die prä-inkubierte Zellsuspension wurde durch einen Glastrichter mit Glaswolle filtriert. In Vorversuchen, in denen die Zellsuspension nicht filtriert wurde, kam es beim Pipettieren der Suspension in die Glasröhrchen aufgrund vorhandener Gewebsreste zu Verlegungen der Pipettenspitzen und folglich zu einer ungenauen Verteilung der Probemengen sowie Zellkonzentrationen. Dies führte zu unterschiedlichen Cortisol-Gehalten der als Doppelprobe im Bioassay eingesetzten Proben. Des weiteren verursachte eine mehrmalige Filtration sowie eine zu fest gestopfte und trocken in den Glastrichter eingelegte Glaswolle eine massive

Zellschädigung und einen signifikanten Volumenverlust der filtrierten Zellsuspension. Demnach wurde in den Folgeversuchen nur eine einmalige Filtration durch die locker in den Glastrichter eingelegte und zuvor mit Medium B durchtränkte Glaswolle durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit 4°C kaltem 10 mM EDTA-Puffer versetzt. Ohne den EDTA-Zusatz kam es in den Proberöhrchen zu unterschiedlich lang anhaltenden Cortisol-Sekretionen der porcinen Zellen, was folglich zu falsch hohen und dementsprechend nicht vergleichbaren Cortisolwerten der im RIA gemessenen Bioassay-Proben führte. Zudem lagen die Werte der Bioassay-Proben ohne den Verdünnungseffekt außerhalb der Cortisol-Eichkurve, was die Meßergebnisse zusätzlich verfälschte.

4.1.2. Zellkonzentration

In den anfänglichen Versuchen wurde die Zellsuspension auf 0.4×10^6 , 0.6×10^6 , 0.75×10^6 , 0.8×10^6 , 1.2×10^6 , 1.5×10^6 bzw. 1.6×10^6 Zellen/ml Zellsuspension konzentriert. Nach Zugabe verschiedener ACTH-Verdünnungsstufen (siehe Kapitel 3.2.4.) kam es zu einer Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen. Die anschließend im Cortisol-RIA gemessenen Cortisol-Gehalte der verschiedenen Zellkonzentrationen sind der Tabelle 21 im Tabellenanhang zu entnehmen.

Die Zellkonzentrationen 0,4 x 10⁶, 0,6 x 10⁶, 0,75 x 10⁶ und 0,8 x 10⁶ Zellen/ml Zellsuspension waren für eine ausreichende Cortisol-Gesamtsekretion zu niedrig. Die Werte dieser Proben lagen außerhalb der Cortisol-Eichkurve, da sich zu wenig meßbares Cortisol in den Proben befand. Die Konzentrationen 1,5 x 10⁶ und 1,6 x 10⁶ Zellen/ml Zellsuspension stellten sich hingegen als zu hoch heraus, die Zellen produzierten zu viel Cortisol, welches vom RIA nicht mehr erfaßt wurde. Bei der Konzentration 1,2 x 10⁶ Zellen/ml Zellsuspension befanden sich die Werte im Optimum der Cortisol-Eichkurve des RIAs, weshalb diese Konzentration für die Versuche mit den zu untersuchenden Blutproben verwendet wurde.

4.1.3. ACTH-Eichkurve

Zur Ermittlung geeigneter ACTH-Konzentrationen für die Erstellung der ACTH-Eichkurve wurden in mehreren Versuchen die ACTH-Konzentrationen 0,00025, 0,0025, 0,025, 0,25, 2,5, 12,5, 25, 125, 250, 2500, 25000 und 250000 pg/ml Medium im Bioassay auf ihre Cortisol-Freisetzung untersucht. Die anschließend im Cortisol-RIA gemessenen Cortisol-Gehalte der Bioassayproben sind in den Abbildungen 9 und 10 sowie in der Tabelle 22 im Tabellenanhang aufgeführt. Der 0-Wert stellt hierbei die basale Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen dar.

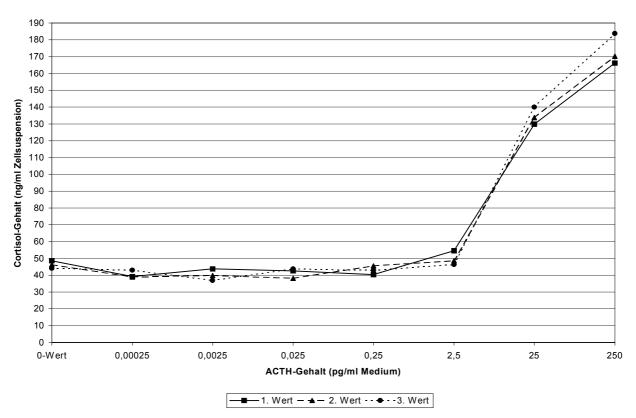


Abb. 9: Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen bei 0,00025-250 pg ACTH/ml Medium

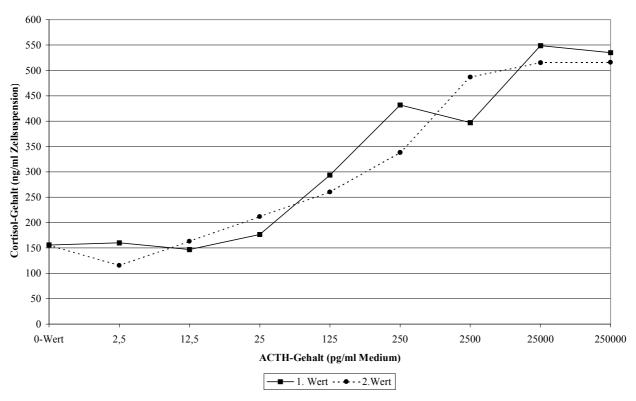


Abb. 10: Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen bei 2,5-250000 pg ACTH/ml Medium

Eine Steigerung der Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen konnte erst ab der ACTH-Konzentration 2,5 pg/ml Kulturmedium B beobachtet werden, so dass die niedrigeren Konzentrationen für die Erstellung der Eichkurve zukünftig entfielen. Bei den ACTH-Konzentrationen 2500-250000 pg/ml Kulturmedium B kam es zu einer überschießenden Cortisol-Produktion, die Werte lagen außerhalb der Cortisol-Eichkurve. Da diese Konzentrationen vom RIA nicht mehr erfaßt werden und in vivo unphysiologisch bzw. sehr selten anzutreffen sind, wurden sie ebenfalls nicht mit in die ACTH-Eichkurve aufgenommen.

Daraus ergab sich für die weiteren Analysen die ACTH-Eichkurve mit den ACTH-Konzentrationen 2,5, 12,5, 25, 125, 250 und 1250 pg/ml Kulturmedium B. Anhand dieser Kurve kann sowohl bei den zu untersuchenden Proben die biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄) als auch die Produktivität der porcinen Zellen beurteilt werden. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen zwei typische ACTH-Eichkurven für einen in-vitro-Bioassay bei guter und mäßiger Produktivität der porcinen Zellen. Die im Cortisol-RIA gemessenen entsprechenden Cortisol-Werte der verschiedenen ACTH-Konzentrationen sind der Tabelle 23 im Tabellenanhang zu entnehmen. Der 0-Wert stellt hierbei die basale Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen dar.

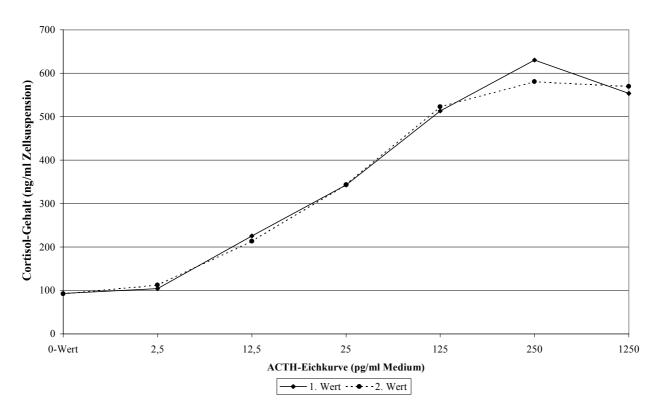


Abb. 11: Cortisol-Sekretion bei guter Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen

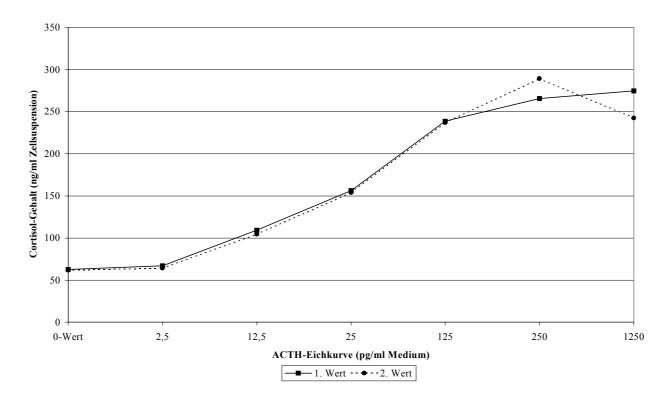


Abb. 12: Cortisol-Sekretion bei moderater Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen

4.1.4. Bioassayproben

4.1.4.1. Bioassay-Kontrollproben

Für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Bioassays wurden humanes ACTH₁₋₃₉ (Bachem: H-1160.1000), humanes ACTH₁₋₁₀ (Sigma: A 1709) und porcines ACTH₁₋₃₉ (Sigma: A 6303) im Bioassay eingesetzt. Für die Herstellung der ACTH-Lösungen wurden 100 IU porcines ACTH₁₋₃₉ in 4 ml sowie 1 mg humanes ACTH₁₋₃₉ und ACTH₁₋₁₀ in 1 ml physiologische Kochsalzlösung (NaCl; Merck: 1.06404) aufgenommen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Essigsäure (Merck: 1.00063) auf 4,5 eingestellt. Da sich der Meßbereich des IMMULITE® zwischen 5-1250 pg/ml befindet, wurden die ACTH-Lösungen auf eine ACTH-Konzentration von 10⁻⁹ M/l mit Kulturmedium B verdünnt. Die im IMMULITE® gemessenen Werte lagen für das humane und porcine ACTH₁₋₃₉ bei 0,3 bzw. 0,8 ng/ml Cortisol und 1250 bzw. 84,6 pg/ml ACTH. Die Werte des humanen ACTH₁₋₁₀ konnten nicht ermittelt werden (< 2,0 ng/ml Cortisol und < 5,0 pg/ml ACTH), da der IMMULITE® nur intaktes ACTH₁₋₃₉ mißt. Die Cortisol-Gehalte der entsprechenden Bioassay-Doppelproben wurden abzüglich der basalen Cortisol-Sekretion der Zellen (0-Wert) in der Tabelle 10 dargestellt:

	Bioassay-Doppelproben						
Probeart	Cortisol-Gel	ACTH-Gehalt (pg/ml) - biologische Aktivität*					
	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert			
Humanes ACTH ₁₋₃₉ , 10 ⁻⁹ M/l verdünnt	175,1	170,4	1636,9	1311,3			
Porcines ACTH ₁₋₃₉ , 10 ⁻⁹ M/l verdünnt	80,5	93,1	28,3	45,5			
Humanes ACTH ₁₋₁₀ , 10 ⁻⁹ M/l verdünnt	0	0	0	0			

Tab. 10: Stimulation der porcinen Zellen durch Humanes und Porcines ACTH* als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄)

Durch die Zugabe des porcinen und humanen ACTH₁₋₃₉ konnte eine deutliche Stimulation der porcinen Zellen beobachtet werden. Bei dem humanen ACTH₁₋₁₀ kam es hingegen zu keiner Stimulation der Nebennierenrindenzellen.

4.1.4.2. Blutproben-Aufbereitung

Da möglichst nur die Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen bestimmt werden sollte, mußte vor Beginn des Bioassays das endogene Cortisol aus den nativen Blutproben entfernt werden. Das endogene ACTH hingegen mußte für die Stimulation der Zellen erhalten bleiben. Für die Cortisol-Entfernung standen zwei Vorgehensweisen zur Verfügung, die Steroidabsorption an Aktivkohle und die Steroidextraktion mit Lösungsmitteln.

Steroidabsorption an Aktivkohle

Das verwendete Serum stammte von einem an ECS erkrankten Pferd und wies mittels IMMULITE[®] einen Cortisol-Gehalt von 40 ng/ml und einen ACTH-Gehalt von 68,8 pg/ml auf. Der im RIA ermittelte Cortisol-Wert des nativen Serums betrug 12,8 ng/ml.

Für die Herstellung der Aktivkohle-Suspension wurde zu 1 ml EDTA-Puffer 0,33 g Aktivkohle (Dextran coated charcoal; Sigma: C-6197) gegeben. 500 μl Serum wurden mit 50 μl Aktivkohle-Suspension versetzt. Durch eine verlängerte Kontaktzeit von 20 Minuten konnte möglichst viel Cortisol an die Aktivkohle gebunden werden. Danach wurden die Proben für 10 Minuten, bei 20°C und 20.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Kohlesediment mit dem gebundenen Cortisol verworfen. Danach wurde im Bioassay überprüft, ob die Kohlebehandlung einen hemmenden Effekt auf die Cortisol-Freisetzung der Zellen ausübt. Hierfür wurden die Cortisol-Werte der mit Kohle behandelten und unterschiedlich verdünnten Proben (Überstand) mit den entsprechend unbehandelten Proben

(Serum) verglichen. Die Cortisol-Gehalte der Bioassay-Doppelproben wurden abzüglich der basalen Cortisol-Sekretion der Zellen (0-Wert) in der Tabelle 11 dargestellt.

	Bioassay-Doppelproben					
Serumproben	Cortisol-Ge	ehalt (ng/ml)	ACTH-Gehalt (pg/ml) - biologische Aktivität* -			
	1. Wert	1. Wert 2. Wert		2. Wert		
Unbehandeltes Serum, unverdünnt	145,6	156,5	13,5	14,8		
Serum + Kohle, unverdünnt	0	0	0	0		
Serum + Kohle, 1:3 verdünnt	0	0	0	0		
Serum + Kohle, 1:39 verdünnt	0	0	0	0		

Tab. 11: Ermittlung einer hemmenden Wirkung auf die porcinen Nebennierenrindenzellen durch die Aktivkohle-Behandlung der Proben

Bei allen mit Aktivkohle behandelten Verdünnungsstufen konnte, im Gegensatz zu den entsprechend unbehandelten Proben, keine Stimulation der porcinen Zellen beobachtet werden. Folglich übt die Kohlebehandlung einen hemmenden Effekt auf die Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen aus. Der Grund dafür könnte sein, dass sich trotz Zentrifugation noch Kohlereste in den Proben befanden, die sich möglicher Weise zelltoxisch auswirkten. Demzufolge war diese Methode für die Entfernung des endogenen Cortisols unbrauchbar.

Steroidextraktion mit Lösungsmitteln

Das Cortisol wurde anfänglich durch eine Einfachextraktion mit destillierten Lösungsmitteln herausgelöst. Die Auflistung der Lösungsmittel ist in der Abbildung 13 als eluotrope Reihe dargestellt:

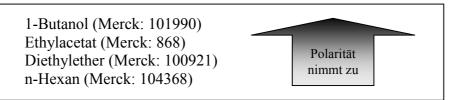


Abb. 13: Die eluotrope Reihe der Lösungsmittel

^{*} als Äquivalent von Synacthen (ACTH₁₋₂₄)

0,5 ml Serum wurden mit 1 ml 1-Butanol, 3 ml Ethylacetat, 2 ml Diethylether bzw. 2 ml n-Hexan versetzt und für 30 Minuten auf dem Schüttler (Vibrax®) geschüttelt. Anschließend wurden die abgedeckten Proben bei -20°C eingefroren. Die nicht gefrorene obere, organische Phase (Lösungsmittel mit dem extrahiertem Cortisol) wurde verworfen, die gefrorene untere, wäßrige Phase (Blutbestandteile mit ACTH) in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Das Einengen entfernte die Lösungsmittelreste aus den Probe. Der Trockenrückstand wurde danach in 0,5 ml Aqua dest. wieder aufgenommen und im IMMULITE® auf seinen Cortisolund ACTH-Gehalt überprüft (Tabelle 12):

Serum +	Lösungsmittel-	Cortisol-Gehalt		ACTH-Gehalt	
Lösungsmittel	menge (ml)	ng/ml	%	pg/ml	%
Natives Serum 1	/	46,0	100,0	181,0	100,0
Natives Serum 2	/	60,0	100,0	62,1	100,0
Serum 1 + 1-Butanol	1	31,0	67,4	165,0	91,2
Serum 2 + Ethylacetat	3	15,0	25,0	47,4	76,3
Serum 2 + Diethylether	2	26,0	43,3	29,2	47,0
Serum 2 + n-Hexan	2	58,0	96,7	46,3	74,6

Tab. 12: Cortisol- und ACTH-Gehalte der Serumproben nach Einfachextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln

Durch Ethylacetat und 1-Butanol wurde das Cortisol zu 75% bzw. 32,6% und ACTH zu 23,7% bzw. 8,8% herausgelöst. Die anderen beiden Lösungsmittel entfernten entweder zu wenig Cortisol oder zu viel ACTH aus den Proben, so dass sie für die Extraktion unbrauchbar waren. Die Extraktion mit Ethylacetat und 1-Butanol wurden in darauffolgenden Versuchen durch eine Zweifachextraktion optimiert (Tabelle 13):

Serum +	Lösungsmittel-	Cortisol-Gehalt		ACTH-Gehalt	
Lösungsmittel	menge (ml)	ng/ml	%	pg/ml	%
Natives Serum 3	/	48,0	100,0	191,0	100,0
Natives Serum 4	/	48,0	100,0	184,0	100,0
Natives Serum 5	/	15,0	100,0	68,8	100,0
Natives Serum 6	/	45,0	100,0	153,0	100,0
Natives Serum 7	/	32,0	100,0	215,0	100,0
Serum 3 + 1-Butanol	1	19,0	39,6	150,0	78,5
Serum 4 + 1-Butanol	1	15,0	31,3	137,0	74,5
Serum 4 + Ethylacetat	2	4,8	10,0	160,0	87,0
Serum 5 + Ethylacetat	2	< 0,2	< 1,3	67,6	98,3
Serum 6 + Ethylacetat	2	6,6	14,7	146,0	95,4
Serum 7 + Ethylacetat	2	2,4	7,5	129,0	60,0

Tab. 13: Cortisol- und ACTH-Gehalte der Serumproben nach Zweifachextraktion mit 1-Butanol und Ethylacetat

Das mit 1-Butanol extrahierte Serum 4 sowie eine 1-Butanol-Blanc-Probe (1 ml lyophilisiertes 1-Butanol in 500 µl Aqua dest. aufgenommen) wurden im Bioassay auf einen hemmenden Effekt überprüft (Tabelle 14):

Lyophil Prob				ssay- proben	Basale Cortisol- Sekretion der Zellen (0-Wert)	
	IMMU	LITE®	Cortisol-Gehalt (ng/ml)		Continui W	
Probenart	Cortisol- Gehalt (ng/ml)	ACTH- Gehalt (pg/ml)	1. Wert	2. Wert	Cortisol-Wert (ng/ml)	
Serum 4 + 1-Butanol, unverdünnt	15,0	137,0	68,0	148,2		
Serum 4 + 1-Butanol, 1:3 verdünnt	13,0	137,0	99,0	98,8	128,2	
1-Butanol (blanc), unverdünnt	0,4	< 5,0	99,4	48,4	120,2	
1-Butanol (blanc), 1:3 verdünnt	0,4	> 5,0	50,4	51,2		

Tab. 14: Ermittlung eines hemmenden Effektes von 1-Butanol auf die porcinen Zellen

Bei allen Proben wurde die basale Cortisol-Sekretion der Zellen (0-Wert) gehemmt. Demnach wirkte sich 1-Butanol, welches sich anscheinend trotz Lyophilisierung noch in den Proben befand, hemmend auf die Cortisol-Sekretion der Zellen aus. Möglicherweise hat 1-Butanol eine zelltoxische Wirkung. Folglich konnte es für die Extraktion nicht verwendet werden.

Schließlich wurde das Serum 7 mit und ohne Ethylacetat-Extraktion im Bioassay auf einen hemmenden Effekt auf die Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen überprüft. Die Cortisolwerte des nativen Serums lagen abzüglich der basalen Sekretion der Zellen (0-Wert) bei der unverdünnten Probe bei 55,2 ng/ml und bei der 1:3 verdünnten Probe bei 119,8 ng/ml. Nach der Extraktion des Serums wurden bei der unverdünnten Probe nur noch 6,4 ng/ml Cortisol und bei der 1:3 verdünnten Probe nur noch 8,0 ng/ml Cortisol gemessen.

Eine Ethylacetat-Blanc-Probe (2 ml lyophilisiertes Ethylacetat in 500 μl Aqua dest. aufgenommen) wurde als Kontrolle ebenfalls im Bioassay eingesetzt. Die im Cortisol-RIA gemessenen Cortisol-Gehalte der entsprechenden Bioassay-Doppelproben sind in der Tabelle 15 aufgeführt. Eine Suppression der basalen Cortisol-Produktion der porcinen Zellen (0-Wert) würde für eine hemmende Wirkung von Ethylacetat sprechen.

Lyophilisierte Proben			Bioassay- Doppelproben		Basale Cortisol- Sekretion der Zellen (0-Wert)
Probenart	IMMU	LITE®	Cortisol-Gehalt (ng/ml)		Cortisol-Wert
Trobenart	Cortisol- Wert (ng/ml)	ACTH- Wert (pg/ml)	1. Wert	2. Wert	(ng/ml)
Ethylacetat (blanc), unverdünnt	0,7	10.2	13,8	10,9	15.2
Ethylacetat (blanc), 1:3 verdünnt	0,7	10,3	11,6	12,9	15,3

Tab. 15: Ermittlung eines hemmenden Effektes von Ethylacetat auf die porcinen Zellen

Bei den extrahierten Serumproben konnte, im Gegensatz zu der Ethylacetat-Blanc-Probe, eine Hemmung der Cortisol-Sekretion der Zellen beobachtet werden. Demzufolge befanden sich trotz Lyophilisierung anscheinend noch Lösungsmittelreste in den Proben, die sich in höherer Konzentration eventuell zelltoxisch auswirkten. Möglicher Weise wurden auch durch die Extraktion bestimmte Lipide herausgelöst, wodurch Hemmstoffe auf die Zellen freigesetzt wurden oder es kam durch die Extraktion zu eine pH-Verschiebung, die eine Schädigung der Zellen verursachte. In jedem Fall war jedoch eine Extraktion der Proben vor Einsatz im Bioassay für die Entfernung des endogenen Cortisols nicht durchführbar.

Der oben angeführten Ergebnisse zufolge (Steroidabsorption an Aktivkohle sowie Steroidextraktion mit Lösungsmitteln) konnten nur unbehandelte Serum- oder Plasmaproben im Bioassay eingesetzt werden. Dadurch mußten aber die im Cortisol-RIA gemessenen endogenen Cortisolwerte der nativen Blutproben von den Cortisol-Gehalten der Bioassay-Doppelproben subtrahiert werden, um die tatsächliche ACTH-induzierte Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen ermitteln zu können.

4.1.4.3. Serum und Blutproben-Zusätze

Für die Ermittlung eines hemmenden Effektes durch Serumbestandteile oder Blutzusätze (EDTA, Lithium-Heparin und Aprotinin) auf die Cortisol-Ausschüttung der porcinen Nebennierenrindenzellen wurden entsprechende Blutproben im Bioassay getestet.

Serumbestandteile

Die Seren stammten von gesunden Pferden, bei denen ein Dexamethason-Suppressionstest durchgeführt wurde. Die Blutproben wiesen 19 Stunden post injectionem durch die

Dexamethason-Supprimierung geringe Cortisol- und ACTH-Gehalte auf. Aufgrund der niedrigen ACTH-Konzentrationen konnte eine Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen nach Zugabe des Serums ausgeschlossen werden. Demzufolge dürfte nur die basale Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen in den entsprechenden Bioassay-Proben zu messen sein. Eine Suppression des 0-Wertes hingegen würde für eine hemmende Wirkung der Serumbestandteile auf die Cortisol-Sekretion der Zellen sprechen. Die im Cortisol-RIA gemessenen Cortisol-Gehalte der entsprechenden Bioassay-Doppelproben sind in Tabelle 16 dargestellt:

	Native Serum nethason-Sup	proben pressionstest)		ssay- proben	Basale Cortisol-Sekretion der Zellen (0-Wert)		
Probe- Cortisol- Gehalt		ACTH-	Cortisol-Ge	(0 /	Cortisol-Wert		
Nr.	(ng/ml)	Gehalt (pg/ml)	1. Wert	2. Wert	(ng/ml)		
1	6,1	< 5,0	50,8	51,4	61,8		
2	2,6	< 5,0	76,3	97,3	101,3		
3	< 2,0	< 5,0	18,4	9,1	15,3		

Tab. 16: Ermittlung eines möglichen Serumeffektes auf die porcinen Nebennierenrindenzellen

Da die basale Cortisol-Sekretion der Zellen nahezu unbeeinflußt blieb, konnte ein Serumeffekt ausgeschlossen werden.

Blutzusätze (EDTA, Lithium-Heparin und Aprotinin)

Die Gerinnungshemmer EDTA und Lithium-Heparin wurden anhand einer EDTA-Plasmaprobe (IMMULITE®: 48,0 ng/ml Cortisol und 73,5 pg/ml ACTH) sowie einer LithiumHeparin-Plasmaprobe (IMMULITE®: 32,0 ng/ml Cortisol und 714,0 pg/ml ACTH) von
Cushing-Pferden im Bioassay auf einen möglicher Weise hemmenden Effekt auf die CortisolSekretion der porcinen Zellen überprüft. Bei beiden Plasmaproben konnte abzüglich der
basalen Sekretion der Zellen (0-Wert) eine Stimulation der Cortisol-Sekretion der porcinen
Zellen beobachtet werden (EDTA: 58,0 ng/ml Cortisol, Lithium-Heparin: 28,5 ng/ml
Cortisol), so dass eine hemmende Wirkung der Gerinnungshemmer EDTA und LithiumHeparin ausgeschlossen werden konnte.

Danach wurden 25 μl des Proteinaseinhibitors Aprotinin (Trasylol® 500.000 KIE, Bayer Vital GmbH, Leverkrusen) zu 0,5 ml Serum gegeben, dies entspricht 500 KIE Aprotinin / 1 ml Serum. Das Serum stammte von einem therapierten Tier und wies mittels IMMULITE® einen Cortisol-Gehalt von 45,0 ng/ml und einen ACTH-Gehalt von < 5,0 pg/ml auf. Die Probe wurden einmal ohne und einmal mit dem Zusatz von Aprotinin im Bioassay auf einen möglicher Weise hemmenden Effekt auf die Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen

getestet. Die Cortisol-Werte der Aprotinin-freien Probe lagen abzüglich der basalen Sekretion der Zellen (0-Wert) bei 807,5 ng/ml und die der Aprotinin-haltigen Probe bei 712,7 ng/ml. Demzufolge konnte bei beiden Proben eine vergleichbare Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen beobachtet werden, so dass ein hemmender Effekt durch Aprotinin ausgeschlossen werden konnte.

Der oben genannten Ergebnisse zufolge beeinflußten weder Serumbestandteile noch Blutzusätze (EDTA, Lithium-Heparin sowie Aprotinin) die Cortisol-Freisetzung der porcinen Nebenierenrindenzellen. Demnach kann jede Art von Blutprobe (Serum/Plasma) im Bioassay eingesetzt werden.

4.1.4.4. Kontrollserum

Als Kontrollserum wurde das Serum eines Cushing-Pferdes verwendet. Die im IMMULITE[®] gemessenen Cortisol- und ACTH-Gehalte betrugen 40,0 ng/ml Cortisol bzw. 68,8 pg/ml ACTH. Die Cortisol-Gehalte der Bioassay-Doppelproben wurde abzüglich der basalen Cortisol-Sekretion der Zellen (0-Wert) sowie der endogenen Cortisol-Konzentrationen der im RIA gemessenen nativen Plasmaproben in Tabelle 17 dargestellt. Die Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen war in allen Versuchen annähernd konstant.

	Bioassay-Doppelproben						
Kontrollserum	Cortisol-Ge	halt (ng/ml)	ACTH-Gehalt (ng/ml) - biologische Aktivität* -				
	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert			
1. Versuch	136,6	135,8	12,4	12,3			
2. Versuch	153,5	133,5	5,1	4,3			

Tab. 17: Die Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen durch das Kontrollserum * als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄)

4.2. Cortisol-Radioimmunoassay (Cortisol-RIA)

4.2.1. Probemenge

Um die für die Cortisol-Messung geeignete Probemenge ermitteln zu können, wurden anfänglich 1-10 μ l im Cortisol-RIA eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Verwendung von mehr als 2 μ l Probemenge die Cortisol-Werte außerhalb der Cortisol-Eichkurve lagen. Die optimale Probemenge, bei der die Cortisol-Gehalte im Bereich der Cortisol-Eichkurve zu liegen kamen, betrug demnach 1 μ l. Da 1 μ l jedoch nicht präzise zu pipettieren war, wurden die Proben am Ende des Bioassays mit EDTA-Puffer 1:9 verdünnt. Durch diese Verdünnung konnten 10 μ l Probemenge im RIA pipettiert werden, die dann 1 μ l der eigentlichen Probe entsprachen.

4.2.2. Extraktion der Proben im Cortisol-RIA

Für die Erstellung der ACTH-Eichkurve wurden im RIA nur Proben gemessen, die ausschließlich Zellsuspension mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen (siehe Kapitel 4.1.3.) enthielten. Für diese Proben war eine vorherige Extraktion mit Ethylacetat nicht notwendig, da konstante Bedingungen vorlagen und die Cortisol-Gehalte der extrahierten und der nicht extrahierten Proben nahezu identisch waren. Die entsprechenden Cortisol-Gehalte sind in der Abbildung 14 sowie in der Tabelle 24 des Tabellenanhangs aufgeführt.

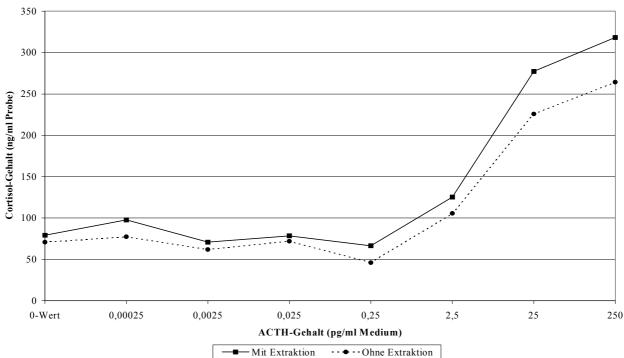


Abb. 14: Cortisol-Gehalte der extrahierten und nicht extrahierten Zellsuspensionen (0,8 x 10⁶ Zellen/ml Suspension) mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen (0,00025-250 pg/ml Medium)

Für die Plasmaproben hingegen war aufgrund der Blutbestandteile (insbesondere der Proteine), eine Extraktion mit Ethylacetat unerläßlich, da sonst der Ablauf des Cortisol-RIAs beeinflußt wurde und demzufolge die Meßergebnisse verfälscht wurden.

4.3. Biologisch-immunreaktives Verhältnis von ACTH (ACTH-BI-Ratio)

4.3.1. Cortisol- und ACTH-Gehalte der equinen Plasmaproben

Für die Ermittlung der biologischen Aktivität des endogenen ACTHs wurden jeweils 5 native Plasmaproben an ECS erkrankter, bereits therapierter sowie gesunder Pferde im Bioassay eingesetzt und mittels Cortisol-RIA auf ihren Cortisol-Gehalt untersucht. Die endogenen Cortisol-Werte der entsprechenden nativen Plasmaproben wurden ebenfalls im RIA gemessen, um sie von den Cortisol-Werten der Bioassay-Doppelproben subtrahieren zu können. Mit Hilfe der ACTH-Eichkurve konnte dann für die Bioassayproben die biologische Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®] (ACTH₁₋₂₄) berechnet werden.

Die immunreaktive Aktivität des endogenen ACTHs wurde anhand der im IMMULITE[®] gemessenen Cortisol- und ACTH-Gehalte der Plasmaproben ermittelt. Die entsprechenden ACTH- und Cortisol-Gehalte der verschiedenen Proben sind in der Tabelle 18 aufgeführt:

		IMMULITE®		Cortisol-RIA			
Blutpro	Cortisol (ng/ml)	ACTH (pg/ml)	Cortisol (ng/ml)		ACTH (pg/ml) -biolog. Aktivität*-		
			1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	
I	nativ	44,0	254,0	30,7	/	/	/
Pferd, ECS	Bioassay	/	/	92,1	124,4	9,5	10,6
II Pferd, ECS	nativ	47,0	351,0	36,3	/	/	/
	Bioassay	/	/	173,4	178,1	9,6	10,1
III Pferd, ECS	nativ	32,0	141,0	27,7	/	/	/
	Bioassay	/	/	73,1	84,7	9,0	9,3
IV Pferd, ECS	nativ	50,0	471,0	14,6	/	/	/
	Bioassay	/	/	117,8	114,9	5,6	5,5
V	nativ	47,0	248,0	13,3	/	/	/
Pferd, ECS	Bioassay	/	/	155,7	137,3	8,1	6,8

Tab. 18: Die im IMMULITE® und Cortisol-RIA gemessenen Cortisol- und ACTH-Werte der verschiedenen equinen Plasmaproben bzw. der entsprechenden Bioassay-Proben * als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄)

		IMMULITE®		Cortisol-RIA			
Blutpro	Cortisol (ng/ml)	ACTH (pg/ml)	Cortisol (ng/ml)		ACTH (pg/ml) -biolog. Aktivität*-		
			1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	
A	nativ	37,0	70,5	14,7	/	/	/
Pferd, therapiert	Bioassay	/	/	70,5	71,3	8,9	8,9
В	nativ	57,0	94,8	33,3	/	/	/
Pferd, therapiert	Bioassay	/	/	76,3	74,7	9,1	9,0
С	nativ	45,0	182,0	28,2	/	/	/
Pferd, therapiert	Bioassay	/	/	73,8	39,0	9,0	8,0
D	nativ	53,0	28,9	34,3	/	/	/
Pferd, therapiert	Bioassay	/	/	29,7	0	7,7	0
Е	nativ	29,0	14,3	15,4	/	/	/
Pferd, therapiert	Bioassay	/	/	199,4	105,1	13,7	10,0
1	nativ	21,0	26,8	9,7	/	/	/
Pferd, gesund	Bioassay	/	/	55,5	55,8	8,4	8,4
2	nativ	40,0	28,9	19,2	/	/	/
Pferd, gesund	Bioassay	/	/	75,2	100,0	9,0	9,8
3	nativ	34,0	20,5	14,9	/	/	/
Pferd, gesund	Bioassay	/	/	50,7	55,5	8,3	8,4
4 Pferd, gesund	nativ	29,0	23,5	13,3	/	/	/
	Bioassay	/	/	71,5	76,7	8,9	9,1
5	nativ	37,0	5,6	22,7	/	/	/
Pferd, gesund	Bioassay	/	/	24,1	25,7	7,6	7,6

Fortsetzung Tab. 18: Die im IMMULITE[®] und Cortisol-RIA gemessenen Cortisol- und ACTH-Werte der verschiedenen equinen Plasmaproben bzw. der entsprechenden Bioassay-Proben

Die im RIA gemessenen Cortisol-Gehalte der nativen Plasmaproben fielen zwischen 13,4-71,7% niedriger aus als die im IMMULITE® gemessenen Cortisol-Konzentrationen. Durch die Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen nach Zugabe der Plasmaproben der an ECS erkrankten, bereits therapierten sowie gesunden Pferde konnte im Vergleich zu den im RIA gemessenen entsprechenden Cortisol-Basalwerten ein 3,0-11,7facher, 1,4-6,8facher bzw. 1,1-5,8facher und im Vergleich zu den im IMMULITE® gemessenen entsprechenden Cortisol-Basalwerten ein 2,1-3,8facher, 1,3-3,6facher bzw. 1,5-2,7facher Cortisol-Anstieg in den Bioassay-Doppelproben ermittelt werden. Der 1. Bioassay-Doppelwert des Plasmas des therapierten Pferdes E stellte ein schlechtes Replikat

^{*} als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄)

dar und wurde deshalb für die Interpretation nicht mit berücksichtigt. Bei dem therapierten Pferd D und dem gesunden Pferd 5 entsprachen die Cortisol-Gehalte der Bioassay-Doppelproben denen der entsprechenden nativen Plasmaproben. Trotz der allgemein stärkeren Stimulation in vitro stand die Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen nicht im Verhältnis zu den im IMMULITE® gemessenen hohen ACTH-Basalwerten, wie sie bei den erkrankten und teilweise auch therapierten Pferden vorkamen. Die Versuche ergaben, entsprechen der Verhältnisse in vivo, eine eher mäßige Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen.

Das Verhältnis zwischen der biologischen Aktivität als Äquivalent von Synacthen (ACTH₁₋₂₄) und der immunreaktiven Aktivität des endogenen ACTHs in den Plasmaproben lag bei den an ECS erkrankten Pferden bei 1:25,2 ,1:35,5, 1:15,3, 1:84,9 und 1:33,1, bei den bereits therapierten Pferden bei 1:7,9, 1:10,5, 1:21,4, 1:3,8 und 1:1,4 sowie bei den gesunden Pferden bei 1:3,2, 1:3,1, 1:2,5, 1:2,6 und 1,4:1.

4.3.2. Stabilitätsstudie

Sowohl bei dem therapierten Pferd E als auch bei den gesunden Pferden 2 und 4 konnte trotz im IMMULITE® niedrig gemessener ACTH-Basalwerte (Referenz) eine signifikante Stimulation der porcinen Zellen beobachtet werden. Zur Abklärung eines möglichen Zerfalls des in den Proben befindlichen endogenen ACTHs in biologisch aktive Fragmente während der Lagerung bei 4°C, welche zur Stimulation der porcinen Zellen beitragen könnten, wurde abschließend eine Stabilitätsstudie mit dem Plasma eines gesunden Pferdes (PS) durchgeführt. Aliquote des Plasmas wurden nach unterschiedlichen Lagerungszeiten und -temperaturen im im IMMULITE® auf ihren Cortisol- und ACTH-Gehalt gemessen. Für die Ermittlung der biologischen Aktivität des endogenen ACTHs wurden die Plasmaproben im Bioassay eingesetzt und mittels Cortisol-RIA auf ihren Cortisol-Gehalt untersucht. Die endogenen Cortisol-Basalwerte der entsprechenden nativen Aliquote wurden ebenfalls im RIA gemessen, um sie von den Cortisol-Werten der Bioassay-Doppelproben subtrahieren zu können. Mit Hilfe der ACTH-Eichkurve konnte dann für die Bioassayproben die biologische Aktivität als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄) berechnet werden. Die entsprechenden ACTH- und Cortisol-Gehalte der verschiedenen Proben sind in der Tabelle 19 aufgeführt:

		IMMULITE®		Cortisol-RIA			
Blutpro	Cortisol (ng/ml)	ACTH (pg/ml)	Cortisol (ng/ml)		ACTH (pg/ml) -biolog. Aktivität*-		
			1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	
PS (0)	nativ	31,0	22,3	29,2	/	/	/
0-Wert	Bioassay	/	/	71,2	51,3	16,7	9,2
PS (1a)	nativ	30,0	21,0	33,8	/	/	/
1. Tag, 20°C	Bioassay	/	/	313,7	75,2	/	18,9
PS (2a)	nativ	28,0	20,9	32,2	/	/	/
2. Tag, 20°C	Bioassay	/	/	70,5	66,8	16,3	14,7
PS (3a)	nativ	33,0	20,2	32,4	/	/	/
3. Tag, 20°C	Bioassay	/	/	74,3	67,0	18,4	14,7
PS (1b)	nativ	33,0	20,6	30,2	/	/	/
1. Tag, 4°C	Bioassay	/	/	47,3	43,6	8,2	7,4
PS (2b) 2. Tag, 4°C	nativ	31,0	19,2	30,5	/	/	/
	Bioassay	/	/	60,2	48,2	12,1	8,5
PS (3b)	nativ	30,0	19,1	35,6	/	/	/
3. Tag, 4°C	Bioassay	/	/	44,9	51,5	7,6	9,3

Tab. 19: Die im IMMULITE® und Cortisol-RIA gemessenen Cortisol- und ACTH-Werte der verschiedenen Aliquote bzw. entsprechenden Bioassay-Doppelproben der Stabilitätsstudie nach unterschiedlichen Lagerungszeiten und -temperaturen
* als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄)

Durch die Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen nach Zugabe der Aliquote konnte im Vergleich zu den im Cortisol-RIA bzw. im IMMULITE® gemessenen entsprechenden Cortisol-Basalwerten bei dem 0-Wert ein 1,8-2,4facher bzw. 1,7-2,7facher, bei den bei Zimmertemperatur gelagerten Aliquoten ein 2,1-2,3facher bzw. 2,0-2,5facher und bei den im Kühlschrank gelagerten Aliquote ein 1,3-2,0facher bzw. 1,3-1,9facher Cortisol-Anstieg in den Bioassay-Doppelproben ermittelt werden. Der 1. Bioassay-Doppelwert des Aliquots PS (1a) stellte ein schlechtes Replikat dar und wurde deshalb für die Interpretation nicht mit berücksichtigt.

Das Verhältnis zwischen der biologischen Aktivität als Äquivalent von Synacthen (ACTH₁₋₂₄) und der immunreaktiven Aktivität des endogenen ACTHs lag beim 0-Wert bei 1:1,7, nach 1 Tag Lagerung bei 20°C bei 1:1,1, nach 2 Tagen Lagerung bei 20°C bei 1:1,3 und nach 3 Tagen Lagerung bei 20°C bei 1:1,2 sowie nach 1 Tag Lagerung bei 4°C bei 1:2,6, nach 2 Tagen Lagerung bei 4°C bei 1:1,9 und nach 3 Tagen Lagerung bei 4°C bei 1:2,2.

5. Diskussion

Ziel dieser Studie ist es, einen ACTH-Bioassay mit porcinen Nebennierenrindenzellen zu entwickeln, um die biologische Aktivität von endogenem ACTH in equinen Plasmaproben messen zu können. Anschließend wird die biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®] mit der immunreaktiven ACTH-Aktivität ins Verhältnis gesetzt (ACTH-BI-Ratio). Durch die Ermittlung der ACTH-BI-Ratio soll im Bereich der Diagnostik geklärt werden, warum trotz hoher ACTH-Basalwerte, wie sie im Plasma an ECS erkrankter Pferde häufig vorkommen, meist nur verhältnismäßig niedrige Cortisol-Plasmakonzentrationen gemessen werden. Die Cortisolwerte befinden sich dabei überwiegend im Referenzbereich oder sind sogar erniedrigt. Die Stimulation der Nebennierenrindenzellen steht somit nicht im Verhältnis zur endogenen ACTH-Sekretion aus der Pars intermedia der Hypophyse. Des weiteren soll in dieser Arbeit erläutert werden, warum es trotz niedriger Cortisol-Basalwerte zur Ausbildung der typischen klinischen ECS-Symptomatik kommt.

5.1. ACTH-Bioassay

5.1.1. Entwicklung des Bioassays mit porcinen Nebennierenrindenzellen

Der ACTH-Bioassay mit Nebennierenrindenzellen vom Schwein wurde anhand des Protokolls von Robertson und Bidey (1990), die einen Bioassay mit Nebennierenrindenzellen vom Meerschweinchen durchführten, entwickelt. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen der Zellen an ihr Umgebungsmilieu und der Praktikabilität im hiesigen Labor der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule mußte dieses Protokoll jedoch weitestgehend modifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.).

Wegen der wesentlich besseren Zellqualität sollten für die Gewinnung der Nebennierenrindenzellen nur Nebennieren von jungen Schlachtschweinen verwendet werden. Bei der Aufbereitung ist zudem auf einen sehr schonenden Umgang mit den empfindlichen Zellen zu achten, da die Herabsetzung jeglicher einwirkender mechanischer Kräfte für die Erhaltung der Zellen in vitro essentiell ist. Dies schließt die manuelle als auch die maschinelle Gewebszerkleinerung ein. Die Nebennierenrinde wird durch behutsames Zerschneiden mit dem Skalpell in 1x1 mm große Gewebsstücke zerkleinert. Anschließend werden die Zellverbände in einem im Institut selbst angefertigten Gewebszerkleinerer (siehe Kapitel 3.2.2., Abbildung 8) unter Zugabe von 0,2% Kollagenase bei 37°C, 60-100 U/min. und hoher Luftfeuchtigkeit innerhalb eines Inkubators aufgelöst. Durch den Gewebszerkleinerer werden die Zellen weniger gequetscht als in einem Becherglas mit Rührstäbchen auf dem Magnetrührer.

Da die ersten beiden Überstände während der Zellvereinzelung nach 10 bzw. 25 Minuten für die Herstellung der Zellkultur noch zu grobe Gewebsreste und Fettbestandteile enthalten, müssen diese abpipettiert und verworfen werden. Erst der 3. Überstand, und für eine ausreichende Menge an Zellsuspension auch der 4. Überstand, können für die Weiterverarbeitung verwendet werden.

Die Kulturmedien A und B, bestehend aus RPMI-1640-Medium, sollten 0,08% 8 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 0,5% Bovines Serumalbumin (BSA) sowie 0,6% Fötales Bovines Serum (FBS) enthalten. Calciumchlorid enthält Calcium für die Transduktion der Information zwischen dem Rezeptor und der Adenylatzyklase nach der Bindung von ACTH an den adrenocorticalen Hormonrezeptor. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des Adenylatzyklase-Systems und zur Kumulation der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dies wiederum aktiviert die Proteinkinase-A, wodurch der Einstrom des zytoplasmatischen Cholesterins in das Mitochondrium gefördert und somit die Cortisol-Synthese und -Sekretion der Nebennierenrindenzellen stimuliert wird. BSA hingegen ist für die Zellernährung notwendig und FBS liefert essentielle Substanzen für den Zellstoffwechsel, u.a. Fettsäuren für die Cortisol-Synthese.

Nach der Inkubation werden die Proben mit 4°C kaltem 10 mM EDTA-Puffer versetzt und danach eingefroren. EDTA entzieht den Zellen durch Komplexbildung Calcium, wodurch die rezeptorvermittelten Vorgänge nach der Bindung von ACTH an den adrenocorticalen Hormonrezeptor unterbunden werden und somit die Cortisol-Synthese und -sekretion der Nebennierenrindenzellen versiegt. Zudem werden die Zellen durch die Kälte zerstört, so dass es endgültig zum Abbruch der Cortisol-Ausschüttung kommt. Diese Vorgehensweise gewährleistet eine einheitliche Unterbrechung der Cortisol-Sekretion, so dass die Proben nach der Cortisol-Messung miteinander verglichen werden können. Aufgrund des zusätzlichen Verdünnungseffektes, durch Zugabe des Puffers, erfolgt die Cortisol-Messung der mit viel Cortisol angereicherten Proben im Bereich der Cortisol-Eichkurve.

5.1.2. Zellkonzentration und ACTH-Eichkurve

Bei der Konzentration 1,2 x 10⁶ Zellen/ml Zellsuspension befanden sich die Werte der Bioassay-Doppelproben im Optimum der Cortisol-Eichkurve des Cortisol-RIAs, weshalb diese Konzentration für die Versuche mit den zu untersuchenden Blutproben verwendet wurde.

Eine Steigerung der Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen wurde zwischen den ACTH-Konzentrationen 2,5-1250 pg/ml Kulturmedium B beobachtet, woraufhin diese Konzentrationen für die Erstellung der ACTH-Eichkurve verwendet wurden. Der 0-Wert stellt dabei die basale Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen (Zellsuspension ohne ACTH-Zugabe) dar. Anhand dieser Kurve kann sowohl bei den zu untersuchenden Proben die biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen® (ACTH₁₋₂₄) als auch die Produktivität der porcinen Zellen beurteilt werden, die je nach

Qualität der Zellen sehr unterschiedlich ausfallen kann. Der 0-Wert sollte sich dabei zwischen 50-100 ng Cortisol/ml Suspension befinden, was für eine moderate bis gute Sekretion der porcinen Zellen spricht.

5.1.3. Bioassayproben

5.1.3.1. Bioassay-Kontrollproben

Für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Bioassays wurden zunächst unterschiedliche ACTH-Proben mit bekannter ACTH-Konzentration verwendet. Da sich laut Müller (1978) bei den verschiedenen Spezies lediglich die Aminosäure-Sequenz 25-33 unterscheidet, wurden stellvertretend für das equine ACTH, welches in isolierter Form nicht zu erhalten ist, humanes ACTH₁₋₁₀ und ACTH₁₋₃₉ sowie porcines ACTH₁₋₃₉ im Bioassay eingesetzt.

Da sich die Werte des humanen ACTH₁₋₃₉ nicht im Optimum der ACTH-Eichkurve befanden, darf bei diesen Proben die biologische Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®] (ACTH₁₋₂₄) nicht überbewertet werden. Dennoch konnte eine deutliche Stimulation der porcinen Zellen durch das porcine und humane ACTH₁₋₃₉ beobachten werden, was dafür spricht, dass der ACTH-Bioassay bei Durchführung des beschriebenen Protokolls (siehe Kapitel 3.2.) funktionsfähig ist. Bei dem humanen ACTH₁₋₁₀ handelte es sich um ein ACTH-Fragment, welches zu keiner Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen führte. Dies läßt sich dadurch erklären, dass die biologische Aktivität von ACTH an das N-terminale Ende (ACTH₁₋₂₄) gebunden ist und Peptide mit weniger als 16 Aminosäuren ihre corticosteroidogene Aktivität verlieren.

5.1.3.2. Blutproben-Aufbereitung sowie Serumbestandteile und Blutproben-Zusätze

Vor Einsatz der Blutproben im Bioassay sollte das endogene Cortisol aus den nativen Proben entfernt werden, um möglichst nur die Cortisol-Sekretion der porcinen Nebennierenrindenzellen bestimmen zu können. Sowohl die für die Cortisol-Entfernung durchgeführte Steroidabsorption an Aktivkohle als auch die Steroidextraktion mit Lösungsmitteln wirkten sich jedoch auf die Cortisol-Freisetzung der porcinen Nebennierenrindenzellen hemmend aus. Demnach mußten die Blutproben unbehandelt im Bioassay eingesetzt werden und die Cortisol-Werte der selben im RIA gemessenen nativen Proben später von den Cortisol-Gehalten der entsprechenden Bioassay-Doppelproben subtrahiert werden, um auf die tatsächliche Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen schließen zu können.

Es können alle Arten an Blutproben (Serum/Plasma) im Bioassay eingesetzt werden, da sich weder Serumbestandteile noch Blutproben-Zusätze (EDTA, Lithium-Heparin und Aprotinin) hemmend auf die Cortisol-Ausschüttung der porcinen Nebennierenrindenzellen ausgewirkt haben.

5.1.3.3. Kontrollserum und Blank-Probe

Als Kontrollserum wurde im ACTH-Bioassay das Serum eines cushingoiden Pferdes eingesetzt. Ein derartiger Kontrollwert ist unerläßlich, da es sich bei dem Bioassay um eine lebende Zellkultur handelt, bei der die Cortisol-Sekretion der Zellen je nach Zellqualität sehr variabel ausfallen kann. Dies spiegelt sich, wie auch in dieser Studie (siehe Kapitel 4.1.4.4.), in der biologischen Aktivität des endogenen ACTHs wieder. Trotz annähernd konstanter Cortisol-Gehalte in den verschiedenen Versuchen fiel bei diesen Proben die biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®] (ACTH₁₋₂₄) unterschiedlich aus.

Als Blank-Probe wurde in jedem Bioassay das Kulturmedium B (ohne Zellen) mitgemessen. Da das Medium weder ACTH zur Stimulation der Nebennierenrindenzellen noch Cortisol enthält, darf bei dieser Probe im Cortisol-RIA kein Cortisol-Gehalt meßbar sein.

5.2. Biologisch-immunreaktives Verhältnis von ACTH (ACTH-BI-Ratio)

Für die Ermittlung der biologischen Aktivität des endogenen ACTHs wurden jeweils 5 Plasmaproben an ECS erkrankter, bereits therapierter sowie gesunder Pferde im ACTH-Bioassay eingesetzt und dessen Cortisol-Gehalte gemessen. Anhand der Cortisol-Werte der entsprechenden Bioassay-Proben konnte dann mit Hilfe der ACTH-Eichkurve die biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®] (ACTH₁₋₂₄) berechnet werden. Anschließend wurde das biologisch-immunreaktive Verhältnis des endogenen ACTHs dieser Proben beurteilt.

Im Rahmen der Cortisol-Messungen fiel auf, dass die im Cortisol-RIA ermittelten Cortisol-Gehalte der nativen Plasmaproben zwischen 13,4-71,7% niedriger ausfielen als die im IMMULITE® gemessenen Cortisol-Konzentrationen. Dies würde die Aussage von Klein et al. (1989) bestätigen, dass die gemessenen Cortisol-Konzentrationen je nach Bestimmungsmethode und somit unterschiedlich verwendeten spezifischen Antiseren verschieden sind. Eiler et al. (1980) fanden ebenfalls heraus, dass die im RIA gemessenen Cortisolwerte wesentlich niedriger liegen als die Werte, die mit einer kompetetiven Proteinbindungsmethode ermittelt wurden und laut Froin et al. (1997) sind die im RIA gemessenen Werte wegen der hohen Empfindlichkeit und Spezifität des RIAs nicht mit den Werten vergleichbar, die mit kommerziell angebotenen Kits bestimmt werden.

Sowohl in vitro als auch in vivo kommt es trotz hoher endogener ACTH-Plasmakonzentrationen nur zu einer verhältnismäßig geringen Cortisol-Ausschüttung der Nebennierenrindenzellen. Die Ursache dafür ist die unterschiedliche biologische und immunreaktive Aktivität des endogenen ACTHs. Das biologisch-immunreaktive Verhältnis des ACTHs der in dieser Studie untersuchten Plasmaproben lag bei den an ECS erkrankten Pferden zwischen 1:15,3 und 1:84,9, bei den bereits therapierten Pferden zwischen 1:1,4 und 1:21,4 sowie bei den

gesunden Pferden zwischen 1,4:1 und 1:3,2. Demzufolge wird von der tumorös entarteten PI der Hypophyse wesentlich mehr biologisch inaktives ACTH ausgeschüttet. Auch nach Orth und Nicholson (1982) entsteht bei der Prozessierung von pro-OLMC in der tumorösen PI mehr immunreaktives ACTH als biologisch aktives ACTH. In PI-Adenomen waren die Konzentrationen von bioaktivem ACTH genauso hoch wie in der gesunden PI, aber aufgrund der Größe der Adenome überschritten die Gesamtmengen an bioaktivem ACTH der Tumoren die Menge der gesamten gesunden Hypophyse. Die immunreaktiven ACTH-Gesamtmengen in den PI-Tumoren waren sogar noch höher, was nahe legt, dass das immunreaktive ACTH der Tumoren zum Teil biologisch inaktiv ist. Nach Froin et al. (1997, 1998, 1998a) und Orth et al. (1982) unterscheiden sich die neoplastischen melanotropen Zellen von den gesunden melanotropen Zellen in ihrer Enzymausstattung, so dass unter anderem die Acetylierung der Peptide in der gesunden PI und beim ECS variiert. Hierbei zeigen die acetylierten Formen des ACTHs eine weitaus geringere corticosteroidogene Wirkung als die desacetylierten Formen. Unabhängig von der biologischen Wirkung können beide Formen gleichermaßen immunreaktiv bei den Messungen mit den Antiseren reagieren, was zu erhöhten immunreaktiven ACTH-Plasmagehalten bei ausbleibendem adäguaten Anstieg der Cortisol-Konzentration führt.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass beim Pferd auch ACTH-Antagonisten oder Inhibitoren vorhanden sein könnten, die die Aktivität der Nebennierenrinde herabsetzen. Walker et al. (1994) fanden heraus, dass beispielsweise hohe Insulinlevel, wie sie bei cushingoiden Pferden vorkommen, die Cortisol-Freisetzung senken. Da die ACTH-Ausschüttung unbeeinflußt blieb, schlossen sie daraus, dass Insulin nur an der Nebennierenrinde und nicht an der Hypophyse inhibitorisch wirkt. Nach Froin et al. (1998) können auch andere von der tumorös entarteten Pars intermedia gebildeten Peptide, wie α -MSH, β -MSH, CLIP und β -END sowie nach Orth et al. (1998) auch γ_3 -MSH, β -LPH und N-terminale Peptide, die Wirkung von ACTH an der Nebenniere modulieren.

Schließlich könnten auch falsch hohe gemessene ACTH-Basalwerte ein möglicher Grund für die Unverhältnismäßigkeit zwischen der ACTH- und Cortisol-Plasmakonzentration sein. Beispielsweise ähnelt die Aminosäure-Sequenz von α-MSH und CLIP der von ACTH, so dass auch diese Peptide zum Teil mitgemessen werden (Couëtil et al., 1996). Mutschler (1991), Ehrlich und Styvala (1973) sowie Dopouy et al. (1985) beschreiben die Bindung von dem Antikoagulans Heparin an das ACTH. Derartige heparinvernetzte ACTH-Molekülaggregationen bewirken laut Hegstad et al. (1990) eine Herabsetzung der Antigen-Antikörper-Bindung im Radioligandenassay, woraus ebenfalls zu hoch berechnete ACTH-Konzentrationen resultieren.

Der canine Hyperadrenocortizismus ist zu ca. 70% ebenfalls hypophysär bedingt, allerdings handelt es sich dabei um ein Adenom der Pars distalis der Hypophyse. Die Symptome sind auch beim Hund sehr vielfältig und umfassen u.a. Stammfettsucht, talgiges Haarkleid mit Schuppenbildung, Alopezie, Hyperpigmentation der haarlosen, pergamentartigen Haut, Polydipsie, Polyurie, Polyphagie, Trägheit und erhöhte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten. Weiterführende Untersuchungen (Labor, Sonographie) ergeben in den meisten Fällen eine Hepatomegalie mit erhöhten Leberwerten (ALT, AP) und eine herabgesetzte Aktivität des Gonadengewebes. Im Gegensatz zum cushingoiden Pferd weisen Hunde mit Morbus Cushing jedoch häufig niedrige ACTH-Basalwerte (<45 pg/ml), aber stark erhöhte Cortisol-

Plasmakonzentrationen (35-500 ng/ml) auf. Die Ergebnisse des ACTH-Bioassays mit caninen Blutproben, wie sie in einer Parallelstudie eingesetzt wurden, spiegeln die in-vivo-Verhältnisse deutlich wieder. Die Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen fiel nach Zugabe der caninen Proben überschießend aus. Demzufolge scheinen beim Hund noch andere POMC-Peptide bzw. ACTH-ähnliche Fragmente eine corticosteroidogene Wirkung auf die Nebennierenrindenzellen zu haben.

Zu den zu untersuchenden Cushing-Hunden gehörte auch mein eigener Boxer "Fabio", der im Laufe meiner Studienarbeit an Morbus Cushing erkrankte. Er wies die oben genannten typischen Symptome des caninen Hyperadrenocortizismus auf. Seine Basalwerte von 5,3 pg ACTH/ml Plasma bzw. 26,0 ng Cortisol/ml Plasma befanden sich zwar innerhalb des Referenzbereiches (ACTH: < 45 pg/ml bzw. Cortisol: 15-35 ng/ml), letzterer ließ sich jedoch bei Durchführung des Dexamethason-Hemmtestes nicht unter 5 ng/ml supprimieren (die Cortisolwerte lagen 4 bzw. 8 Stunden nach der Dexamethason-Applikation bei 9 bzw. 9,3 ng/ml). Auch die Zugabe seines Blutes führte im ACTH-Bioassay zu einer überschießenden Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen. Unter der eingeleiteten Therapie mit Trilostane (Modrenal®) in einer täglich abwechselnden Dosierung von 60 mg und 120 mg konnte jedoch schon innerhalb der ersten Behandlungswochen eine deutliche Besserung der klinischen Symptome erzielt werden.

Unerklärlicher Weise kam es auch bei dem therapierten Pferd E sowie bei den gesunden Pferden 2 und 4 trotz im IMMULITE® niedrig gemessener ACTH-Basalwerte (Referenz) zu einer deutlichen Stimulation der porcinen Zellen. Das biologisch-immunreaktive Verhältnis des endogenen ACTHs lag bei diesen Proben bei 1:1,4, 1:3,1 und 1:2,6. Die Vermutung, dass das endogene ACTH der Proben während der Lagerung eventuell in biologisch aktive Substanzen zerfallen sein könnte, welche zur Stimulation der porcinen Zellen führen, konnte anhand der Stabilitätsstudie widerlegt werden. Die Ergebnisse zeigen eine relativ gleichbleibende biologische Aktivität von ACTH in den unterschiedlich gelagerten Proben. Bei der Lagerungstemperatur von 4°C konnte sogar ein geringgradiger Abfall der biologischen Aktivität des ACTHs beobachtet werden. Da alle in dieser Studie zu untersuchenden Plasmaproben unter 4°C gelagert wurden, kann den oben genannten Ergebnissen zufolge ein Zerfall in biologisch aktive Fragmente als Grund für die hohe Cortisol-Sekretion der Zellen trotz niedriger ACTH-Basalwerte ausgeschlossen werden.

Demnach muß als mögliche Ursache in Erwägung gezogen werden, dass der Bioassay mit porcinen Nebennierenrindenzellen für equine Blutproben nicht bedingungslos kompatibel ist. Durch diesen Bioassay lassen sich bezüglich der ACTH-stimulierten Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen lediglich Tendenzen aufzeigen. In diesem Zusammenhang könnte die Entwicklung des Bioassays mit equinen Nebennierenrindenzellen unter der gleichen Thematik für Nachfolgestudien von großem Interesse sein.

5.3. Entwicklung der klinischen ECS-Symptomatik

Bei an ECS erkrankten Pferden manifestieren sich trotz physiologischer oder sogar erniedrigter Cortisol-Plasmagehalte klinisch sichtbare ECS-Symptome. Demnach müssen noch andere biologisch aktive Substanzen, wie pro-OLMC-Peptide oder ACTH-Fragmente, an der Entwicklung der klinischen Symptomatik beteiligt sein.

Neben ACTH werden auch hohe α-MSH-, β-MSH-, β-END-, β-LPH, γ-LPH- und CLIP-Gehalte im Plasma cushingoider Pferde gefunden (Froin et al., 1998, 1998a; Couëtil et al., 1996; Mair et al., 1995,1998; van der Kolk et al., 1995a; Heinrichs et al., 1990; Wilson et al., 1982; Orth et al., 1982; Moore et al., 1979 und Gribble, 1972). Millington et al. (1988) und Orth et al. (1982) sprechen von einem vom Basalwert ausgehenden bis zu 60fachen Anstieg der pro-OLMC-Peptide (Tabelle 20). Wilson et al. (1982) und Orth et al. (1982) berichten sogar von einer über 40mal höheren Freisetzung von pro-OLMC-Peptiden im Vergleich zu ACTH (10 gesunde Pferde: 32 ± 5 pg/ml; 2 kranke Pferde: 340-4500 pg/ml).

Pro-OLMC-Peptide	10 gesunde Pferde	2 Cushing-Pferde
α-MSH	24 ± 2 pg/ml	3000 pg/ml 250 pg/ml
β-MSH/β-LPH/γ-LPH	29 ± 2 pg/ml	2000 pg/ml 410 pg/ml
β-END/β-LPH	63 ± 15 pg/ml	11400 pg/ml 2100 pg/ml
CLIP	60 ± 4 pg/ml	4500 pg/ml 340 pg/ml

Tab. 20: Plasmagehalte der pro-OLMC-Peptide bei gesunden und cushingoiden Pferden (nach Millington et al., 1988 und Orth et al., 1982)

Qualitativ sind α -MSH, β -MSH, β -END, γ -LPH und CLIP mit denen der gesunden Pars intermedia vergleichbar. Somit scheinen die vorliegenden Veränderungen der Synthese der pro-OLMC-Peptide beim ECS vorwiegend quantitativ als qualitativ zu sein. Eine qualitative Veränderung der pro-OLMC-Peptide ist jedoch nicht auszuschließen. Millington et al. (1988) konnten in der gesunden Pars intermedia überwiegend N-Acetyl- β -END₁₋₂₇ finden, wohingegen das β -END₁₋₃₁ quantitativ geringer vorhanden war. In der adenomatösen PI stieg dagegen der Gehalt an β -END₁₋₃₁ und N-Acetyl- β -END₁₋₃₁, dabei sanken die Mengen an N-Acetyl- β -END₁₋₂₇ und N-Acetyl- β -END₁₋₂₆ signifikant. Folglich bedeutet dies, dass die Pars intermedia cushingoider Pferde eine signifikant höhere Konzentration an Opiat-aktivem- β -END ausschüttet als das Kontrollgewebe.

Wilson et al. (1982) fanden drei immunreaktive Peptide, die weitaus länger waren, als die Komponenten in der gesunden PI. Alle drei besaßen ACTH₁₁₋₂₄-, ACTH₁₋₃₉-, β-END- und β-LPH-Immunreaktivität. Sie wiesen ein Gewicht von 38,5, 47 und 63 kDa auf. Es wird davon ausgegangen, dass diese Peptide keine physiologischen Translationsprodukte einer

mRNA sind. Unter Umständen liegt eine unvollständige intranukleäre Prozessierung der pro-OLMC-mRNA mit einer Zurückhaltung einer zusätzlich codierenden Nukleotidsequenz vor. Es ist außerdem möglich, dass ein zusätzliches Gen für das pro-OLMC existiert und in den Tumorzellen transkriptiert wird. Ein Beleg dafür könnte das Vorhandensein von einem zweiten Gen für ACTH in den Tumorzellen der Maus (Haralson et al., 1979) und der Ratte (Drouin und Goodman, 1980) sein. Es wird möglicherweise beim gesunden Tier nicht exprimiert, kommt aber im Falle eines Adenoms der PI zum Tragen. Ob bei cushingoiden Pferden eine ähnliche Veränderung vorliegt, ist jedoch bislang nicht geklärt.

MSH stimuliert nach Watson (1996) die Melaninsynthese in den Melanozyten und führt so zur Hyperpigmentation der Haut. Van der Kolk et al. (1993a) vermuten, dass die übermäßige Ausschüttung von MSH bei der Entwicklung des Hirsutismus eine wichtige Rolle spielen könnte. α-MSH steigert in erhöhter Plasmakonzentration das Wachstum der adrenalen Zona arcuata (Produktionsort für Mineralocorticoide, u.a. Aldosteron) und verstärkt die Aldosteron-Sekretion sowie die stimulierenden Effekte von ACTH auf die Aldosteron- und Cortisol-Freisetzung. Zudem reduziert es Entzündungsprozesse. β-MSH stimuliert ebenfalls die Aldosteron-Sekretion (Orth und Kovacs, 1998). γ3-MSH könnte ein adrenale Wachstumsfaktor sein und beeinflußt die Wirkung von ACTH auf die Steroidgenese in der Nebennierenrinde (Orth et al. 1982, 1998).

Die physiologische Funktion von β -LPH ist nach Orth und Kovacs (1998) noch ungeklärt, es hat jedoch eine schwache steroidogene und lipolytische Wirkung, verstärkt die melanotrope Aktivität und beeinflußt ebenfalls die steroidogene Wirkung von ACTH.

β-END ist ein "endogenes opioides Peptid" und spielt im zentralen Nervensystem (ZNS) für die Herabsetzung der Schmerzempfindlichkeit eine große Rolle (Seidel, 1994). Symptome wie Lustlosigkeit, Apathie, Somnolenz und Lethargie sowie andere Verhaltensänderungen (z.B. Unterwürfigkeit) könnten durch erhöhte β-END-Gehalte im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF; Liquor) bedingt sein (Mair et al., 1995, 1998; Assmann et al., 1997; Millington et al., 1988 und Orth et al., 1982) könnten.

Die Wirkung von *CLIP* ist unbekannt, Couëtil et al. (1996) vermuten jedoch, dass es für einige klinische Symptome des Equinen Cushing-Syndroms verantwortlich sein könnte. Nach Orth und Kovacs (1998) ist es ein schwaches Freisetzungshormon für Insulin und könnte die exokrine Pankreasfunktion stimulieren.

Demzufolge werden einige klinische Symptome nicht alleine durch erhöhte Cortisolwerte, sondern möglicherweise durch die qualitativ und quantitativ veränderten pro-OLMC-Peptide verursacht. Okada et al. (1997b) sehen die Entwicklung von ECS im Zusammenhang mit einer Hypersekretion von ACTH und β -END und van der Kolk et al. (1995b) ziehen in Betracht, dass außer Cortisol auch MSH und β -END für die Insulinresistenz verantwortlich sind und so zur Entstehung der Hyperglykämie beitragen. Bei der Untersuchung anderer Spezies fand man heraus, dass POMC-Peptide die Immunfunktion und Resistenz gegenüber

Krankheiten beeinflussen können. Beim Pferd werden pro-OLMC-Peptide als Ursache für die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen ebenfalls diskutiert (Millington et al., 1988).

Neben den endokrin bedingten klinischen Symptomen, ist ein Teil der Symptomatik laut Froin et al. (1997) allein durch das Tumorwachstum erklärbar. Die in der Sella turcica befindlichen neoplastischen Pars intermedia der Hypophyse führt bei entsprechender Expansion zu einem Druck auf den Hypothalamus und beeinflußt damit die kapillären und neuralen Verbindungen zwischen Hypothalamus und Hypophyse. Der Hypothalamus steuert den Fellwechsel, den Appetit und die Temperaturkontrolle, so dass ein raumfordernder Prozeß zu einer Entgleisung dieser Funktionen führen kann, wodurch Hirsutismus, Hyperhidrosis und Tachypnoe entstehen könnten. Auch die seltener vorkommenden zentralnervale Anfälle, Krämpfe und Kreislaufkollaps sind nach Assmann et al. (1997), Froin et al. (1997, 1998) und Mair et al. (1995) vermutlich auf eine Druckatrophie des raumgreifenden Adenoms der Pars intermedia auf das ZNS zurückzuführen. Ebenso können visuelle Störungen durch eine Druckatrophie mit Demyelisierung der Sehnerven am Chiasma opticum hervorgerufen werden, was zur Erblindung des Tieres führen kann.

Abschließend ist zu sagen, dass die Wirkung der einzelnen pro-OLMC-Peptide und anderer ACTH-ähnlichen Fragmente noch weitestgehend ungeklärt ist. Für eine präzisere Klärung wären weiterführende Untersuchungen notwendig, die die Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) für die Differenzierung und Identifizierung der Peptide im Plasma an ECS erkrankter Pferde im Vergleich zur klinischen Symptomatik mit einbeziehen müßten.

Das Equine Cushing-Syndrom: Entwicklung eines ACTH-Bioassays für die Ermittlung des biologisch-immunreaktiven Verhältnisses von endogenem ACTH in equinen Blutproben

Katja Sommer

6. Zusammenfassung

Das Equine Cushing-Syndrom (ECS) galt lange Zeit als eine selten vorkommende und nur bei alten Pferden und Ponys auftretende Erkrankung. Durch eine Vielzahl an wissenschaftlichen Abhandlungen und neu gewonnenen Erkenntnissen sowie einer verbesserten Aufklärung der Tierärzteschaft wurde das ECS in den letzten Jahren jedoch immer häufiger diagnostiziert. Dabei stellen auch jüngere Pferde (bis 10 Jahre) eine ernstzunehmende Patientengruppe dar.

In der vorliegenden Studie wurde ein ACTH-Bioassay mit porcinen Nebennierenrindenzellen entwickelt, um die biologische Aktivität von endogenem ACTH in equinen Plasmaproben messen zu können. Anschließend wurde das biologisch-immunreaktive ACTH-Verhältnis (ACTH-BI-Ratio) beurteilt. Durch die Ermittlung der ACTH-BI-Ratio soll im Bereich der Diagnostik geklärt werden, warum es trotz hoher ACTH-Basalwerte, wie sie im Plasma an ECS erkrankter Pferde häufig vorkommen, zu keiner adäquaten Cortisol-Sekretion der Nebennierenrindenzellen kommt. Die Cortisolwerte befinden sich dabei überwiegend im Referenzbereich oder sind sogar erniedrigt. Die Stimulation der Nebennierenrindenzellen steht somit nicht im Verhältnis zur endogenen ACTH-Sekretion aus der Pars intermedia der Hypophyse. Des weiteren wurde in dieser Arbeit erläutert, warum sich bei erkrankten Pferden trotz niedriger Cortisol-Basalwerte klinische ECS-Symptome manifestieren.

ACTH-Bioassay mit porcinen Nebennierenrindenzellen

Aufgrund der besseren Zellqualität wurden für die Versuche nur Nebennieren von jungen Schlachtschweinen verwendet. Die Auflösung der Zellverbände erfolgte in einem Gewebszerkleinerer unter Zugabe von Kollagenase und speziellem Kulturmedium. Die Blutproben mußten unbehandelt im Bioassay eingesetzt werden, da sich die Steroidabsorption an Aktivkohle sowie die Steroidextraktion mit Lösungsmitteln für die Entfernung des endogenen Cortisols auf die porcinen Zellen hemmend auswirkten. Jedoch konnten für den Bioassay alle Arten an Blutproben (Serum/Plasma) verwendet werden, da weder Serumbestandteile noch Blutzusätze (EDTA, Lithium-Heparin und Aprotinin) den Ablauf des Assays beeinflußten.

Biologisch-immunreaktives Verhältnis von endogenem ACTH (ACTH-BI-Ratio)

Für die Ermittlung der biologischen Aktivität des endogenen ACTHs wurden jeweils 5 Plasmaproben an ECS erkrankter, bereits therapierter sowie gesunder Pferde im ACTH-Bioassay eingesetzt und deren biologische ACTH-Aktivität als Äquivalent von Synacthen[®]

(ACTH₁₋₂₄) mit Hilfe der ACTH-Eichkurve berechnet. Anschließend wurde die biologische Aktivität mit der immunreaktiven Aktivität des endogenen ACTHs ins Verhältnis gesetzt.

Sowohl in vitro als auch in vivo kommt es trotz hoher ACTH-Plasmakonzentrationen nur zu einer verhältnismäßig geringen Cortisol-Ausschüttung der Nebennierenrindenzellen. Dies liegt an der unterschiedlichen biologischen und immunreaktiven Aktivität des endogenen ACTHs. Das biologisch-immunreaktive Verhältnis des ACTHs der in dieser Studie untersuchten Plasmaproben lag bei den an ECS erkrankten Pferden zwischen 1:15,3 und 1:84,9, bei den bereits therapierten Pferden zwischen 1:1,4 und 1:21,4 sowie bei den gesunden Pferden zwischen 1,4:1 und 1:3,2. Demzufolge wird von der tumorös entarteten Pars intermedia der Hypophyse wesentlich mehr biologisch inaktives ACTH ausgeschüttet.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass beim Pferd auch ACTH-Antagonisten oder Inhibitoren vorhanden sein könnten, die die Aktivität der Nebennierenrinde herabsetzen. In diesem Zusammenhang wurden hohe Insulinlevel und von der tumorös entarteten Pars intermedia vermehrt sezernierte Peptide, wie α -MSH, β -MSH, CLIP, β -END, γ ₃-MSH, β -LPH und N-terminale Peptide, als mögliche Faktoren angeführt.

Schließlich könnten auch falsch hohe gemessene ACTH-Basalwerte ein möglicher Grund für die Unverhältnismäßigkeit zwischen der ACTH- und Cortisol-Plasmakonzentration sein. Als Ursachen werden die Messung von ACTH-ähnlichen Aminosäure-Sequenzen bei anderen Pro-Opiolipomelanocortin(pro-OLMC-)Peptiden sowie heparinvernetzte ACTH-Molekülaggregationen diskutiert.

Unerklärlicher Weise kam es aber auch bei einem der therapierten Pferde und bei zwei der gesunden Pferde trotz im IMMULITE® niedrig gemessener ACTH-Basalwerte (Referenz) zu einer deutlichen Stimulation der porcinen Zellen. Das biologisch-immunreaktive Verhältnis des endogenen ACTHs lag bei diesen Proben bei 1:1,4, 1:3,1 und 1:2,6. Die Vermutung, dass das endogene ACTH während der Lagerung der Proben eventuell in biologisch aktive Substanzen zerfallen sein könnte, welche zur Stimulation der porcinen Zellen führen, konnte im Rahmen einer Stabilitätsstudie widerlegt werden. Demnach muß in Erwägung gezogen werden, dass der Bioassay mit porcinen Nebennierenrindenzellen für equine Blutproben nicht bedingungslos kompatibel ist. Durch diesen Bioassay lassen sich für die ACTH-stimulierte Cortisol-Ausschüttung der porcinen Zellen lediglich Tendenzen aufzeigen.

Entwicklung der klinischen ECS-Symptomatik

Bei an ECS erkrankten Pferden manifestieren sich trotz physiologischer oder sogar erniedrigter Cortisol-Plasmagehalte klinisch sichtbare ECS-Symptome. Demnach müssen noch andere biologisch aktive Substanzen, wie pro-OLMC-Peptide (α -MSH, β -MSH, β -END, β -LPH, γ -LPH, CLIP und γ ₃-MSH) oder ACTH-Fragmente, die qualitativ oder quantitativ verändert aus dem tumorösen Hypophysenzwischenlappen freigesetzt werden, an der Entwicklung der klinischen Symptomatik beteiligt sein.

Neben den endokrin bedingten klinischen Symptomen, könnte ein Teil der Symptomatik auch allein durch das Tumorwachstum verursacht werden. Durch die Expansion der Neoplasie wird Druck auf den Hypothalamus ausgeübt, wodurch kapilläre und neurale Verbindungen zwischen Hypothalamus und Hypophyse geschädigt werden und es so zu einer Entgleisung der hypothalamischen Funktionen kommt.

The equine Cushing syndrome: Development of an ACTH-Bioassay for determination of the biological-immunoreactive-ratio of endogenous ACTH in equine blood samples

Katja Sommer

7. Summary

The Equine Cushing syndrome (ECS) has been considered a rare disease confined to old horses and ponies in the past. Through a lot of scientific dissertations and the latest findings as well as a better informed veterinary profession ECS however was diagnosed more frequently. Younger horses (up to 10 years) occasioned to be a serious group of patients.

In the present study ACTH-Bioassay was developed with porcine adrenocortical cells, to be able to measure the biological activity of endogenous ACTH in equine plasma samples. Subsequently the biological-immunoreactive-ratio of endogenous ACTH (ACTH-BI-ratio) was rated. By establishing the ACTH-BI-ratio, it shall be clarified on the field of diagnostics, why there is no adequate cortisol secretion of the adrenocortical cells in spite of high basal ACTH measurements, as are often found in plasma of affected ECS horses. The cortisol levels are mainly found in the reference range or are even reduced. The stimulation of adrenocortical cells is consequently not in proportion to the endogenous ACTH-secretion of the pars intermedia of the pituitary. In addition this paper explains why clinical symptoms are manifest in affected horses in spite of low base cortisol values.

ACTH-Bioassay with porcine adrenocortical cells

Only adrenal glands of young slaughter pigs were used, because of the better quality of the cells. The dissolution of the tissue took place in a tissue chopper by adding of collagenase and a special culture medium. The blood samples had to be used in the bioassay untreated, because the steroid absorption on activated carbon as well as the steroid extraction with solvent for the removal of endogenous cortisol has inhibitory effects on the porcine cells. For the bioassay however all kinds of blood samples (serum/plasma) could be used, as neither serum components nor blood additives (EDTA, Lithium-Heparin and Aprotinin) influence the bioassay.

Biological-immunoreactive-ratio of endogenous ACTH (ACTH-BI-ratio)

For determination of biological activity of the endogenous ACTH five plasma samples each of ECS affected, already treated and healthy horses were applied into the ACTH-Bioassay and their biological ACTH activity was determined as equivalent of Synacthen® (ACTH₁₋₂₄) by

means of the ACTH calibration curve. Subsequently the biological activity was put in proportion to the immunoreactive activity of the endogenous ACTH.

As well as in vitro as in vivo there is only a relatively low cortisol secretion of the adrenocortical cells in spite of high ACTH plasma concentration. The reason for this lies in the difference between the biological activity and the immunoreactivity of the endogenous ACTH. The biological-immunoreactive-ratio of endogenous ACTH of the plasma samples examined in this study ranged with the ECS affected horses between 1:15,3 and 1:84,9, with the already treated horses between 1:1,4 and 1:21,4 and with the healthy horses between 1,4:1 and 1:3,2. Consequently there is significantly more biologically inactive ACTH secreted from the tumorous deformed pars intermedia of the pituitary gland.

An other possible explanation could be, that there could exist ACTH antagonists or inhibitors in a horse, that decrease the activity of the adrenal cortex. In this context high insulin levels and increased release of peptides of the tumorous deformed pars intermedia, as α -MSH, β -MSH, CLIP, β -END, γ_3 -MSH, β -LPH and N-terminal peptides, are mentioned as possible factor.

Finally faulty high measured basal ACTH values could be a reason for the disproportion between ACTH and cortisol plasma concentration. As a cause the measurement of ACTH like amino-acid sequences from other pro-opiolipomelanocortin(pro-OLMC-) peptides as well as ACTH molecular aggregations caused by heparin are discussed.

Unaccountably there occurred a marked stimulation of the porcine cells in one of the treated horses and in two of the healthy horses as well in spite of low measured basal ACTH values (reference range) in IMMULITE®. The biological-immunoreactive-ratio of endogenous ACTH in this samples ranged between 1:1,4, 1:3,1 and 1:2,6. The theory that the endogenous ACTH could have divided into biological active substances, which lead to stimulation of the porcine cells, during storage, could be defeated in the course of a study on stability of ACTH. Consequently it has to be taken into consideration, that the bioassay with porcine adrenocortical cells is not absolutely compatible with equine blood samples. Through this bioassay it is only possible to demonstrate tendencies regarding ACTH stimulated cortisol secretion of the porcine cells.

Development of clinical ECS signs

In ECS affected horses clinically evident ECS signs show, in spite of physiologically or even decreased cortisol plasma levels. Consequently other biological active substances like pro-OLMC-peptides (α -MSH, β -MSH, β -END, β -LPH, γ -LPH, CLIP and γ_3 -MSH) or ACTH fragments, which are released from the tumorous intermediate lobe of the pituitary gland altered in quality or in quantity, have to participate in the development of clinical signs.

Next to the endocrinously caused clinical signs, a part of the signs could be caused by the growth of the tumour alone. Through the expansion of the neoplasm pressure is put on the hypothalamus, whereby capillary and neural connections between hypothalamus and pituitary gland are damaged and consequently a dysfunction of the hypothalamus results.

8. Literaturverzeichnis

Alexander, S.L., Irvine, C.H., Ellis, M.J. u. Donald, R.A. (1991):

The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginin vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse Endocrinology, 128 (1): 65-72

Alexander, S.L., Irvine, C.H. u. Donald, R.A. (1996):

Dynamics of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses Front. Neuroendocrinol., 17 (1): 1-50

Alexander, S.L., Roud, H.K., Irvine, C.H. (1997):

Effect of insulin-induced hypoglycaemia on secretion patterns and rates of corticotrophinreleasing hormone, arginine vasopressin and adrenocorticotrophin in horses J. Endocrinol., 153 (3): 401-409

Alexander, S.L., Irvine, C.H. (2000):

The effect of the alpha-2-adrenergic agonist, clonidine, on secretion patterns and rates of adrenocorticotropic hormone and its secretagogues in the horse Neuroendocrinology, 12 (9): 874-880

Allen, J.R., Barbee, D.D., Crisman, M.V. (1988):

Diagnosis of equine pituitary tumors by computed tomography, Part I Comp. Cont. Educ. Pract. Vet., 10: 1103-1106

Allen, J.R., Barbee, D.D., Crisman, M.V. (1998):

Diagnosis of equine pituitary tumors by computed tomography, Part II Comp. Cont. Educ. Equine, 10 (10): 1196-1200

Amann, J.F., Smith, R.M., Ganjam, V.K., Paull, W.K., McClure, R.C., Green, E.M. u. Garner, H.E. (1987):

Distribution and implications of beta-endorphin and ACTH-immunoreactive cells in the intermediate lobe of the hypophysis in healthy equids

Am. J. Vet. Res., 48 (2): 323-327

Assmann, G., Weiss, S., Baur, T. u. Froin, H.R. (1997):

Das equine Cushing-Syndrom – Klinisches Bild BPT-Kongreß Münster, S. 149-150

Auer, D.E., Wilson, R.G., Groenendyk, S. u. Filippich, L.J. (1987):

Glucose metabolism in a pony mare with a tumour of the pituitary gland pars intermedia Australian Veterinary J., 64 (12): 379-382

Autefage, A., Alvinierie, M. u. Toutain, P.L. (1986):

Synovial fluid and plasma kinetics of methylprednisolone and methylprednisolone acetate in horses following intra-articular administration of methylprednisolone acetate Equine Vet. J., 18: 193-198

Babson, A.L. (1991):

The IMMULITE automated system J. Clin. Immunoassay, 14: 83-88

Baker, H.W.G., Baker, I.D.C., Epstein, V.M. u. Hudson, B. (1982):

Effect of stress on steroid hormone levels in racehorses

Austr. Vet. J., 58: 70-71

Beech, J. (1983):

Tumors of the pituitary gland (pars intermedia)

In: Robinson, N.E. (Hrsg.)

Current Therapy in Equine Medicine

2. Aufl., W.B. Saunders Co., Philadelphia, S. 182-185

Beech, J. u. Garcia, M. (1985):

Hormonal response to thyrotropin-releasing-hormone in healthy horses and in horses with pituitary adenoma

Am. J. Vet. Res., 46 (9): 1941-1943

Beech, J. (1987):

Tumors of the pituitary gland (pars intermedia)

In: Robinson, N.E. (Hrsg.)

Current therapy in equine medicine 2

W.B. Saunders, Philadelphia, S.: 182-185

Beech, J. (1999):

Chapter 18: Endocine system

In: Colahan, P.T., Mayhew, I.G., Merrt, A.M. u. Moore, J.N. (Hrsg.)

Equine Medicine and Surgery

5. Aufl., Mosby-Verlag; S.: 1947-1966

Berson, S.A. u. Yalow, R.S. (1968):

Radioimmunoassay of ACTH in Plasma

J. Clin. Investigation, 47: 2725-2749

Bevier, D.E. (1991):

Haircoat abnormalities

In: Colahan, P.T., Mayhew, I.G., Merritt, A.M. u. Moore, J.N. (Hrsg.)

Equine Medicine and Surgery

Edition 4, Vol. 1, Goleta, American Veterinary Puplications, S. 23-24

Bickhardt, K. (1992):

Enzyme

In: Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S.: 118-122

Bottoms, G.D., Roesel, O.F., Rausch, F.D. u. Akins, E.L. (1972):

Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares Am. J. Vet. Res., 33: 785-790

Boujon, C.E., Bestetti, G.E., Meier, H.P., Straub, R., Junker, U. u. Rossi, G.L. (1993):

Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study

J. Comp. Pathol., 109 (2): 163-178

Brüns, C. (2001):

Diagnose und Therapieverlauf des equinen Cushing-Syndroms – Rolle des endogenen ACTH Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation, S. 1-83

Caloni, F., Spotti, M., Villa, R., Mariani, C., Montana, M. u. Pompa, G. (1999):

Hydrocortisone levels in the urine and blood of horses treated with ACTH Equine Vet. J., 31 (4): 273-276

Church, D.B., Evans, D.L., Lewis, D.R. u. Rose, R.J. (1987):

The effect of exercise on plasma adrenocorticotrophin, cortisol and insulin in the horse and adaptations with training

In: Gillespie, J.R. u. Robinson, N.E. (Hrsg.)

Equine exercise physiology II

ICEEP Publications, Davis, S.: 506-515

Cohen, N.D. u. Carter, G.K. (1992):

Steroid hepatophaty in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism J. Am. Vet. Med. Ass., 200 (11): 1682-1684

Couëtil, L. (1996):

Clinical response and plasma adrenocorticotropin concentration in horses with Equine Cushing's disease treated with cyproheptadine

AAEP Proceedings, 42: 297-298

Couëtil, L., Paradis, M.R. u. Knoll, J. (1996):

Plasma adrenocorticotropin concentration in healthy horses and in horses with clinical signs of hyperadrenocorticism

J. Vet. internal Medicine, 10 (1): 1-6

Cudd, T.A., LeBlanc, M., Silver, M., Norman, W., Madison, J., Keller-Wood, M. u. Wood, C.E. (1995):

Ontogeny and ultradian rhythms of adrenocorticotropin and cortisol in the late gestation fetal horse

J. Endocrinol., 144 (2): 271-283

Döcke, F. (1999):

Krankheiten der endokrinen Organe: Überfunktion der Nebennierenrinde (Cushing-Syndrom) In: Dietz, O. u. Huskamp, B. (Hrsg.)

Handbuch Pferdepraxis

2. Aufl., Enke-Verlag, S.: 618-619

DPC Biermann GmbH (2000):

Ein Unternehmen der DPC (Diagnostic Products Corporation) ACTH- und Cortisol-IMMULITE $^{\mathbb{R}}$

Broschüre zum IMMULITE[®], Bad Nauheim, 2000

Drouin, J. u. Goodman, H.M. (1980):

Most of the coding region of rat ACTH β -LPH precursor gene lacks intervening sequences Nature, 288: 610

Dupouy, J.P., Chatelain, A. u. Godaut, M. (1985):

Influences of heparin on ACTH distribution and immunoreactivity in plasma of the rat J. Physiol., 76: 631-635

Dybdal, N.O., Hargreaves, K.M., Madigan, J.E., Gribble, D.H., Kennedy, P.C. u. Stabenfeldt, G.H. (1994):

Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses J. Am. Vet. Med. Assoc., 204 (4): 627-632

Ehrlich, J. u. Styvala, S.S. (1973):

Chemistry and pharmacology of heparin

J. Pharmacol. Sci., 62: 517-544

Eiler, H., Goble, D. u. Oliver, J. (1979a):

Adrenal gland function in the horse: Effects of cosyntropin (synthetic) and corticotropin (natural) stimulation

Am. J. Vet. Res. 40 (5): 724-726

Eiler, H., Oliver, J. u. Goble, D. (1979b):

Adrenal gland function in the horse: Effects of dexamethasone on hydrocortisone secretion and blood cellularity and plasma electrolyte concentrations

Am. J. Vet. Res., 40: 727-729

Eiler, H., Oliver, J. u. Goble, D. (1980):

Combined dexamethason-suppression cosynthropin- (synthetic ACTH-) stimulation test in the horse: a new approach to testing of adrenal gland function

Am. J. Vet. Res., 41 (3): 430-434

Eiler, H., Oliver, J.W., Andrews, F.M., Fecteau K.A., Green, E.M. u. McCracken, M. (1997):

Results of a combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test in healthy horses and horses suspected to have a pars intermedia pituitary adenoma J. Am. Vet. Med. Assoc., 211 (1): 79-81

Engler, D., Redei, E. u. Kola, I. (1999):

The Corticotropin-Release Inhibitory Factor Hypothesis: A Review of the Evidence for the Existence of Inhibitory as well as Stimulatory Hypophysiotropic Regulation of Adrenocorticotropin Secretion and Biosynthesis

Endocr. Rev., 20 (4): 460-500

Evans, D.R. (1972):

The recognition and diagnosis of a pituitary tumor in the horse

Proceedings of the Anual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 18: 417-419

Evans, L.H., Siegel, E.T. u. Hubben, K. (1968):

Clinicopathologic Conference

J. Am. Vet. Med. Assoc., 152: 1778-1786

Evans, M.J., Marshall, A.G., Kitson, N.E., Summers, K., Donald, R.A. (1993):

Factors affecting ACTH release from perifused equine anterior pituitary cells J. Endocrinol., 137 (3): 391-401

Feige, K., Eser, M.W., Geisbühler, U., Balestra, E. u. Metzler, K. (2000):

Klinische Symptomatik und diagnostische Möglichkeiten des Hypophysenadenoms beim Pferd

Pferdeheilkunde 16: 200-201

Schweiz Archiv Tierheilk. 142: 49-54

Fey, K., Jonigkeit, E. u. Moritz, A. (1998):

Zum equinen Cushing-Syndrom (ECS): Fallbericht, Literaturauswertung zu Diagnostik und Therapie sowie wesentliche Unterschiede zum Cushing-Syndrom des Hundes Tierärztl. Praxis, 26 (1): 41-47

Field, J.R. u. Wolf, C. (1988):

Cushing's syndrome in a horse Equine Vet. J., 20 (4): 301-304

Fix, A.S. u. Miller, L.D. (1987):

Equine adrenocortical carcinoma with hypercalcemia Vet. Pathol., 24 (2):190-192

Flisinska-Bojanowska, A., Skwarlo, K., Lukaszewska, J., Bobilewicz, D. Wilk, M. u. Gill, J. (1974):

Diurnal variations of serum cortisol and PBI in the thoroughbred horse and effect of physical effort on plasma cortisol concentration

Bull. Acad. Pol. Sci., 22: 719-724

Freestone, J.F. u. Melrose, P.A. (1995):

Chapter 49: Endocrine Diseases

In: Kobluk, C.N., Ames, T.R. u. Geor, R.J. (Hrsg.)

The Horse – Diseases and Clinical Management

W.B. Saunders Co., Vol. II, Philadelphia, S.: 1137-1148

Froin, H.R. (1997):

Das equine Cushing-Syndrom: Klinisches Bild und Labordiagnostik Congrès de médicine et chirurgie équine, Genève, S.: 149-150

Froin, H.R., Assmann, G. u. Hoppen, H.-O. (1997):

Pathophysiologie und Diagnostik der hypophysären Dysfunktion der Pars intermedia BPT-Kongreß Münster, S. 151-154

Froin, H.R. (1998a):

Diagnosis of Equine Cushing's Syndrome by ACTH Measurement In: DPC® Technical Report (Diagnostic Products Corporation), Los Angeles, S.: 1-3

Froin, H.R. (1998b):

Die ACTH-Bestimmung als Testverfahren zur Diagnose des equinen Cushing (Dysfunktion der Pars intermedia der Hypophyse)

Proc. 7. Jahrestag der DVD Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik, München

Froin, H.R., Assmann, G. u. Hoppen, H.-O. (1998):

Das equine Cushing-Syndrom

Prakt. Tierarzt, coll. vet. XXVIII, S.: 16-21

Garcia, M.C. u. Beech, J. (1986):

Equine intravenous glucose tolerance test: glucose and insulin response of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma

Am. J. Vet. Res., 47 (3): 570-572

Gibson, S., Pollock, A., Littley, M., Shalet, S. u. White, A. (1989):

Advantages of IRMA over RIA in the measurement of ACTH Am. Clin. Biochem., 26: 500-507

Glardon, O. u. Schatzmann, U. (1982):

L'influence de l'ACTH sur le taux de cortisol plasmatique et sur l'image sanguine du cheval Schw. Arch. Tierheilk. 124: 435-445

Gosling, J.P. (2000):

Chapter 1: Analysis by spezific binding In: Immunoassays

Oxford University Press, S.: 1-17

Gribble, D.H. (1972):

The endocrine system In: Catcott, E.J. u. Smithcors, J. F. (Hrsg.) Equine Medicine and Surgery

2. Aufl., Amer. Vet. Public., Wheaton IL, S. 433

Guthrie, G.P., Cecil, S.G. u. Kotchen, T.A. (1980):

Renin, aldosteron and cortisol in the thoroughbred horse J. Endocr., 85: 49-53

Hagedorn, H.W. u. Schulz, R. (1997):

Cortisol levels in blood and urine of trotting horses Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 110 (11-12): 456-460

Haralson, M.A., Fairfield, S.J., Nicholson, W.E., Harrison, R.W. u. Orth, D.N. (1979):

Cell-free synthesis of mouse corticotropin

J. Biol. Chem., 254: 2172

Harman, J. u. Ward, M. (2001):

The role of nutritional therapy in the treatment of equine Cushing's syndrome and laminitis Altern. Med. Rev., 6 Suppl.: 4-16

Hegstad, R.L., Johnston, S.D. u. Pasternak, D.M. (1990):

Effects of sample handling on adrenocorticotropin concentration measured in canine plasma, using a commercially available radioimmunoassay kit

J. Vet. Res., 51: 1141-1147

Heinrichs, M., Baumgärtner, W. u. Capen, C.C. (1990):

Immunocytochemical demonstration of proopiomelanocortin-derived peptides in pituitary adenomas of the pars intermedia in horses

Vet. Pathol., 27 (6): 419-425

Herrtage, M.E. (1996):

Kapitel 4: Nebennieren

In: Hutchison, M. (Hrsg.), Döcke, F. (deutsche Übersetzung)

Kompendium der Endokrinologie, Hund und Katze

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co., Hannover, S.: 74-103

Hillyer, M.H., Taylor, F.C.R., Mair, T.S., Murphy, D., Watson, T.D.G. u. Love, S. (1992):

Diagnosis of hyperadrenokorticism in the horse

Equine Vet. Education, 4 (3): 131-134

Hodson, N.P., Wright, J.A. u. Hunt, J. (1986):

The sympatho-adrenal system and plasma levels of adrenocorticotropic hormone, cortisol and catecholamines in equine grass sickness

Veterinary Record, 119 (6): 148-150

Hoffsis, G.F. u. Murdick, P.W. (1970):

The plasma concentrations of corticosteroids in normal and diseased horses

J. Am. Vet. Med. Assoc., 157 (11): 1590-1594

Hoffsis, C.F., Murdick, P.W., Tharp, V.L. u. Ault, K. (1970):

Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in the normal horse

Am. J. Vet. Res., 31 (8): 1379-1387

Holzbauer, M. u. Racke, K. (1985):

The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland

Med. Biol., 63 (3): 97-116

Horvath, C.J., Ames, T.R., Metz, A.L. u. Larson, V.L. (1988):

Adrenocorticotropin-containing neoplastic cells in a pars intermedia adenoma in a horse J. Am. Vet. Med. Assoc., 192 (3): 367-371

James, V.H., Horner, M.W., Moss, M.S. u. Rippon, A.E. (1970):

Adrenocortical function in the horse

J. Endocinol., 48 (3): 319-335

Johansson, B. u. Segall, T. (1994):

Meningiom – en ovanlig tumörform hos häst

Svensk Veterinär Tidning, 46: 123-126

Klein, H.-J., Deegen, E., Hoogen, H. u. Hoppen, H.-O. (1989):

Funktionstest der equinen Nebennierenrinde

Pferdeheilkunde 5, S.: 225-230

Knol, B.W., Dielemann, S.J., Bevers, M.M., van den Brom, W. u. Mol, J.A. (1992):

Effects of methods used for blood collection on plasma concentrations of luteinising hormone, testosterone, and cortisol in male dogs

Vet. Q., 14: 126-129

Kolk, J.H. van der, Klein, W.R., Putten S.W. van der u. Mol, J.A. (1991):

A horse with Cushing's disease

Tijdschr. Diergeneeskd., 116 (13): 670-675

Kolk, J.H. van der, Kalsbeek, H.C., Garderen, E. van, Wensing, T. u. Breukink, H.J. (1993a):

Equine pituitary neoplasia: a clinical report of 21 cases (1990-1992)

Vet. Rec., 133 (24): 594-597

Kolk, J.H. van der, Kalsbeek, H.C., Wensing, T. u. Breukink, H.J. (1993b):

Equine Hyperadrenokorticism – A report of 40 cases (1990-1993)

Proceedings of the 3rd Congress of the World Equine Veterinary Association, Geneva, Switzerland, S. 17

Kolk, J.H. van der, Hoorn, C.J. van, Garderen, E. van u. Belt, A.J. van den (1993c):

Anorexia in a pony with Cushing's disease

Tijdschr. Diergeneeskd., 118 (9): 298-300

Kolk, J.H. van der, Kalsbeek, H.C., Wensing, T. u. Breukink, H.J. (1994a):

Urinary concentration of corticoids in normal horses and horses with hyperadrenokorticism Res. Vet. Sci., 56 (1): 126-128

Kolk, J.H. van der, Mars, M.H. u. Gaag, I. van der (1994b):

Adrenocortical carcinoma in a 12-years-old mare

Vet. Rec., 134 (5): 113-115

Kolk, J.H. van der (1995):

Diagnosis of equine hyperadrenocorticism

Equine Practice, 17 (1): 24-27

Kolk, J.H. van der, Wensing, T., Kalsbeek, H.C. u. Breukink, H.J. (1995a):

Laboratory diagnosis of equine pituitary pars intermedia adenoma

Domestic Animal Endocrinology, 12: 35-39

Kolk, J.H. van der, Wensing, T., Kalsbeek, H.C. u. Breukink, H.J. (1995b):

Lipid metabolism in horses with hyperadrenokorticism

J. Am. Vet. Med. Assoc., 206 (7): 1010-1012

Kolk, J.H. van der (1997):

Equine Cushing's disease Equine Vet. Educ., 9: 209-214

Kolk, J.H. van der, Ijzer, J., Overgaauw, P.A. u. Linde-Sipman, J.S. van der (2001a):

Pituitary-independent Cushing's syndrome in a horse

Equine Vet. J., 33 (1): 110-112

Kolk, J.H. van der, Nachreiner, R.F., Schott, H.C., Refsal, K.R. u. Zanella, A.J. (2001b):

Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease

Equine Vet. J., 33 (2): 211-213

Kroneman, J. (1999):

In: Wintzer, H.-J. (Hrsg.)

Krankheiten des Pferdes

3. Aufl., Parey Verlag, S.: 520-521

Labhart, A. u. Müller, J. (1978):

D. Physiologie

In: Labhart, A. (Hrsg.)

Klinik der inneren Sekretion

3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.: 297-311

Larsson, M., Edquist, L.-E., Ekman, L. u. Persson, S. (1979):

Plasma cortisol in the horse, diurnal rhythm and effects of exogenous ACTH

Acta Vet. Scand. 20 (1): 16-24

Levy, M. (1993):

Radiological diagnosis of pituitary adenoma in the horse

Proc. 3rd Cong. World Equine Vet. Assoc., S.: 115-118

Liotta, A.S., Suda, T. u. Krieger, D.T. (1978):

Beta-Lipotropin is the major opioid-like peptide of human pituitary and rat pars distalis: lack of significant beta-endorphin

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (6): 2950-2954

Löscher, W., Ungemach, F.R. u. Kroker, R. (1994):

Fluorierte Glukokortikoide: Triamcinolon

Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren

2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S.: 340-341

Love, S. (1993):

Equine Cushing's disease

Br. Vet. J., 149 (2): 139-153

MacHarg, M.A., Bottoms, G.D., Carter, G.K. u. Johnson, M.A. (1985):

Effects of multiple intramuscular injections and doses of dexamethasone on plasma cortisol concentrations and adrenal responses to ACTH in horses

Am. J. Vet. Res., 46 (11): 2285-2287

Mair, T.S., Freestone, J., Hillyer, M.M., Love, S. u. Watson, E.D. (1995):

The endocrine system

In: Higgins, A.J. u. Wright, I.M. (Hrsg.)

The equine Manual

W.B. Saunders Co., London, S.: 541-565

Mair, T.S., Love, S., Schumacher, J. u. Watson, E.D. (1998):

Chapter 9: Endocrinology

In: Equine Medicine, Surgery and Reproduction

W.B. Saunders Co., S. 182-185

Mazan, M.R. (1997):

Medical management of a full-thickness tear of the retroperitoneal portion of the rectum in a horse with hyperadrenocorticism

JAVMA, 210 (5): 665-667

McDonald, L.E. (1980):

Chapter 7: The adrenal cortex

In: Veterinary Endokrinology and Reproduction

3. Aufl., Lea & Febiger, Philadelphia, S.: 168-195

McFarlane, D., Sellon, D.C., Gaffney, D., Hedgpeth, V., Papich, M. u. Gibbs, S. (1998):

Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses

Am. J. Vet. Res., 59 (10): 1247-1251

Millington, W.R., Dybdal, N.O., Dawson, R. Jr., Manzini, C. u. Mueller, G.P. (1988):

Equine Cushing's disease: differential regulation of beta-endorphin processing in tumors of the intermediate pituitary

Endocrinology, 123 (3): 1598-1604

Moore, J.N., Steiss, J., Nicholson, W.E., Orth, D.N. (1979):

A case of pituitary adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome in the horse Endocrinology, 104 (3): 576-582

Müller, J. (1978):

7. Chemie des Corticortopins (ACTH) und der Melanotropine (MSH)

In: Labhart, A. (Hrsg.)

Klinik der inneren Sekretion

3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.: 296-297

Munoz, M.C., Doreste, F., Ferrer, O., Gonzalez, J. u. Montoya, J.A. (1996):

Pergolide treatment for Cushing's syndrome in a horse

Vet. Rec., 139 (2): 41-43

Mutschler, E. (1991):

Arzneimittelwirkungen

In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie

6. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart

Nathanielsz, P.W., Rossdale, P.D., Silver, M. u. Comline, R.S. (1975):

Studies on fetal, neonatal and maternal cortisol metabolism in the mare

J. Reprod. Fert. (Suppl.), 23: 625-630

Nickel, R., Schummer, A. u. Seiferle, E. (1992):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere

Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen

3. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S.: 117-132, 477-482, 491-496

Okada, T., Shimomuro, T., Oikawa, M., Nambo, Y., Kiso, Y., Morikawa, Y., Liptrap, R.M., Yamashiro, S., Little, P.B. u. Sasaki, F. (1997a):

Immunocytochemical lokalisation of adrenocorticotropic hormone-immunoreactive cells of the pars intermedia in thoroughbreds

Am. J. Vet. Res., 58 (8): 920-924

Okada, T., Yuguchi, K., Kiso, Y., Morikawa, Y., Nambo, Y., Oikawa, M. u. Sasaki, F. (1997b):

A case of a pony with Cushing's disease

J. Vet. Med. Sci., 59 (8): 707-710

Orth, D.N. (1979):

Chapter 8:

Adrenocorticotropic hormone and melanocyte stimulating hormone (ACTH and MSH)

In: Jaffe, B.M. u. Behrman, H.R. (Hrsg.)

Methods of hormone radioimmunoassay

2. Aufl., Academic Press, New York, S. 125-155

Orth, D.N., Holscher, M.A., Wilson, M.G., Nicholson, W.E., Plue, R.E. u. Mount, C.D. (1982):

Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiolipomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests

Endocrinology, 110 (4): 1430-1441

Orth, D.N., Nicholson, W.E. (1982):

Bioactive and immunoreaktive adrenocorticotropin in normal equine pituitary and in pituitary tumors of horses with Cushing's disease

Endocrinology, 111 (2): 559-563

Orth, D.N. u. Kovacs, W.J. (1998):

Chapter 12: The adrenal cortex

In: Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M. u. Larson, P.R. (Hrsg.)

Williams textbook of endocrinology

9. Aufl., W.B. Saunders, Philadelphia, S.: 517-614

Pallaske, G. (1932):

Zur Kasuistik seltener Geschwülste bei den Haustieren

Zeitung für Krebsforschung, 36, S.: 342

Persson, S.B.G., Larsson, M. u. Lindholm, A. (1980):

Effects of training on adreno-cortical function and red-cell volume in trotters Zbl. Vet. Med., 27: 261-268

Petazzi, F., Zarrilli, A. u. Ceci, L. (1983):

Comportamento del T₃, T₄ e del cortisolo in cavalli adulti sottoposti a stress da trasporto Obiett. Doc. Vet., 4: 55-56

Raker, C.W. u. Fegley, H. (1965):

Clinicopathologic Conference

J. Am. Vet. Med. Assoc., 147: 848-860

Robertson, W.R. u. Bidey, S.P. (1990):

Chapter 10: Bioassay of peptide hormones using primary cells of the target organ

In: Hutton, J.C. u. Siddle, K. (Hrsg.)

Peptide Hormone Secretion - A Practical Approach

Irl. Press. at Oxford University Press, S.: 143-157

Rohde, W. (1994):

Kapitel 3: Biochemie, Struktur und Nachweis der Peptidhormone

In: Döcke, F. (Hrsg.)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

3. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S.: 63-64

Schierz, H.G. (1988):

Zur Bestimmung von Triamcinolonacetomid und Kortisol bei Pferd und Hund, insbesondere bei der Ankaufsuntersuchung des Pferdes

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation

Schott, H.C., Courson, C.L., Eberhart, S.W., Nachreiner, R.F., Refsal, K.R., Ewart, S.L. u. Martenuik, J.V. (2001):

The Michigan Cushings Project: A preliminary report

Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing

Seger, M. u. Bennett, H. (1986):

Structure and bioactivity of the amino-terminal of pro-opiomelanocortin J. Steroid Biochem., 25 (5B): 703-710

Shanker, G. u. Sharma, A. (1979):

Beta-endorphin stimulates corticosterone synthesis Biochem. Biophys. Res. Commun., 86: 1-5

Seidel, H. (1994):

Kapitel 13: Nebennierenrinde

In: Döcke, F. (Hrsg.)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

3. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S.: 309-347

Singh, A.K., Jiang, Y., White, T. u. Spassova, D. (1997):

Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses

J. Vet. Diagn. Invest., 9 (3): 261-268

Snow, D.H. u. Munro, C.D. (1975):

Changes in blood levels of several hormones following ACTH administration and during exercise

Proc. 1st Int. Symp. Equine Hematology, East Lansing, S.: 481-489

Snow, D.H. u. Rose, R.J. (1981):

Hormonal changes associated with long distance exercise Equine Vet. J., 13: 195-197

Thompson, J.C., Ellison, R., Gillett, R. u. Badcoe, L. (1995):

Problems in the diagnosis of pituitary adenoma (Cushing's syndrome) in horses New Zealand Vet. J., 43: 79-82

Thorner, M.O., Vance, M.L., Laws, E.R., Horvath, E. u. Kovacs, K. (1998):

Chapter 9: The anterior pituitary

In: Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M. u. Larson, P.R. (Hrsg.)

Williams textbook of endocrinology

9. Aufl., W.B. Saunders, Philadelphia, S.: 249-340

Toutain, P.L., Brandon, R.A., Pomyers, H., Alvinierie, M. u. Baggot, J.D. (1984):

Dexamethasone and prednisolone in the horse: Pharmacokinetics and action on the adrenal glands

Am. J. Vet. Res., 45: 1750-1756

Toutain, P.L., Oukessou, M., Autefage, A. u. Alvinerie, M. (1988):

Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses Domestic Animal Endocrinology, 5 (1): 55-59

Überreiter, O. (1957):

Beitrag zur Diagnostik und Therapie der chirurgischen Krankheiten des Gehirns und seiner Häute

Schweiz. Arch. Tierheilkd., 99: 51

Vague, P., Oliver, C. u. Jaquet, P. (1971):

Le dosage radioimmunologique de l'ACTH plasmatique. Results chez les sujets normaux Rev. Eur. Clin. Biol., 16: 485-499

Vinson, G., Whitehouse, B. u. Henville, K. (1985):

The actions of alpha melanocyte stimulating hormone on the adrenal cortex

In: Hadley, M. (Hrsg.)

The melanotropic peptides, Vol. 2

Boca Raton, Fla: CRC Press, S.: 88-96

Walker, M., Berrish, T.S., James, A.R. u. Alberti, K.G. (1994):

Effect of hyperinsulinaemia on the function of the pituitary-adrenal axis in healthy man Clin. Endocrinol. (Oxf.), 40 (4): 493-497

Warfield, A., Finkel, D.M., Schatz, N.J., Savino, P.J. u. Snyder, P.J. (1984):

Bromocriptin treatment of prolactin-secreting pituitary adenomas may restore pituitary function

Ann. Intern. Med., 101 (6): 783-785

Watson, A.D.J. (1996):

Kapitel 1: Hypophyse

In: Hutchison, M. (Hrsg.), Döcke, F. (deutsche Übersetzung)

Kompendium der Endokrinologie, Hund und Katze

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co., Hannover, S.: 74-103

Wiesner, E. u. Ribbeck, R. (1991):

Wörterbuch der Veterinärmedizin

3. Aufl., Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

Wiest, J.J., Thompson, D.L., McNeill-Wiest, D.R., Garza, F. u. Mitchell, P.S. (1988):

Effect of administration of adrenocorticotropic hormone on plasma concentrations of testosterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and cortisol in stallions Equine Vet. Sci., 8: 168-170

Willemse, T. u. Mol, J.A. (1994):

Comparison of in vivo corticotropin-releasing hormone-stimulated release of proopiomelano-cortin-derived peptides in cats

Am. J. Vet. Res., 55 (12): 1677-1681

Wilson, M.G., Nicholson, W.E., Holscher, M.A., Sherrell, B.J., Mount, C.D. u. Orth, D.N. (1982):

Proopiolipomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor and plasma of normal and Cushing's horses

Endocrinology, 110 (3): 941-954

Tabellenanhang

	Cortisol-Gehalt (ng/ml Zellsuspension)		
ACTH-Gehalt (pg/ml Medium)	1. Wert	2. Wert	3. Wert
0.4×10^6	Zellen/ml Zellsuspens	ion	
0-Wert	< 0,02	0,24	< 0,02
2,5	< 0,02	< 0,02	< 0,02
25	< 0,02	0,68	< 0,02
250	< 0,02	< 0,02	0,38
0.6×10^6	Zellen/ml Zellsuspens	ion	
0-Wert	0,48	0,50	0,34
0,00025	1,1	1,2	1,0
0,0025	1,2	1,0	1,4
0,025	0,59	1,3	0,92
0,25	0,71	0,68	0,39
2,5	0,50	0,42	0,32
25	0,54	0,35	0,56
250	0,04	0,1	0,04
250000	< 0,02	0,32	0,21
0.75×10^6	Zellen/ml Zellsuspen.	sion	
0-Wert	34,0	30,0	/
0,025	24,0	26,0	/
0,125	24,0	24,0	/
0,25	26,0	26,0	/
1,25	28,0	32,0	/
2,5	22,0	34,0	/
12,5	78,0	72,0	/
25	142,0	140,0	/
125	208,0	192,0	/
250	380,0	272,0	/
0.8×10^6		ion	
0-Wert	48,6	46,2	44,2
0,00025	39,2	39,0	43,0
0,0025	43,8	39,8	36,8
0,025	42,6	38,2	43,8
0,25	40,4	45,6	42,8
2,5	54,6	48,6	46,4
25	129,8	133,8	140,0
250	166,2	170,2	183,8

Tab. 21: Cortisol-Gehalte verschiedener Zellkonzentrationen (0,4-1,6 x 10⁶ Zellen / ml Zellsuspension)

	Cortisol-	Gehalt (ng/ml Zellsu	spension)
ACTH-Gehalt (pg/ml Medium)	1. Wert	2. Wert	3. Wert
1,2 x 10 ⁶	Zellen/ml Zellsuspens	ion	
0-Wert	155,8	155,4	/
2,5	160,2	115,2	/
12,5	146,6	163,0	/
25	176,4	211,6	/
125	293,6	260,0	/
250	431,6	338,2	/
2500	396,8	486,6	/
25000	548,8	515,4	/
250000	535,2	515,6	/
1.5×10^6	Zellen/ml Zellsuspens	ion	
0-Wert	56,0	60,0	/
0,025	62,0	78,0	/
0,125	50,0	56,0	/
0,25	58,0	56,0	/
1,25	58,0	58,0	/
2,5	54,0	58,0	/
12,5	92,0	90,0	/
25	128,0	140,0	/
125	352,0	336,0	/
250	270,0	204,0	/
1.6×10^6	Zellen/ml Zellsuspens	ion	
0-Wert	67,2	75,2	58,4
0,00025	55,4	52,6	53,4
0,0025	70,6	83,2	65,2
0,025	68,4	61,8	57,8
0,25	62,0	59,6	65,6
2,5	91,2	90,8	74,4
25	144,8	120,2	101,8
250	175,2	183,4	191,6

Fortsetzung Tab. 21: Cortisol-Gehalte verschiedener Zellkonzentrationen (0,4-1,6 x 10⁶ Zellen/ml Zellsuspension)

ACTH Coholt (ng/ml Modium)	Cortisol-	Gehalt (ng/ml Zellsu	spension)		
ACTH-Gehalt (pg/ml Medium)	1. Wert	2. Wert	3. Wert		
	tionen 0,00025-250 pg				
(0.8×10^6)	Zellen/ml Zellsuspens	rion)			
0-Wert	48,6	46,2	44,2		
0,00025	39,2	39,0	43,0		
0,0025	43,8	39,8	36,8		
0,025	42,6	38,2	43,8		
0,25	40,4	45,6	42,8		
2,5	54,6	48,6	46,4		
25	129,8	133,8	140,0		
250	166,2	170,2	183,8		
ACTH-Konzentra	ACTH-Konzentrationen 2,5-250000 pg/ml Medium				
	Zellen/ml Zellsuspens				
0-Wert	155,8	155,4	/		
2,5	160,2	115,2	/		
12,5	146,6	163,0	/		
25	176,4	211,6	/		
125	293,6	260,0	/		
250	431,6	338,2	/		
2500	396,8	486,6	/		
25000	548,8	515,4	/		
250000	535,2	515,6	/		

Tab. 22: Cortisol-Gehalte verschiedener ACTH-Konzentrationen (0,00025-250000 pg/ml)

ACTH Calcal (calcal Madeum)	Cortisol-Gehalt (ng/	ml Zellsuspension)			
ACTH-Gehalt (pg/ml Medium)	1. Wert	2. Wert			
	roduktivität der Zellen				
(1.2×10^6)	Zellen/ml Zellsuspension)				
0-Wert	93,3	92,4			
2,5	104,3	112,5			
12,5	225,4	213,2			
25	343,0	343,3			
125	513,1	522,7			
250	630,1	580,3			
1250	553,5	569,4			
Moderate	Moderate Produktivität der Zellen				
(1.2×10^6)	$(1.2 \times 10^6 \text{ Zellen/ml Zellsuspension})$				
0-Wert	62,6	61,8			
2,5	67,0	64,2			
12,5	109,2	104,6			
25	156,4	154,0			
125	238,8	237,0			
250	265,6	289,2			
1250	274,8	242,6			

Tab. 23: Cortisol-Gehalte der ACTH-Eichkurve (2,5-1250 pg/ml Medium) bei guter und moderater Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen

ACTH-Gehalt (pg/ml Medium)	Cortisol- (ng/ml Zells			
ACTH-Ka (l	ACTH-Konzentrationen 0,00025-250 pg/ml Medium (0,8 x 10^6 Zellen/ml Zellsuspension)			
	Mit Extraktion	Ohne Extraktion		
0-Wert	79,2	70,8		
0,00025	97,6	77,2		
0,0025	70,8	62,0		
0,025	78,4	72,0		
0,25	66,4	46,0		
2,5	125,2	105,6		
25	277,2	225,6		
250	318,4	264,4		

Tab. 24: Cortisol-Gehalte der extrahierten und nicht extrahierten Zellsuspensionen (0,8 x 10⁶ Zellen/ml Suspension) mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen (0,00025-250 pg/ml Medium)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Cortisol-Referenzwerte (ng/ml) im Plasma gesunder Pferde	29
Tab. 2:	Cortisol-Gehalte (ng/ml) im Plasma cushingoider Pferde	30
Tab. 3:	ACTH-Referenzwerte (pg/ml) im Plasma gesunder Pferde	31
Tab. 4:	ACTH-Gehalte (pg/ml) im Plasma cushingoider Pferde	32
Tab. 5:	Herstellung der ACTH-Verdünnungsreihe	45
Tab. 6:	Kreuzreaktion des Cortisol-Antikörpers im RIA (nach Klein et al., 1989)	48
Tab. 7:	Spezifität des Antiserums zu ACTH-Fragmenten (nach DPC Biermann GmbH, 2000)	49
Tab. 8:	Kreuzreaktion des Cortisol-Antikörpers im IMMULITE® (nach DPC Biermann GmbH, 2000)	50
Tab. 9:	Qualitätskriterien der ACTH- und Cortisol-IMMULITE®-Assays (nach Brüns, 2001)	50
Tab. 10:	Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen durch humanes und porcines ACTH	56
Tab. 11:	Ermittlung einer hemmenden Wirkung auf die porcinen Nebennierenrindenzellen durch die Aktivkohle-Behandlung der Proben	57
Tab. 12:	Cortisol- und ACTH-Gehalte der Serumproben nach Einfachextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln	58
Tab. 13:	Cortisol- und ACTH-Gehalte der Serumproben nach Zweifachextraktion mit 1-Butanol und Ethylacetat	58
Tab. 14:	Ermittlung eines hemmenden Effektes von 1-Butanol auf die porcinen Nebenierenrindenzellen	59
Tab. 15:	Ermittlung eines hemmenden Effektes von Ethylacetat auf die porcinen Zellen	60

Tab. 16:	Ermittlung eines möglichen Serumeffektes auf die porcinen Nebennierenrindenzellen	61
Tab. 17:	Die Stimulation der porcinen Nebennierenrindenzellen durch das Kontrollserum	62
Tab. 18:	Die im IMMULITE® und Cortisol-RIA gemessenen Cortisol- und ACTH-Werte der verschiedenen equinen Plasmaproben bzw. der entsprechenden Bioassay-Doppelproben	64
Tab. 19:	Die im IMMULITE [®] und Cortisol-RIA gemessenen Cortisol- und ACTH-Werte der verschiedenen Aliquote bzw. entsprechenden Bioassay-Doppelproben der Stabilitätsstudie nach unterschiedlichen Lagerungszeiten und -temperaturen	67
Tab. 20:	Plasmagehalte der pro-OLMC-Peptide bei gesunden und cushingoiden Pferden (nach Millington et al., 1988 und Orth et al., 1982)	74
Tab. 21:	Cortisol-Gehalte verschiedener Zellkonzentrationen (0,4-1,6 x 10 ⁶ Zellen / ml Zellsuspension)	97
Tab. 22:	Cortisol-Gehalte verschiedener ACTH-Konzentrationen (0,00025-250000 pg/ml Medium)	99
Tab. 23:	Cortisol-Gehalte der ACTH-Eichkurve (2,5-1250 pg/ml Medium) bei guter und moderater Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen	99
Tab. 24:	Cortisol-Gehalte der extrahierten und nicht extrahierten Zellsuspensionen (0,8 x 10 ⁶ Zellen/ml Suspension) mit verschiedenen ACTH-Konzentrationen (0,00025-250 pg/ml Medium)	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die neuroendokrine Regulation der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse	13
Abb. 2:	Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese in der Pars distalis gesunder Pferde (nach Froin et al., 1998)	15
Abb. 3:	Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese in der Pars intermedia gesunder Pferde (nach Froin et al., 1998)	16
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Proopiolipomelanocortin-Moleküls und seine Aufspaltung in verschiedene Fragmente (nach Nakanishi et al., 1979)	18
Abb. 5:	Schematische Darstellung der pro-OLMC-Peptidsynthese bei einer Dysfunktion der Pars intermedia bei cushingoiden Pferde (nach Froin et al., 1998)	22
Abb. 6:	Circulus vitiosus als Antwort auf einen erhöhten ACTH-Plasmaspiegel (nach Field und Wolf, 1988)	27
Abb. 7:	Die sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve des Bioassays (modifiziert nach Rohde, 1994)	38
Abb. 8:	Gewebszerkleinerer (angefertigt in der Tierärztlichen Hochschule Hannover)	43
Abb. 9:	Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen bei 0,00025-250 pg ACTH/ml Medium	53
Abb. 10:	Cortisol-Sekretion der porcinen Zellen bei 2,5-250000 pg ACTH/ml Medium	53
Abb. 11:	Cortisol-Sekretion bei guter Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen	54
Abb. 12:	Cortisol-Sekretion bei moderater Produktivität der porcinen Nebennierenrindenzellen	55

Abb. 13:	Die eluotrope Reihe der Lösungsmittel	57
Abb. 14:	Cortisol-Gehalte der extrahierten und nicht extrahierten Zellsuspensionen (0,8 x 10 ⁶ Zellen/ml Suspension) mit	
	verschiedenen ACTH-Konzentrationen (0,00025-250 pg/ml Medium)	63

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-O. Hoppen für die Überlassung des interessanten Themas meiner Dissertation, die fachliche Betreuung und die freundliche Unterstützung.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Endokrinologie der Zentrumsabteilung Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule, insbesondere Frau H. Niederstucke, die mich in die Geheimnisse der Labortechniken mit großem Engagement und Engelsgeduld eingewiesen hat sowie Herrn S. Schlote für die konstruktiven Diskussionen und Ratschläge.

Des weiteren möchte ich Anja Möhring für das Einbringen ihrer Englischkenntnisse bei der Übersetzung der unendlich vielen englischen Journals sowie der Korrektur des Summary einen großen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Dirk Schütter für`s Ausdrucken und Binden sämtlicher Exemplare "in letzter Minute" bedanken.

Meinem Bruder Jörg und meinem Freund Torsten Schal danke ich für die Lösung sämtlicher Probleme im Kampfe gegen die "Computerintelligenz". Torsten danke ich zudem für die Beseitigung der verhexten Tippfehler und schrägen Satzkonstruktionen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern recht herzlich bedanken, die mir das Studium der Veterinärmedizin und die anschließende Promotion finanziell überhaupt ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.