

Aus der Klinik für Pferde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Dopingrelevanz inhalativ verabreichter
Glukokortikoide (Budesonid)
bei Sportpferden mit COB**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henrike Heinemann
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3929

Aus der Klinik für Pferde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Dopingrelevanz inhalativ verabreichter
Glukokortikoide (Budesonid) bei Sportpferden mit COB**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von
Henrike Heinemann
Tierärztin
aus Hamburg

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3929

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses; competition; chronic obstructive pulmonary disease; doping;
blood sampling; urine analysis; HPLC; inhalation; glucocorticoid

Tag der Promotion: 24.05.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-852-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	5
2.	Einleitung	9
3.	Literatur.....	11
3.1	Doping im Pferdesport.....	11
3.1.1	Definition des Dopings	11
3.1.2	Aktuelle Problematik des Dopings im Pferdesport.....	12
3.1.3	Bestimmung der Pferdesportverbände.....	13
3.1.4	Analyseverfahren zur Nachweisbarkeit von Dopingsubstanzen	16
3.2	Grundlagen der Inhalationstherapie.....	17
3.2.1	Inhalationssysteme	17
3.3	Chronisch obstruktive Bronchitis (COB).....	18
3.3.1	Definition.....	18
3.3.2	Vorkommen	19
3.3.3	Therapie	20
3.3.4	Inhalative Therapie der COB.....	23
3.4	Glukokortikoide.....	23
3.4.1	Pharmakokinetik	24
3.4.2	Budesonid.....	25
4.	Materialien und Methodik	27
4.1	Versuchsaufbau	27
4.2	Patientengut	27
4.3	Voruntersuchung	28
4.3.1	Allgemeine und spezielle Untersuchung	29
4.4	Inhalationsphase	34
4.5	Probenentnahme	35
4.5.1	Blutprobenentnahme- und Lagerung.....	35
4.5.2	Urinprobenentnahme- und Lagerung	35
4.6	Probenaufbereitung	36
4.6.1	Plasmaprobenvorbereitung	37
4.6.2	Urinprobenvorbereitung	37
4.7	Analytik.....	38
4.7.1	Analyse der Plasmaproben	39
4.7.2	Analyse der Urinproben	40
4.8	Angewandte Statistik	40

5.	Ergebnisse	43
5.1	Beschreibung der Stichprobe.....	43
5.2	Klinische Wirksamkeit der Therapie.....	43
5.3	Wirkstoffkonzentrationen zu den Messzeitpunkten	46
5.4	Einfluss des Gesundheitszustandes und des Verabreichungsmodus auf die Wirkstoffkonzentrationen	47
5.5	Analyse der Nachweiszeiten der Wirkstoffkonzentrationen.....	48
5.6	Gesundheitsstatus und Wirkstoffabbau	50
5.7	Verabreichungsmodus und Wirkstoffabbau	52
6.	Diskussion.....	56
6.1	Diskussion von Material und Methoden	56
6.1.1	Diskussion zum Studienaufbau	56
6.1.2	Diskussion zur Analyse der Proben	58
6.2	Diskussion der Ergebnisse	58
6.2.1	Ergebnisse der Inhalationstherapie.....	58
6.2.2	Ergebnisse zur Nachweisbarkeit von Wirkstoffkonzentrationen im Gruppenvergleich	59
6.2.3	Ergebnisse zur Analyse der Nachweiszeiten in den Gruppen.....	62
6.2.4	Bewertung der Ergebnisse bezüglich ihrer Dopingrelevanz.....	65
7.	Zusammenfassung.....	66
8.	Summary.....	67
9.	Literaturverzeichnis	68
10.	Tabellenverzeichnis	78
11.	Abbildungsverzeichnis.....	79
12.	Untersuchungsbögen	80
13.	Anhang	81
13.1	Tabellen	81
13.2	Abbildungen	92
13.3	Untersuchungsbögen	96
14.	Publikationsverzeichnis	101
15.	Danksagung.....	102
16.	Selbstständigkeitserklärung	103

1. Abkürzungsverzeichnis

Δ Ppl max	Maximale Interpleuraldruckdifferenz
AaDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz
Abs.	Absatz
ADMR	Anti-Doping- und Medikamentenkontroll-Regeln der FN
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
COB	Chronisch-obstruktive Bronchitis
COPD	Chronic obstructiv pulmonary disease
DVR	Direktorium für Vollblutzucht und Rennen e.V.
df	Degrees of freedom
DPI	Dry Powder Inhaler
DSHS Köln	Deutsche Sporthochschule Köln
EADCMRs	Equine Anti-Doping and Controlled Medication Regulations
EDTA-Röhrchen	Blutröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure
EHSLC	European Horserace Scientific Liaison Committee
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray-Ionisations-Interface
FEI	Fédération Equestre Internationale
FN	Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V.
ggr	Geringgradig
GS	Gesamtscore
hgr	Hochgradig
HPLC	High performance liquid chromatography
HVT	Hauptverband für Traber-Zucht und Rennen
i.m.	Intramuskuläre Injektion
IPC	Irrelevante Plasmakonzentration
IUC	Irrelevante Urinkonzentration
i.v.	Intravenöse Injektion
KG	Kilogramm
kV	Kilovolt

LC-MS-Analyse	Liquid-chromatography-mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
m/z	Masse-zur-Ladung-Verhältnis
mAs	Milli-Ampere-Sekunden
max	Maximum
MDI	Metered Dose Inhaler
mg	Milligramm
mgr	Mittelgradig
min	Minimum
µl	Microliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MRM-Modus	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Fälle
NADA	Nationale Anti-Doping Agentur Deutschland
obB	Ohne besonderen Befund
p	Signifikanzniveau
Pa	Partialdruck
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PD	Pharmakodynamik
Pg/mL	Picogramm pro Milliliter
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PK	Pharmakokinetik
Pkt	Punkte
RAO	Recurrent airway obstruction
RP-Säulen	Reversed Phase-Säulen
RRA	Relative Rezeptoraffinität
S	Seite
SD	Standard deviation

Abkürzungsverzeichnis

Std	Stunden
TBS	Tracheobronchialsekret
TRO	Trabrennordnung
vs	Versus
WADA	Welt Anti-Doping Agentur
χ^2	Chi-Quadrat Teststatistik
\bar{x} (h)	Mittelwert in Stunden
\bar{x} pg/mL	Mittelwert in pg/mL
\bar{x}	Mittelwert
z	Teststatistik z
z.T.	Zum Teil

2. Einleitung

Kortikosteroide finden aufgrund ihrer starken entzündungshemmenden Wirkung vielfältigen Einsatz bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen des Bewegungs- und Atmungsapparates. Im Allgemeinen unterdrücken sie Schmerz und Entzündung schnell und effektiv und ermöglichen so Sportlern weiter Leistung zu erbringen trotz vorliegender Verletzungen. Dies hat zur Folge, dass Kortikosteroide von der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) der Liste der verbotenen Substanzen hinzugefügt wurden. Im humanen Sport unter Athleten wird Budesonid zur Behandlung von Asthma eingesetzt und über Inhalation regelmäßig angewendet.

In der Pferdemedizin nimmt die Inhalation mit Kortikosteroiden ebenfalls zu und es fällt auf, dass besonders Substanzen, die auch therapeutisch eingesetzt werden, bei Pferden, die in Training und Wettkampf an ihre Leistungsgrenzen gebracht werden, oft Anlass für positive Medikationstests geben.

Aus Tierschutzsicht ist es nicht tragbar, dass ein Pferd, welches einer Behandlung bedarf, an einem Wettkampf teilnimmt und nicht das langfristige Wohl des Tieres, sondern die schnelle Leistungswiederherstellung des Pferdes für den Wettkampf im Vordergrund steht. § 3 des Tierschutzgesetzes verbietet ein solches Vorgehen. Auf der Grundlage des Tierschutzgesetzes haben die Reitsportverbände detaillierte Regelwerke entwickelt. Um eine Leistungsbeeinflussung auszuschließen, verbieten diese Vorschriften, dass zum Zeitpunkt des Wettkampfes körperfremde Substanzen in den Körperflüssigkeiten des Pferdes nachgewiesen werden können.

Die Schwierigkeit für Sportpferde betreuende Tierärzte liegt darin, dass für verschiedene Substanzen nur unzureichende Kenntnisse zu Ausscheidungs- bzw. Karenzzeiten existieren. Oft ist unbekannt, wie lange es dauert, bis eine Substanz vollständig ausgeschieden ist. Somit kann es auch zu unbeabsichtigten positiven Ergebnissen in einer Dopingprobe kommen.

Trotz des vielfältigen Einsatzes gibt es wenige pharmakokinetische Studien mit Daten über die Nachweise von Budesonid und dessen Metaboliten in Zusammenhang mit Dopinganalysen (Deventer et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Ausscheidungsverhalten von Budesonid und dessen Metaboliten anhand einer quantitativen Nachweismethode untersucht werden. Die Probanden wurden in verschiedene Gruppen unterteilt und diese wurden untereinander verglichen. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollte geprüft werden, ob Aussagen zu Ausscheidungszeiten beziehungsweise Absetzfristen für den Arzneistoff Budesonid bei inhalativem Einsatz beim Sportpferd gemacht und ergänzt werden können. Zum einen soll beantwortet werden ob sich kranke und gesunde Pferde hinsichtlich ihrer Wahrscheinlichkeiten des Erreichens der Nachweisgrenze für die Wirkstoffe Budesonid (Blut) und Budesonid (Urin) unterscheiden, zum anderen soll untersucht werden ob sich die Gruppe der Pferde, welche einen Wirkstoff unter Belastung verabreicht bekommen

Einleitung

haben, hinsichtlich ihrer Wahrscheinlichkeiten des Eintretens des Ereignisses LOD, also der Nachweisgrenze für die Wirkstoffe Budesonid (Blut) und Budesonid (Urin) von der Gruppe der Pferde, die den Wirkstoff in Ruhe verabreicht bekommen haben unterscheiden.

3. Literatur

3.1 Doping im Pferdesport

3.1.1 Definition des Dopings

Die Nationale Anti Doping Agentur (NADA) ist im Humansport maßgeblich verantwortlich für die Dopingbekämpfung in Deutschland. Am 28. November 2012 kontrollierte die NADA erstmals Pferde auf Doping. Die NADA formuliert die Definition des Doping als Vorliegen eines oder mehrerer Verstöße der festgelegten Anti-Doping Bestimmungen. Dabei steht im Vordergrund, dass der Athlet selbst dafür verantwortlich ist, dass keine verbotenen Substanzen in seinen Körper gelangen (NADA 2015).

Im Gegensatz zum Humansport spielt im Pferdesport der Tierschutzaspekt die wichtigste Rolle. Im Pferdesport trifft der Besitzer, Trainer, Reiter oder Longenführer diese Entscheidung für den Athleten Pferd.

Nach § 3 Abs. 1a Tierschutzgesetz (TierSchG) wird verboten, einem Tier, an dem Eingriffe und Behandlungen vorgenommen worden sind, die einen leistungsmindernden körperlichen Zustand verdecken, Leistungen abzuverlangen, denen es wegen seines körperlichen Zustandes nicht gewachsen ist. Weiterhin verbietet § 3 Abs. 1b TierSchG an einem Tier bei sportlichen Wettkämpfen Dopingmittel anzuwenden. Eine genaue Definition von Doping gibt der Gesetzesgeber nicht.

Neben den gesetzlichen Bestimmungen aus Gründen des Tierschutzes finden für Pferde in sportlichen Wettkämpfen die Regelwerke der den Pferdesport regulierenden Verbände Anwendung. Diese werden später näher ausgeführt. Nach Ungemach ist Doping als die „*unerlaubte Verabreichung eines jeden Mittels, außer der normalen Ernährung, das dazu geeignet sein kann, die natürliche und aktuelle Leistungsfähigkeit zum Zeitpunkt des Rennens zu beeinflussen*“ zu verstehen (Ungemach 1985). Tobias sieht wiederum moralisch-ethische Aspekte als Grundlage für ein Dopingverbot. Sie erklärt den Schutz der in menschlicher Obhut und Abhängigkeit lebenden Tiere vor Schäden, Leiden und Schmerzen als Hauptgrund für die Reglementierung des Dopings (Tobias 2004).

Doping kann in unterschiedliche Formen mit verschiedenen Zielsetzungen unterteilt werden (Ungemach 1999):

- Doping auf Sieg
- Doping zur Wiederherstellung der natürlichen Leistungsfähigkeit
- Doping mit körpereigenen Substanzen
- Physikalisch-technisches Doping
- Doping auf Niederlage

Literatur

- Doping zur Maskierung und zur Verdünnung anderer Substanzen (Maßnahmen zur Erschwerung des Dopingsnachweises)
- Versehentliches oder unbeabsichtigtes Doping

Dabei versteht man nach Ungemach die ersten 4 Dopingformen als „positives Doping“, während Doping auf Niederlage als „negatives Doping“ gilt. Für den erschwerten Dopingsnachweis werden Mittel zur Diureseseigerung eingesetzt.

3.1.2 Aktuelle Problematik des Dopings im Pferdesport

Dopingfälle im Reitsport – wie auch im Humansport – erregen große Aufmerksamkeit in der Öffentlichkeit. Besonders seit den olympischen Spielen in Peking im Jahr 2008, als gleich vier positive Dopingfälle bekannt wurden, steht die Branche im Fokus. Im Pferdesport geht es dabei meist nicht – wie im Humansport – um den Missbrauch von anabolen Steroiden oder leistungssteigerndes Blutdoping, sondern vielmehr um therapeutisch eingesetzte Medikamente, die zu einem positiven Dopingtest führen.

Dopingvorwürfe im Reitsport gestalten sich schwieriger als im Humansport. Seit 2006 gliedert die Internationale Reiterliche Vereinigung (FEI) ihre Dopingliste in verbotene Substanzen, verbotene Medikation Klasse A und B. Das bedeutet, es gibt Substanzen, die zur Behandlung der Pferde außerhalb des Wettkampfes, also während des Trainings, zugelassen sind. Beim Turnier dürfen aber nur gesunde Pferde starten, daher sind die Mittel im Wettkampf verboten.

Die Schwierigkeit der behandelnden Tierärzte für Sportpferde liegt in dem genauen Festlegen von Karenzzeiten und Ausscheidungszeiten auf Basis ungenügender Kenntnisse. Oft ist nicht genau bekannt, wie lange eine Substanz wirklich im Körper bleibt und wann sie vollständig ausgeschieden ist. Gleichzeitig ist es wichtig, einen Unterschied zwischen Nachweis einer Substanz und Nachweis der Wirksamkeit der Substanz zu treffen. Durch eine fehlende Kenntnis dieses Unterschieds kann es andernfalls zu einer erhöhten Dosierung und damit zu unbeabsichtigt positiven Medikamententests kommen. Die Nachweiszeit beschreibt die Zeit, die vom Absetzen des Medikaments bis zum Erreichen der Konzentration vergeht, bei der eine Bestimmung des eingesetzten Wirkstoffes oder seiner Metaboliten mit der verwendeten analytischen Methode nicht mehr möglich ist. Die Dauer der Nachweiszeit wird von vielen Faktoren beeinflusst. Dazu zählen (Machnik 2007):

- Physis des Pferdes (Körpergewicht, Ernährung, Gesundheitszustand, Leistungsfähigkeit der Enzym- und Organsysteme),
- Wirksubstanz (chemische Struktur, Dosierung und Pharmakokinetik),
- Applikationsart (i.m., i.v., s.c., oral oder lokal),
- Analytik (Nachweisgrenze).

Addiert man zu der Nachweiszeit eine Sicherheitsspanne, erhält man die Karenzzeit (auch Absetz- oder Wartezeit). Karenzzeiten geben den Zeitraum vor, in dem das Pferd nach einer Medikamentengabe nicht an den Start gehen darf.

Die Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V. (FN) veröffentlichte 2010 das erste Mal eine Broschüre über die gültigen Anti-Doping- und Medikamentenkontroll-Regeln (ADMR). Angepasst an die internationalen Regelwerke sind die ADMR Bestandteil der Leistungs-Prüfungs-Ordnung (LPO) und dienen den Pferdesportlern zur näheren Erläuterung und geben ihnen wertvolle Informationen zur richtigen Umsetzung der Bestimmungen ((FN) 2013).

Im Jahr 2014, im dritten Jahr nach der Einführung der Medikationskontrollen bei Pferden außerhalb des Wettkampfes, wurden durch die NADA 148 Kaderpferde in den Disziplinen Springen, Dressur und Vielseitigkeit kontrolliert. Die Durchführung der Probenentnahme im Namen der NADA übernahm die *PWC animal Control GmbH* und alle Analysen erfolgten im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (DSHS Köln). Genau wie im Jahr 2013 wurden auch im Jahr 2014 nur Substanzen nachgewiesen, die zur Behandlung verabreicht wurden und im Behandlungsbuch von den Kaderreitern dokumentiert waren. Während der Wettkämpfe wurden 18 Kontrollen durchgeführt. Es kam zu keinem Dopingverstoß ((NADA) Mai 2015).

3.1.3 Bestimmung der Pferdesportverbände

In den Bestimmungen der nationalen und internationalen Pferdesportverbände gilt im Pferdesport analog zum Humanleistungssport:

„Zum Zeitpunkt des Wettkampfes darf kein unerlaubtes Mittel im Körper sowie in seinen Ausscheidungen vorhanden sein.“

Die meisten Stoffe, die nicht natürlich im Körper vorkommen, sind verboten. Dazu zählen auch solche Mittel, die therapeutisch eingesetzt werden. Für endogene Stoffe oder Futterbestandteile gibt es festgelegte Grenzwerte. Überwiegend sind in den Bestimmungen jedoch nur Wirkstoffgruppen aufgeführt und keine Angaben für einzelne Wirkstoffe nachlesbar. Eine Ausnahme bildet die Broschüre der FN, die aber auch nachdrücklich darauf hinweist, dass alle Angaben nur als Überblick oder Anleitung zu verstehen sind und nicht das Regelwerk ersetzen ((FN) 2013).

Die drei wichtigsten Herausgeber von nationalen Regelwerken im Pferdesport sind die Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V. (FN), das Direktorium für Vollblutzucht und Rennen e.V. (DVR) und der Hauptverband für Traber-Zucht und -Rennen e.V. (HVT). Deren Abschnitte zu Dopingbestimmungen werden im Folgenden kurz aufgeführt, wobei die FN besonders eine enge Übereinstimmung zu den Bestimmungen der FEI sucht.

Regelwerk der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN)

(Leistungsprüfungsordnung (LPO) der Deutschen Reiterlichen Vereinigung vom 01.01.2008) ((FN) 1994)

Unter Abschnitt A VIII (S.61-62) sind unter § 67a die Liste der verbotenen Substanzen aufgeführt, diese unterscheidet zwischen:

1. **Dopingsubstanzen:** Stoffgruppen wie Stimulantia, Sedativa und Narkotika, sowie anabole Substanzen
2. **Verbotene Substanzen:** Substanzen, die, auch wenn sie als Arzneimittel eingesetzt werden, verboten sind, und zwar solche, die auf das Nerven-System, Herz-Kreislauf-System, Atmungssystem, Verdauungs-System, Harn-System, Muskel- und Skelettsystem, auf die Geschlechtsorgane, die Haut oder gegen Infektionserreger wirken.
3. **Ausnahmen:** Substanzen, die verabreicht/angewendet werden dürfen im zeitlichen Zusammenhang mit dem Wettkampf, wie zum Beispiel Impfungen oder Antiparasitika.

Regelwerk des Direktoriums für Vollblutzucht und Rennen (DVR)

In der Rennordnung (RO) des Direktoriums für Vollblutzucht und Rennen unter Abschnitt XIV wird im Allgemeinen das Verbot der Anwendung, die Einteilung, die Entnahme ,Vorbereitung und Auswertung von Dopingproben aufgeführt.

Es wird unterschieden zwischen erlaubten und unerlaubten Substanzen. Die erlaubten **Mittel** werden in erlaubte Substanzen, Substanzen mit Grenzwerten und kontrolliert erlaubte Substanzen aufgeteilt. Die **unerlaubten Mittel** sind die in Liste 4 aufgeführten Dopingsubstanzen und sonstige unerlaubte Substanzen ((DVR) 2002).

Regelwerk des Hauptverbandes für Traber-Zucht und Rennen (HVT)

In der Trabrennordnung (TRO) vom 26.04.2007 wird in § 93 zum Doping festgelegt: *“Kein Pferd darf am Renntag in seinem Gewebe, seinen Körperflüssigkeiten oder seinen Ausscheidungen ein unerlaubtes Mittel aufweisen.“*

Erlaubte und nicht erlaubte Mittel sind in den Durchführungsbestimmungen zur Feststellung und Verhinderung des Dopings gemäß § 93 Abs. 11 TRO unter Ziffer I aufgelistet.

- **Liste I – Erlaubte Substanzen:** Anerkannte Impfstoffe gegen Infektionserreger
- **Liste II – Substanzen mit Grenzwerten:** Zum Beispiel Arsen, DMSO, Cortisol
- **Liste III – Kontrolliert erlaubte Substanzen:** antimykotische, antibakterielle, antiparasitische Substanzen
- **Liste IV – Dopingsubstanzen**

- **Liste V – Sonstige nicht erlaubte Substanzen**

Pferde die mit Mitteln aus Liste II, IV, V behandelt wurden, müssen am Wettkampftag zweifelsfrei frei von jeglichem Nachweis dieser Mittel sein ((HVT) 2003).

Regelwerk der Federation Equestre Internationale (FEI)

International gilt die FEI als Regelwerk seit 2010 und basiert auf dem Regelwerk der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA).

In ihren Bestimmungen „Equine Anti-Doping and Controlled Medication Regulations (EADCMRs)“ werden die Doping- und Medikamentenkontrolle von Sportpferden reguliert und befindet sich die FEI Liste der verbotenen Substanzen (sogenannte „Prohibited Substance List“). Es werden zwischen „Banned Substances“, verbotene Substanzen, die keine Zulassung im Pferdesport haben, und „Controlled Medication“, kontrollierte Substanzen, die therapeutisch eingesetzt werden, aber im Wettkampf verboten sind, unterschieden.

European Horserace Scientific Liaison Committee (EHSLC)

Im Jahr 1991 beschlossen Rennsportvereinigungen aus Frankreich, Großbritannien und Irland, gemeinsam gegen potentielle Probleme im Hinblick auf den Gebrauch von verbotenen Substanzen vorzugehen und gründeten 1992 das *European Horserace Scientific Liaison Committee* (EHSLC) zur Verbesserung von Kooperation und Zusammenarbeit bezüglich der Dopingproblematik im Pferdesport. Seit 1999 sind auch Deutschland und Italien dem EHSLC beigetreten. Die Ziele des EHSLCs sind das technische Vorgehen und die Vorschriften der Dopingkontrolle zu harmonisieren und eine einheitliche Basis zu schaffen, so dass jedes Pferd, in welchem dieser fünf Länder es auch immer an den Start geht, samt seiner Belange in der gleichen Art und Weise behandelt wird ((EHSLC) 2002). Die FN und die EHSLC arbeiten in Deutschland eng zusammen, indem sie einheitlich aufgebaute pharmakologische Studien unterstützen, die ergänzend zu den üblichen Untersuchungen, die pharmakologischen Effekte von therapeutisch eingesetzten Substanzen kontrollieren. Es wird eine Grenze festgelegt, ab der die untersuchte Substanz keine Wirkung mehr hat. Zudem wird ein Unterschied zwischen Grenzwerten oder Nulllösung festgelegt, welcher auch immer wieder für Diskussionen sorgt.

Die Pferdesportverbände geben vor, dass sich zum Zeitpunkt des Wettkampfes keine körperfremden Substanzen im Pferd und in seinen Ausscheidungen befinden dürfen. Das heißt, es gilt der qualitative Nachweis einer Substanz als positiver Befund, unabhängig von seiner Konzentration. Diese „Nulllösung“ ist aber bei Kritikern umstritten, da immer feinere Nachweismethoden immer niedrigere Konzentrationen einer Substanz messen können, folglich auch dann, wenn sie nicht mehr wirksam sind. Aus diesem Grund fordern einige der Kritiker eine Abkehr von der Nulllösung. Sie halten eine Lösung mit Grenzwerten für sinnvoller (Oexmann 2010).

Toutain und Lassourd haben in diesem Zusammenhang ein Modell entwickelt, mit dem sich eine sogenannte ineffektive und somit irrelevante Plasma- und Urinkonzentration (IPC bzw. IUC) berechnen lässt. Mittels Umrechnung der effektiven Plasmakonzentration wird eine ineffektive und somit irrelevante Plasmakonzentration (IPC) bestimmt. Aus der errechneten irrelevanten Plasmakonzentration wird wiederum eine irrelevante Urinkonzentration (IUC) abgeleitet. IPC und ICU können somit als Grenzwerte von Wirkstoffen festgelegt werden. Dieses PK/PD-Modell wurde bereits für verschiedene pharmakokinetische Studien bei Pferden angewandt (Toutain and Lassourd 2002).

Für Glukokortikoide ist aufgrund der überwiegend über Proteinbiosynthese vermittelten Wirkungen keine Berechnung der wirksamen Plasmakonzentration möglich, da sie länger wirken als sie im Plasma gemessen werden können (Ungemach 2002).

3.1.4 Analyseverfahren zur Nachweisbarkeit von Dopingsubstanzen

In der Analytik von chemischen Substanzen ist der Einsatz von immunologischen Methoden wie zum Beispiel Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und chromatographischen Trennverfahren gängig. In der Nachweisbarkeit von Dopingsubstanzen haben sich hauptsächlich chromatographische Analysemethoden durchgesetzt.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatographie – HPLC) ist eine Methode zum Nachweis von gelösten Substanzen. Sie besteht aus einer Pumpe, Trennsäule, Einspritzsystem und Detektor (Unger 1995). Die Pumpe befördert das zu trennende Stoffgemisch in einem Lösungsmittel, der mobilen Phase, über eine stationäre Phase (Schwedt 2010). Über das Einspritzsystem wird die Probe der mobilen Phase zugeführt. Die stationäre Phase besteht aus vielen kleinen porösen Teilchen und befindet sich im Inneren einer Trennsäule. Die mobile Phase wird in die Trennsäule transportiert. Dort verweilen die chemischen Substanzen der Probe aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften unterschiedlich lange. Sie werden durch einen Detektor geführt, der die verschiedenen Substanzen dann im Chromatogramm sichtbar macht (Schwedt 2010).

Man unterscheidet bei der HPLC zwei Methoden, die „Normal Phase-HPLC“ und die „Reversed Phase-HPLC“. Bei der Reversed Phase-HPLC wird im Gegensatz zu der Normal Phase-HPLC eine unpolare stationäre Phase benutzt. Die Reversed Phase-HPLC ist in der Praxis die Methode der Wahl und wird bei 70 % aller HPLC-Trennungen eingesetzt und wurde auch in dieser Studie angewendet.

Je nach Reaktionsstärke mit der stationären Phase erscheinen unterschiedliche Substanzen zu verschiedenen Retentionszeiten am Ende der Säule, wo sie mit Hilfe eines Detektors sichtbar gemacht werden. Es stehen verschiedene Detektoren zu Verfügung. In dieser Studie erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Massenspektrometers (MS). Die Massenspektrometrie dient der direkten Identifizierung unbekannter Substanzen, es werden Moleküle oder Verbindungen in Ionen zerlegt und nach Masse und Ladung

getrennt. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Die Ionenquelle erzeugt aus der zu untersuchenden Probe einen Strahl gasförmiger Ionen, der Analysator trennt diese nach Masse und Ladung auf und der Detektor bildet das Massenspektrum ab (Lehmann 1996).

3.2 Grundlagen der Inhalationstherapie

Inhalationssysteme sind Dispensiersysteme von Partikeln oder kleinsten Teilchen, die im Gas verteilt sind. Die Verteilung dieser Teilchen oder die Effektivität der Inhalation hängt von dem Inhalationsfluss und der Partikelgröße ab. Die erzeugten Aerosole sind heterogene Aerosole, das heißt, es entstehen Teilchen mit unterschiedlicher Größe. Eine Partikelgröße von 1-5 µm erlaubt das Ankommen auch in den tieferen Atemwegen und somit eine Wirksamkeit der Therapie, während Teilchen unter 0,5 µm ohne zu sedimentieren direkt ausgeschieden werden. Nach Duvivier müßte das ideale Inhalationsgerät einfach zu bedienen und anzuwenden sein, dazu robust, angepasst an den Pferdekopf und erschwinglich. Es müßte Partikel mit einem speziellen Durchmesser generieren, um bestimmte Region im Respirationstrakt zu erreichen und kompatibel für verschiedene Medikamente sein (Duvivier et al. 1997).

3.2.1 Inhalationssysteme

Bei der Inhalation werden mechanische Düsen- oder Ultraschallvernebler zur Feuchtinhalation oder Dosieraerosole (MDI: metered dose inhaler) und Trockenpulverinhalatoren (DPI: dry powder inhaler) unterschieden. Bei einem mechanischen Düsenvernebler wird mithilfe eines Kompressors ein einleitender Luftstrom erzeugt, der für die Herstellung eines Aerosols sorgt. Akkubetriebene Ultraschallvernebler (z.B. SaHOMa, NEBUTEC, Deutschland; Flexineb, Nortev, Irland) erlauben es, Arzneimittel direkt vor den Nüstern zu vernebeln und über einen geschlossenen Atemkreislauf zu inhalieren. Durch Vibration eines Quarzkristalles wird ein Aerosol erzeugt. Von Vorteil ist auch bei diesen Masken die Anwendung unter Bewegung des Pferdes, um eine vertiefte Atmung zu erzielen (Ehrmann 2012). Der in dieser Studie verwendete SaHOMa II (SaHOMa, NEBUTEC, Deutschland) ist ein akkubetriebenes Ultraschallgerät, mit dem man in Ruhe oder an der Longe unter Belastung die Pferde inhalieren kann. Das Inhaliergerät ist ein geschlossenes System, kompatibel für alle Suspensionen, die vernebelt werden können. Laut Herstellerangaben tritt bei der Anwendung kaum ein Medikamentenverlust auf; es erfolgt so ein geringerer Verbrauch des Medikamentes und eine geringere Belastung für den Anwender. Die kostenintensive Anschaffung der Ultraschallvernebler schränkt die Nutzbarkeit unter Pferdehaltern dagegen ein (Durham 2001).

Dosieraerosole (z.B. AeroMask und AeroHippus, Trudell Medical International, Kanada; Equine Haler, Kruuse, Dänemark) kommen heutzutage immer häufiger zur Anwendung. Für maximale Effektivität sind sie gekoppelt an Inhalationshilfen mit einer Vorsatzkammer („spacer“), in der das Medikament appliziert wird und dann durch ein atmungsgesteuertes Ventil („one-way-valve“) vom Pferd inhaliert werden kann. In der Humanmedizin werden

solche Inhalationsmasken besonders bei Kleinkindern verwendet, bei denen noch die notwendige Koordination fehlt (Durham 2001; Gehlen 2009; Ehrmann 2012). In den Industrieländern werden 2/3 aller Inhalationstherapien beim Menschen mit Dosieraerosolen durchgeführt (Kamin 2007).

Es steht folglich eine große Anzahl unterschiedlichster Dosieraerosole zur Verfügung. Auf diese Humanarzneimittel kann zurückgegriffen werden, da bisher keine Tierarzneimittel zur Inhalationsbehandlung zur Verfügung stehen. So können diese unter Berücksichtigung des Arzneimittelgesetzes (§ 56a (Umwidnungskaskade) auch in der Pferdemedizin eingesetzt werden. Seit den 90er Jahren sind auch geeignete Inhalationshilfen für die Anwendung von Dosieraerosolen beim Pferd erhältlich. Der Vorteil im Vergleich zum Vernebler liegt in der einfachen Handhabung und der reduzierten Kontaminationsgefahr. Je nach Modell sind auch deutlich geringere Investitionskosten zu veranschlagen. Ein Beispiel für einen häufig eingesetzten Dosieraerosoler in der Pferdemedizin ist der Equine Haler, ein handliches Inhalationssystem, das lediglich auf einer Nüster aufgesetzt wird. Das Dosieraerosol wird in eine große Vorkammer appliziert, aus der das Pferd das Aerosol aktiv einatmet. Die Sedimentationsrate beträgt ca. 8 %. Der Rest verbleibt an der Nüster und in den oberen Atemwegen (Funch-Nielsen 2001). Die Trockenpulverinhalatoren haben sich in der Pferdemedizin bislang nicht durchgesetzt (Gehlen 2009).

3.3 Chronisch obstruktive Bronchitis (COB)

3.3.1 Definition

Die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) ist eine weit verbreitete Erkrankung der unteren Atemwege und ist die meist vorkommende Ursache von chronischem Husten bei älteren Pferden (Pirie 2013).

Die Bezeichnung „equine COPD“ wurde von Sasse (1971) eingeführt, um die Symptome der Entzündungen und Obstruktion der Atemwege, die bei älteren Pferden in Erscheinung treten, zu beschreiben. Die COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) ist eine Krankheitsbezeichnung, die aus der Humanmedizin übernommen wurde. Im Vergleich zur humanen COPD gibt es aber große Unterschiede, da im Gegensatz zur humanen Erkrankung die COB des Pferdes ein großteils reversibler Prozess ist, weil durch die Änderung in der Umgebung oder durch die Behandlung mit Kortikosteroiden (Lapointe et al. 1993) oder mit Bronchodilatoren (Robinson et al. 1993) eine sofortige Verbesserung der Symptome stattfindet.

So wurde 2000 im Rahmen des International Workshop on Equine Chronic Airway Disease in Michigan beschlossen, die COPD des Pferdes als „Recurrent Airway Obstruction“ (RAO) oder „heaves“ zu bezeichnen (Robinson 2001). Der Begriff COB (chronisch-obstruktive Bronchitis) hat sich besonders im deutschsprachigen Raum durchgesetzt und der Terminus definiert präziser die Dauer, Lokalisation und entzündliche Genese der Erkrankung (Fey 2006). Sie ist charakterisiert durch eine Hyperreaktivität in

den Atemwegen, induziert durch eine vermehrte Sekretproduktion, Husten (Fey 2006) und eine Obstruktion der Bronchien auftretend bei suboptimaler Umgebung hoch an aerogener Staubbelastung (Pirie 2013). Eine Provokation mit entsprechenden Umwelteinflüssen führt zu einer akuten Verschlechterung der Symptomatik, auch Exazerbation genannt (Robinson 2001).

3.3.2 Vorkommen

Die Erkrankung tritt bei mehr als 50 % der Pferde im Alter zwischen 12 bis 14 Jahren in den nördlichen Hemisphären auf. Dort werden in der Regel die Pferde vermehrt aufgestallt und mit trockenem Heu gefüttert (Robinson et al. 1996; Fey 2006). Mit hoher Wahrscheinlichkeit entwickelt sich die Krankheit aus der Zusammenwirkung von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen (Moran 2011). Eine genetische Grundlage wurde von *Marti* vermutet. Diese beobachtete, dass das Auftreten von COB bei Nachkommen von COB-erkrankten Pferden größer ist als von Nachkommen nicht betroffener Pferde (Marti et al. 1991).

Auslösende Umweltfaktoren sind Stäube mit Bestandteilen von Schimmelpilzen, besonders *Aspergillus fumigatus*, und deren Sporen sowie Endotoxinen und organischem Material (Robinson et al. 1996; Moran 2011; Pirie 2013). *Aspergillus fumigatus* findet sich häufig in der Umgebung des Pferdes und ist ein starker Auslösungsfaktor (Moran et al. 2010). Andere auslösende Allergene sind Milben, Federstaub, Urin von Nagern oder Überreste von Insekten.

Empfängliche Pferde entwickeln eine Überempfindlichkeit gegenüber diesen bestimmten Faktoren mit nachfolgender Entzündung und daraus folgender Atemwegobstruktion. Die Atemwegobstruktion kann bei COB-anfälligen Pferden durch Aufstallung und Füttern von staubhaltigem Heu mangelhafter Qualität immer wieder induziert werden (Derksen et al. 1985). Sofortige klinische Besserung erfolgt durch Weidehaltung oder das Reduzieren von Staub in der Umgebung (Fey 2006; Pirie 2013) und ist bei COB-anfälligen Pferden die Behandlung erster Wahl (Thomson und McPherson 1984).

Die chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes zeigt eine sehr komplexe immunologische Pathogenese, die bis heute nicht vollständig entschlüsselt wurde. Nach heutigen Erkenntnissen ist aber sicher zu sagen, dass COB einem weitaus komplexeren Prozess zu Grunde liegt, als der einer einfachen allergischen Erkrankung wie einer Insektenbiss-Hypersensivität oder dem atopischen Asthma bei Menschen. Auf den ersten Blick zeigen sich viele Ähnlichkeiten im klinischen Bild zu der humanen Asthmaerkrankung: reversible und wiederkehrende Obstruktion der Atemwege, ausgelöst durch das Inhalieren von allergenen Luftpartikeln, sofortige Verbesserung erfolgt bei Eliminierung der Auslösungsfaktoren und eine erfolgreiche Therapie mit Kortikosteroiden und Bronchodilatoren (Robinson 2001). Es liegt daher nahe, eine ähnliche immunologische Basis bei der COB zu vermuten.

Bei humanem Asthma gibt es eine frühe Typ I-Reaktion mit Mastzellen und IgE als Hauptfaktoren bei Einwirkungen von reizenden Allergenen; ein direkter Spasmus der Bronchien ist die Folge (Deaton et al. 2007). 8 bis 12 Stunden danach folgt eine verspätete Typ IV –Hypersensitivitätsreaktion, charakterisiert durch bronchial einströmende Infiltration von CD4+T-Zellen, basophilen Granulozyten, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der COB des Pferdes nicht zu einem direkten Spasmus der Bronchien. Eine frühe Hypersensitivitätsreaktion mit Allergenveränderung bleibt aus und eine verspätete Antwort mit dominierender neutrophiler Genese innerhalb von 4 bis 6 Stunden ist charakterisierend (Schmallenbach et al. 1998; Art et al. 2008).

Da nur COB-anfällige Pferde auf spezielle Antigenveränderungen reagieren, nimmt Robinson an, dass COB eine Überempfindlichkeitsreaktion der Lunge zu spezifischen Antigenen und nicht eine unspezifische Reaktion auf Staub und Allergene in der Stallumgebung sei (Robinson, Derksen et al. 1996). Der Nachweis von T-Helfer Zellen des Typ 2, induziert durch CD4 Lymphozyten in der Lunge vor und nach dem Einfluss von natürlichen Antigenen soll als Beweis genommen werden, dass COB einem immunologischen Mechanismus zu Grunde liegt und es für eine allergische Erkrankung spricht wie das humane Asthma (Lavoie et al. 2001). Dagegen zeigen andere Studien, dass COB eher auf einer Typ I-Antwort mit angeborener Immunität beruht.(Art et al. 2008). Jüngste Versuche, das zytokine Profil der chronisch obstruktiven Bronchitis in eine vorrangig dominante T-Helfer 1 oder T-Helfer 2- Antwort zu kategorisieren, scheiterten und es wird angeraten, sich in Zukunft auf neu entdeckte T-Zell-Typen wie das TH17 oder die regulatorischen T-Zellen zu konzentrieren (Art et al. 2008; Pirie 2013).

3.3.3 Therapie

Atemwegserkrankungen sind neben Erkrankungen des Bewegungsapparates die zweithäufigste Ursache für Leistungsmangel beim Pferd. Umso wichtiger ist eine effiziente Therapie, die bei längerfristiger Behandlungsdauer auch vom Pferdebesitzer oder -halter selbst durchgeführt werden kann (Ehrmann 2012). Eine effektive Therapie der COB sollte mit besonderem Augenmerk auf die Verbesserung der Lufthygiene abzielen. So trägt eine Offenstallhaltung, das Aufstallen mit staubarmer Einstreu, wie zum Beispiel Späne und das Füttern von nassem Heu oder Silage schon zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Bildes bei. Die Lungenfunktion kann allein durch die Veränderung der Haltungsbedingungen innerhalb von drei Tagen verbessert werden (Jackson et al. 2000).

Die Art von Futter hat einen größeren Einfluss auf den Staubgehalt in der Umgebung als die Einstreu. Das Füttern von Heusilage oder nassem Heu statt trockenem Heu reduziert die Staubkonzentration in der eingeatmeten Luft um 60-70 %. Im Vergleich dazu wird bei der Einstreu der Staubgehalt nur um 23-32 % durch das Ändern von Stroh zu Späne reduziert (Clements und Pirie 2007). Das Füttern von nassem Heu ist eine gute Alternative zur Heusilage in Hinsicht auf die Staubminimierung. Dabei zeigt auch die

Studie von Clements und Pirie, dass es keinen Unterschied in der Reduktion von Staub gibt, ob das Heu 30 Minuten oder 12 Stunden gewässert wird.

Detaillierte Aufklärung über mögliche Quellen von Allergenen oder Luftverschmutzungen, die zu Irritationen führen, können also nicht genug betont werden, wenn es um eine wirksame Therapie in der COB-Behandlung geht. Der therapeutische Einsatz von Medikamenten in der Behandlung der COB sollte nur zur vorübergehenden Abhilfe der Bronchenverengung angesehen werden und der Fokus sollte langfristig auf verbessertes Haltungsmanagement liegen (Durham 2001).

Neben der Haltungsoptimierung hat sich meist eine kombinierte Arzneimitteltherapie bewährt, besonders bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung mit sichtbar klinischer Einschränkung. Alle klinisch-pathologischen Aspekte der COB werden verursacht durch eine Entzündungsreaktion in den unteren Atemwegen, sodass der therapeutische medikamentelle Ansatz darauf abzielt, diese Entzündungsreaktion einzuschränken oder zu unterdrücken. Glukokortikoide erfüllen diese Aufgabe sehr gut und können in vielfältiger Art und Weise eingesetzt werden. Sie können systemisch oder lokal verabreicht werden. Die systemische Gabe ist einfach, besonders wenn man das Medikament oral verabreichen kann, aber das Risiko, dass Nebenwirkungen auftreten können, ist wesentlich höher (Robinson 2001). Neben Immunsuppressionen, Hyperglykämie, Polydypsie und Polyurie ist beim Pferd besonders die Hufrehe als Nebenwirkung eine Gefahr. Durch die lokale Aerosoltherapie in der Humanmedizin werden diese Nebenwirkungen vermindert (Kampmann 2001).

So ist ein wichtiger Aspekt in der Behandlung der COB beim Pferd, der immer mehr an Bedeutung erlangt, die Inhalation mit Glukokortikoiden, die unter dem Kapitel 3.3.4. Inhalative Therapie der COB noch näher erläutert wird.

Tabelle 1: Systemisch eingesetzte Glukokortikoide bei COB-Therapie (nach Robinson 2001)

Wirkstoff	Dosis	Verabreichungsform	Kommentar
Prednisolon-Tabletten	2,2 mg/kg alle 24 Std	Oral	Wird gut vom Magen-Darm-Trakt absorbiert
Dexamethason	0,1 mg/kg alle 24 Std	Oral, i.v., i.m.	Effektive Therapie bei i.v. Gabe. Verbesserung in 3-7 Tagen. Stufenweise reduzieren der Dosis nötig.
Dexamethasone-21-isonicotinate	0,04mg/kg alle 3 Tage	i.m.	Langzeit-wirksame Form von Dexamethason,
Triamcinolone	0,09 mg/kg	i.m.	Eine Dosis verbessert Symptome bis zu 3 Wochen (Kann Hufrehe auslösen)

Die bei der COB-Therapie systemisch eingesetzten Glukokortikoide werden in Tabelle 1 aufgeführt. Dexamethason und Prednisolon sind die am meisten systemisch eingesetzten Kortikosteroide. Obwohl es in der veterinärmedizinischen Literatur keinen Beweis für den

nachweislich therapeutischen Effekt gibt, wird Prednison oft vorgezogen, um das Risiko einer Hufrehe geringer zu halten (Jackson et al. 2000). Prednison muss erst in der Leber zu Prednisolon umgewandelt werden, um eine effektive Wirkung zu erzielen. Nach Gabe von Prednison-tabletten bei Pferden zeigte sich nur ein kleiner Anteil von Prednisolon im Blut und bei den meisten überstieg die Prednisolonkonzentration noch nicht einmal die Nachweisgrenze. Das Fehlen von Prednisolonkonzentration erklärt, warum die Gabe von Prednison-tabletten wenig effektiv ist. Dagegen zeigt die orale Gabe von Prednisolon eine 50 % Bioverfügbarkeit (Robinson 2001). Die intravenöse Gabe von Dexamethason zeigt eine schnelle Wirkung. Nach Verabreichung zeigt sich eine Besserung nach 2 bis 4 Stunden. Deshalb nimmt man an, dass Dexamethason eine schnelle Wirkung auf die Regulation der Transkription von Entzündungsmediatoren hat (Cornelisse et al. 2004). Die orale Gabe von Dexamethason zeigt die gleiche effektive Wirkung. Durch eine hohe orale Bioverfügbarkeit von 61 % kommt es schon innerhalb von 6 Stunden zu einer Verbesserung der Symptome. Basierend auf der Messung von dem maximalen Pleuraldruck, der bei der Atmung aufgewendet werden muss, zeigen alle Dexamethasongaben eine Wirkung bis zu 30 Stunden; bei der oralen Gabe von Dexamethason bei nüchternen Pferden sogar eine Wirkungsdauer bis zu 72 Stunden (Robinson et al. 2003). Die Therapie mit Prednisolon zeigt eine schnelle Reduktion der Atemwegsentzündung und eine signifikante Verringerung der Zellzahl, besonders der neutrophilen Zellen. Andererseits sagt der Nachweis von neutrophilen Zellen nachweislich nichts über die Lungenfunktion aus (Jackson et al. 2000).

Die schnellste Verbesserung der Lungenfunktion wird durch die Gabe von Bronchodilatoren erwirkt, wie zum Beispiel durch anticholinerge oder β_2 -adrenerge Agonisten. Atropin bewies sich als am effektivsten hinsichtlich der maximalen Bronchienerweiterung bei klinisch erkrankten Pferden mit einer Verbesserung der Lungenfunktion für bis zu 1 bis 2 Stunden nach intravenöser Gabe (Couetil et al. 2012). Nach einer aktuellen Studie von Couetil wurde N-butylscopolammonium Bromid als sichere Alternative zu Atropin in der Therapie von akuten COB Krisen diskutiert. N-Butylscopolammonium Bromid ist ein nichtspezifischer Antagonist der Muskarinrezeptoren, der die Wirkung des parasympatischen Nervensystems blockiert und zu einer Bronchienerweiterung in der Lunge führt. Die Wirkung ist nur kurzzeitig, also eignet es sich nicht zur Langzeittherapie. Durch das Erhalten von quaternären Ammoniumverbindungen im Vergleich zu Scopolamin und Atropin kann es nicht mehr in das Gehirn gelangen und eine zentrale Wirkung bleibt aus. Die Dosis von 0,3 mg/kg pro Stunde für drei Stunden wird empfohlen und schließt Nebenwirkungen aus (Couetil et al. 2012). Atropin oder N-Butylscopolammonium Bromid verursachen beide nach 10 Minuten eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion.

Auch Clenbuterol, ein β_2 -Agonist, findet sehr häufigen Einsatz in der COB-Therapie aufgrund dessen bronchodilatatorischer Wirkung und der leichten Gabe übers Futter. Zu empfehlen ist aber der kombinierte Einsatz von Clenbuterol mit Kortikosteroiden, da es sonst zu einer Down-Regulation von β_2 -Adrenrezeptoren kommt und so zu einer nachlassenden Wirksamkeit von Clenbuterol bei gleichbleibender Dosis. Dexamethason

wirkt gegen die Clenbuterol induzierte Down-Regulation von dem Lymphozyten-beta-Adrenorezeptor und so ist eine Kombination von Dexamethason mit Clenbuterol als Therapie bei COB sehr förderlich (Abraham et al. 2002).

3.3.4 Inhalative Therapie der COB

Die Inhalationstherapie ist eine effektive Methode zur Behandlung des Respirationstraktes und findet immer breitere Anwendung. Mittlerweile gibt es verschiedenste Medikamente wie Bronchodilatoren, Anti-allergene Wirkstoffe, Entzündungshemmer sowie Antibiotika, die inhalativ appliziert werden können (Duvivier et al. 1997).

Die Therapie mit Aerosolen verbessert die effiziente Behandlung und minimiert die Toxizität und die systemischen Rückstände. Die Dosierungen sind wesentlich niedriger; trotzdem sorgt eine hohe lokale Konzentration des Medikaments für eine optimale Wirkung ohne besondere Nebenwirkungen (Duvivier et al. 1997; Ehrmann 2012).

Die Monotherapie mit einem inhalativ verabreichten β 2-Agonisten oder mit einem Parasympatholytikum mit anticholinergischer Wirkung, wie zum Beispiel Ipratropium Bromid führt zu einer nachweislichen Bronchodilatation bei den meisten Patienten mit reversibler COB. Die Kombination zweier Wirkstoffe führen zu einem synergetischen Effekt, ohne die nachteilige Wirkung des einzelnen Medikaments zu verstärken. In der Pferdepraxis werden oft Kombinationen von verschiedenen Medikamenten wie zum Beispiel β 2-Agonist in Verbindung mit Kortikosteroiden oder Kortikosteroide mit Antibiotika genutzt, um undefinierte Erkrankungen des Atmungstraktes zu behandeln (Duvivier et al. 1997). Die zugelassenen β 2-Sympathomimetika aus der Humanmedizin Salbutamol, Fenoterol oder Terbutalin sowie Salmeterol oder Formoterol stehen nach Umwidmung für die inhalative Therapie zur Verfügung (Ehrmann 2012). Auch aus der Humanmedizin umgewidmete Anticholinergika wie Ipratropiumbromid dienen der Bronchodilatation; dabei ist die niedrigste empfohlene Dosis von Ipratropiumbromid beim Pferd 1,2 mg/500 kg alle 8 Stunden (Duvivier et al. 1997; Bayly et al. 2002). Isotone oder hypertone salinische Lösungen, zusätzlich inhalativ eingesetzt, helfen, den Schleim in den Bronchien zu verflüssigen und erleichtern so dessen Abhusten und Abtransport. Mastzellstabilisatoren, zum Beispiel Chromoglyzinsäure, verhindern durch Membranstabilisierung eine Mastzelldegranulation und somit die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Sie können präventiv eingesetzt werden (Thomson und McPherson 1981).

3.4 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind körpereigene Hormone, die von den Nebennieren gebildet werden. Sie gehören zusammen mit den Mineralokortikoiden zu den Kortikosteroiden. Im Körper wird hauptsächlich Cortisol, auch „Hydrocortison“ genannt, gebildet und in geringem Ausmaß Cortison. Beim Pferd stellt Cortisol 90 % der zirkulierenden Glukokortikoide dar (Klaus und Hapke 1996).

3.4.1 Pharmakokinetik

Synthetische Glukokortikoide sind im Blut zu 80 % an Proteine gebunden. Dabei binden die synthetischen Glukokortikoide fast ausschließlich an Albumin, welches eine hohe Transportkapazität, aber eine niedrige Affinität aufweist (Hogger 2003). Freie Glukokortikoide können sich aufgrund ihrer Lipophilie in alle Gewebe verteilen und die Blut-, Hirn- und Plazentaschranke überwinden (Ungemach 2002).

Glukokortikoide zeigen eine bevorzugte Aufnahme und Annahme in bestimmten Geweben. Bei inhalativ verabreichten Glukokortikoiden spielt die Effektivität der Substanz, ihre Gewebeaffinität und wie schnell eine metabolische Inaktivierung erfolgt, eine besondere Rolle. Die Gewebeaffinität sagt aus, wie langsam die Umverteilung von Zielgewebe zu systemischer Zirkulation erfolgt. Unerwünschte Nebenwirkungen werden maßgeblich bestimmt durch die Konzentration, die der Wirkstoff in systemischer Zirkulation erreicht; so ist auch eine schnelle und komplette Inaktivierung des Wirkstoffes von großer Bedeutung. Da eine nicht unerhebliche Menge bei der Inhalation verschluckt wird, ist eine geringe orale Bioverfügbarkeit mit hohem „first pass“-Effekt von Vorteil (Hogger 2003).

Bezüglich der Halbwertszeiten bestehen erhebliche tierartliche Unterschiede. Diese werden verursacht durch Unterschiede der Bindung an die verschiedenen Blutproteine und der Metabolisierung. Die hepatische Metabolisierung stellt für die verabreichten Glukokortikoide die wichtigste Inaktivierungsreaktion da.

Topisch verabreichte Kortikosteroiden, die nur sehr geringe Plasmakonzentrationen zeigen, werden vollständig biotransformiert. Diese Molekülveränderungen resultieren letztendlich in pharmakologisch inaktiven Metaboliten, die überwiegend renal ausgeschieden werden (Hogger 2003). Die pharmakokinetische Größe, die Eliminationsvorgänge beschreibt, ist die Clearance, die angibt, welches Blutvolumen pro Zeiteinheit von dem Arzneistoff vollständig befreit wird. Inhalativ angewandte Glukokortikoide zeigen eine hohe Clearance, das heißt, es kommt zu einer schnellen metabolischen Inaktivierung und Eliminierung des Wirkstoffes.

Der therapeutische Einsatz von synthetischen Glukokortikoiden ist groß, bei Sportpferden kommen Glukokortikoide besonders bei Erkrankungen des Bewegungsapparates, bei allergisch-chronischen Erkrankungen des Respirationstraktes, bei akuter und chronischer Bronchitis sowie Laryngitis und Dermatosen zu Anwendung (Klaus und Hapke 1996). Diese Autoren merken aber an, dass die Glukokortikoidtherapie eine rein symptomatische Maßnahme darstellt und eine ätiologische Besserung nicht erreicht wird.

Die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide beruht auf der Hemmung der Arachidonsäurekaskade auf Ebene der Phospholipase A. Glukokortikoide induzieren die Synthese von Lipocortin, einem Inhibitor der Phospholipase A. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase wird die Freisetzung von Arachidonsäure ebenfalls blockiert. Glukokortikoide wirken membranstabilisierend, wodurch die Ausschüttung von

Entzündungsmediatoren und Kapillarpermeabilität herabgesetzt wird. Ihr systemischer Einsatz bringt zahlreiche Nebenwirkungen mit sich; deswegen hat sich in der Humanmedizin die inhalative Gabe von Glukokortikoiden als führende Behandlungsform bei chronisch obstruktiver Bronchitis und Asthma durchgesetzt. Mittlerweile werden auch inhalative Glukokortikoide bei Pferden mit COB immer mehr eingesetzt.

Die am häufigsten inhalativ eingesetzten Glukokortikoide sind in Tabelle 2 aufgeführt (Pirie 2013):

Tabelle 2: Inhalativ eingesetzte Glukokortikoide

Wirkstoff	Handelsname	Verabreichungsform	Dosis
Beclomethason (RRA: 1345)	Bronchocort	inhalativ	1,4 mg/500 kg alle 12 Std
Fluticason (RRA: 1800)	Flutide	inhalativ	6 mg/500 kg alle 12 Std
Budesonid (RRA:993)	Pulmicort	inhalativ	1,5 mg/500 kg alle 12 Std

Im Vergleich zum Dexamethason (relative Rezeptoraffinität, RRA: 100) haben die genannten Kortikosteroide eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu Glukokortikoidrezeptoren, ihre Konzentration im Zielgewebe ist so höher. Es wird dadurch eine gute therapeutische Wirksamkeit mit Einschränkung von unerwünschten Nebenwirkungen erzielt. Bei der Anwendung von Beclomethason Dipropionid zeigt sich eine Verbesserung der respiratorischen Ventilation in COB Pferden innerhalb einer Woche und führt zur weiteren Verbesserung in der zweiten Woche (Ammann et al. 1998).

Fluticason zeigt die gleiche effektive Wirkung zu intravenös gegebenem Dexamethason, um Exazerbationen bei COB Pferden zu verhindern. Weniger effektiv zeigt es sich bei kurzfristiger Gabe in akuten COB-Fällen. Eine Kombination mit einem Bronchodilatator, wie zum Beispiel Albuterol, kurz vor der Verabreichung von Fluticasone gegeben, kann die Wirkung bei vorliegender Obstruktion und Mukusbildung verbessern (Robinson et al. 2009). Eine Langzeitgabe von inhalativ verabreichten Fluticason Propionat über 11 Monate hat gezeigt, dass die therapeutische Dosis keinen Einfluss auf das Immunsystem nimmt und es zu keinen klinisch auffälligen Nebenwirkungen kommt (Dauvillier et al. 2011).

3.4.2 Budesonid

Budesonid ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid und wird hauptsächlich in der Behandlung von Krankheiten der Atemwege angewendet. Als Aerosol wird es vor allem in der Langzeittherapie von Asthma bronchiale, einer chronischen Bronchitis oder einer COPD eingesetzt.

Literatur

Inhalativ verabreichtes Budesonid hat eine geringere Bindungsaffinität zu den Glukokortikoidrezeptoren als Fluticason oder Beclomethason. In der Praxis hat es sich durchgesetzt, da sich Budesonid durch die hohe Gewebeaffinität schnell am Zielgewebe bindet und dort ein Wirkstoffdepot bildet (Miller-Larsson et al. 1998). Die Umverteilung und der Abtransport des Wirkstoffes in die systemische Zirkulation sind verlangsamt und es kommt zu keinen hohen Plasmakonzentrationen, eine Gefahr von Nebenwirkungen ist deshalb minimiert (Hogger 2003).

Budesonid wird über die Leber inaktiviert und unter anderem zu 16 α -Hydroxy-Prednisolon metabolisiert. Budesonid zeigt eine hohe Clearance-Rate. Clearance beschreibt pharmakokinetisch die Größe der Eliminierungsvorgänge, die bei Budesonid fast dem hepatischen Blutfluss entspricht und so die maximale Eliminierungsgröße von hepatischen Arzneistoffen aufweist (Derendorf et al. 1998). Therapeutisch eingesetzt, erzielt es die Verbesserung klinischer Symptome bei geringgradig bis mittelgradig COB-erkrankten Pferden und zeigt einen positiven Therapieeffekt (Kampmann 2001).

4. Materialien und Methodik

4.1 Versuchsaufbau

Bei diesem Versuch wurde die Nachweisbarkeit von Budesonid nach inhalativer Verabreichung beim gesunden und lungenkranken Warmblutpferd in Korrelation mit dessen Wirksamkeit ermittelt. Das Versuchsprotokoll umfasste 19 Tage, gegliedert in allgemeine und spezielle Lungenuntersuchungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen, der zehntägigen Inhalationsphase und an sechs Tagen Probenentnahmen.

Im Rahmen dieses Versuchs wurden 16 Reitpferde nach der allgemeinen und speziellen Lungenuntersuchung in die Gruppen „gesund“ oder „chronisch lungenkrank“ eingeteilt und über 10 Tage zweimal täglich mit einer Budesonidsuspension inhaliert. Die Inhalation fand in Ruhe oder unter Belastung statt, wobei die Einteilung unter Berücksichtigung eventueller orthopädischer Erkrankungen, aber unabhängig vom Schweregrad der Lungenerkrankung erfolgte. Im Anschluss wurden zur Nachweisbarkeit der Budesonidkonzentration bei den untersuchten Pferden in festgelegten Abständen über sechs Tage Blut und Urinproben gewonnen. Die Proben wurden zur Aufarbeitung und weiteren Analyse an das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (DSHS Köln) gesendet.

4.2 Patientengut

Bei den 16 Probanden handelte es sich um Patienten der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin sowie um klinikeigene Pferde. Über den Behandlungszeitraum wurden alle Pferde auf Spänen aufgestellt und mit nassem Heu gefüttert, um gleiche Bedingungen für alle Probanden zu schaffen. Detaillierte Angaben zu den Pferden sind der nachfolgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Angaben zu dem Patientengut

Pferd (Nr.)	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Stockm aß (cm)	KGW (kg)	Gesundheits status	Inhalationsgruppe 1: unter Belastung 2: in Ruhe
2.	12	Stute	Hannoveraner	170	550	RAO/COB in Remission	1
5.	10	Wallach	Oldenburger	170	560	RAO/COB in Remission	1
7.	22	Wallach	Traber	159	450	RAO/COB in Exacerbation	1
11.	12	Wallach	Deutsch. Reitpony	148	350	RAO/COB in Exacerbation	1
1.	5	Stute	Pony-Mix	132	320	Gesund	1
8.	16	Wallach	Warmblut	170	550	Gesund	1
17.	8	Wallach	Pinto	136	350	Gesund	1
18.	10	Stute	Tarpan	136	420	Gesund	1
3.	19	Stute	Araber-Mix	152	400	RAO/COB in Exazerbation	2
4.	10	Wallach	Traber	162	480	RAO/COB in Remission	2
9.	23	Stute	Araber	150	450	RAO/COB in Exazerbation	2
13.	22	Stute	Warmblut	168	550	RAO/COB in Exazerbation	2
16.	8	Stute	Warmblut	152	450	Gesund	2
19.	12	Stute	Kleinpferd	140	300	Gesund	2
20.	16	Wallach	Deutsches Reitpony	137	340	Gesund	2
21.	10	Wallach	Warmblut	158	470	Gesund	2

4.3 Voruntersuchung

Bei allen Patienten wurde ein detaillierter Vorbericht im Hinblick auf Vorerkrankung, Lungenstatus und COB-Vorgeschichte erhoben. Über die ersten drei Tage wurden jeweils eine klinische Allgemeinuntersuchung und eine spezielle Untersuchung des Atmungsapparates sowie eine arterielle Blutgasentnahme durchgeführt.

Des Weiteren erfolgten eine Untersuchung unter Belastung mit Erhebung der Wiederberuhigungswerte der Herz- und Atemfrequenz, eine Endoskopie mit Tracheobronchialsekret-Analyse und bronchoalveolären Lavage, Thoraxröntgen und eine Interpleuraldruckmessung, um den aktuellen Erkrankungsstatus der Patienten zu ermitteln.

4.3.1 Allgemeine und spezielle Untersuchung

Im Rahmen der allgemeinen Untersuchung des Patienten wurde die Kennzeichnung des Pferdes (Alter, Rasse, Geschlecht) und der Vorbericht erhoben und mithilfe eines standardisierten Untersuchungsbogens dokumentiert (siehe Anhang: Untersuchungsbögen).

Bei der klinischen allgemeinen Untersuchung wurde die Haltung des Pferdes, der Ernährungs- und Pflegezustand, das Verhalten und der Habitus des Pferdes protokolliert.

Die Puls- und Atemfrequenz wurde in Ruhe gemessen, das Herz wurde auskultiert, die Schleimhautfarbe und die kapillare Füllungszeit überprüft und die Lnn. mandibulares palpirt.

Am Anfang der Untersuchung wurde das Pferd auf Nasenausfluss untersucht und dessen Farbe und Viskosität beurteilt. Die Bestimmung des Atmungstyps erfolgte unter Einteilung in kostal, kostoabdominal oder abdominal. Zudem wurde auf das Vorliegen einer Dyspnoe geachtet, die entweder als inspiratorisch (Nüsternblähen, Afteratmung, Einziehung der Interkostalräume), expiratorischen (Doppelschlägigkeit, Dampf Rinne, Afteratmung) oder gemischt beurteilt wurde.

Die Auslösbarkeit von Husten wurde durch Druck auf die ersten Tracheobronchialsphingen untersucht. Die Auskultation der Lunge erfolgte im Seitenvergleich am stehenden Pferd. Beide Lungenflügel wurden im Bereich der Bifurcatio tracheae, im kranioventralen und im kaudodorsalen Bereich des Thoraxes miteinander verglichen. Dabei wurde auf das Auftreten von einem inspiratorisch verschärftem, vesikulärem Atemgeräusch, einem verschärftem bronchialem Atemgeräusch in der Inspiration oder Expiration, Rasseln, Giemen oder Knistern geachtet. Bei der Lungenperkussion wurde die Hammer-Plessimeter Methode nach Zirchner und Deegener (1970) verwendet, um die kaudoventralen Lungengrenzen zu bestimmen.

Die spezielle klinische Untersuchung erfasste neben Lungenauskultation und -perkussion eine Blutgasentnahme, die Bronchoskopie mit Entnahme von Tracheobronchialsekret (TBS) und einer bronchoalveolären Lavage (BAL), Thoraxröntgen und eine Interpleuraldruckmessung.

Die allgemeinen und speziellen Untersuchungen an den ersten drei Tagen wurden auf einem standardisierten Untersuchungsbogen festgehalten (siehe Anhang: Untersuchungsbögen).

Die Pferde wurden anhand der Untersuchungsergebnisse einer lungengesunden Gruppe und einer Gruppe mit COB/RAO zugeteilt. Die Klassifizierung wie auch die Einstufung des Schweregrades der Lungenerkrankung erfolgte nach einem modifizierten, validierten Score- System nach Ohnesorge et al. (1998) (siehe Anhang Tabelle 5), bei dem

entsprechend internationalen Empfehlungen der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BALF anstatt des TBS berücksichtigt wurde (Robinson 2001).

Arterielle Blutgasanalyse

Zur Entnahme des arteriellen Blutes für die Blutgasanalyse wurde die rechte Arteria carotis communis eine Hand breit über dem Brusteingang lokal handdesinfiziert und mit einer Einmal-Injektionskanüle, (0,70 x 30 mm BL/LB, Gr. 12, 22 G x 1¼", Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) diagonal zum gegenüberliegenden Hüfthöcker des Pferdes punktiert.

Das Blut wurde luftblasenfrei in Blutgaskapillaren (*Capillary Tubes*, ~200µl, Cobas, Roche Diagnostics GmbH) aufgefangen. Mithilfe des Blutgasmessgerätes (*Modell Cobas b 123*, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden der Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), der Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂) und die daraus sich errechnende arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) des Blutes laborchemisch in mmHg bestimmt.

Die physiologischen Werte von dem Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO₂) betragen nach 40 mmHg (+/- 5 mmHg), für die des Sauerstoffpartialdruckes (PaO₂) 100 mmHg (+/- 5 mmHg).

Die errechnete arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) sowie Abweichungen des PaO₂ und des PaCO₂ wurde zur Abschätzung des Schweregrades der COB herangezogen.

Belastungstest

Der Belastungstest dient zur Untersuchung, ob eine Verzögerung der Wiederberuhigungszeiten vorlag. Eine Leistungsintoleranz kann durch eine eingeschränkte Lungenfunktion aufgezeigt werden. Zu Beginn wurden die Atem- und Pulsfrequenz in Ruhe gemessen. Das Pferd wurde an der Longe nach ausreichender Schrittphase zehn Minuten getrabt und fünf Minuten galoppiert, danach wurde direkt die Puls- und Atemfrequenz gemessen und alle fünf Minuten wiederholt, bis die Ruhewerte wieder erreicht wurden. Zusätzlich wurden noch die Laktatwerte im Blut vor und nach der Belastung gemessen, siehe Anhang: Untersuchungsbögen.

Interpleuraldruckmessung

Gemessen wurde der interpleurale Druckverlauf bei lungengesunden und chronisch lungenkranken Pferden. Dabei wurde die indirekte interpleurale Druckmessung wegen der einfachen Durchführung und des geringeren Risikos besonders für Verlaufs- und Screening-Untersuchungen bevorzugt (McPherson und Lauson, 1974).

Mithilfe eines Venti-Graphen (*Modell PG100/REC*, Böhringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) wurde die Druckdifferenz im Ösophagus gemessen. Der Venti-Graph besteht aus einem Druckwandler mit Leuchtdiodenanzeige und gekoppeltem Schreibwerk, welches die Druckkurven aufzeichnet. Eine Sonde mit einer Druckkammer

am vorderen Ende ist mit dem Druckmessgerät verbunden. Am stehenden nicht sedierten Pferd wurde die Sonde über die Nase in den Ösophagus bis in den Bereich der Herzbasis vorgeschoben. Nach einer Adaptionszeit von ca. 5-10 Minuten konnte die interpleurale Druckverlaufskurve aufgezeichnet werden.

Die Aufzeichnung der interpleuralen Druckverlaufskurve ermöglicht eine Auswertung hinsichtlich der Atemfrequenz, des Verhältnisses von Expirations- und Inspirationsdauer, des Druckverlaufes und der maximalen interpleuralen Druckdifferenz während eines Atemzuges ($\Delta P_{pl \max}$). Die Druckdifferenz, die während der Ventilation auftritt, ist beim gesunden Pferd relativ niedrig. Eine signifikante Zunahme von $\Delta P_{pl \max}$ spiegelt eine Verschlechterung der Lungenfunktion wider. Zur Ermittlung der $\Delta P_{pl \max}$ wurden die aufgezeichneten Druckkurven bei gleichmäßiger ruhiger Atmung mithilfe der beiliegenden Auswertungsschablone gemessen, dabei wiesen lungengesunde Pferde $\Delta P_{pl \max}$ -Werte zwischen 2-4 cm H₂O auf.

Bronchoskopie mit Tracheobronchialesekret (TBS)- und Bronchoalveoläre Lavage (BAL) Entnahme

Die Patienten wurden in den Stand geführt und mit Detomidin (*Cepesedan*® 0,01 mg/KG) und Levomethadon (*L-Polamivet*® 0,05-0,1 mg/KG) sediert. Mithilfe eines 60 cm langen, flexiblen Videoendoskops (*Videomed GmbH, München, Deutschland*) von 1,8 m Länge wurde die Tracheobronchoskopie durchgeführt, dabei wurde das Vorkommen von Schleim in den oberen Atemwegen, dessen Konsistenz, die Farbe der Schleimhaut und die Breite der Carina tracheae beurteilt und nach dem TBS Score-System von Diekmann (1987) bewertet (siehe Tabelle 4).

Unter Sichtkontrolle wurde eine Tracheobronchialesekretprobe entnommen, die im klinikeigenen Labor zytologisch weiter untersucht wurde. Vor der Entfernung des Endoskops wurde über den Arbeitskanal 20 ml Lidocainhydrochlorid 2 %ig (*Lidocainhydrochlorid 2 %, bela-pharm*) in die Hauptbronchien gesprüht für die nachfolgende bronchoalveoläre Lavage (BAL).

Die BAL-Entnahme wurde blind mit einem speziellen sterilen BAL-Katheter aus Silikon mit einer Länge von 3 m und einem äußeren Durchmesser von 11 mm (*Broncho-Alveolar Lavage Catheter (Silicone), SurgiVet*®) durchgeführt. An der Spitze befindet sich ein aufblasbarer Ballon, der den Rückfluss der Spülflüssigkeit verhindert. Der BAL-Katheter wurde über den Nasengang bei gestreckter Halshaltung des Pferdes bis zum Punkt eingeführt, an dem ein leichter Widerstand zu fühlen war. Mithilfe einer 10 ml Spritze (*Injekt*®) wurde der Ballon aufgeblasen, um die Fixierung des Katheters zu gewährleisten. Bei gutem Sitz wurden 500 ml sterile, phosphatgepufferte Salzlösung (*PBS, BioWhittaker*®) über den BAL-Katheter eingegeben und im Anschluss vorsichtig mit einer 100 ml Spritze (*Omnifix*®) angesaugt. Die gewonnene BAL-Flüssigkeit wurde im klinikeigenen Labor zytologisch untersucht.

Tabelle 4: Beurteilung der TBS nach Deegen und Dieckmann(1990)

Sekretmenge	Score	Sekretviskosität	Score
Keine Sekretansammlung keine Sekretflocken	0	Schleimhaut feucht, nur geringe Menge wässrigen Sekrets aspirierbar	0
Keine Sekretansammlung, einzelne Sekretflocken	1	Schleimhaut feucht, einzelne feine Sekretflocken in wässrigem Sekret, leicht aspirierbar	1
Flache, ventrale Sekretansammlung, einzelne größere Sekretflocken	2	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret, ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar	2
Deutlich ventrale Sekretansammlung, reichlich Sekretflocken	3	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret mit einzelnen konsistenteren Sekretflocken, ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar	3
Durchgehende ventrale Sekretstraße, Sekretseebildung	4	Schleimhaut feucht/pappig muköses bis mukopurulentem Sekret, einige dorsale Schleimflocken, deutlich erschwerte Aspiration	4
Mehr als ein Viertel des Tracheallumens füllender Sekretstraße/-see	5	Schleimhaut pappig/ trocken, muköses bis purulentem Sekret, reichlich dorsale Schleimflocken, z.T. spinnwebenartige Schleimformationen, erschwerte Aspiration (kaum noch möglich)	5

Labordiagnostik

Die Tracheobronchialsekretprobe wurde direkt auf einen Objektträger ausgestrichen, angefärbt nach Pappenheim (*May-Grünwald-Eosin-Methylenblaulösung*) und anschließend unter dem Lichtmikroskop analysiert.

Es wurde der Gehalt von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in die Kategorien „nicht vorhanden (-)“ bis „hochgradig vorhanden (++++)“ eingestuft. Das Vorkommen von Kreola-Körperchen, Epithelzellen, Becherzellen, Riesenzellen, Curschmann-Spiralen und Bakterien wurde als „geringgradig“ bis „hochgradig“ beziehungsweise „nicht vorhanden“ kategorisiert.

Die zurückgewonnene bronchoalveoläre Flüssigkeit wurde als erstes bei 1.500 Umdrehung für 10 Minuten in der Zentrifuge Rotofix 32 (Typ: 1205) zentrifugiert, das zellreiche Segment wurde auf einen Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, angefärbt nach Pappenheim (*May-Grünwald's-Eosin-Methylenblaulösung*) und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Unter der 400fachen Vergrößerung wurde sich ein Überblick über den Ausstrich verschafft, um dann unter 1000facher Vergrößerung mäanderförmig auf einem Abschnitt des Objektträgers die Zellen zu zählen und auszuwerten. Es wurde der Gehalt an Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten

ausgezählt und der prozentuelle Anteil errechnet. Auf die gleiche Weise wurde das Vorkommen von Epithelzellen, Riesenzellen, Bakterien und Erythrozyten quantifiziert.

Die Befunde der einzelnen Untersuchungen wurden zusammengetragen und anhand eines modifizierten Score Systems nach Ohnesorge et. al. (1998) wurde der klinische Gesundheitsstatus der Lunge des Patienten ermittelt (siehe nachfolgende Tabelle 5).

Tabelle 5: Score-System (modifiziert nach Ohnesorge 1998)

Untersuchung	Befund	Punkt- zahl	Score		
			Tag 1	Tag 2	Tag 3
Hustenauslösung (max. 1 Punkt)	Nicht auslösbar	0			
	Mehrfach auslösbar	1			
	Auswurf	1			
	Spontaner Husten	1			
Ruhedyspnoe (max. 3 Punkte)	Abdominale Atmung	1			
	Verlängerte Expiration	1			
	Einsinkende ICR	3			
	Nüsternblähen	3			
	Dampfrinne	3			
	Afteratmung	3			
Lungenperkussion (max. 2 Punkte)	Erweiterung 3 Finger	0			
	Erweiterung handbreit	1			
	Dämpfung	2			
Lungenauskultation (max. 2 Punkte)	Rasseln	2			
	Knistern	2			
	Giemen	2			
Tracheobronchoskopie (max. 2 Punkte)	Sekret deutlich vermehrt u./o. mäßig viskös	1			
	Sekret hgr. vermehrt u./o. zähviskös	2			
	Carina tracheae deutlich verdickt	1			
BAL (max. 3 Punkte)	Neutrophile < 8 %	0			
	Neutrophile 8-15 %	1			
	Neutrophile 15-25 %	2			
	Neutrophile >25 %	3			
Blutgasanalyse (max. 2 Punkte)	AaDo ₂ 7-14mmHg	1			
	AaDo ₂ > 14mmHg	2			

Röntgen

Zur weiterfolgenden speziellen Lungenuntersuchung gehörte das Röntgen der Lunge mit einer digitalen Röntgenanlage (*Gierth RHF 200 ML*). Es wurden zwei laterolaterale Aufnahmen der Lunge aufgenommen; kaudoventral im Bereich der Herzbasis und der kaudodorsale Anteil der Lunge. Die vorgegebene Geräteeinstellung maß 90 kV und 30 mAs mit einem Film-Fokus-Abstand von einem Meter. Die Röntgenbilder wurden hinsichtlich COB-typischen Bronchienwandverdickungen und interstitieller Verschattungen beurteilt (Gehlen et al. 2009).

4.4 Inhalationsphase

Nach der Voruntersuchung schloss sich die Inhalationsphase an. Für die Studie wurde das geschlossene, mobile Inhalationssystem *SaHoMa™-II mobile ultrasonic nebulizer* von der Firma NEBU-TEC benutzt (Abbildung 1).

Abbildung 1: Inhalation mit der SaHoMa-II Inhalationsmaske in Ruhe



Die Inhalationsmaske ist ein mobiler Ultraschallvernebler mit Akkubetrieb. An den Tagen 3-5 wurden die Probanden an das Inhalationsequipment gewöhnt. Dazu wurde ihnen zweimal täglich mit dem SaHoMa-II Inhalator physiologische Kochsalzlösung für 10 Minuten inhaliert.

Ab Tag 6 wurden die Pferde zweimal täglich mit der Budesonid-Suspension (*Pulmicort® 1mg/2ml Ampullen, 3µg/KG*) über einen Zeitraum von 10 Tagen inhaliert. Die Inhalation wurde je nach Einteilung in den Inhalationsgruppen in Ruhe oder unter Belastung durchgeführt. Bei der Inhalation unter Belastung wurden die Pferde an der Longe nach

anfänglicher Aufwärmphase im Schritt, 10 Minuten im Trab und fünf Minuten im Galopp inhaliert.

4.5 Probenentnahme

Die Probenentnahme startete nach der letzten Inhalation an Tag 15 des Versuchsprotokolls. Den Patienten wurden täglich Blut- und Urinproben bis einschließlich Tag 20 entnommen. Am ersten Tag der Probenentnahme erfolgte die Blutentnahme in den ersten 12 Stunden alle vier Stunden, an den folgenden fünf Tagen einmal täglich.

4.5.1 Blutprobenentnahme- und Lagerung

Die Blutentnahme erfolgte am Pferd abwechselnd an der V. jugularis dexter oder sinister. Dabei wurde die Stelle zur Venenpunktion vorher mit einem Alkoholtupfer desinfiziert und die Vene mit einer rosa Kanüle (*einmal Injektionskanüle, 20 x 40 mm BC/SB, 18G x 1 ½*) punktiert.

Das Vollblut wurde gleichmäßig in zehn 4 ml EDTA-Röhrchen aufgefangen und direkt im klinikeigenen Labor 15 Minuten bei 3.000 Umdrehungen pro Minute in der Zentrifuge *Modell Rotofix 32* zentrifugiert. Der sich als Plasma darstellende Überstand wurde in zwei Serumröhrchen pipettiert, beschriftet und bis zur Aufarbeitung bei -20 Grad Celsius eingefroren.

4.5.2 Urinprobenentnahme- und Lagerung

Die Urinproben wurden einmal täglich über sechs Tage gesammelt. Den Wallachen wurde ein speziell angefertigter, klinikeigener Urinbeutel aus Hartgummi umgeschnallt, ausgekleidet mit einer frischen Polyethylen-Plastiktüte, in der der Harn aufgefangen wurde.

Bei Stuten oder Wallachen, die den Urinbeutel nicht tolerierten, wurde mit einem an einem ca. 90 cm langen Holzstab befestigtem 1-Liter-Messbecher Spontanharn gesammelt (Abbildung 2). Vor dem Sammeln des Urins wurde der Messbecher jedes Mal mit einer frischen Polyethylen-Plastiktüte ausgekleidet.

Abbildung 2: Auffangen von Spontanharn



Die Probe wurde direkt in einen 100 ml Urinbecher mit Schraubverschluss aus Polypropylen überführt und bis zur Untersuchung im Labor bei -20 Grad Celsius gelagert.

4.6 Probenaufbereitung

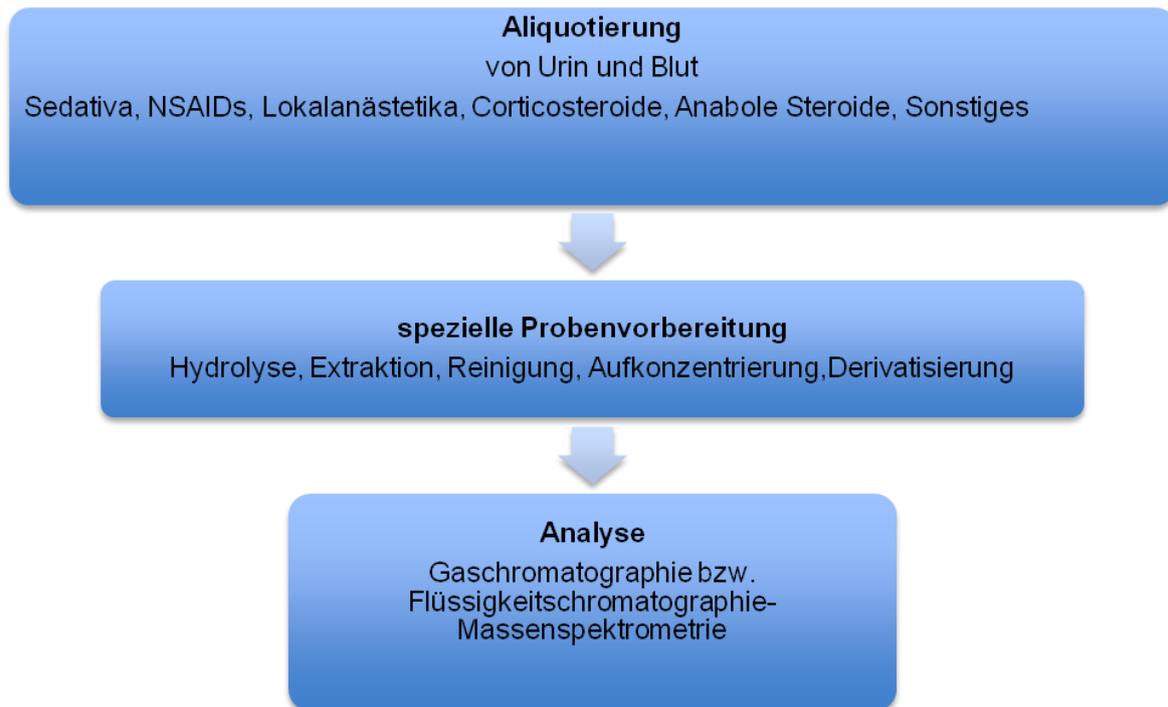
Die Proben wurden an das Labor für Dopinganalytik am Institut für Biochemie der DSHS Köln geschickt und dort analysiert (Abbildung 3).

Die Isolierung kleinster Mengen chemischer Substanzen aus Urin und Blut erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung, bei der Flüssig-Flüssig- und Fest-Phasen-Extraktionsverfahren zum Einsatz kommen. Im Anschluss kann eine Derivatisierung der Substanzen erfolgen. Schutzgruppen werden in Moleküle eingeführt, um sie besser zugänglich für die Chromatographie und Massenspektrometrie zu machen.

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion lösen sich die gesuchten Substanzen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften bei einem bestimmten pH-Wert besser in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Ether) als in der Probe.

In nachfolgenden Schritten kann die Etherphase durch Zentrifugation vom Urin beziehungsweise Blut getrennt und analysiert werden. Ein anderes Verfahren, die sogenannte Festphasenextraktion, nutzt die Wechselwirkung von Arzneistoffen zu chemisch modifizierten Oberflächen, die als Festphase in zum Beispiel Säulen aufgebracht sind. Auch hierbei wird eine Isolierung der gesuchten Substanzen aus der Probe erreicht.

Abbildung 3: Screeningverfahren in der Pferde-Dopinganalytik



4.6.1 Plasmaprobenvorbereitung

Vor der Analyse wurden 2 ml Plasma aliquotiert und 0.2 ng Flunisolid als interner Standard zugesetzt. Durch Zugabe von ca. 200 mg $K_2CO_3/NaHCO_3$ -Puffer wurde der pH-Wert auf 9.6 eingestellt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 5 ml tert.-Butylmethylether und 20-minütiges Schütteln. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 1.800 U/min zentrifugiert, die Etherphase in ein weiteres Reagenzglas überführt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trocknung eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μ l Ammoniumacetatpuffer (0.1 % Eisessig, pH 3.5) plus Acetonitril (3:2) angelöst. Mit jedem Probenbatch wurde gleichzeitig eine Kalibrierkurve mit mindestens sieben Kalibrierpunkten über den Arbeitsbereich aufgearbeitet, anhand derer die Quantifizierung der Proben durchgeführt werden konnte.

4.6.2 Urinprobenvorbereitung

Vor der Analyse der Urinproben wurden 5 mL Urin aliquotiert und 5 ng Flunisolid als interner Standard zugesetzt. Durch Zugabe von ca. 1,5 g $K_2CO_3/NaHCO_3$ -Puffer wurde der pH-Wert auf 9.6 eingestellt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 7 ml tert.-Butylmethylether und 15-minütiges Schütteln. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 1.800 U/min zentrifugiert, die Etherphase in ein weiteres Reagenzglas überführt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trocknung eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μ l Ammoniumacetatpuffer (0.1 % Eisessig, pH 3.5) plus Acetonitril (3:2) angelöst. Mit jedem Probenbatch wurde gleichzeitig eine Kalibrierkurve mit mindestens sieben Kalibrierpunkten über den Arbeitsbereich aufgearbeitet, anhand derer die Quantifizierung der Proben durchgeführt werden konnte.

4.7 Analytik

Die Aufarbeitung sowie die quantitative Analyse der Plasma- und Urinproben zur Bestimmung der Konzentrationen von Budesonid und dessen Metaboliten, 6 β -Hydroxybudesonid und 16 α -Hydroxyprednisolon wurden im akkreditierten Dopinglabor des Instituts für Biochemie an der Sporthochschule Köln durchgeführt.

Die eigentliche Analyse bestand aus einem chromatographischen Trenn- und einem anschließenden Detektionssystem. Bei der Chromatographie wird zwischen Flüssigkeits- und Gaschromatographie unterschieden. Beide Verfahren dienen der Trennung von Substanzen.

GC-Chromatographie:

Im Gaschromatographen werden die Substanzen bei Temperaturen von zirka 300 Grad Celsius verdampft und mithilfe eines Gasstroms durch eine Kapillarsäule befördert. Durch unterschiedlich molekulare Wechselwirkung mit der stationären Schicht der Innenwand verbleiben die Substanzen unterschiedlich lang in der Säule und können entsprechend ihrer Verweildauer (Retentionszeit) voneinander getrennt werden.

LC-Chromatographie:

Bei Bestimmung von Glukokortikoiden hat sich die Verwendung von LC-MS-Methoden bewährt. Bei der Flüssigkeitschromatografie werden die Substanzen nicht in die Gasphase überführt, sondern in einem geeigneten Lösungsmittel (Laufmittel) durch eine gepackte Säule befördert. Auch bei der Flüssigkeitschromatografie werden die Substanzen durch die Wechselwirkung zur chemisch modifizierten, stationären Phase in der Säule voneinander getrennt.

In dieser Studie erfolgte der Nachweis der Analyten nach dem in der Routinediagnostik zur Detektierung von Glukokortikoiden bereits angewandten Verfahren über die Kombination eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) mit einem Massenspektrometer (MS). Budesonid erfährt eine hohe effektive hepatische Metabolisierung nach oraler und topischer Anwendung, die Folge sind sehr geringe Plasmakonzentrationen die eine höchst sensible analytische Nachweismethode verlangen, welche HPLC/MS nachweislich erfüllt (Dimova et al. 2003; Deventer et al. 2006).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die hier verwendete Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist eine weiterentwickelte Form der Flüssigkeitschromatographie, wobei die Trennung der Substanz an zwei Phasen, der stationären und der mobilen Phase, erfolgt.

Die stationäre Phase liegt als Füllung in einer Säule vor. Bei der Bestimmung von Hormonen und Dopingmitteln sind RP-Säulen (Reverse-Phase-Säulen) die gebräuchlichsten.

Die verwendeten Trennsäulen sind in der Regel 3 bis 25 cm lang mit einem Innendurchmesser von 1-10 mm. Die Korngröße der Säulenfüllung beträgt nur 5-10 µm. Um einen ausreichenden Lösungsmittelfluss zu erreichen, wird das Lösungsmittel mit einem hohen Druck (bis zu 400 bar) durch die Säule gepumpt.

Dem Trennungsverfahren schließt sich in der Regel ein Massenspektrometer an.

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der die gasförmigen Moleküle ionisiert werden, einem Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich ihres Masse/Ladungszahl-Verhältnisses (m/z) auftrennt, und einem Detektor, der die Intensität der erzeugten Ionen misst und daraus ein Massenspektrum erstellt.

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist in vereinfachter Form das Beschießen eines Moleküls mit Elektronen. Im Massenspektrometer zerfällt ein Molekül nach Elektronenbeschuss immer in die gleichen Bruchstücke. Damit ergibt sich eine Art "Fingerabdruck", mit dem eine Substanz charakterisiert, also identifiziert werden kann.

Die Massenspektrometrie wird als eindeutige Identifizierungsmethode von Substanzen in der Dopinganalytik eingesetzt, wobei ein empfindlicher Messbereich im Pico- und Nanogramm routinemäßig erreicht werden kann.

4.7.1 Analyse der Plasmaproben

Die LC-MS/MS Analysen wurden an einem *Agilent Series 1260* Flüssigkeitschromatographen (Waldbronn, Germany), in Verbindung mit einem *AB Sciex 5500 QTrap Triple Quadrupol* Massenspektrometer durchgeführt. Die Ionisation erfolgte mit einem Electrospray-Ionisations-Interface (ESI). Als analytische Säule wurde eine *Nucleodur® C18 Pyramid* (2 x 50 mm, 1.8 µm) mit Vorsäule von *Macherey und Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet. Als mobile Phasen wurden Ammoniumacetat-Puffer A (5 mmol Ammoniumacetat, 0.1 % Essigsäure, pH 3.5) und Acetonitril B eingesetzt. Die Flussrate betrug 0.2 ml/min bei linearem Gradient von 0 % @ 100 % B in 7,5 Minuten mit fünf Minuten Reequilibrierungszeit und einem Injektionsvolumen von 10 µl.

Die Interfacetemperatur betrug 500 Grad Celsius. Im negativen Ionisationsmodus wurden Acetat-Adduktionen gebildet. Diagnostische Produktionen entstanden nach kollisionsinduzierter Dissoziation mit Stickstoff (2.3×10^{-3} Pa) und wurden im MRM-Modus aufgezeichnet. Für die Quantifizierung wurden die Ionenübergänge m/z 489/357 und m/z 493/357 für Budesonid bzw. den internen Standard Flunisolid aufgezeichnet. Budesonidkonzentrationen wurden über die Signalfächen von Budesonid in Relation zu den Flächenwerten des internen Standards errechnet. Im Rahmen der Methodvalidierung wurde für alle 3 Analyten Spezifität, Wiederfindung, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Stabilität im Urin und Plasma getrennt festgelegt. In insgesamt 121 Plasmaproben wurde die Konzentration von Budesonid bestimmt. Für die Nachweisgrenze (LOD) von Budesonid wurde ein Wert von 5 pg/mL festgesetzt und eine Bestimmungsgrenze (LOQ) von 10 pg/mL.

4.7.2 Analyse der Urinproben

Das angewandte Analyseverfahren bei den Urinproben entsprach weitgehend der Analyse im Plasma. Allerdings wurde im positiven und negativen Ionisationsmodus gemessen. Für den Nachweis von Budesonid und 6 β -Hydroxybudesonid wurden MRM-Übergänge aufgezeichnet, die sich aus der Bildung von Acetat-Adduktionen ableiten, während der Nachweis von 16 α -Hydroxyprednisolon zusätzlich über Ionenübergänge geführt wurde, die sich aus protonierten Molekülen ableiten.

Von Budesonid und 6 β -Hydroxybudesonid lag die Nachweisgrenze im Urin bei 5 pg/mL und die Bestimmungsgrenze bei 10 pg/mL. Für 16 α -Hydroxyprednisolon wurde für die Nachweisgrenze (LOD) im Urin ein Wert von 100 pg/mL festgesetzt und eine Bestimmungsgrenze (LOQ) von 500 pg/mL.

4.8 Angewandte Statistik

Nicht für alle Pferde konnten zu jedem Messzeitpunkt Messwerte der Wirkstoffkonzentration analysiert werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen in den Gruppen wurden die Voraussetzungen für die Durchführung von T-Tests, insbesondere die Annahme der Normalverteilung des Merkmals, als nicht erfüllt angesehen. Ist die Normalverteilungsannahme verletzt, kann auf sogenannte „nicht-parametrische Testverfahren“ zurückgegriffen werden, welchen (in der Regel) deutlich geringere Annahmen über die Eigenschaften der Datengrundlage zugrunde liegen. Für einen Zwei-Gruppen-Vergleich stellen der Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon Test) und der Median-Test die gängigsten nicht-parametrischen Testverfahren dar.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test stellte in dieser Studie das für die Fragestellung und Datengrundlage angemessene inferenz-statistische Verfahren dar und kann sowohl für metrisch-, als auch ordinal-skalierte Variablen verwendet werden.

Zu Beginn wurde der therapeutische Effekt der Inhalation von den Therapiegruppen in Ruhe und unter Belastung verglichen, siehe 0 Klinische Wirksamkeit der Therapie, Tabelle 9a.

Für den Vergleich des Einflusses der Therapie zwischen den zwei Inhalationsgruppen wurden zunächst die Differenzen (= Treatment Effect) zwischen der Vorher- und Nachher-Messung gebildet und diese zwischen den Gruppen miteinander verglichen. Anhand von Mann-Whitney-U Tests wurde jeweils auf Unterschiede in den Differenzen (= Treatment Effect) zwischen den Gruppen getestet.

Zur statistischen Analyse des Einflusses von dem Gesundheitszustand und dem Verabreichungsmodus auf die Wirkstoffkonzentrationen von Budesonid und dessen Metaboliten in Blut und Urin wurde ebenfalls der Mann-Whitney-U Test (Mann 1947) zur inferenz-statistischen Analyse etwaiger Gruppenunterschiede durchgeführt (Kapitel 5.4

Einfluss des Gesundheitszustandes und des Verabreichungsmodus auf die Wirkstoffkonzentrationen, Tabelle 11.).

Bei der Analyse der Nachweiszeiten konnten für die Budesonid-Messungen (Blut und Urin) keine Nachweiszeiten berechnet werden, da ein substantieller Anteil der Untersuchungspopulation die LOD-Werte bis zum letzten der insgesamt 3 bzw. 5 Messzeitpunkte nicht erreicht hatte (Blut: 6 Pferde; Urin: 9 Pferde). Über den tatsächlichen Zeitpunkt des nahezu vollständigen Wirkstoffabbaus konnte in dieser Subgruppe daher keine Aussage getroffen werden. Dies hatte Implikationen für die Schätzung der Nachweiszeit: Die Zeitdauer bis zum Eintreffen des Ereignisses („LOD Budesonid“) konnte für diese Pferde nicht bestimmt werden. Deshalb wurde in dieser Studie bei der Analyse der Wirkstoffkonzentration im Zeitverlauf eine spezifische inferenzstatistische Datenanalyse zum Analysieren der Wahrscheinlichkeit des Eintretens von Ereignissen gewählt.

Viele medizinische und insbesondere klinische Studien sind an der wiederholten Beobachtung und Messung von Untersuchungseinheiten interessiert. In vielen Fällen tritt das zentrale interessierende Ereignis wie bspw. der Erfolg einer Therapie jedoch erst nach dem Ende einer Studie auf, oder kann aus anderen Gründen nicht mehr beobachtet werden. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn Patienten sich im Laufe einer Studie gegen eine weitere Teilnahme entscheiden oder versterben (Zwiener et al. 2011). In diesem Fall spricht man von zensierten Daten bzw. einer Zensierung (censored data). Im Allgemeinen wird zwischen links- und rechts-zensierten Daten unterschieden. Im ersten Fall sieht sich der Forscher mit unvollständigen Informationen zum Beginn eines Studienzeitraums konfrontiert. Dies ist bspw. der Fall, wenn Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten in eine Studie eintreten. Der zweite Fall – die Rechts-Zensierung – stellt die weitaus häufigere Art der Zensierung dar und beschreibt die Tatsache, dass Studienteilnehmer nicht bis zum Eintreten eines definierten Ereignisses beobachtet werden können. Generell erfordern zensierte Daten spezifische Methoden der inferenzstatistischen Datenanalyse, um unverzerrte Schätzer bspw. die Schätzung der mittleren Dauer bis zum Therapieerfolg zu ermöglichen. Das Ignorieren der zensierten Datenstruktur oder das Ausschließen der von Zensur betroffenen Fälle führt in der Regel zu verzerrten Schätzern. Für die vorliegende Untersuchungspopulation liegt für die Budesonid-Messungen eine Rechts-Zensierung der Datengrundlage vor.

Zur Analyse von Wahrscheinlichkeiten des Eintretens von Ereignissen und insbesondere zum Vergleich dieser Wahrscheinlichkeiten zwischen Gruppen können Techniken der „Überlebenszeitanalyse“ oder „Ereignisanalyse“, auch „Survival Analysis“ verwendet werden (Hosmer 2008). Die Ereignisanalyse stellt ein gängiges Verfahren zur Analyse von Längsschnittdaten dar und bietet sich insbesondere an, wenn (ein Teil der) Daten zensiert ist. Die Ereignisanalyse ermöglicht den systematischen Vergleich der Zeit bis zum Eintreten eines Ereignisses zwischen zwei und mehr Gruppen. Die Analyse zielt hierbei auf die Frage ab, ob ein Ereignis in einer der Gruppen (signifikant) früher oder später eintritt als in den übrigen Gruppen.

Innerhalb der Ereignisanalyse wurde auf den Kaplan-Meier-Schätzer (auch Produkt-Limit-Schätzer) zurückgegriffen (Kaplan & Meier 1958). Geschätzt wird die sogenannte Überlebensfunktion (survival function) von der für jeden (Mess-) Zeitpunkt die Überlebenswahrscheinlichkeit abgeleitet werden kann, siehe Kapitel 5.6 Gesundheitsstatus und Wirkstoffabbau (Abbildung 4 und 5) sowie Kapitel 5.7 Verabreichungsmodus und Wirkstoffabbau (Abbildung 6 und 7).

Der Kaplan-Meier-Schätzer der Überlebensfunktion schätzt damit die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Eintretens eines konkreten Ereignisses und ist definiert als (Hosmer 2008):

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_i \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i}$$

mit

n_i : Anzahl der Einheiten zum Zeitpunkt t_i

d_i : Anzahl der Einheiten mit Eintreten des Ereignisses

und

$$\hat{S}(t) = 1 \text{ wenn } t < t_1$$

Inwieweit das Ereignis LOD in der Gruppe der gesunden Pferde tatsächlich signifikant häufiger bzw. früher auftritt, wurde auf Basis des Log-Rank Tests geprüft (Mantel 1966), siehe Kapitel 5.6. Gesundheitsstatus und Wirkstoffabbau (Tabelle 14) sowie Kapitel 5.7. Verabreichungsmodus und Wirkstoffabbau (Tabelle 15).

Beim Log-Rank-Test handelt es sich um ein nicht-parametrisches Testverfahren. Getestet wird die Nullhypothese: "Es gibt zu keinem (Mess-) Zeitpunkt einen Unterschied hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses zwischen zwei oder mehreren Gruppen". Der Test beruht dabei auf einem Vergleich der Anzahl der tatsächlich eingetretenen Ereignisse in den Gruppen mit der Anzahl der zu erwartenden Ereignisse in den Gruppen falls es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Die Teststatistik folgt einer Chi-Quadrat-Verteilung (χ^2 -Verteilung).

5. Ergebnisse

5.1 Beschreibung der Stichprobe

Die Untersuchungsstichprobe umfasste insgesamt 16 Pferde. Untersucht wurden 8 Stuten und 8 Wallache. Es wurden 8 gesunde und 8 kranke Pferde untersucht. Innerhalb beider Gruppen wurde außerdem eine Unterteilung hinsichtlich des Verabreichungsmodus vorgenommen: Jeweils eine Gruppe inhalierte die Wirkstoffe in Ruhe, die andere Gruppe unter Belastung (Tabelle 6).

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung in ausgesuchten Merkmalen der Patientenpopulation

Variable		n	%
<i>Inhalation</i>	In Ruhe	8	50.0
	Unter Belastung	8	50.0
	Total	16	100.0
<i>Gesundheitsstatus</i>	gesund	8	50.0
	krank	8	50.0
	Total	16	50.0
<i>Geschlecht</i>	Stute	8	50.0
	Wallach	8	50.0
	Total	16	100.0

Das mittlere Alter der Pferde betrug 13,44 Jahre. Das jüngste Pferd war 5 Jahre, das älteste 23 Jahre alt. Das Gewicht der Pferde lag zwischen 300 und 560 kg ($\bar{x} = 434$). Im Mittel betrug die Körpergröße 153,2 cm (Tabelle 7).

Tabelle 7: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation

Variable	Mittelwert	SD	Min	Max	Median	n
Alter (Jahre)	13.44	5.57	5.00	23.00	12.00	16
Gewicht (kg)	434.00	90.06	300.00	560.00	450.00	15
Größe (cm)	153.20	13.55	136.00	170.00	151.00	10

5.2 Klinische Wirksamkeit der Therapie

Die Patienten mit der Diagnose COB wurden vor und nach der 10tägigen Inhalation einer kompletten Lungenuntersuchung unterzogen. An 3 aufeinanderfolgenden Tagen wurden arterielle Blutgasanalysen durchgeführt, TBS- und BAL-Proben entnommen und diese zytologisch untersucht (Tabelle 8a). Die Ergebnisse wurden klinisch eingeteilt und bewertet (Tabelle 8b).

Ergebnisse

Tabelle 8a: Therapieeffekt

Fall	Vor Therapie		pO2 (mmHg)	Nach Therapie		pO2 (mmHg)
	PMN %	AaDO2 (mmHg)		PMN %	AaDO2 (mmHg)	
Unter Belastung						
2	18,75	0	103,85	2,5	0	102,36
5	27,8	1,16	95,66	69,4	2,52	95,89
7	52	2,03	96,8	67,8	0	107,65
11	87,8	12,21	81,81	34,2	0	106,05
In Ruhe						
3	47,4	0	98,45	14,4	0	102,86
4	11,8	0	100,83	1,75	0	94,26
9	27	7,99	94,24	34,2	0	103,03
13	84,2	0,91	99,01	56	0	110,9

Tabelle 8b: Vergleich vor Therapie vs. nach Therapie

Variable	Vor Therapie		Nach Therapie		Wilcoxon z
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
PMN %	44,59	28,87	35,03	27,48	0,98
AaDO2 (mmHg)	3,04	4,55	0,32	0,89	1,45
pO2 (mmHg)	96,33	6,59	91,09	37,07	-1,12
BAL	2,63	0,74	2,13	1,36	1,72*
BGA	0,13	0,35	0,00	0,00	1,00
GS	5,63	2,13	3,63	2,33	2,49**
* p < .10, ** p < .05, *** p < .01					

Für die Messwerte PMN (%), AaDO2 (mmHg), pO2 (mmHg) und BGA können auf Basis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen der Pre- und Post-Therapie-Messung festgestellt werden. Für BAL fällt der Posttherapie-Wert hingegen schwach signifikant geringer aus (z = 1,72, p = 0,0848). Beim Gesamtscore (GS) lagen ebenfalls signifikant geringere Werte nach der Therapie vor (z = 2,49, p = 0,0129).

Die Ergebnisse wurden nach einem modifizierten Score-System von Ohnesorge eingeteilt (siehe Tabelle 5) und beurteilt (siehe Tabelle 9a). Die Scoreeinteilung ist wie folgt:

- BAL Neutrophilenanzahl in der BALF-Zytologie Score: 0 = <8 %; 1 = 8-15 %; 2 = 15-25 %; 3 = >25 %

- BGA AaDO₂ Score: 0 = obB, 1 = 7-14 mmHg; 2 = > 14 mmHg
- GS Gesamtpunktzahl im Score: 0-15 Punkte
- Erkrankungsgrad entsprechend der Gesamtpunktzahl: 0 = gesund (0-1 Pkt.); 1 = ggr. erkrankt (2-3); 2 = mgr. (4-6); 3 = hgr. (>/=7)

In Tabelle 9b wurden die Therapiegruppen in Ruhe und unter Belastung verglichen. Für den Vergleich des Einflusses der Therapie zwischen den zwei Inhalationsgruppen wurden zunächst die Differenzen (= Treatment Effect) zwischen der Vorher- und Nachher-Messung gebildet und diese zwischen den Gruppen miteinander verglichen.

Tabelle 9a: Einteilung nach dem modifizierten Score-System von Ohnesorge

Fall	Vor Therapie		GS	Nach Therapie		GS
	BAL	BGA		BAL	BGA	
Unter Belastung						
2	2	0	4	0	0	0
5	3	0	4	3	0	4
7	3	0	8	3	0	6
11	3	1	8	3	0	5
In Ruhe						
3	3	0	6	2	0	4
4	1	0	2	0	0	0
9	3	0	7	3	0	5
13	3	0	6	3	0	5

Tabelle 9b: Vergleich der Therapiegruppen

Variable	Unter Belastung (Vorher-/Nachher-Differenz)		Nach Therapie (Vorher-/Nachher-Differenz)		U-Test z
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
PMN %	3,11	41,14	16,01	18,36	-0,58
AaDO ₂ (mmHg)	3,22	6,15	2,23	3,87	0,00
pO ₂ (mmHg)	-8,46	11,85	18,94	54,68	-0,29
BAL	0,50	1,00	0,50	0,58	-0,33
BGA	0,25	0,50	0,00	0,00	1,00
GS	2,25	1,71	1,75	0,50	0,77
* p < .10, ** p < .05, *** p < .01					

Auf Basis der Mann-Whitney-U Tests konnte bei keinen Messwerten ein signifikanter Unterschied der Differenzen zwischen den zwei Inhalationsgruppen festgestellt werden.

5.3 Wirkstoffkonzentrationen zu den Messzeitpunkten

Tabelle 10 listet die Wirkstoffkonzentrationen zu den einzelnen Messzeitpunkten auf. Es lagen 15 gültige Messwerte vor (Größe der Stichprobe: 16). Die Standardabweichung betrug 44.35 und repräsentierte die durchschnittliche Entfernung der einzelnen Messungen vom Mittelwert 44.35 pg/mL. Durchschnittlich betrug die Budesonid-Konzentration am ersten Messzeitpunkt (nach 4 Stunden) 71.00 pg/mL. Das Minimum der gemessenen Wirkstoffkonzentration lag bei 11.00, das Maximum bei 150.00. Der Median betrug 57.00. Demnach wiesen die Hälfte aller Beobachtungen (50 % der geordneten Liste) einen Messwert ≤ 57.00 auf.

Tabelle 10: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation

Variable	\bar{x} pg/mL	SD	Min	Max	Median	n
Budesonid (Blut) t1 (4h)	71.00	44.35	11.00	150.00	57.00	15
Budesonid (Blut) t2 (16h)	21.38	11.58	3.00	40.00	17.50	16
Budesonid (Blut) t3 (48h)	16.34	17.81	0.50	74.00	11.50	16
Budesonid (Blut) t4 (96h)	5.88	7.36	0.50	26.00	3.50	16
Budesonid (Blut) t5 (144h)	1.69	2.69	0.50	11.00	0.50	16
Budesonid (Urin) t1 (24h)	61.08	111.83	8.00	408.00	23.00	13
Budesonid (Urin) t2 (72h)	52.34	81.32	2.50	265.00	20.00	16
Budesonid (Urin) t3 (96h)	4.50	0.00	4.50	4.50	4.50	14
Hydroxybudesonid (Urin) t1 (24h)	41.54	71.19	4.50	266.00	10.00	13
Hydroxybudesonid (Urin) t2 (72h)	5.06	1.58	4.50	10.00	4.50	16
Hydroxybudesonid (Urin) t3 (96h)	4.50	0.00	4.50	4.50	4.50	14
Hydroxyprednisolon (Urin) t1 (24h)	967.00	1047.23	99.50	3160.00	594.00	13
Hydroxyprednisolon (Urin) t2 (72h)	99.50	0.00	99.50	99.50	99.50	16

5.4 Einfluss des Gesundheitszustandes und des Verabreichungsmodus auf die Wirkstoffkonzentrationen

Tabelle 11 listet Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zu allen Messzeitpunkten für verschiedene Stichproben-Subgruppen auf. Zur inferenz-statistischen Analyse etwaiger Gruppenunterschiede wurden zusätzlich jeweils Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.

Tabelle 11: Wirkstoffkonzentration zu den Messzeitpunkten: Gruppenspezifische Mittelwerte und Mann-Whitney-U Tests

Variable	t	Gesund		Krank		U-Test	In Ruhe		Belastung		U-Test
		\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	z	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	z
Budesonid (Blut)	t1 (4h)	44.57	(37.74)	94.13	(39.88)	-2.49**	69.13	(47.02)	73.14	(44.72)	-0.35
	t2 (16h)	15.88	(11.19)	26.88	(9.63)	-2.26**	19.63	(12.35)	23.13	(11.29)	-0.63
	t3 (48h)	14.06	(24.38)	18.63	(8.57)	-2.10**	13.94	(11.43)	18.75	(23.14)	-0.05
	t4 (96h)	1.50	(2.02)	10.25	(8.26)	-3.09***	3.50	(3.64)	8.25	(9.48)	-0.92
	t5 (144h)	0.56	(0.18)	2.81	(3.56)	0.43	1.88	(3.69)	1.50	(1.36)	-0.91
Budesonid (Urin)	t1 (24h)	84.67	(158.60)	40.85	(54.94)	0.43	19.50	(6.63)	96.71	(147.54)	-1.08
	t2 (72h)	15.75	(14.64)	88.94	(104.39)	-1.37	50.56	(88.65)	54.13	(79.40)	0.11
	t3 (96h)	8.75	(8.25)	17.67	(25.08)	-0.61	6.25	(6.14)	17.31	(21.67)	-1.14
Hydroxybudesonid (Urin)	t1 (24h)	21.58	(17.31)	58.64	(95.63)	0.07	19.08	(21.30)	60.78	(93.92)	-1.09
	t2 (72h)	4.94	(1.24)	5.19	(1.94)	-0.09	4.50	(0.00)	5.63	(2.15)	-1.46
	t3 (96h)	4.50	(0.00)	4.50	(0.00)	-/-	4.50	(0.00)	4.50	(0.00)	-/-
Hydroxyprednisolon (Urin)	t1 (24h)	432.08	(561.88)	1425.50	(1182.74)	-1.81*	271.58	(260.52)	1563.07	(1112.96)	-2.25**
	t2 (72h)	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-
	t3 (96h)	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-

* $p < .10$, ** $p < .05$, *** $p < .01$

In einem ersten Block (linke Hälfte der Tabelle) wurden die Subgruppen Gesund ($n = 8$) und Krank ($n = 8$) miteinander verglichen. Im direkten Vergleich der Mittelwerte der Wirkstoffkonzentration des Budesonid im Blut zeigt sich folgendes Bild: Für alle 5 Messzeitpunkte (4h, 16h, 48h, 96h, 144h) liegt die Wirkstoffkonzentration in der Gruppe

der kranken Pferde über der mittleren Konzentration in der Gruppe der gesunden Pferde. Mit Ausnahme der Konzentration zum Messzeitpunkt t5 (144h) kann auf Basis der Ergebnisse der Mann-Whitney-U Tests von signifikanten Gruppenunterschieden ausgegangen werden ($p = .05$ bzw. $p = .01$).

Im Gruppenvergleich für die Wirkstoffe Budesonid (Urin), Hydroxybudesonid (Urin) und Hydrocortison (Urin) zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier liegt die durchschnittliche Wirkstoffkonzentration mit einer Ausnahme (Budesonid (Urin) t1) in der Gruppe der kranken Pferde für alle Messzeitpunkte über der Konzentration in der Gruppe der gesunden Pferde. Die Ergebnisse der Mann-Whitney-U Tests lassen für einen Großteil der Gruppenvergleiche jedoch keinen Rückschluss auf signifikante Gruppenunterschiede zu. Lediglich der Vergleich der Konzentration des Hydrocortison zum Messzeitpunkt t1 weist einen schwach signifikanten Gruppenunterschied zwischen gesunden und kranken Pferden auf ($z = -1.81$, $p = .10$). Der zweite Analyseblock (rechte Hälfte der Tabelle) bezieht sich auf Mittelwertunterschiede zwischen solchen Pferden, die den Wirkstoff in Ruhe verabreicht bekommen haben ($n = 8$) und solchen, bei denen die Verabreichung unter Belastung erfolgt ist ($n = 8$). Im Vergleich zu den Mittelwertdifferenzen zwischen gesunden und kranken Pferden zeigt sich hierbei ein geringfügig uneindeutigeres Bild. Zwar liegt die Wirkstoffkonzentration in der Gruppe Belastung für alle Wirkstoffe und Messzeitpunkte über der mittleren Konzentration in der Gruppe in Ruhe, jedoch fallen die Gruppenunterschiede insgesamt tendenziell geringer aus. Dieser Umstand wird zusätzlich von den Ergebnissen der inferenz-statistischen Analysen bestätigt. Mit Ausnahme des Vergleichs der Hydrocortison-Konzentration zum Messzeitpunkt t1 ($z = -2.25$, $p = .05$), zeigen sich keine signifikanten Gruppenunterschiede.

5.5 Analyse der Nachweiszeiten der Wirkstoffkonzentrationen

Allgemein wird die Nachweiszeit definiert als das Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt der Verabreichung eines Wirkstoffes bis zum Zeitpunkt des (vollständigen) Abbaus des Wirkstoffes im Organismus. Innerhalb der vorliegenden Studie definieren sich die Nachweiszeiten für die verschiedenen Wirkstoffe daher als Zeitintervall t mit dem Startpunkt Verabreichung (Inhalation) zur Stunde 0 eines Wirkstoffes bis hin zum (nahezu vollständigen) Abbau des Wirkstoffes im Blut bzw. Urin (Stunde X). Der Zeitpunkt des nahezu vollständigen Abbaus des Wirkstoffs wird dabei über das Erreichen der "Limit of Detection" (LOD) approximiert. Das LOD repräsentiert den Wert der Wirkstoffkonzentration, unter dem eine valide, d.h. exakte Messung der Konzentration mit gegebener Messlabortechnik nicht mehr umsetzbar ist. Nicht mehr exakt messbar ist ein Wirkstoff wenn er nur noch in verschwindend geringem Maße vorhanden ist. Tabelle 12 listet die LOD-Werte der Wirkstoffe im Blut und Urin.

Tabelle 12: Limit of Detection (LOD) Werte für die Wirkstoffe

Wirkstoff	Wert
Budesonid (Blut)	0.5. pg/mL
Budesonid (Urin)	2.5 pg/mL
Hydroxybudesonid (Urin)	4.5 pg/mL
Hydroxyprednisolon (Blut)	99.5 pg/mL

Tabelle 13 stellt die mittleren Nachweiszeiten der Wirkstoffe Hydroxybudesonid und Hydroxyprednisolon für die gesamte Untersuchungspopulation, sowie für die Experimentalgruppen getrennt dar. Für die Budesonid-Messungen (Blut und Urin) konnten keine Nachweiszeiten berechnet werden.

Tabelle 13: Nachweiszeiten in Stunden: Hydroxybudesonid (Urin) und Hydroxyprednisolon (Urin)

Variable		Gesamt	Gesundheitszustand			Verabreichungsmodus		
			Gesund	Krank	z ^a	In Ruhe	Unter Belastung	z ^a
Hydroxybudesonid (Urin)	\bar{x} (h)	63	69	57	0.854	54	72	-1.586
	SD	24.59	20.03	28.51		28.84	22.22	
Hydroxyprednisolon (Urin)	\bar{x} (h)	60	54	66	-1.118	54	66	-1.118
	SD	21.47	24.84	16.97		24.84	16.97	

* $p < .10$, ** $p < .05$, *** $p < .01$

Für Hydroxybudesonid beträgt die Nachweiszeit insgesamt 63 Stunden. Innerhalb der Experimentalgruppen zum Gesundheitsstatus liegt die Nachweiszeit in der Gruppe der gesunden Pferde bei 69 Stunden und innerhalb der Gruppe der kranken Pferde bei 57 Stunden. Hinsichtlich des Verabreichungsmodus beträgt die Nachweiszeit in der Gruppe "in Ruhe" 54 Stunden und in der Gruppe "Belastung" 72 Stunden. Trotz der nicht unerheblichen Mittelwertdifferenzen kann auf Basis des Mann-Whitney-U Rangsummen-Test jedoch vorläufig nicht von signifikanten Gruppenunterschieden ausgegangen werden ($p = 0.10$). Die Nachweiszeit für Hydroxyprednisolon beträgt insgesamt 60 Stunden. Gesunde Pferde weisen 54 Stunden auf, bei kranken Pferden beträgt der Wirkstoffabbau 66 Stunden. Ein identisches Bild zeigt sich hinsichtlich des Verabreichungsmodus: In der Gruppe "in Ruhe" liegt die Nachweiszeit bei 54 Stunden, in der Belastungsgruppe hingegen bei 66 Stunden. Erneut weisen die inferenz-statistischen Analysen trotz der absoluten Mittelwertdifferenzen nicht auf signifikante Gruppenunterschiede hin ($p = 0.10$).

5.6 Gesundheitsstatus und Wirkstoffabbau

Die Abbildungen 4 und 5 stellen die Kaplan-Meier Überlebenskurven für Budesonid im Blut und im Urin dar. Dabei wurde jeweils eine Funktion für die Gruppe der gesunden Pferde, und eine weitere Funktion für die Gruppe der kranken Pferde geschätzt.

Im Vergleich der Überlebenskurven für den Wirkstoff Budesonid im Blut (Abbildung 4) zeigen sich recht deutliche Verlaufsunterschiede. In der Gruppe der kranken Pferde sinkt bei allen die Überlebenswahrscheinlichkeit erstmals zum letzten Messzeitpunkt (144 Stunden). Ein anderes Bild ergibt sich für die Gruppe der gesunden Pferde. Die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt hier schon zum dritten Messzeitpunkt (48 Stunden) auf 87.5 % und sinkt zum vierten Messzeitpunkt (96 Stunden) weiter auf 25 %. Nach 96 Stunden haben drei Viertel aller Pferde in der Gruppe der gesunden Pferde den Wirkstoff Budesonid im Blut (nahezu) vollständig abgebaut hat (LOD). Zum Messzeitpunkt t_5 fällt die Überlebenswahrscheinlichkeit erneut um 12.5 % auf insgesamt 12.5 %. Ein Pferd aus der Gruppe der gesunden Pferde hat den LOD-Wert zum letzten Messzeitpunkt nicht erreicht. Im Vergleich liegt der Prozentsatz in der Gruppe der kranken Pferde bei 62.5 %.

Abbildung 4: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Gesund vs. Krank

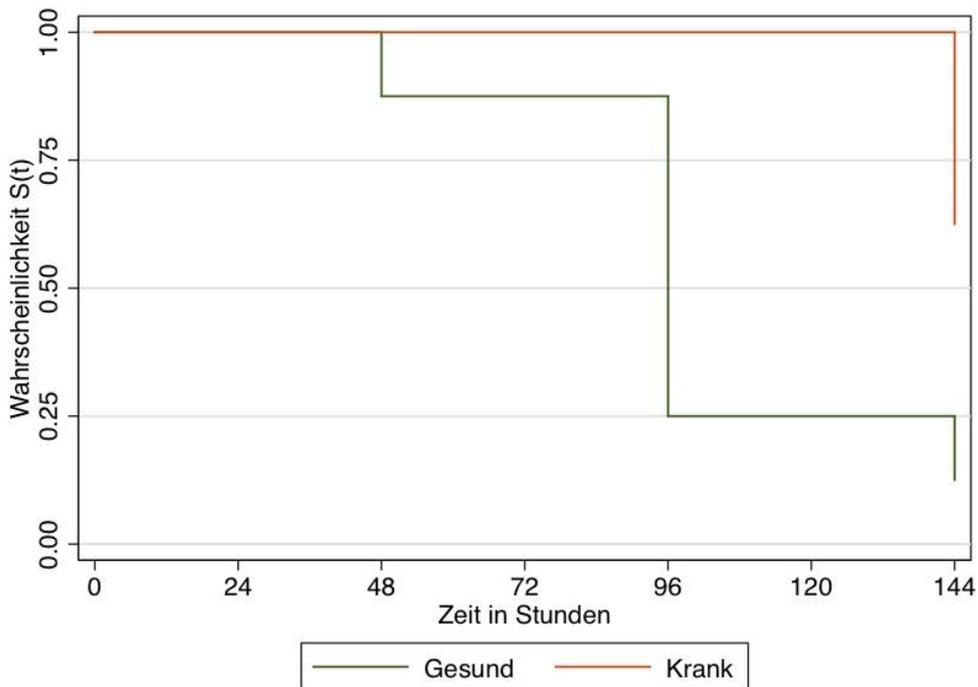


Abbildung 5: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Gesund vs. Krank

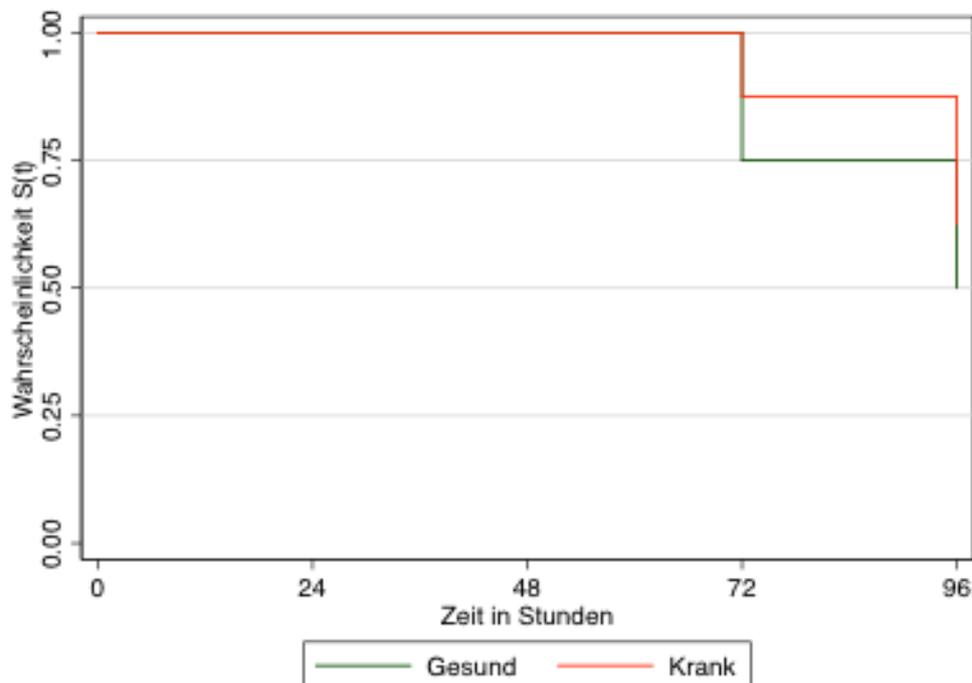


Abbildung 5 stellt die Überlebenskurven der beiden Gruppen für Budesonid im Urin dar. Im Vergleich zur Entwicklung der Überlebenswahrscheinlichkeiten für die Messungen im Blut zeigen sich deutlich geringere Unterschiede zwischen den Subgruppen. In beiden Gruppen sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit erstmals zum Messzeitpunkt t_2 (72 Stunden) unter 100 %. Die Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit zu den Messzeitpunkten 2 (72 Stunden) und 3 (96 Stunden) signalisieren jedoch auch für die Untersuchung des Wirkstoffs im Urin einen schnelleren Wirkstoffabbau in der Gruppe der gesunden Pferde. Zum Messzeitpunkt t_3 (96 Stunden) haben 50 % der gesunden Pferde das LOD erreicht, bei den kranken Pferden sind es 37,5 %.

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven deuten insbesondere für Budesonid im Blut auf einen signifikanten Gruppenunterschied hin. Inwieweit das Ereignis LOD in der Gruppe der gesunden Pferde tatsächlich signifikant häufiger bzw. früher auftritt, kann auf Basis des Log-Rank Tests geprüft werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-Rank-Tests

Variable		Gesund vs. Krank	
		Observed	Expected
Budesonid (Blut)	gesund	7	3.63
	krank	3	6.37
	Total	10	10.00
	χ^2	7.24	
	p	.0071	
Budesonid (Urin)	gesund	4	3.35
	krank	3	3.65
	Total	7	7.00
	χ^2	0.31	
	p	.5799	

n = 16, χ^2 , df = 1

Tabelle 14 enthält die Ergebnisse der Log-Rank Tests des Wirkstoffs Budesonid (Blut und Urin) zwischen den Gruppen gesunde und kranke Pferde. Die Ergebnisse der Tests bestätigen initialen Eindruck auf Basis der Kaplan-Meier-Überlebenskurven. Gesunde Pferde weisen einen signifikant schnelleren Wirkstoffabbau auf als kranke Pferde und unterschreiten daher im Messzeitraum häufiger das LOD ($\chi^2 = 7.24$, $p = .0071$). Für Budesonid im Urin können hingegen keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden ($\chi^2 = 0.31$, $p = .5799$).

5.7 Verabreichungsmodus und Wirkstoffabbau

Neben dem Gruppenvergleich zwischen gesunden und kranken Pferden wurde auch der Einfluss des Verabreichungsmodus auf den Wirkstoffabbau untersucht. Verglichen wurden hierbei die Gruppen in Ruhe und unter Belastung. Abbildung 6 stellt die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für den Wirkstoff Budesonid (Blut) dar. Insgesamt fällt die Überlebenskurve für die Gruppe in Ruhe schneller ab. Dies bedeutet, dass in dieser Gruppe zu den einzelnen Messzeitpunkten im Vergleich mehr Pferde das Ereignis LOD erreichen, als in der Gruppe unter Belastung. So liegt die Überlebensrate (kein LOD) für die Gruppe in Ruhe zum Messzeitpunkt 96h bei 50 %, in der Gruppe unter Belastung hingegen noch bei 75 %. Dieser Trend bleibt bis zum letzten Messzeitpunkt (144h) erhalten, wobei die Pferde der Gruppe in Ruhe mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 25 % verbleiben, d.h., 75 % der Pferde haben den Wirkstoff (nahezu) vollständig abgebaut (Ereignis LOD). Im Vergleich liegt die Rate in der Gruppe unter Belastung bei lediglich 50 %.

Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Ruhe vs. Belastung

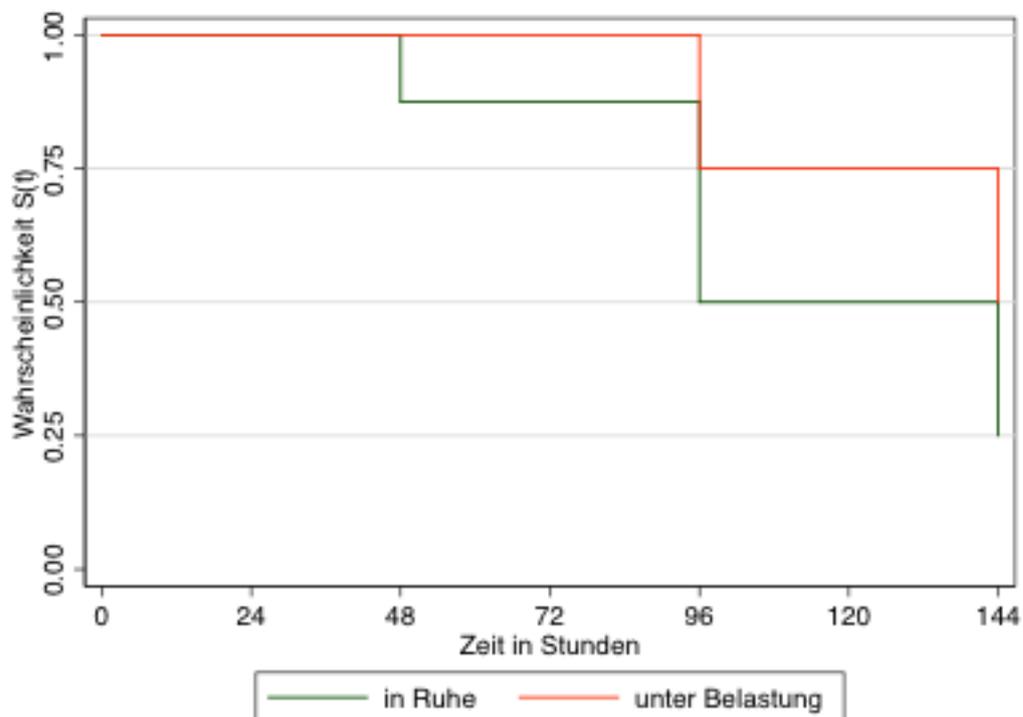


Abbildung 7 enthält die Überlebenskurven für Budesonid im Urin. Im Vergleich zu den Messwerten im Blut zeigen sich insgesamt geringere Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen. Während die Überlebensrate zum zweiten Messzeitpunkt (72h) in der Gruppe in Ruhe mit 87.5 % noch höher liegt, als in der Gruppe unter Belastung, haben zum letzten Beobachtungszeitpunkt (96h) 50 % der Pferde, denen der Wirkstoff in Ruhe verabreicht wurde, des Grenzwert LOD erreicht. In der Gruppe unter Belastung sind dies lediglich 38.5 %. Zur inferenz-statistischen Überprüfung der beobachteten Gruppenunterschiede wurde erneut auf den Log-Rank Test zurückgegriffen (Tabelle 15).

Ergebnisse

Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Ruhe vs. Belastung

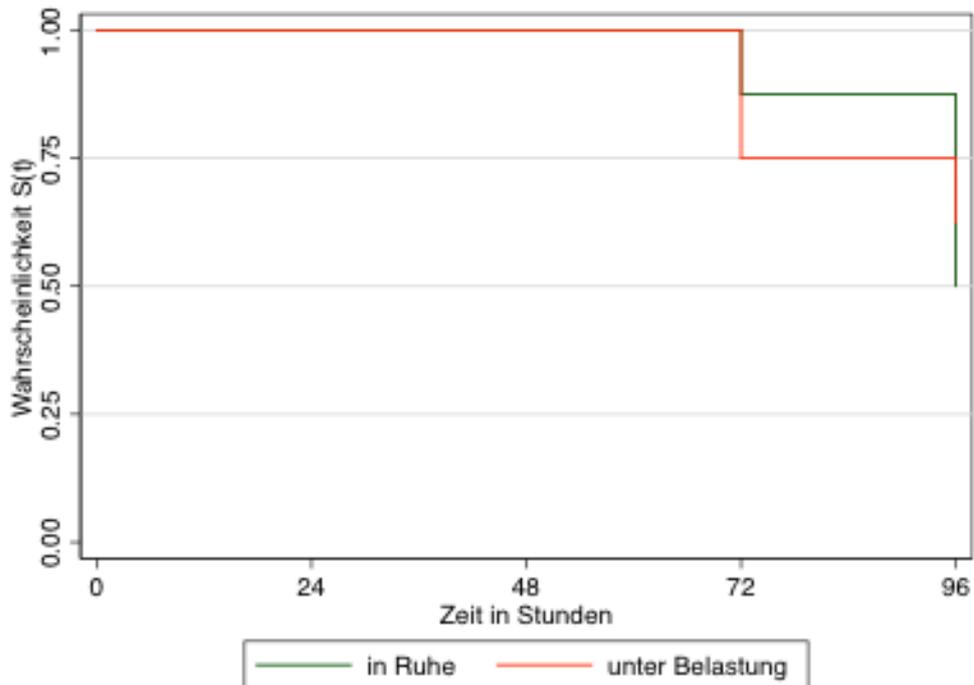


Tabelle 15: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-Rank-Tests

Variable		in Ruhe vs. unter Belastung	
		Observed	Expected
Budesonid (Blut)	In Ruhe	6	4.43
	Belastung	4	5.57
	Total	10	10.00
	χ^2	1.38	
	p	.2401	
Budesonid (Urin)	in Ruhe	4	3.65
	Belastung	3	3.35
	Total	7	7.00
	χ^2	0.09	
	p	.7695	

n = 16, χ^2 , df = 1

Für Budesonid im Blut kann auf Basis der Ergebnisse nicht von einem signifikanten Unterschied des Wirkstoffabbaus zwischen den Experimentalgruppen in Ruhe und unter Belastung ausgegangen werden ($\chi^2 = 1.38$, $p = .2401$). Gleiches gilt für Budesonid im Urin: Auch hier weist die Anzahl beobachteter Ereignisse im Verhältnis zu der erwartenden Anzahl von Ereignissen (unter der Annahme nicht vorhandener

Gruppenunterschiede) nicht auf einen signifikanten Gruppenunterschied hin ($\chi^2 = 0.09$, $p = .7695$).

6. Diskussion

Ziel der durchgeführten Arbeit war es, mittels einer klinisch-pharmakologischen Studie eine Aussage über das Ausscheidungsverhalten von Budesonid zu treffen. Dazu wurde bei 16 Pferden nach 10-tägiger Inhalation mit Budesonid eine quantitative Analyse von Plasma- und Urinproben durchgeführt. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollte geprüft werden, ob sich konkrete Unterschiede in Nachweisfristen und Ausscheidungszeiten bei den einzelnen Gruppen ergeben. Dafür wurden die 16 Patienten in 4 Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen: „Krank“, „Gesund“, „Inhalation in Ruhe“ und „unter Belastung“.

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Diskussion zum Studienaufbau

In dieser Studie wurden 16 Pferde untersucht, davon waren 8 Pferde klinisch gesund und 8 Pferde lungenkrank. Anhand der Kriterien Anamnese, Neutrophilienanteil in der BALF, klinischer Score, Endoskopieergebnisse und Blutgasuntersuchungen wurden die Pferde den Gruppen *Lungenkrank* oder *Gesund* zugeordnet. 5 Patienten mit COB in Exazerbation zeigten eine erschwerte Atmung, Leistungsintoleranz und vermehrtes Husten. Diese Merkmale sind auch bei COB Patienten in vorhergegangenen Studien aufgeführt worden (Pirie et al. 2002; Leclere et al. 2011). Gleiches gilt bei den 3 COB Patienten, die sich in Remission befanden. Sie zeigten im Allgemeinen normale Atmungsparameter in Ruhe und es kam erst unter Belastung zu einer expiratorischen Dyspnoe, ähnlich wie in den Studien von McGorum und Pirie (2008) und Gerber (1973).

Obwohl klinische Anzeichen regelmäßig genutzt werden, um gesunde Pferde von kranken zu differenzieren (Tesarowski 1994, Vandenput 1998), darf man nicht außer Acht lassen, dass der Grad der Erkrankung allein auf Basis der klinischen Anzeichen nicht beurteilt werden kann (Robinson 2000). In der Studie von Tesarowski et al. (1996) wurden alle Kriterien der Lungenuntersuchung einschließlich der Auskultation der Lunge zur Klassifizierung des Lungenstatus berücksichtigt. Rush et al. 1998 beschrieb ebenfalls ein Scoresystem, welches anhand klinischer Untersuchung und abdominaler Atembewegung die Lungenerkrankung einstuft. Im Vergleich dazu erfolgte in dieser Studie die Klassifizierung wie auch die Einstufung des Schweregrades der Lungenerkrankung nach einem modifizierten, validierten Score-System nach Ohnesorge et al. 1998 (siehe Anhang Tabelle 5). Die klinischen Parameter von Blutgasen, Interpleuraldruck und dem neutrophilen Granulozytenprozentsatz zeigten eine sich ergänzende signifikante Aussagekraft, die uns bestätigte, dass die Scoremethode zur Beurteilung der Lungenerkrankung anzuerkennen ist. Der Gesamtscore variierte von 0-1 bei klinisch gesunden Pferden, von 2-6 bei Pferden mit COB in Remission und von 6-14 bei erkrankten Pferden mit COB in Exazerbation. Diese Werte stimmen mit Studien von Ohnesorge et al. (1998) und Herholz et al. (2002) überein (siehe Anhang Tabelle 9a).

Das Scoresystem nach Ohnesorge et al. (1998), Kampmann et al. (2001) und Diekmann (1987) benutzte zur Bestimmung der respiratorischen Sekretion den neutrophilen

Granulozytenanteil des TBS, während bei dieser Studie nach den entsprechenden internationalen Empfehlungen der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BAL anstatt im TBS berücksichtigt wurde (Robinson, 2001). In der Humanmedizin wird die COPD über die Klinik und einer bronchoalveolären Lavage- oder Sputumzytologie charakterisiert. Bei Pferden hingegen ist bewiesen, dass ein erhöhter Anteil an neutrophilen Granulozyten im TBS nicht spezifisch auf eine COB hinweist und ebenfalls oft nicht mit der BAL Zytologie und histologischen Veränderungen übereinstimmt (Leclere 2011, Robinson 2001). Ein prozentualer Anteil von neutrophilen Granulozyten in einer BAL-Probe über 25 % ist anerkannt als signifikanter Hinweis einer COB- Erkrankung und deckt sich auch mit den Ergebnissen dieser Studie (Pirie et al. 2002; Leclere et al. 2011; Tilley et al. 2012).

Die Erkrankung tritt bei mehr als 50 % der Pferde im Alter zwischen 12 bis 14 Jahren auf (Fey 2006). So ist auch hier eine höhere Altersspanne in der Gruppe der kranken Pferde auffällig gewesen, die zwischen 10 und 23 Jahren lag; im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die zwischen 5 und 16 Jahren lag. Hingegen gab es keine Hinweise auf eine Geschlechtsprädisposition: Beide Geschlechter waren auf gleiche Weise anfällig, worauf auch schon Leguillette hinwies (Leguillette 2003).

Auslöser der Krankheit ist oft eine staubhaltige Umgebung, die in der Regel bei Pferden auftritt, die vermehrt aufgestallt und mit trockenem Heu gefüttert werden (Robinson et al. 1996; Fey 2006). Daher mussten alle 8 Kontrollpferde unserer Studie bei Studienbeginn Kontakt mit trockenem Heu haben, um hierdurch und durch die tierärztliche klinische Untersuchung zusätzlich sicher zu stellen, dass keine COB-Patienten in klinischer Remission in die gesunde Kontrollgruppe eingeordnet wurden.

Zur Inhalation wurde in dieser Studie ein ultraschallbetriebener Vernebler verwendet, ein sogenanntes SaHoMA II Inhalationsgerät. Eine Studie von Votion et al. (1997) konnte bereits die Effektivität von ultraschallbetriebenen Verneblern testen und zeigen, dass nach vorliegenden Untersuchungen zur Verteilung von inhalativen Substanzen eine wirksame Wirkstoffkonzentration in den unteren Atemwegen erzeugt werden konnte (Votion, et al. 1997). Gleichzeitig wurde durch das geschlossene, leicht tragbare System eine Inhalation unter Belastung ermöglicht, welches ein tieferes Einatmen des Aerosols noch unterstützt (Ehrmann 2012).

Die Dosis des Präparates Budesonid zur Inhalation wurde entsprechend den aus der Humanmedizin abgeleiteten Körpergewicht-Dosis-Beziehungen und den Angaben anderer Autoren (Kampmann 2001; Rush et al. 1997; Duvivier et al.1999) auf die Körpermasse von Großpferden umgerechnet. Die Behandlungsdauer der Inhalation wurde nach Vorgaben von Kampmanns Budesonidstudie (2001), die eine Therapiedauer von wenigstens 10 bis 14 Tagen empfiehlt, für 10 Tage durchgeführt (Kampmann 2001).

6.1.2 Diskussion zur Analyse der Proben

Der Nachweis der Analyten erfolgte über die Kombination eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) mit einem Massenspektrometer (MS). Im Jahr 2005 wurde die Methode bereits erfolgreich in der Messung von einer Großzahl an Plasmaproben von Rennpferden angewendet und erwies sich im Vergleich zu der vorher häufig benutzten Gaschromatographie als einfache, sensitive und selektive Alternative (Luo et al. 2005). Deventer beschrieb in einer Humanstudie im Jahr 2006 ebenfalls die Messung mit LC-MS nach Inhalation mit Budesonid und dessen Metaboliten als erfolgreiche, schnelle und akkurate Methode zum quantitativen Nachweis (Deventer et al. 2006). Die chromatographische Analyse von Budesonid wurde so hauptsächlich in den letzten Jahren mit Flüssigkeitschromatographie durchgeführt, unabhängig vom verwendeten Probenmaterial und ob Budesonid alleine oder mit dessen Metaboliten nachgewiesen werden sollte (Deventer et al. 2006; Berg et al. 2012). Budesonid erfährt eine schnelle Metabolisierung, welches besonders bei lokaler Anwendung zu niedrigen Plasmakonzentrationen führt. Deshalb ist eine hoch sensible und selektive Methode erforderlich, um die Nachweisbarkeit im Plasma nach inhalativer Gabe messen zu können (Li et al. 2001). Luo verwendete die Methode aus Flüssigchromatographie und Massenspektroskopie (LC-MS) zur Detektion von 21 Glukokortikoiden in equinem Plasma, wo die meisten Analyten eine Nachweisgrenze von 50-100pg/ml aufwiesen (Luo et al. 2005). In dieser Studie konnte bereits eine weitaus geringere Nachweisgrenze gemessen werden. Das führt uns zu der Überzeugung, die richtige Nachweismethode für die Studie gewählt zu haben.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Ergebnisse der Inhalationstherapie

Bei allen lungenkranken Patienten konnte nach 10-tägiger Inhalation anhand von klinischen Parametern und Scorepunkten eine signifikante Verbesserung festgestellt werden (Anhang Tabelle 9a). Demnach zeigt die Inhalation mit Budesonid eine therapeutische Wirksamkeit und schließt sich den Ergebnissen der Studie von Kampmann an, dass eine regelmäßige Aerosoltherapie mit Budesonid zu einer klinischen Verbesserung bei gering- und mittelgradig lungenkranken Pferden führt (Kampmann 2001). Nach O'Connell wird die therapeutische Effektivität von inhalativen Glukokortikoiden beeinflusst von ihrer Lipophilie, Ablagerung in der Lunge und ihrer Akkumulation im Lungengewebe, wohingegen die Eliminationsrate die systemische Wirkung determiniert (O'Connell 2003). Budesonid verbleibt, im Gegensatz zu anderen inhalativen Glukokortikoiden, länger im Lungengewebe aufgrund eines Veresterungsprozesses, welcher die Lipophilie verstärkt (Miller-Larsson et al. 2000; Buhl 2003). Das erklärt die verlängerte klinische Wirksamkeit und warum sich Budesonid vor anderen inhalativen Glukokortikoiden in der Praxis durchsetzen konnte (O'Connell 2003). Im Vergleich der Inhalationsgruppen in Ruhe und unter Belastung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei Inhalation unter Belastung scheint

durch das tiefere Einatmen des Patienten mehr Wirkstoff in die Lunge zu gelangen. Eine erhöhte Effektivität der Therapie konnte aber nicht bestätigt werden. Zu beachten ist hier aber die geringe Fallzahl, weshalb die Ergebnisse in beiden Richtungen sehr zurückhaltend interpretiert werden müssen. Außerdem muss noch die Beeinflussung der Behandlungsergebnisse durch Umwelteinflüsse beachtet werden: Die COB-erkrankten Pferde wurden im Zeitraum der Inhalation staubarm aufgestallt und mit nassem Heu gefüttert. Die optimierte, staubarme Haltungsbedingung allein führt nachweislich schon zu einer Verbesserung der Lungenfunktion innerhalb weniger Tage (Jackson et al. 2000). In der Humanmedizin wurde bereits in mehreren Studien untersucht, dass die Kombination von Budesonid mit einem β 2-Agonisten eine verbesserte therapeutische Wirkung erzielt als eine Monotherapie von Budesonid und neben Asthma auch bei der Behandlung von COPD Erfolge zeigt. Die täglich zweimalige Anwendung konnte auf eine einmalige Gabe bei Anwendung der Kombination reduziert werden, ohne dass die Wirksamkeit eingeschränkt wurde (Miller-Larsson et al. 2000; Buhl 2003). Weiterführende Studien in der Pferdemedizin wären zu empfehlen, um zu untersuchen, ob die therapeutische Wirksamkeit von Budesonid bei Pferden ebenfalls noch gesteigert werden kann.

6.2.2 Ergebnisse zur Nachweisbarkeit von Wirkstoffkonzentrationen im Gruppenvergleich

Von 16 Probanden wurden Blutproben in den ersten Stunden nach letzter Inhalation in den Abständen 4, 16, 48, 96 und 144 Stunden und an den darauf folgenden 5 Tagen einmal täglich untersucht sowie Urinproben nach der letzten Inhalation an den Messzeitpunkten nach 24, 72 und 96 Stunden und ebenfalls an den folgenden 5 Tagen einmal täglich analysiert. Die Messzeitpunkte wurden so festgelegt, um einen genauen Überblick über den Wirkstoffkonzentrationsabfall zu bekommen. Zum einen stützt sich unsere gewählte Zeit auf die vorgegebene Karenzzeit der FN von 7 Tagen für Budesonid, zum anderen orientierten wir uns an vorhergegangene Studien zu Budesonid in der Humanmedizin. Obwohl schon ausführliche Untersuchungen und Daten zur systemischen Absorption und oraler Elimination von Budesonid zu finden sind, definieren nur ein paar Studien die systemische Disposition von inhaliertem Budesonid (Donnelly und Seale 2001). Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass Budesonid nach intravenöser Gabe eine Halbwertszeit von bis zu 4 Stunden aufweist und inhaliertes Budesonid schon nach 30 Minuten die höchste Plasmakonzentration aufweist (Buhl 2003). In der Studie von Donnelly zeigten sich bei Inhalationen mit Budesonid im Vergleich von Asthmapatienten zu Gesunden und einzelner Inhalation zu mehrmaliger Inhalation ähnlich kurze Zeiten zum Erreichen der maximalen Wirkstoffkonzentration von Budesonid im Plasma, sowie in der Halbwertszeit (Donnelly und Seale 2001). Die Ergebnisse von Kaiser (1999) unterstützen diese Aussagen, gleichzeitig zeigte sich aber auch in dieser Studie, dass sich bei mehrmaliger Dosis die maximale Plasmakonzentration erhöht und sich die Nachweiszeit der Wirkstoffkonzentration verlängert (Kaiser und Aaronson et al. 1999). Ergänzend dazu ist die Studie von Jendbro et al. zu erwähnen, die an Ratten zeigte, dass Inhalationen mit Budesonid über längere Zeit die Halbwertszeit von Budesonid auf 16 Stunden im Lungengewebe erhöht (Jendbro et al. 2001).

In der vorliegenden Studie konnte bei allen untersuchten Wirkstoffen eine monoton fallende Konzentration im Blut bzw. Urin beobachtet werden. Anzumerken ist die sehr geringe messbare Wirkstoffkonzentration im Plasma und Urin, das Minimum der gemessenen Wirkstoffkonzentration im Plasma lag bei 11.00 pg/mL, das Maximum bei 150.00 pg/mL. Der Median betrug 57.00 pg/mL. Demnach wiesen die Hälfte aller Beobachtungen einen Messwert unter 57.00 pg/mL auf. Dies ist vergleichbar mit Ergebnissen von Budesonidwirkstoffkonzentrationen, die in Plasma von Hunden gemessen wurden (Berg et al. 2012). Es ist aber ebenfalls zu betonen, dass in der Studie von Berg et al. nur eine einmalige Inhalation mit Budesonid an den Hunden erfolgte. Wie bereits erwähnt, verlängern sich der Nachweis und die Halbwertszeit von Budesonid bei mehrmaliger Gabe. Der verlängerte Nachweis des Wirkstoffes zeigte sich ebenfalls in unserer Studie. Der geringe Konzentrationsnachweis von Budesonid in Plasma und Urin ist zu begründen mit dem geringen Anteil von inhaliertem Budesonid, der in die Lunge transportiert wird. Eine Studie von Seale bei Menschen zeigte bereits, dass ein geringer prozentualer Anteil von dem applizierten Wirkstoff in der Lunge ankommt und dieser stark variieren kann abhängig vom verwendeten Inhalationsgerät (Donnelly und Seale 2001). Bei Pferden wurden mechanische Düsenvernebler und Ultraschallvernebler getestet und obwohl beide nachweislich einen ähnlichen Inhalationseffekt hatten, wurde aufgezeigt, dass bei Ultraschallverneblung der Durchmesser der applizierten Partikel größer ist und so quantitativ weniger in der Lungenperipherie ankommt. (Duvivier et al. 1997, Votion et al. 1997). Des Weiteren zeigte Nikander bei einer humanen Studie, dass Budesonidsuspensionen sich schwieriger mit einem Ultraschallinhalationsgerät vernebeln lassen als mit einem mechanischen Düsenvernebler (Nikander et al. 1999). Dazu ist zu berücksichtigen, dass bei der Studie nur gesunde Probanden einmalig inhaliert wurden und es doch deutliche Unterschiede in der Länge der Nasenhöhlen im Vergleich Mensch zu Pferd gibt, so daß nicht von der gleichen Filtrationsfunktion bei beiden ausgegangen werden kann (Duvivier 1997). Zudem wurde bei qualitativer Untersuchung die gleiche Wirkung bei der Inhalation mit einem Ultraschallgerät erzielt wie bei einem Düsenvernebler (Votion et al. 1997).

Das ist wohl auch auf die Besonderheit von Budesonid im Vergleich zu anderen inhalativ eingesetzten Glukokortikoiden zurückzuführen. Jendbro zeigte bereits in einer Studie bei Ratten, dass Budesonid höhere Konzentrationen im Lungengewebe erreicht als im Plasma (Jendbro et al. 2001). Aufgrund eines reversiblen Veresterungsprozesses im Lungengewebe kommt es zu einer lokalen Akkumulation des Wirkstoffes, die Lipophilie wird gesteigert so dass der Wirkstoff nur langsam abgegeben und nur ein geringer Teil systemisch absorbiert wird (Jendbro et al. 2001; Goldsmith und Keating 2004). Folglich ist die Wirkstoffmenge, die systemisch absorbiert wird, klein und die Plasmakonzentration sehr gering (Berg et al. 2012; Kaiser et al 1999).

Neben Budesonid wurden aufgrund von Ergebnissen vorhergegangener Studien auch die beiden Hauptmetaboliten analysiert. In der Humanmedizin wird Hydroxyprednisolon als Hauptmetabolit und als wichtigster Faktor zum Nachweis in der Dopinganalytik gesehen (Edsbacker et al. 1987; Deventer et al. 2006). Trotzdem gibt es noch sehr wenig Literatur

zum Nachweis von Budesonid und dessen Metaboliten im Rahmen von Dopinguntersuchungen (Deventer et al. 2006). In unserer Studie konnten die Metaboliten Hydroxybudesonid und Hydroxyprednisolon im Blut nicht nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund der schnellen Metabolisierung von Budesonid. Ähnliches zeigte sich schon in einer Studie an Mäusen (Edsbacker et al. 1987). Dies ist dadurch zu erklären, dass Budesonid keine Biotransformation in der Lunge erfährt. Erst nach hepatischer Metabolisierung wird Budesonid zu Metaboliten, die nur eine <1 % Aktivität als Budesonid und nur noch eine geringe Glukokortikoid -Potenz aufweisen (Andersson und Ryrfeldt 1984).

Vergleicht man die Subgruppen *Gesund* und *Lungenkrank* so zeigte sich im Vergleich der Mittelwerte der Wirkstoffkonzentration des Budesonids im Blut ein eindeutiges Bild. Für alle 5 Messzeitpunkte (4h, 16h, 48h, 96h, 144h) lag die Wirkstoffkonzentration in der Gruppe der kranken Pferde über der mittleren Konzentration der Gruppe der gesunden Pferde. Demnach weisen kranke Pferde einen verlangsamten Abbau von Budesonid im Blut auf. Im Gruppenvergleich zeigt sich für die Wirkstoffe Budesonid (Urin), Hydroxybudesonid (Urin) und Hydroxyprednisolon (Urin) ein ähnliches Bild. Auch hier lag die durchschnittliche Wirkstoffkonzentration (mit einer Ausnahme Budesonid (Urin) t1) in der Gruppe der kranken Pferde für alle Messzeitpunkte über der Konzentration in der Gruppe der gesunden Pferde. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse der Humanmedizin. Eine Humanstudie von Dalby (2009) zeigte eine durchschnittlich geringere Plasmakonzentration von Budesonid bei COPD-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nach Inhalation mit Budesonid (Dalby et al. 2009). Bei einer Studie von Asthmapatienten wurden gleiche Plasmakonzentrationen von Budesonid bei kranken und gesunden Patienten gemessen (Harrison et al. 2003). Es sei anzumerken, dass die Patienten in den Humanstudien nicht über 10 Tage inhaliert wurden, was Auswirkungen auf die Plasmakonzentration haben kann. Aufgrund des Veresterungsprozesses und der dadurch gesteigerten Lipophilie akkumuliert Budesonid im Lungengewebe und erzielt so eine verlängerte Wirkung (Jendbro et al. 2001). Man könnte vermuten, dass bei lungenkranken Pferden aufgrund von gestörten, mukoziliären Mechanismen und entzündlichen Prozessen im Lungengewebe der Veresterungsprozess noch intensiviert werde und zu einer verzögerten Abgabe von Budesonid in den Blutkreislauf führte. Die Folge würde ein messbar längerer Nachweis von Budesonid in der Gruppe der lungenkranken Pferde sein, womit sich der in dieser Studie messbare verlangsamte Abbau von Budesonid in der Gruppe der kranken Pferde erklären ließe. In unserer Studie fehlen für den Großteil der Gruppenvergleiche signifikante Unterschiede in den Ergebnissen. Zum einen ist dieses auf die geringe Stichprobenzahl zurückzuführen, zum anderen lässt es die erzielten Ergebnisse aber auch nur zurückhaltend interpretieren und spekulativ betrachten. Es gibt bereits Hinweise aus humanen Populationsanalysen, dass die Absorptionseigenschaften von Budesonid in der Lunge individuell stark variieren, aber im Allgemeinen ist festzustellen, dass noch sehr wenige pharmakokinetische Daten vorliegen, um die pulmonaren Absorptionscharakteristiken zu definieren (Donnelly et al. 2001).

Bei dem Vergleich der Mittelwertunterschiede der Pferde unserer Studie, die den Wirkstoff in Ruhe inhalierten, und Pferde, die den Wirkstoff unter Belastung verabreicht bekommen hatten, zeigte sich das Bild eher uneindeutig. Zwar lag die Wirkstoffkonzentration in der Gruppe „*Belastung*“ für alle Wirkstoffe und Messzeitpunkte über der mittleren Konzentration in der Gruppe „*Ruhe*“, jedoch fielen die Gruppenunterschiede insgesamt tendenziell geringer aus. Dieser Umstand wurde zusätzlich von den Ergebnissen der inferenz-statistischen Analysen bestätigt. Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Jedoch ist davon auszugehen, dass die fehlende Signifikanz der Tests erneut auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen ist. Der deskriptive Vergleich der Gruppenmittelwerte deutet daher insgesamt auf einen verlangsamten Wirkstoffabbau in der Gruppe der Pferde, die den Wirkstoff unter Belastung verabreicht bekommen haben, hin.

Die erhöhte Wirkstoffkonzentration in der Gruppe „*Belastung*“ würde sich mit einer erhöhten Aufnahme des Wirkstoffes während des Inhalationsprozesses erklären. Spekulativ betrachtet würde durch eine intensiviertere, tiefere Einatmung eine höhere Wirkstoffdosis in die peripheren Atemwege gelangen und würde weniger dem vermehrten mukoziliären Abtransport in den Zentralbronchien erliegen. So erklärt es sich auch Harrison (2003) in einer Humanstudie über Asthmapatienten, die mit Budesonid unter Belastung inhaliert wurden. Er führt an, dass durch die Art und Weise der Inhalation eine vermehrte periphere zu zentrale Deposition von Budesonid stattfinden kann und das Aerosol nicht wie zum Beispiel bei Fluticason vermehrt in den oberen Atemwegen verbleibt. Gleichzeitig erklärt er es sich ebenfalls durch die schnelle Absorption von Budesonid über die bronchiale Schleimhaut, welches die Dosis des Medikamentes reduziert, die der mukoziliären klärenden Mechanismen unterliegt. Im Lungengewebe akkumuliert der Wirkstoff in inaktiver Form und wird nach und nach abgegeben und entfaltet seine Wirkung. Wir gehen davon aus, dass die Rezeptoraffinität und die Bioverfügbarkeit im Lungengewebe sich in der Gruppe „*Belastung*“ nicht zu den Pferden in der Gruppe „*Ruhe*“ unterscheidet. Es ergäbe sich folglich keine Wirkungssteigerung, sondern nur eine verlängerte Abgabe bzw. Abbau des Wirkstoffes und würde erklären, dass keine Unterschiede im klinischen Effekt in unserer Studie vorlagen. Die fehlende Signifikanz unserer Ergebnisse schließt sich Donnellys und Seales Aussage an, dass weiterführende pharmakokinetische Studien notwendig sind, um die Absorptionseigenschaften von Budesonid in der Lunge in spezifischen Patientengruppen näher zu untersuchen (Donnelly et al. 2001).

6.2.3 Ergebnisse zur Analyse der Nachweiszeiten in den Gruppen

Ausgehend von Daten aus der Humanmedizin ist im menschlichen Urin die höchste Konzentration der Metaboliten in den ersten 12 bis 24 Stunden nach Wirkstoffgabe messbar (Deventer et al. 2006; Matabosch et al. 2012). Dies entspricht auch den Ergebnissen unserer Studie. Der deutlich schnellere Abbau der Metaboliten im Vergleich zu Budesonid erklärt sich mit der schnellen hepatischen Metabolisierung von freiem Budesonid zu den inaktiven Metaboliten, die nur noch eine Glukokortikoidpotenz in Höhe

von 1 % aufweisen (Andersson und Ryrfeldt 1984). Die Ergebnisse in dieser Studie zeigten für Hydroxybudesonid im Urin eine Nachweiszeit von insgesamt 63 Stunden. Bei Hydrocortison zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Nachweiszeit betrug insgesamt 60 Stunden. Im Vergleich dazu konnte nach einer Studie von Matabosch bei Menschen bis zu 72 Stunden nach Wirkstoffgabe Metaboliten von Budesonid im Urin gemessen werden (Matabosch et al. 2012). In der Humanstudie wurde Budesonid oral verabreicht, so dass die Ergebnisse der beiden Studien durch die unterschiedlichen Absorptions- und Eliminierungsvorgänge nicht in einen realen Vergleich zueinander gebracht werden können. Trotz Unterschieden in den Experimentalgruppen zum Gesundheitsstatus und Verabreichungsmodus, wiesen die weiterführenden interferenz-statistischen Analysen nicht auf signifikante Gruppenunterschiede in dieser Studie hin. Eine Ursache kann wieder der geringe Umfang der Stichprobe sein. Obwohl verschiedene pharmakokinetische Studien publiziert wurden, gibt es bisher nur wenig Daten über den Nachweis von Budesonid und dessen Metaboliten im Zusammenhang mit Doping (Deventer et al. 2004). Nach den vorliegenden Ergebnissen würden wir uns Matabosch et al. anschließen, dass ein verbessertes Wissen über den Metabolismus von Budesonid sinnvoll wäre, um auch Unterschiede in den Administrationswegen aufzeigen zu können (Matabosch et al. 2012).

Bei der Analyse der Nachweiszeiten konnten für die Budesonid-Messungen (Blut und Urin) keine Nachweiszeiten berechnet werden, da ein substantieller Anteil der Untersuchungspopulation die LOD-Werte bis zum letzten der insgesamt 3 bzw. 5 Messzeitpunkte nicht erreicht hatte (Blut: 6 Pferde; Urin: 9 Pferde). Über den tatsächlichen Zeitpunkt des nahezu vollständigen Wirkstoffabbaus kann in dieser Subgruppe daher keine Aussage getroffen werden. Diese hat Implikationen für die Schätzung der Nachweiszeit: Die Zeitdauer bis zum Eintreffen des Ereignisses ("LOD Budesonid") kann für diese Pferde nicht bestimmt werden.

Zur Analyse von Wahrscheinlichkeiten des Eintretens von Ereignissen und insbesondere zum Vergleich dieser Wahrscheinlichkeiten zwischen Gruppen können Techniken der "Überlebenszeitanalyse" oder "Ereignisanalyse" (auch "Survival Analysis") verwendet werden (Hosmer et al. 2008). Die Ereignisanalyse stellt ein gängiges Verfahren zur Analyse von Längsschnittdaten dar und bietet sich insbesondere an, wenn ein Teil der Daten zensiert ist. Die Ereignisanalyse ermöglicht den systematischen Vergleich der Zeit bis zum Eintreten eines Ereignisses zwischen zwei und mehr Gruppen. Die Analyse zielt hierbei auf die Frage ab, ob ein Ereignis in einer der Gruppen (signifikant) früher oder später eintritt als in den übrigen Gruppen.

In dieser Ereignisanalyse unserer Studie wurde die Wahrscheinlichkeit des Eintretens des Ergebnisses – also hier die Entwicklung der Wirkstoffkonzentration von Budesonid – kalkuliert und zwischen den Gruppen verglichen. In der Gruppe der kranken Pferde zeigte sich, dass bis einschließlich dem Messzeitpunkt 4 (96 Stunden) kein Pferd der Gruppe das Ereignis LOD, also die Nachweisgrenze von Budesonid im Blut erreicht hatte. Ein anderes Bild ergab sich für die Gruppe der gesunden Pferde. Dort zeigte sich, dass nach 96 Stunden drei Viertel aller Pferde in der Gruppe der gesunden Pferde den Wirkstoff

Budesonid im Blut (nahezu) vollständig abgebaut hatten (LOD). Im Vergleich zur Entwicklung der Überlebenswahrscheinlichkeiten für die Messungen im Blut zeigten sich deutlich geringere Unterschiede zwischen den Subgruppen für Budesonid im Urin. Trotzdem wird deutlich, dass die Untersuchung des Wirkstoffs im Urin einen schnelleren Wirkstoffabbau in der Gruppe der gesunden Pferde erfuhr. Nach 96 Stunden hatten 50 % der gesunden Pferde die Nachweisgrenze von Budesonid erreicht, hingegen nur 37,5 % der kranken Pferde. Bei dem Vergleich der Gruppen "in Ruhe" und "unter Belastung" wurden auf Basis der Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede im Wirkstoffabbau von Budesonid in Blut und Urin deutlich.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse im Wirkstoffabbau in den einzelnen Gruppen auf eine starke individuelle Variation zwischen einzelnen spezifischen Patienten hinweist. Diese biologische Variabilität muss auch bei dem Festlegen der Karenzzeit beachtet werden. Karenzzeiten können theoretisch anhand von pharmakologischen und tiermedizinischen Erkenntnissen aus den Nachweiszeiten berechnet werden. Dabei wird ein Sicherheitsfaktor zu den Nachweiszeiten gerechnet, der die individuellen Schwankungen misst, dennoch sind es nur Empfehlungen mit einem Restrisiko. Die aktuell vorgegebene Karenzzeit bei Inhalation von Budesonid von der FN liegt bei 7 Tagen. Dabei wurde die errechnete Plasmanachweiszeit mit einem Sicherheitsfaktor von 2,6 multipliziert. Es ist aber festzuhalten, dass unter den Verbänden allein die FN Karenzzeiten vorgibt; alle anderen nehmen aufgrund der Interindividualität und der immer genaueren Messungen der Labore davon Abstand. Nach Kietzmann würde eine verdoppelte oder verdreifachte Ausscheidungszeit eine sichere Karenzzeit von 95 bis 99 % bieten. So würde eine standardisierte Verdoppelung der "detection time" aus pharmakologischer Sicht eine ausreichende Sicherheitsspanne bedeuten (Kietzmann 2009).

Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie auf Wahrscheinlichkeitsberechnungen basieren, zeigt sich doch, dass die bemessene Nachweiszeit deutlich zwischen den einzelnen Gruppen, abhängig vom Gesundheitsstatus, variiert. Nach der Wahrscheinlichkeitsberechnung für die Budesonidkonzentration im Blut in der Gruppe der kranken Pferde zeigte sich, dass nach 96 Stunden kein Pferd die Nachweisgrenze (LOD) erreicht hatte. Verdoppelt man diese 96 Stunden nach Kietzmans Empfehlungen, so würde man auf 192 Stunden, umgerechnet auf 8 Tage, kommen und die Nachweisgrenze (LOD) wurde noch nicht mal vollständig erreicht. Die aktuell festgesetzte Karenzzeit von der FN könnte demnach überschritten werden. Die Studie zeigt, dass die festgesetzte Karenzzeit von Budesonid von der FN mit einem größeren Sicherheitsfaktor bei lungenkranken Pferden korrigiert werden sollte. Weiterführende Studien mit zeitlich längerer Untersuchung des Nachweises von Budesonid wären zu empfehlen, um eine genau korrigierte Karenzzeit für individuelle Gesundheitszustände festsetzen zu können.

6.2.4 Bewertung der Ergebnisse bezüglich ihrer Dopingrelevanz

Geringe, immer länger nachweisbare Wirkstoffkonzentrationen erschweren den therapeutischen Einsatz von Medikamenten. Besonders die Anwendung von Glukokortikoidpräparaten bei Sportpferden ist dadurch stark eingeschränkt. Die zurzeit gültige Regelung im Pferdesport ist streng: Bei Rennpferden steht in der Rennordnung des DVR unter §6, dass bei keinem Pferd zum Zeitpunkt des Rennens im Körpergewebe, in Körperflüssigkeiten und Körperausscheidungen eine unerlaubte Substanz nachgewiesen werden darf. So hält es ebenfalls der HVT (Hauptverband für Traber-Zucht und -Rennen) unter § 93 fest. Die Regelung der FN führt es noch genauer aus: Derzeit wird jeder Nachweis einer verbotenen Substanz, bzw. in diesem Fall von Glukokortikoiden, als positives Dopingergebnis gewertet ("Null-Lösung"). Jeder oberhalb einer festgesetzten Nachweisgrenze liegende Wert gilt als Doping positiv. Werte unterhalb der Nachweisgrenze gelten als Doping negativ. Dies kann einer therapeutischen Anwendung eines solchen Präparates bei Sportpferden und somit einem gewünschten Therapieerfolg entgegenstehen. Auch wird nicht berücksichtigt, dass die Menge der vorliegenden Substanz bereits vollkommen wirkungslos sein kann, so dass das Pferd in seiner Leistung nicht mehr beeinflusst wird. Solange eine Substanz in den Körperflüssigkeiten eines Pferdes nachgewiesen werden kann, wird in der Regel davon ausgegangen, dass sie wirksam ist. Für viele Substanzen lassen sich unwirksame Plasmakonzentrationen bestimmen, nicht jedoch für Glukokortikoide (Ungemach 2002). Unabhängig von der Dopingproblematik sollte aber der Tierschutzgedanke die zentrale Rolle spielen. Nach aktuellem Tierschutzgesetz ist es nicht erlaubt, einem Pferd Leistung abzuverlangen, der es aufgrund seines körperlichen Zustandes nicht gewachsen ist. So wäre es demnach falsch, ein lungenerkranktes Pferd an einem Wettkampf teilnehmen zu lassen, welches diesen nur Mithilfe von medikamenteller Behandlung antreten kann. Wenn ein Medikament in einer Dopingprobe nachgewiesen wird, ist im Sinne des Tierschutzgesetzes davon auszugehen, dass eine Erkrankung des Tieres kurz vor dem Wettkampf noch vorlag, welche einen therapeutischen Einsatz von Medikamenten erforderte. Nach einer Erkrankung sollte dem Tier im Sinne des Tierschutzes eine ausreichende Zeit der Rekonvalenz zugestanden werden, bevor es wieder an einem Wettkampf teilnimmt. Unter den derzeitigen Anti-Doping Bestimmungen muss die Rekonvaleszenzzeit, in der ein Pferd nicht an Wettkämpfen teilnimmt, mindestens so lang sein, wie die Substanz im Urin oder Plasma des Pferdes nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse, dieser Studie, beruhend auf Wahrscheinlichkeitsrechnungen zeigen, dass die Nachweiszeit von Budesonid individuell variieren kann. Die Möglichkeit besteht, dass die festgesetzte Karenzzeit von der FN von 7 Tagen für das Präparat Budesonid bei lungenerkrankten Pferden überschritten werden und zu einem positiven Dopingnachweis führen könnte, welches fatale Folgen für Pferd und Reiter haben kann. Um dies zu vermeiden sollte die Karenzzeit der FN für das Präparat Budesonid um mindestens 2 Tage verlängert werden.

7. Zusammenfassung

Dopingrelevanz inhalativ verabreichter Glukokortikoide (Budesonid) bei Sportpferden mit COB

Henrike Heinemann

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob sich die Nachweisbarkeit von Budesonid in Blut- und Urinproben bei lungenkranken Pferden gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe verändert und ob die Art der Inhalation (in Ruhe oder unter Belastung) Einfluss darauf nimmt.

16 Pferde nahmen nach Einbeziehung von klinischer Untersuchung, Blutgasanalyse, Bronchoskopie, BAL Zytologie und Thorax Röntgen an der Studie teil. Davon waren 8 Pferde COB-erkrankt und 8 bildeten die gesunde Kontrollgruppe.

Je 4 Pferde jeder Gruppe wurde 2mal täglich mit Budesonid (3 µ/kg KGW) über 10 Tage unter Belastung inhaliert, bei den anderen 4 erfolgte die Inhalation in Ruhe.

Blut und Urinproben wurden ab der 4. Stunde bis zur 96. Stunde nach letzter Inhalation genommen und auf die Nachweisbarkeit von Budesonid und dessen Metaboliten Hydroxybudesonid und Hydroxyprednisolon hin untersucht.

Bei allen lungenkranken Pferden zeigte sich eine signifikant höhere Wirkstoffkonzentration von Budesonid bei allen Messzeitpunkten im Vergleich zu den gesunden Pferden. In allen Proben der COB-erkrankten Pferde zeigte sich noch bis zur 96. Stunde Budesonidkonzentration über der Nachweisgrenze. Dagegen waren es in der gesunden Gruppe nur 25 % der Patienten. Einen Unterschied zeigte auch der Vergleich der Gruppen in Ruhe und unter Belastung. Pferde, die unter Belastung inhaliert wurden, zeigten im Allgemeinen einen verlangsamten Abbau von Budesonid; dieser war aber nicht bei allen Messzeitpunkten signifikant. Die Metaboliten konnten nur im Urin nachgewiesen werden. Hydroxybudesonid zeigte insgesamt eine Nachweiszeit von 63 Stunden, für Hydroxyprednisolon wurde insgesamt eine Nachweiszeit von 60 Stunden gemessen. Bei dem Wirkstoffabbau der Metaboliten konnten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die vorliegende Studie zeigt eine starke individuelle Variation im Wirkstoffabbau unter den verschiedenen Gruppen und empfiehlt, dass die festgesetzte Karenzzeit von der FN von 7 Tagen für Budesonid mit einem größeren Sicherheitsfaktor bei lungenkranken Pferden korrigiert werden sollte. Weiterführende Studien mit einem größeren Patientengut und einer zeitlich länger angesetzten Untersuchung des Nachweises von Budesonid wären zu empfehlen, um eine genau korrigierte Karenzzeit für individuelle Gesundheitszustände festsetzen zu können.

8. Summary

Inhaled glucocorticoids (Budesonid) in relation to the relevance of doping for competition horses with RAO

Henrike Heinemann

The goal of this study was to evaluate, if respiratory disease (Recurrent airway obstruction vs. controls) and the mode of inhalation (rest vs. exercise) influences the detectability of inhaled budesonide in equine plasma and urine samples.

In 16 horses, clinical examinations, arterial blood gas analysis, bronchoscopy, BAL cytology and thoracic radiography were performed. 8 horses were diagnosed with RAO while the 8 horses of the control group showed no signs of respiratory disease. 4 horses of each group were inhaled twice daily with budesonide (3 µg/kg BW) over 10 days at rest and 4 of each group during lunging exercise. Plasma and urine samples were obtained at 4 to 96 hours post inhalation and evaluated for budesonide in plasma and urine, as well as the metabolites hydroxybudesonide and hydroxyprednisolone in urine.

All samples of RAO affected horses showed significantly higher plasma concentrations and detection times of budesonid compared to controls. After 96 hours, the budesonide concentrations were above the limit of detection in nearly all RAO horses, while this was the case in only 25% of controls. Detected concentrations of budesonide were higher at all time-points in horses inhaled under exercise compared to inhalation at rest as well, but the differences were not significant at all time-points. Metabolites could only be detected in urine samples. Detection time for hydroxybudesonide and -prednisolone were 63 and 60 hours, respectively. There were no specific group differences in times of detection and concentration in plasma and urine.

The study shows a great variety in budesonide concentration and in time of detection between the specific groups. Further pharmacokinetic studies are required for more exact results. In conclusion, the results of the study lead to the recommendation to increase the time span between glucocorticoid inhalation and participation in sporting events, in horses affected by respiratory disease to the 7 days period of restriction the FN sets.

9. Literaturverzeichnis

Abraham, G.; Brodde, O. E.; Ungemach, F. R. (2002):
Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone.

Equine Vet J. 34(6), 587-593.

Ammann, V. J.; Vrins, A. A.; Lavoie, J. P. (1998):

Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Equine Vet J. 30(2), 152-157.

Andersson, P.; Ryrfeldt, A. (1984):

Biotransformation of the topical glucocorticoids budesonide and beclomethasone 17 alpha, 21-dipropionate in human liver and lung homogenate.

J Pharm Pharmacol. 36(11), 763-765.

Art, T.; Bureau, F.; Robinson, N. E. (2008):

Hunting for a key to the enigma of heaves in the black box of the white cells.

Vet J. 177(3), 307-8.

Barnes, P. J. (2000):

Mechanisms in COPD: differences from asthma.

Chest, 117, 10S-4S.

Bayly, W. M.; Duviols, D. H.; Votion, D.; Vandenput, S.; Art, T.; Lekeux, P. (2002):

Effects of inhaled ipratropium bromide on breathing mechanics and gas exchange in exercising horses with chronic obstructive pulmonary disease.

Equine Vet J. 34(1), 36-43.

Buhl, R. (2003):

Budesonide/formoterol for the treatment of asthma.

Expert Opin Pharmacother. 4(8), 1393-406.

Clements, J. M.; Pirie, R. S. (2007):

Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems.

Res Vet Sci. 83(2), 256-262.

Cornelisse, C. J.; Robinson, N. E.; Berney, C. E.; Kobe, C. A.; Boruta, D. T.; Derksen, F. J. (2004):

Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction.

Equine Vet J. 36(5), 426-430.

Couetil, L.; Hammer, J.; Miskovic Feutz, M.; Nogradi, N.; Perez-Moreno, C.; Ivester, K. (2012):

Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction.

J Vet Intern Med. 26(6), 1433-1438.

Dalby, C.; Polanowski, T.; Larsson, T.; Borgstrom, L.; Edsbacker, S.; Harrison, T. W. (2009):

The bioavailability and airway clearance of the steroid component of budesonide/formoterol and salmeterol/fluticasone after inhaled administration in patients with COPD and healthy subjects: a randomized controlled trial.

Respir Res. 10, 104.

Dauvillier, J.; Felipe, M. J.; Lunn, D. P.; Lavoie-Lamoureux, A.; Leclere, M.; Beauchamp, G.; Lavoie, J. P. (2011):

Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves.

J Vet Intern Med. 25(3), 549-557.

Deaton, C. M.; Deaton, L.; Jose-Cunilleras, E.; Vincent, T. L.; Baird, A. W.; Dacre, K.; Marlin, D. J. (2007):

Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse.

J Appl Physiol (1985). 102(3), 1071-1077.

Derendorf, H.; Hochhaus, G.; Meibohm, B.; Mollmann, H.; Barth, J. (1998):

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids.

J Allergy Clin Immunol. 101(4 Pt 2), 440-446.

Derksen, F. J.; Robinson, N. E.; Armstrong, P. J.; Stick, J. A.; Slocombe, R. F. (1985):
Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves).

J Appl Physiol (1985). 58(2), 598-604.

Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN) (1994):

Leistungsprüfungsordnung (LPO), 55-59, 226-227.

Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN) (2013):

Praktische Informationen zu den Anti-Doping- und Medikamentenkontroll-Regeln für den Pferdesport (ADMR).

Broschüre Fairer Sport, 5-23.

Deventer, K.; Mikulcikova, P.; Van Hoecke, H.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. (2006):

Detection of budesonide in human urine after inhalation by liquid chromatography-mass spectrometry.

J Pharm Biomed Anal. 42(4), 474-479.

Dieckmann, M. P. (1987):

Zur Wirksamkeit von Ambroxolhydrochlorid (Mukovent) bei lungenkranken Pferden - klinische, funktionelle und zytologische Untersuchungen [Efficacy of Ambroxol Hydrochloride (Mukovent) in horses with lung disease - clinical, functional and cytological investigations].

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany

Gerber, H. (1973):

Chronic pulmonary disease in the horse.

Equine Vet J, 5, 26-33.

Dimova, H.; Wang, Y.; Pommery, S.; Moellmann, H.; Hochhaus, G. (2003):

SPE/RIA vs LC/MS for measurement of low levels of budesonide in plasma.

Biomed Chromatogr. 17(1), 14-20.

Direktorium für Vollblutzucht und Rennen e. V. (DVR) (2002):

Rennordnung(RO).

DVR, Köln, 127-136, 226-227.

Donnelly, R.; Seale, J. P. (2001):

Clinical pharmacokinetics of inhaled budesonide.

Clin Pharmacokinet. 40(6), 427-440.

Durham, A. (2001):

Update on therapeutics for obstructive pulmonary diseases in horses.

In Practice 23, 474-481.

Duvivier, D. H.; Votion, D.; Vandenput, S.; Art, T.; Lekeux, P. (1997):

Airway response of horses with COPD to dry powder inhalation of ipratropium bromide.

Vet J. 154(2), 149-153.

Duvivier, D. H.; Votion, D.; Vandenput, S.; Lekeux, P. (1997):

Aerosol therapy in the equine species.

Vet J. 154(3), 189-202.

Duvivier, D.H.; D. Votion, C.A.; Roberts, T. Art und P. Lekeux (1999): Inhalation therapy of equine respiratory disorders.

Equine vet. Educ.,11, 24–130

Edsbacker, S.; Andersson, P.; Lindberg, C.; Paulson, J.; Ryrfeldt, A.; Thalen, A.(1987):

Liver metabolism of budesonide in rat, mouse, and man. Comparative aspects.

Drug Metabol Dispos. 15 (3), 403-11.

Ehrmann, C. (2012):
Tief durchatmen - Inhalative Therapie chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd.
hundkatzeponferd 06/12, 28-29.

European Horserace Scientific Liaison Committee (EHSLC) (2002):
Guidelines for analysis of samples from pharmacokinetic studies- Method Validation.
Guidelines of EHSLC, Portman Square, London The Jockey Club.

Fey, K. (2006):
Chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis.
Dietz, O. & Huskamp, B. Handbuch Pferdepraxis, 3. Auflage, 327-332.

Funch-Nielsen H.; R. C. A., Weekes J. S.; Deaton C. M.; Marlin D. J. (2001):
Evaluation of a new spacer device for delivery of drugs into the equine respiratory tract.
Equine Healthcare APS, Dänemark, Centre for Equine Studies, Animal Health Trust,
Newmarket, UK .

Gehlen, H. N., G. (2009):
Möglichkeiten der Inhalationstherapie.
Pferdeheilkunde 25, 4, 327-332.

Goldsmith, D. R.; Keating, G. M. (2004):
Budesonide/formoterol: a review of its use in asthma.
Drugs. 64(14), 1597-1618.

Hauptverband für Traber-Zucht und -Rennen e.V.(HVT) (2003):
Satzungen und Ordnungen des Hauptverbandes für Traber-Zucht und - Rennen e.V.
HVT, Kaarst, 45, 71-73.

Herholz, C.; Straub, R.; Gerber, V.; Wampfler, B.; Luthi, S. Imhof, A.; Moens, Y. und Bus-
ato, A. (2002):
Relationship between clinical signs and pulmonary function estimated by the single breath
diagram for CO₂ (SBD-CO₂) in horses with chronic obstructive pulmonary disease.
Vet J, 163, 187-195.

Hogger, P. (2003):
What happens in the body with glucocorticoids?
Pharmacokinetics and pharmacodynamics.
Pharm. Unserer Zeit. 32(4), 296-301.

Hosmer D.W., L. S. (2008):
Applied Survival Analysis.
Wiley: Hoboken NJ. 2. Edition

Hotchkiss, J. W.; Reid, S. W. und Christley, R. M. (2007):
A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction.
Equine Vet J, 39, 301-8.

Jackson, C. A.; Berney, C.; Jefcoat, A. M.; Robinson, N. E. (2000):
Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves).
Equine Vet J. 32(5), 432-438.

Jackson, L. D.; Polygenis, D.; Mcivor, R. A.; Worthington I. (1999):
Comparative efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma.
Canadian Journal of Clinical Pharmacology 6, 26–37.

Jendbro, M.; Johansson, C. J.; Strandberg, P.; Falk-Nilsson, H.; Edsbacker, S. (2001):
Pharmacokinetics of budesonide and its major ester metabolite after inhalation and intravenous administration of budesonide in the rat.
Drug Metab Dispos. 29(5), 769-776.

Kaiser, H.; Aaronson, D.; Dockhorn, R.; Edsbacker, S.; Korenblat, P.; Kallen, A. (1999):
Dose-proportional pharmacokinetics of budesonide inhaled via Turbuhaler.
Br J Clin Pharmacol. 48(3), 309-316.

Kamin, W. E. (2007):
Neue Aspekte zur effektiven bronchialen Applikation inhalativer Medikamente im Kindesalter.
Kumulative Habilitation, Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, 8-12.

Kampmann, C. O., B.; Venner, M.; Deegen, E. (2001):
Budesonid-Aerosoltherapie und Lungenfunktion bei chronisch lungenkranken Pferden.
Pferdeheilkunde. 17, 2, 155-160.

Kaplan E. L., M. P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations.
Journal of the American Statistical Association. 53(282), 457-481.

Kietzmann, M.; Düe, M. (2009)
Welche Arzneimittel benötigt der Tierarzt zeitnah zum Turniereinsatz aus pharmakologischer Sicht?
Konsequenzen für das Reglement am Beispiel der "Medicine Box"
Pferdeheilkunde 25, 4, 322-326.

Klaus, A. M.; Hapke, H. J. (1996):
Natural and synthetic glucocorticoids in the racing horse: a review of the literature.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 103(12), 494-500.

- Lapointe, J. M.; Lavoie, J. P.; Vrins, A. A. (1993):
Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease.
Am J Vet Res. 54(8), 1310-1316.
- Lavoie, J. P.; Maghni, K.; Desnoyers, M.; Taha, R.; Martin, J. G.; Hamid, Q. A. (2001):
Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile.
Am J Respir Crit Care Med. 164(8 Pt 1), 1410-1413.
- Leclere, M.; Lavoie-Lamoureux, A.; Lavoie, J. P. (2011):
Heaves, an asthma-like disease of horses.
Respirology. 16(7), 1027-46.
- Leguillette, R. (2003):
Recurrent airway obstruction--heaves.
Vet Clin North Am Equine Pract. 19(1), 63-86, vi.
- Lehmann, W. D. (1996):
Massenspektrometrie in der Biochemie, 1-9.
- Luo, Y.; Uboh, C. E.; Soma, L. R.; Guan, F. Y.; Rudy, J. A.; Tsang, D. S. (2005):
Simultaneous analysis of twenty-one glucocorticoids in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom. 19(10), 1245-1256.
- Machnik, M. (2007):
Behandlung von Sportpferden mit Corticosteroiden: Nachweiszeiten von Flumethason und Betamethason beim Pferd nach i.v. Applikation von Acutol® und i.a. Applikation von Celestovet®.
Pferdeheilkunde. 23, 5, 476-480.
- Mann H. B.; W. D. R. (1947):
On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other.
The Annals of Mathematical Statistics. 18(No.1).
- Mantel, N. (1966):
Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration.
Cancer Chemother Rep. 50(3), 163-170.
- Marti, E.; Gerber, H.; Essich, G.; Oulehla, J.; Lazary, S. (1991):
The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis.
Equine Vet J. 23(6), 457-60.

Matabosch, X.; Pozo, O. J.; Perez-Mana, C.; Farre, M.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R. (2012):

Identification of budesonide metabolites in human urine after oral administration.
Anal Bioanal Chem. 404(2), 325-40.

McGorum, B. C. und Pirie, R. S. (2008):

A review of recurrent airway obstruction and summer pasture associated obstructive pulmonary disease. *Ippologia*, 19, 11-1.

Miller-Larsson, A.; Mattsson, H.; Hjertberg, E.; Dahlback, M.; Tunek, A.; Brattsand, R. (1998):

Reversible fatty acid conjugation of budesonide. Novel mechanism for prolonged retention of topically applied steroid in airway tissue.
Drug Metab Dispos. 26(7), 623-630.

Miller-Larsson, A.; Jansson, P.; Runström, A.; Brattsand, R. (2000):

Prolonged airway activity and improved selectivity of budesonide possibly due to esterification.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162:1455-1461.

Moran, G.; Folch, H.; Araya, O.; Burgos, R.; Barria, M. (2010):

Detection of reagenic antibodies against *Faenia rectivirgula* from the serum of horses affected with Recurrent Airway Obstruction by an in vitro bioassay.
Vet Res Commun. 34(8), 719-726.

Moran, G.; H. F. (2011):

Recurrent airway obstruction in horses – an allergic inflammation: a review.
Veterinarni Medicina. 56(1), 1-13.

Nationale Anti Doping Agentur (NADA Mai 2015):

NADA Jahresbericht 2014. Material Nr. 50.

Nationaler Anti-Doping Code (NADC 2015):

Nationale Anti-Doping Agentur Deutschland,
Artikel 1.

Nikander, K.; Turpeinen, M.; Wollmer, P. (1999):

The conventional ultrasonic nebulizer proved inefficient in nebulizing a suspension.
J Aerosol Med. 12(2), 47-53.

O'Connell, E. J. (2003):

Review of the unique properties of budesonide.
Clin Ther. 25 Suppl C, C42-60.

- Oexmann, B. (2010):
Die rechtliche Multifunktion der Pferdetierärzte.
Pferdeheilkunde 26, 264-274.
- Pirie, R. S. (2013):
Recurrent airway obstruction: A review.
Equine Vet J. 2013, 1-6.
- Pirie, R. S.; Collie, D. D.; Dixon, P. M.; McGorum, B. C. (2002):
Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses.
Equine Vet J. 34(4), 337-42.
- Robinson, N. E. (2001):
Recurrent Airway Obstruction (Heaves).
Lekeux, P. (Ed.), Equine Respiratory Diseases, Ithaca: International Veterinary Information Service.
- Robinson, N. E.; Berney, C.; Behan, A.; Derksen, F. J. (2009):
Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction.
J Vet Intern Med. 23(6), 1247-1253.
- Robinson, N. E.; Berney, C.; Eberhart, S.; deFeijter-Rupp, H. L.; Jefcoat, A. M.; Cornelisse, C. J.; Gerber, V. M.; Derksen, F. J. (2003):
Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction.
Am J Vet Res. 64(5), 550-557.
- Robinson, N. E.; Derksen, F. J.; Berney, C.; Goossens, L. (1993):
The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide.
Equine Vet J. 25(4), 299-303.
- Robinson, N. E.; Derksen, F. J.; Olszewski, M. A.; Buechner-Maxwell, V. A. (1996):
The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses.
Br Vet J. 152(3), 283-306.
- Rush, B.R., Raub, E.S.; Rhoads, W.S.; Flaminio, M.J.; Matson, C.J.; Hakala, J.E.; Gillespie, J.R. (1998):
Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone.
Am J vet Res. 59, 1039-1043.

Schmallenbach, K. H.; Rahman, I.; Sasse, H. H.; Dixon, P. M.; Halliwell, R. E.; McGorum, B. C.; Crameri, R.; Miller, H. R. (1998):

Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Vet Immunol Immunopathol. 66(3-4), 245-256.

Schwedt, G.; Vogt, C. (2010):

Analytische Trennmethoden. 97-142.

Tesarowski, D. B.; Viel, L. und McDonell, W. N. (1996):

Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves).

Am J Vet Res, 57, 1214-1219

Tesarowski, D.B.; Viel, L. ; McDonell, W.N. und Newhouse, M.T. (1994):

The rapid and effective administration of a beta 2-agonist to horses with heaves using a compact inhalation device and metered-dose inhalers.

Can. vet. J. 35, 170-173.

Thomson, J. R.; McPherson, E. A. (1981):

Prophylactic effects of sodium cromoglycate on chronic obstructive pulmonary disease in the horse.

Equine Vet J. 13(4), 243-246.

Thomson, J. R.; McPherson, E. A. (1984):

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

Equine Vet J. 16(1), 35-38.

Tilley, P.; Sales Luis, J. P.; Branco Ferreira, M. (2012):

Correlation and discriminant analysis between clinical, endoscopic, thoracic X-ray and bronchoalveolar lavage fluid cytology scores, for staging horses with recurrent airway obstruction (RAO).

Res Vet Sci. 93(2), 1006-14.

Tobias, S. (2004):

Untersuchung zur Pharmakokinetik des Arzneistoffes Detomidin hinsichtlich der Dopingrelevanz beim Pferd.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 3-4.

Toutain, P. L.; Lassourd, V. (2002):

Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in the horse.

Equine Vet J. 34(3), 242-249.

Ungemach, F. R. (1985):
Doping control in race horses.
Tierärztl. Prax. 13(1), 35-53.

Ungemach, F. R. (2002):
Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen.
Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 333-355.

Ungemach, F. R. (1999):
Doping im Pferdesport.
O. Dietz u. B. Huskamp (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis, 65-80.

Unger, K. K.; Weber E. (Hrsg.) (1995):
Handbuch der HPLC Teil 1 • Leitfaden für Anfänger und Praktiker. 5-17.

Vandenput, S.; Votion, D.; Duvivier, D.H ; Van Erck, E.; Anciaux, N.; Art, T. und Lekeux, P. (1998):
Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses.
Vet. J. 155, 189-195.

Votion, D.; Ghafir, Y.; Munsters, K.; Duvivier, D. H.; Art, T.; Lekeux, P. (1997):
Aerosol deposition in equine lungs following ultrasonic nebulisation versus jet aerosol delivery system.
Equine Vet J. 29(5), 388-93.

Zwiener, I.; Blettner, M.; Hommel, G. (2011):
Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications.
Dtsch Arztebl Int. 108(10), 163-9.

10. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Systemisch eingesetzte Glukokortikoide bei COB-Therapie (nach Robinson 2001)
- Tabelle 2: Inhalativ eingesetzte Glukokortikoide
- Tabelle 3: Angaben zu dem Patientengut
- Tabelle 4: Beurteilung der TBS nach Deegen und Dieckmann(1990)
- Tabelle 5: Score-System (modifiziert nach Ohnesorge 1998)
- Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung in ausgesuchten Merkmalen der Patientenpopulation
- Tabelle 7: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation
- Tabelle 8a: Therapieeffekt
- Tabelle 8b: Vergleich vor Therapie vs. nach Therapie
- Tabelle 9a: Einteilung nach dem modifizierten Score-System von Ohnesorge
- Tabelle 9b: Vergleich der Therapiegruppen
- Tabelle 10: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation
- Tabelle 11: Wirkstoffkonzentration zu den Messzeitpunkten: Gruppenspezifische Mittelwerte und Mann-Whitney-U Tests
- Tabelle 12: Limit of Detection (LOD) Werte für die Wirkstoffe
- Tabelle 13: Nachweiszeiten in Stunden: Hydroxybudesonid (Urin) und Hydrocortison (Urin)
- Tabelle 14: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-rank-Tests
- Tabelle 15: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-rank-Tests

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inhalation mit der SaHoMa-II Inhalationsmaske in Ruhe

Abbildung 2: Auffangen von Spontanharn

Abbildung 3: Screeningverfahren in der Pferde- Dopinganalytik

Abbildung 4: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Gesund vs. Krank

Abbildung 5: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Gesund vs. Krank

Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Ruhe vs. Belastung

Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Ruhe vs. Belastung

Untersuchungsbögen

12. Untersuchungsbögen

1. Belastungstest
2. Klinische Examination

13. Anhang

13.1 Tabellen

Tabelle 1: Systemisch eingesetzte Glukokortikoide bei COB-Therapie (nach Robinson 2001)

Wirkstoff	Dosis	Verabreichungsform	Kommentar
Prednisolon-Tabletten	2,2 mg/kg alle 24 Std	Oral	Wird gut vom Magen-Darm-Trakt absorbiert
Dexamethason	0,1 mg/kg alle 24 Std	Oral, i.v., i.m.	Effektive Therapie bei i.v. Gabe. Verbesserung in 3-7 Tagen. Stufenweise reduzieren der Dosis nötig.
Dexamethasone-21-isonicotinate	0,04mg/kg alle 3 Tage	i.m.	Langzeit-wirksame Form von Dexamethason,
Triamcinolone	0,09 mg/kg	i.m.	Eine Dosis verbessert Symptome bis zu 3 Wochen (Kann Hufrehe auslösen)

Tabelle 2: Inhalativ eingesetzte Glukokortikoide

Wirkstoff	Handelsname	Verabreichungsform	Dosis
Beclomethason (RRA: 1345)	Bronchocort	inhalativ	1,4 mg/500 kg alle 12 Std
Fluticason (RRA: 1800)	Flutide	inhalativ	6 mg/500 kg alle 12 Std
Budesonid (RRA:993)	Pulmicort	inhalativ	1,5 mg/500 kg alle 12 Std

Tabelle 3: Angaben zu dem Patientengut

Pferd (Nr.)	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Stockm aß (cm)	KGW (kg)	Gesundheits-status	Inhalationsgruppe 1: unter Belastung 2: in Ruhe
2.	12	Stute	Hannoveraner	170	550	RAO/COB in Remission	1
5.	10	Wallach	Oldenburger	170	560	RAO/COB in Remission	1
7.	22	Wallach	Traber	159	450	RAO/COB in Exacerbation	1
11.	12	Wallach	Deutsch. Reitpony	148	350	RAO/COB in Exacerbation	1
1.	5	Stute	Pony-Mix	132	320	Gesund	1
8.	16	Wallach	Warmblut	170	550	Gesund	1
17.	8	Wallach	Pinto	136	350	Gesund	1
18.	10	Stute	Tarpan	136	420	Gesund	1
3.	19	Stute	Araber-Mix	152	400	RAO/COB in Exazerbation	2
4.	10	Wallach	Traber	162	480	RAO/COB in Remission	2
9.	23	Stute	Araber	150	450	RAO/COB in Exazerbation	2
13.	22	Stute	Warmblut	168	550	RAO/COB in Exazerbation	2
16.	8	Stute	Warmblut	152	450	Gesund	2
19.	12	Stute	Kleinpferd	140	300	Gesund	2
20.	16	Wallach	Deutsches Reitpony	137	340	Gesund	2
21.	10	Wallach	Warmblut	158	470	Gesund	2

Tabelle 4: Beurteilung der TBS nach Deegen und Dieckmann(1990)

Sekretmenge	Score	Sekretviskosität	Score
Keine Sekretansammlung keine Sekretflocken	0	Schleimhaut feucht, nur geringe Menge wässrigen Sekrets aspirierbar	0
Keine Sekretansammlung, einzelne Sekretflocken	1	Schleimhaut feucht, einzelne feine Sekretflocken in wässrigem Sekret, leicht aspirierbar	1
Flache, ventrale Sekretansammlung, einzelne größere Sekretflocken	2	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret, ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar	2
Deutlich ventrale Sekretansammlung, reichlich Sekretflocken	3	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret mit einzelnen konsistenteren Sekretflocken, ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar	3
Durchgehende ventrale Sekretstraße, Sekretseebildung	4	Schleimhaut feucht/pappig muköses bis mukopurulentem Sekret, einige dorsale Schleimflocken, deutlich erschwerte Aspiration	4
Mehr als ein Viertel des Tracheallumens füllender Sekretstraße/-see	5	Schleimhaut pappig/ trocken, muköses bis purulentem Sekret, reichlich dorsale Schleimflocken, z.T. spinnwebenartige Schleimformationen, erschwerte Aspiration (kaum noch möglich)	5

Anhang

Tabelle 5: Score-System (modifiziert nach Ohnesorge 1998)

Untersuchung	Befund	Punkt- zahl	Score		
			Tag 1	Tag 2	Tag 3
Hustenauslösung (max. 1 Punkt)	Nicht auslösbar	0			
	Mehrfach auslösbar	1			
	Auswurf	1			
	Spontaner Husten	1			
Ruhedyspnoe (max. 3 Punkte)	Abdominale Atmung	1			
	Verlängerte Expiration	1			
	Einsinkende ICR	3			
	Nüsternblähen	3			
	Damprinne	3			
	Afteratmung	3			
Lungenperkussion (max. 2 Punkte)	Erweiterung 3 Finger	0			
	Erweiterung handbreit	1			
	Dämpfung	2			
Lungenauskultation (max. 2 Punkte)	Rasseln	2			
	Knistern	2			
	Giemen	2			
Tracheobronchoskopie (max. 2 Punkte)	Sekret deutlich vermehrt u./o. mäßig viskös	1			
	Sekret hgr vermehrt u./o. zähviskös	2			
	Carina tracheae deutlich verdickt	1			
BAL (max. 3 Punkte)	Neutrophile < 8 %	0			
	Neutrophile 8-15 %	1			
	Neutrophile 15-25 %	2			
	Neutrophile >25 %	3			
Blutgasanalyse (max. 2 Punkte)	AaDo2 7-14mmHg	1			
	AaDo2 > 14mmHg	2			

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung in ausgesuchten Merkmalen der Patientenpopulation

Variable		n	%
<i>Inhalation</i>	In Ruhe	8	50.0
	Unter Belastung	8	50.0
	Total	16	100.0
<i>Gesundheitsstatus</i>	gesund	8	50.0
	krank	8	50.0
	Total	16	50.0
<i>Geschlecht</i>	Stute	8	50.0
	Wallach	8	50.0
	Total	16	100.0

Tabelle 7: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation

Variable	Mittelwert	SD	Min	Max	Median	n
Alter (Jahre)	13.44	5.57	5.00	23.00	12.00	16
Gewicht (kg)	434.00	90.06	300.00	560.00	450.00	15
Größe (cm)	153.20	13.55	136.00	170.00	151.00	10

Tabelle 8a: Therapieeffekt

Fall	Vor Therapie		pO2 (mmHg)	Nach Therapie		pO2 (mmHg)
	PMN %	AaDO2 (mmHg)		PMN %	AaDO2 (mmHg)	
Unter Belastung						
2	18,75	0	103,85	2,5	0	102,36
5	27,8	1,16	95,66	69,4	2,52	95,89
7	52	2,03	96,8	67,8	0	107,65
11	87,8	12,21	81,81	34,2	0	106,05
In Ruhe						
3	47,4	0	98,45	14,4	0	102,86
4	11,8	0	100,83	1,75	0	94,26
9	27	7,99	94,24	34,2	0	103,03
13	84,2	0,91	99,01	56	0	110,9

Tabelle 8b: Vergleich vor Therapie vs. nach Therapie

Variable	Vor Therapie		Nach Therapie		Wilcoxon z
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
PMN %	44,59	28,87	35,03	27,48	0,98
AaDO2 (mmHg)	3,04	4,55	0,32	0,89	1,45
pO2 (mmHg)	96,33	6,59	91,09	37,07	-1,12
BAL	2,63	0,74	2,13	1,36	1,72*
BGA	0,13	0,35	0,00	0,00	1,00
GS	5,63	2,13	3,63	2,33	2,49**
* p < .10, ** p < .05, *** p < .01					

Tabelle 9a: Einteilung nach dem modifizierten Score-System von Ohnesorge

Fall	Vor Therapie		GS	Nach Therapie		GS
	BAL	BGA		BAL	BGA	
Unter Belastung						
2	2	0	4	0	0	0
5	3	0	4	3	0	4
7	3	0	8	3	0	6
11	3	1	8	3	0	5
In Ruhe						
3	3	0	6	2	0	4
4	1	0	2	0	0	0
9	3	0	7	3	0	5
13	3	0	6	3	0	5

Tabelle 9b: Vergleich der Therapiegruppen

Variable	Unter Belastung (Vorher-/Nachher- Differenz)		Nach Therapie (Vorher-/Nachher- Differenz)		U-Test z
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
PMN %	3,11	41,14	16,01	18,36	-0,58
AaDO2 (mmHg)	3,22	6,15	2,23	3,87	0,00
pO2 (mmHg)	-8,46	11,85	18,94	54,68	-0,29
BAL	0,50	1,00	0,50	0,58	-0,33
BGA	0,25	0,50	0,00	0,00	1,00
GS	2,25	1,71	1,75	0,50	0,77
* p < .10, ** p < .05, *** p < .01					

Anhang

Tabelle 10: Lage- und Streuungsmaße in der Untersuchungspopulation

Variable	\bar{x} pg/mL	SD	Min	Max	Median	n
Budesonid (Blut) t1 (4h)	71.00	44.35	11.00	150.00	57.00	15
Budesonid (Blut) t2 (16h)	21.38	11.58	3.00	40.00	17.50	16
Budesonid (Blut) t3 (48h)	16.34	17.81	0.50	74.00	11.50	16
Budesonid (Blut) t4 (96h)	5.88	7.36	0.50	26.00	3.50	16
Budesonid (Blut) t5 (144h)	1.69	2.69	0.50	11.00	0.50	16
Budesonid (Urin) t1 (24h)	61.08	111.83	8.00	408.00	23.00	13
Budesonid (Urin) t2 (72h)	52.34	81.32	2.50	265.00	20.00	16
Budesonid (Urin) t3 (96h)	4.50	0.00	4.50	4.50	4.50	14
Hydroxybudesonid (Urin) t1 (24h)	41.54	71.19	4.50	266.00	10.00	13
Hydroxybudesonid (Urin) t2 (72h)	5.06	1.58	4.50	10.00	4.50	16
Hydroxybudesonid (Urin) t3 (96h)	4.50	0.00	4.50	4.50	4.50	14
Hydroxyprednisolon (Urin) t1 (24h)	967.00	1047.23	99.50	3160.00	594.00	13
Hydroxyprednisolon (Urin) t2 (72h)	99.50	0.00	99.50	99.50	99.50	16

Tabelle 11: Wirkstoffkonzentration zu den Messzeitpunkten: Gruppenspezifische Mittelwerte und Mann-Whitney-U Tests

Variable	t	Gesund		Krank		U-Test	In Ruhe		Belastung		U-Test
		\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	z	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	z
Budesonid (Blut)	t1 (4h)	44.57	(37.74)	94.13	(39.88)	-2.49**	69.13	(47.02)	73.14	(44.72)	-0.35
	t2 (16h)	15.88	(11.19)	26.88	(9.63)	-2.26**	19.63	(12.35)	23.13	(11.29)	-0.63
	t3 (48h)	14.06	(24.38)	18.63	(8.57)	-2.10**	13.94	(11.43)	18.75	(23.14)	-0.05
	t4 (96h)	1.50	(2.02)	10.25	(8.26)	-3.09***	3.50	(3.64)	8.25	(9.48)	-0.92
	t5 (144h)	0.56	(0.18)	2.81	(3.56)	0.43	1.88	(3.69)	1.50	(1.36)	-0.91
Budesonid (Urin)	t1 (24h)	84.67	(158.60)	40.85	(54.94)	0.43	19.50	(6.63)	96.71	(147.54)	-1.08
	t2 (72h)	15.75	(14.64)	88.94	(104.39)	-1.37	50.56	(88.65)	54.13	(79.40)	0.11
	t3 (96h)	8.75	(8.25)	17.67	(25.08)	-0.61	6.25	(6.14)	17.31	(21.67)	-1.14
Hydroxybudesonid (Urin)	t1 (24h)	21.58	(17.31)	58.64	(95.63)	0.07	19.08	(21.30)	60.78	(93.92)	-1.09
	t2 (72h)	4.94	(1.24)	5.19	(1.94)	-0.09	4.50	(0.00)	5.63	(2.15)	-1.46
	t3 (96h)	4.50	(0.00)	4.50	(0.00)	-/-	4.50	(0.00)	4.50	(0.00)	-/-
Hydroxyprednisolon (Urin)	t1 (24h)	432.08	(561.88)	1425.50	(1182.74)	-1.81*	271.58	(260.52)	1563.07	(1112.96)	-2.25**
	t2 (72h)	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-
	t3 (96h)	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-	99.50	(0.00)	99.50	(0.00)	-/-

* $p < .10$, ** $p < .05$, *** $p < .01$

Tabelle 12: Limit of Detection (LOD) Werte für die Wirkstoffe

Wirkstoff	Wert
Budesonid (Blut)	0.5. pg/mL
Budesonid (Urin)	2.5 pg/mL
Hydroxybudesonid (Urin)	4.5 pg/mL
Hydroxyprednisolon (Blut)	99.5 pg/mL

Anhang

Tabelle 13: Nachweiszeiten in Stunden: Hydroxybudesonid (Urin) und Hydrocortison (Urin)

Variable		Gesamt	Gesundheitszustand			Verabreichungsmodus		
			Gesund	Krank	z^a	In Ruhe	Unter Belastung	z^a
Hydroxybudesonid (Urin)	\bar{x} (h)	63	69	57	0.854	54	72	-1.586
	SD	24.59	20.03	28.51		28.84	22.22	
Hydrocortison (Urin)	\bar{x} (h)	60	54	66	-1.118	54	66	-1.118
	SD	21.47	24.84	16.97		24.84	16.97	

* $p < .10$, ** $p < .05$, *** $p < .01$

Tabelle 14: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-rank-Tests

Variable		Gesund vs. Krank	
		Observed	Expected
Budesonid (Blut)	gesund	7	3.63
	krank	3	6.37
	Total	10	10.00
	χ^2	7.24	
	p	.0071	
Budesonid (Urin)	gesund	4	3.35
	krank	3	3.65
	Total	7	7.00
	χ^2	0.31	
	p	.5799	

$n = 16$, χ^2 , $df = 1$

Tabelle 15: Ereignisanalyse: Ergebnisse der Log-rank-Tests

Variable		in Ruhe vs. unter Belastung	
		Observed	Expected
Budesonid (Blut)	In Ruhe	6	4.43
	Belastung	4	5.57
	Total	10	10.00
	χ^2	1.38	
	p	.2401	
Budesonid (Urin)	in Ruhe	4	3.65
	Belastung	3	3.35
	Total	7	7.00
	χ^2	0.09	
	p	.7695	

13.2 Abbildungen

Abbildung 1: Inhalation mit der SaHoMa-II Inhalationsmaske in Ruhe



Abbildung 2: Auffangen von Spontanharn



Abbildung 3: Screeningverfahren in der Pferde-Dopinganalytik

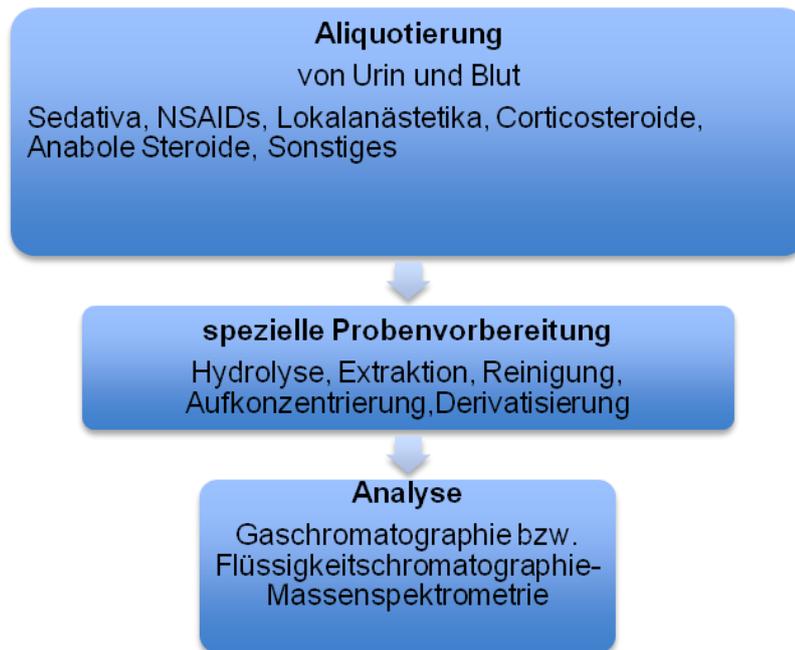


Abbildung 4: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Gesund vs. Krank

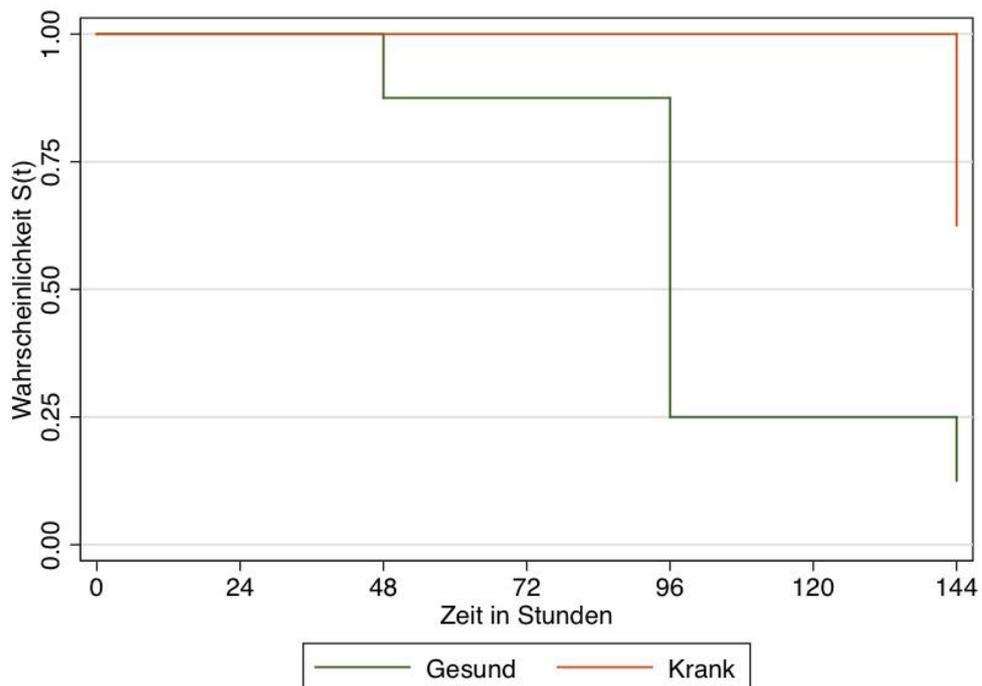


Abbildung 5: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Gesund vs. Krank

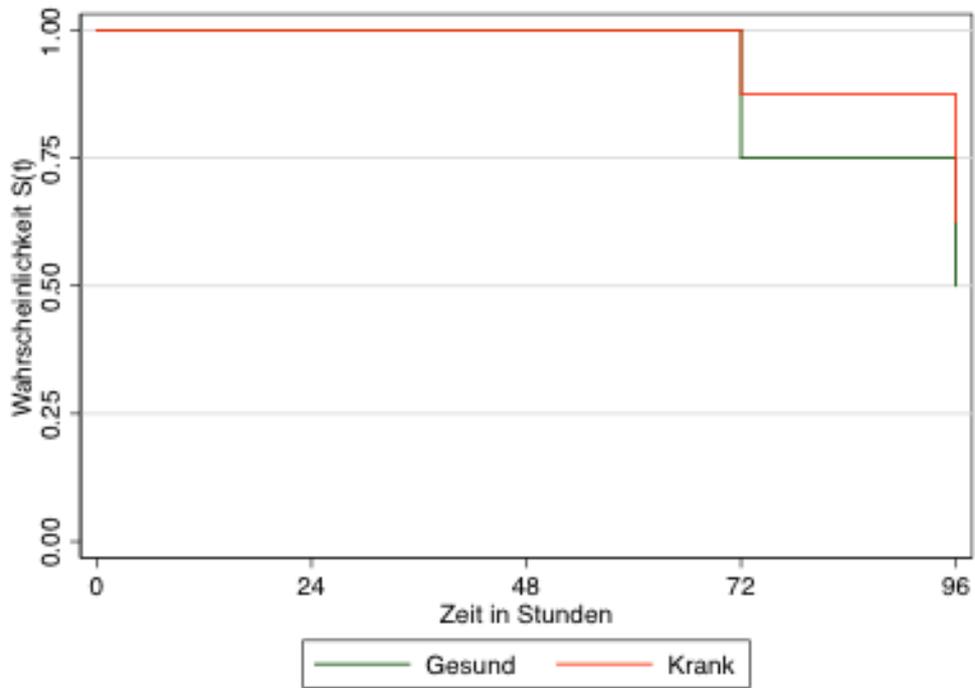


Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Blut): Ruhe vs. Belastung

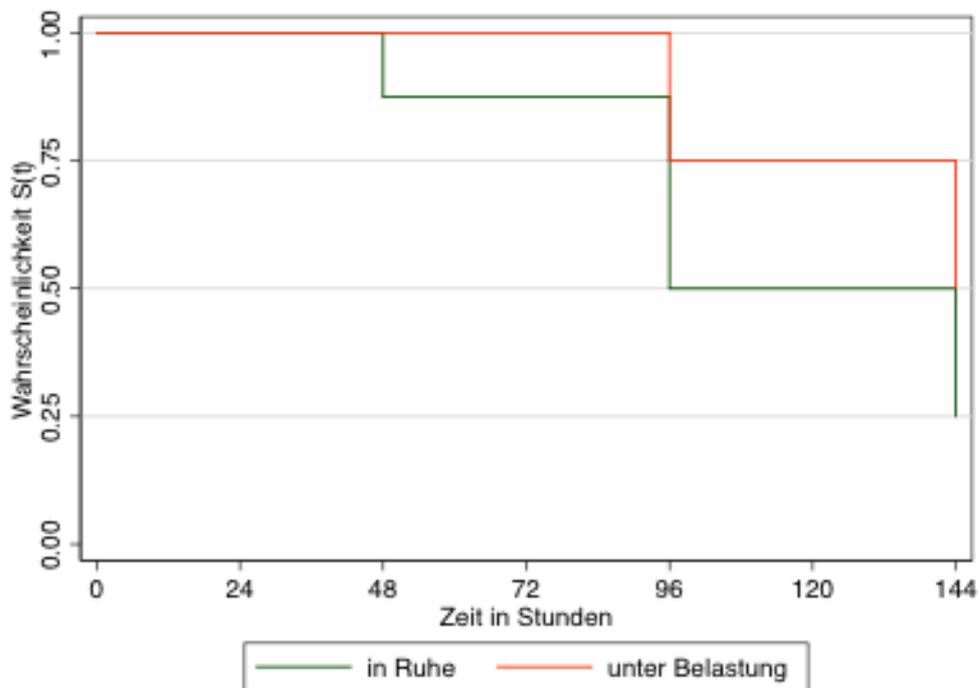
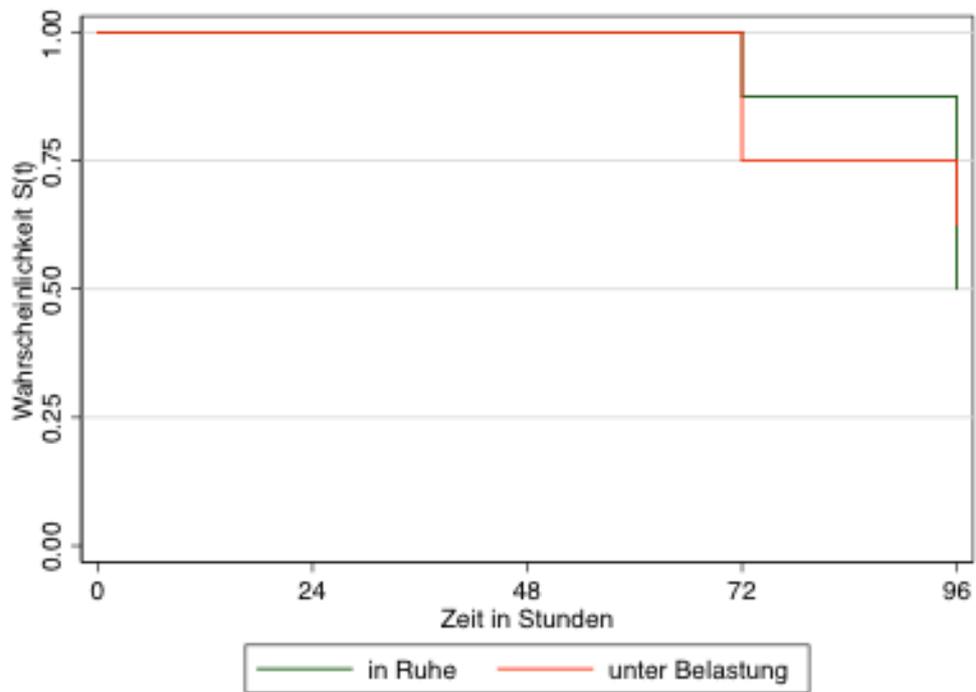


Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenskurve Budesonid (Urin): Ruhe vs. Belastung



13.3 Untersuchungsbögen

Belastungstest:

Date:

Case No.:

Exercise Test

Time – Min.	Heart Rate / Min.	Respiratory Rate / Min.
0		
5		
10		
15		
20		
25		
30		

Lactate before ET: mmol/L

Lactate after ET: mmol/L

Klinischer Untersuchungsbogen

Datum

Tag

1

Case No.

Allgemeine klinische Untersuchung

Körperhaltung Physiologisch
Sonstiges:

Verhalten aufgeregt ruhig u. aufmerksam
 zu ruhig apathisch
Sonstiges:

Ernährungszustand gut zu gut adipös
 mäßig schlecht kachektisch

Entwicklungszustand dem Alter entsprechend
Sonstiges:

Pflegezustand gut mäßig schlecht

Pulsfrequenz /min.

Atemfrequenz /min.

Körperinnentemperatur °C

Körperoberflächen-
temperatur zu den Akren hin abnehmend
Sonstiges:

Hautturgor erhalten vermindert

Schleimhäute blassrosa/rosa gerötet blass
 zyanotisch ikterisch

Anhang

KFZ	<input type="checkbox"/> < 2 sek.	<input type="checkbox"/> 2-3 sek.	<input type="checkbox"/> > 3 sek.
Episkleralgefäße	<input type="checkbox"/> fein gezeichnet	<input type="checkbox"/> verwaschen	<input type="checkbox"/> injiziert
			<input type="checkbox"/> nicht sichtbar
Lnn. mandibulares	links:		
	<input type="checkbox"/> o.b.B.		
	<input type="checkbox"/> vergrößert (Größe: x x cm)		
	<input type="checkbox"/> schmerzhaft	<input type="checkbox"/> nicht verschieblich	
	<input type="checkbox"/> derb	<input type="checkbox"/> vermehrt warm	
	rechts:		
	<input type="checkbox"/> o.b.B.		
	<input type="checkbox"/> vergrößert (Größe: x x cm)		
	<input type="checkbox"/> schmerzhaft	<input type="checkbox"/> nicht verschieblich	
	<input type="checkbox"/> derb	<input type="checkbox"/> vermehrt warm	

Spezielle Untersuchung des Respirationstrakt

Atmemtyp	<input type="checkbox"/> costoabdominal	<input type="checkbox"/> verstärkt abdominal
	<input type="checkbox"/> verstärkt costal	<input type="checkbox"/> Afteratmung
	<input type="checkbox"/> Dampfrinne	
Nüstern	<input type="checkbox"/> o.b.B.	<input type="checkbox"/> gebläht
	Luftstrom:	
	<input type="checkbox"/> gleichmäßig	
	<input type="checkbox"/> links vermindert	<input type="checkbox"/> rechts vermindert
	<input type="checkbox"/> Sekretrinne	
Nasenausfluss	<input type="checkbox"/> o.b.B.	<input type="checkbox"/> bds.
	links:	
	<input type="checkbox"/> ggr.	<input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr.
	<input type="checkbox"/> serös	<input type="checkbox"/> sero - mukös <input type="checkbox"/> mukös purulent
	<input type="checkbox"/> hämorrhagisch	<input type="checkbox"/> mit Futterpartikeln
	rechts:	
	<input type="checkbox"/> ggr.	<input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr.
	<input type="checkbox"/> serös	<input type="checkbox"/> sero - mukös <input type="checkbox"/> mukös purulent
	<input type="checkbox"/> hämorrhagisch	<input type="checkbox"/> mit Futterpartikeln
Husten	<input type="checkbox"/> spontan	<input type="checkbox"/> mehrfach
	<input type="checkbox"/> auslösbar	<input type="checkbox"/> mehrfach
	<input type="checkbox"/> feucht	<input type="checkbox"/> trocken
Dyspnoe	<input type="checkbox"/> in Ruhe	
	<input type="checkbox"/> expiratorisch	<input type="checkbox"/> inspiratorisch <input type="checkbox"/> gemischt
Stridor	<input type="checkbox"/> inspiratorisch	<input type="checkbox"/> expiratorisch
Auskultation Lunge	rechts:	
	links:	
Auskultation Trachea		

Auskultation Larynx

Perkussion des
Lungenfeldes

- o.b.B.
- > eine handbreit erweitert
- > zwei handbreit erweitert
- gedämpft

CO2-Rückatmung:

Endoskopie:

Röntgen:

Diagnose:

Therapie:

14. Publikationsverzeichnis

Barton, A.-K.; Heinemann, H.; Merle, R.; Gehlen, H. (2016): Kann die klinische Wirksamkeit der Aerosol-Therapie mit Budesonid durch Inhalation unter Belastung verbessert werden? *Pferdeheilkunde* 32(2):119-123

Barton, A.-K.; Heinemann, H.; Schenk, I.; Machnik, M.; Gehlen, H. (2017): Influence of respiratory tract disease and mode of inhalation on detectability of budesonide in equine urine and plasma. *American Journal of Veterinary Research* 78 (2): 244-250

15. Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Heidrun Gehlen für die Überlassung des spannenden Themas und der stetigen Unterstützung der Studie.

Ein ganz besonderer Dank geht dabei auch an Frau Dr. Ann-Kristin Barton-Vossschulte für ihre stets offene Tür, ihre fachliche Unterstützung und ihre gute Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. M. Machnik und Frau Dr. I. Schenk aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln für ihre großzügige Unterstützung und die Untersuchung und Auswertung der Proben.

Ebenfalls möchte ich mich auch bei Simon Kühne für seine fachliche Beratung und Unterstützung bedanken.

Die praktische Umsetzung der Studie wäre ohne meine Mitdoktoranden nicht möglich gewesen: Ich danke insbesondere Caroline Wirth, die wirklich mein Fels in der Brandung und eine unglaubliche Hilfe und Motivationskraft war.

Meinen Mitdoktoranden und auch dem gesamten Team der Klinik für Pferde der FU, die immer so unglaublich hilfsbereit und unterstützend waren, gilt ein ganz besonderes Dankeschön.

Einen herzlichen Dank auch an meine gute Anna für den „letzten Schliff“, deine Geduld und deinen Blick für die Feinheiten, der mir besonders am Ende einiges erleichtert hat.

Für gute Ablenkung und aufbauende Worte und für das Gefühl einfach nicht allein mit dem Problem dazustehen, möchte ich Sibylle, Kadda, Janna, Nina und Karen auch sehr danken.

Meine wichtigste Unterstützung waren meine Eltern: Ohne Euch wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen und ich danke Euch von Herzen. Es ist ein unglaubliches Glück, Euch zu haben und von Euch immer wieder so viel Rückhalt zu bekommen.

16. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 24.05.2017

Henrike Heinemann



9 783863 878528

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-852-8