



MODELE EXPERIMENTAL DE FOURBURE : ACTION OXYDATIVE DES ENDOTOXINES SUR LA RELAXATION VASCULAIRE

Par :

- M. Y. MALLEM, O. LE COZ, M. GOGNY, J-C. DESFONTIS
Unité de Pharmacologie Fonctionnelle UPSP DGER,
Ecole Nationale Vétérinaire, Atlanpôle, BP 40706, 44307 Nantes

Résumé

Cette étude a pour objectif de rechercher l'action oxydative de l'endotoxine d'*Escherichia coli* dans l'altération de la relaxation β -adrénergique (β -AR) dans les veines digitées de cheval (VDC) dans un modèle de fourbure expérimentale. L'isoprénaline, agoniste β -AR non sélectif ou le SR 58611A, agoniste β 3-AR préférentiel produisent une relaxation dépendante de la concentration qui est altérée en présence de xanthine/xanthine oxydase ou de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)/ Fe^{++} /EDTA, deux systèmes générateurs d'anions superoxydes ou de radicaux hydroxyles respectivement. Cette altération disparaît totalement après pré-traitement des VDC par la superoxyde dismutase (SOD) ou la déféroxamine, deux neutralisants des anions superoxydes et des radicaux hydroxyles respectivement. L'incubation des VDC en présence d'endotoxine (10 μ g/ml pendant 4h) est réalisée en absence ou en présence de SOD ou de déféroxamine. Les relaxations induites par l'isoprénaline et le SR 58611A sont significativement altérées par l'action endotoxinique mais totalement restaurées après pré-traitement des VDC par la SOD ou la déféroxamine. En conclusion, l'endotoxine d'*E. coli* induit la formation de radicaux libres oxygénés (RLO) qui pourraient intervenir dans la dysfonction de la relaxation β -AR dans les VDC. L'altération de la vasodilatation induite par les endotoxines, mécanisme connu dans l'initiation de la fourbure aiguë, pourrait être liée à une action des RLO. Ce mécanisme pourrait intervenir en plus des RLO générés par le processus de reperfusion. Ceci supporte davantage le rôle potentiel des antioxydants dans le traitement de la fourbure équine.

Mots clés : Récepteurs β -adrénergiques, endotoxine, Espèces réactives de l'oxygène, Fourbure équine.

Summary

We evaluated the oxydative role of endotoxin of *Escherichia coli* on the alteration of beta-adrenoceptors (β -AR)-induced veinodilatation in an experimental model of laminitis. Isoprenaline, a non selective β -AR agonist, and SR 58611A, a β 3-AR agonist produced concentration-dependent relaxations which were impaired after incubation of EDV with xanthine/xanthine oxydase (superoxide anions generating system) or hydrogen peroxyde/ Fe^{++} /EDTA ($(H_2O_2)/Fe^{++}$) (hydroxyl radicals generating system). This alteration was abolished in the presence of superoxide dismutase (SOD) or deferoxamine, two superoxide anions and hydroxyl radicals scavengers respectively. Moreover, EDV were incubated with endotoxin (10 μ g/ml for 4h) in the presence or the absence of SOD or deferoxamine. Isoprenaline and SR 58611A-induced relaxations were significantly altered in the presence of endotoxin but were restored in the presence of SOD or deferoxamine. In conclusion, this study shows that endotoxin-dependent reactive oxygen species (ROS) production was involved in the impairment of β -AR-mediated EDV vasodilation. Impairment of vasodilating phenomenon by endotoxin, that occurs in the acute phase of laminitis, could be attributable to ROS generation. It should be stated, however, that this oxydative action may be considered as another operative mechanism that occurs additionally to reperfusion injury. This further supports the potentiel role of antioxydant therapy in equine laminitis.

Keywords : Beta-adrenoceptor, Endotoxin, Reactive Oxygen species, Equine laminitis

INTRODUCTION

La fourbure équine est une pododermatite aseptique associée à des maladies métaboliques et/ou systémiques. Les lésions rencontrées sont la manifestation locale d'un processus pathologique complexe. Ces lésions entraînent une séparation par désengrènement des feuillets dermiques et épidermiques, aboutissant à un basculement de la troisième phalange sous l'effet des contraintes mécaniques du pied.

On distingue plusieurs origines classiques de la fourbure, une origine alimentaire (ingestion massive et brutale de grains ou consommation rapide d'une grande quantité d'eau froide), une origine infectieuse (métrite post-partum, pleuropneumonie, colique sévère) ou une origine traumatique (commotion des pieds : fourbure de route). Une phase d'endotoxémie caractériserait les deux premières origines.

Quelle que soit la cause initiale, la mise en place de la fourbure aiguë est associée à un défaut d'irrigation sanguine au niveau du podophylle qui entoure la troisième phalange. La vasoconstriction, l'ouverture des shunts artério-veineux et la production de thrombi dans les vaisseaux sanguins ont été proposés comme des causes possibles intervenant dans la genèse de l'ischémie (Moore et Allen, 1996) et l'induction d'un phénomène de dégénérescence des feuillets du podophylle.

Plusieurs études ont suggéré que la présence d'endotoxines dans le sang prédispose les chevaux à développer les signes cliniques de la fourbure. Parmi les facteurs impliqués dans l'action endotoxinique, les produits dérivés de l'acide arachidonique jouent un rôle pathogénique majeur chez le cheval (Bailey et Elliott 1999). La constriction des vaisseaux, particulièrement les veines digitées par les endotoxines est considérée comme un mécanisme possible intervenant en partie dans la diminution de l'irrigation sanguine du pied. Cependant, l'activation de certaines enzymes telles que les métalloprotéinases par les endotoxines pourrait, par destruction directe du podophylle, provoquer la maladie indépendamment de toute altération du débit sanguin digité.

Les récepteurs beta2-adrénergiques (β_2 -AR) (Elliott et coll. 1995) sont considérés parmi les récepteurs principaux impliqués dans la vasodilatation du territoire digité. Dans les veines digitées de cheval (VDC), nous avons mis en évidence l'expression fonctionnelle d'autres récepteurs, appelés les récepteurs β_3 -AR. L'activation de ces récepteurs induit une relaxation dépendante en partie de l'endothélium et du monoxyde d'azote (NO) (Mallem et coll. 2003). D'autre part, l'incubation des VDC en présence d'endotoxine d'*Escherichia Coli* (*E. coli*) réduit significativement la relaxation induite par les récepteurs β_3 -AR (Mallem et coll. 2003).

Bien que des épisodes d'ischémie reperfusion soient impliqués dans la pathogénie de la fourbure équine (Hood, 1999), le rôle des radicaux libres oxygénés (RLO) dans l'altération des phénomènes vasodilatateurs rencontrés dans cette affection n'a pas été encore largement étudié. De plus, le rôle direct des RLO dans l'action endotoxinique n'a pas été évalué dans la vasodilatation et plus particulièrement β -AR. L'objectif de ce travail est d'étudier *in-vitro*, dans les VDC, le rôle des RLO dans l'action de l'endotoxine d'*E. coli* sur la relaxation β -AR.

METHODES (METHODS)

Les VDC sont prélevées au plus près de la bande coronaire sur les membres antérieurs de chevaux sains immédiatement après l'abattage. Elles sont coupées en anneaux de 3 à 4 mm de longueur et suspendues dans des cuves à organes isolés contenant une solution de Krebs (mM) : 118,3 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃, 0,016 EDTA, 11,1 glucose et 2,5 CaCl₂, dont la température est maintenue à 37 °C et le pH est ajusté à 7,4 avec un mélange 95% O₂ / 5% CO₂. Les anneaux de VDC sont étirés à une tension de 2 g et sont équilibrés pendant 1 heure. La présence d'un endothélium fonctionnel est confirmée par l'application d'acétylcholine (1 μ M). Seuls les anneaux qui relaxent à plus de 70 % de la pré-contraction à la phényléphrine sont conservés dans les expériences. Dans le cas de désendothélialisation, la relaxation à l'acétylcholine est absente.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL (PROCEDURE)

Après équilibration, les anneaux de VDC sont pré-contractés à la phényléphrine (2 μ M) et les courbes concentration-relaxation cumulatives (CCRC) à l'acétylcholine, agoniste muscarinique, à l'isoprénaline, agoniste β -AR non sélectif ou au SR 58611A, agoniste β_3 -AR préférentiel sont construites dans différentes conditions expérimentales.

Le rôle des RLO dans la relaxation β -AR est évalué en présence de xanthine (300 μ M)/xanthine oxydase (0,01 U/ml) (X/XO) ou de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)/ Fe^{++} (100 μ M)/EDTA (300 μ M) pendant 30 min, deux systèmes générateurs d'anions superoxydes ou de radicaux hydroxyles respectivement. Les effets neutralisants des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles exercés par la superoxyde dismutase (SOD) (200 U/mL) ou la déféroxamine (100 μ M) respectivement sont vérifiés par l'atténuation de l'inhibition de la relaxation à l'acétylcholine induite par le système X/XO ou le système $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$.

De plus, dans d'autres expériences, les anneaux de VDC sont incubés pendant 4h à 37°C dans un milieu de culture aéré avec du carbogène (95% O_2 / 5% CO_2) et enrichi en sérum de cheval contenant ou non l'endotoxine d'*E. coli* (055 :B5)(10 μ g/ml).

ANALYSE STATISTIQUE (STATISTICAL ANALYSIS)

Les réponses relaxantes sont exprimées en % par rapport à la précontraction induite par la phényléphrine. Les relaxations sont exprimées par leur moyenne \pm s.e.m et le n représente le nombre d'animaux examinés. La comparaison des différentes courbes de relaxation est réalisée par analyse de variance (ANOVA) à deux voies avec mesures répétées. Le seuil de significativité est fixé à 5%.

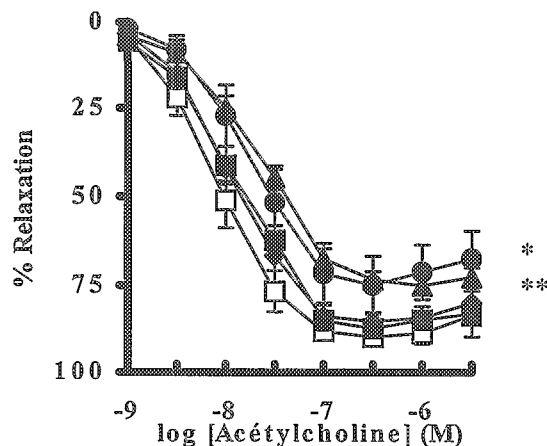
RESULTATS

1. Effets relaxants induits par l'acétylcholine (Relaxant effects to acetylcholine)

Sur des VDC contrôles, l'acétylcholine (1 nM à 3 μ M) produit une relaxation dépendante de la concentration (Figure 1). L'incubation pendant 30 min en présence de X/XO ou de $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$ (Figure 1) altère de façon significative cette relaxation ($P < 0.05$ vs contrôle déterminé par ANOVA). Le pré-traitement des VDC, préalablement incubées en présence de X/XO ou de $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$, par la SOD ou la déféroxamine respectivement, rétablit presque entièrement la réponse à l'acétylcholine.

Figure 1 : Courbes concentration-relaxations cumulatives à l'acétylcholine sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, n=9), après incubation en présence de Xanthine/Xanthine oxydase (cercles pleins, n=6), en présence de $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ (triangles pleins, n=6), en présence de Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (losanges pleins, n=5) ou en présence de $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ + Déféroxamine (carrés pleins, n=5). *, ** $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

Figure 1 : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to acetylcholine alone (opened squares, n=9), after incubation in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase (closed circles, n=6), in the presence of $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ (closed triangles, n=6), in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (closed diamonds, n=5) or in the presence of $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ + deferoxamine (closed squares, n=5). *, ** $P < 0.05$ significant differences from controle.



2. Effets relaxants induits par les agonistes β -AR (Relaxant effects to β -AR agonists)

L'isoprénaline (1nM à 3 μ M) produit une relaxation des VDC de façon dépendante de la concentration (Figure 2). Le traitement des VDC pendant 30 min par le système $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$ (Figure 2a) ou par le système X/XO (Figure 2b) provoque une altération profonde de cette relaxation ($P < 0.05$ vs contrôle déterminé par ANOVA).

Le pré-traitement des VDC, préalablement incubées en présence de $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$ ou de X/XO, par la déféroxamine (Figure 2a) ou la SOD (figure 2b) respectivement, rétablit totalement la réponse à l'isoprénaline.

De façon similaire, les mêmes résultats sont obtenus par le SR 58611A (Figure 3). Cependant, l'altération de la relaxation induite par les systèmes $H_2O_2/Fe^{++}/EDTA$ ou X/XO est moins marquée que celle observée après relaxation à l'isoprénaline.

Figure 2a : Courbes concentration-relaxation cumulatives à l'isoprénaline sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, $n=5$), après incubation en présence de $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ (cercles pleins, $n=5$) ou en présence de $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ + déféroxamine (triangles pleins, $n=5$). * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

Figure 2a : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to isoprenaline alone (opened squares, $n=5$), after incubation in the presence of $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ (closed circles, $n=5$) or in the presence of $H_2O_2/EDTA/Fe^{2+}$ + deferoxamine (closed triangles, $n=5$). * $P < 0.05$ significant difference from controle.

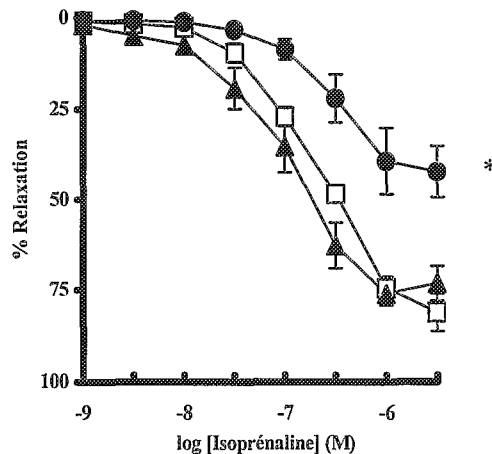


Figure 2b: Courbes concentration-relaxation cumulatives à l'isoprénaline sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, $n=5$), après incubation en présence de Xanthine/Xanthine oxydase (cercles pleins, $n=5$) ou en présence de Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (triangles pleins, $n=5$). * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

Figure 2b : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to isoprenaline alone (opened squares, $n=5$), after incubation in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase (closed circles, $n=5$) or in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (closed triangles, $n=5$). * $P < 0.05$ significant differences from controle.

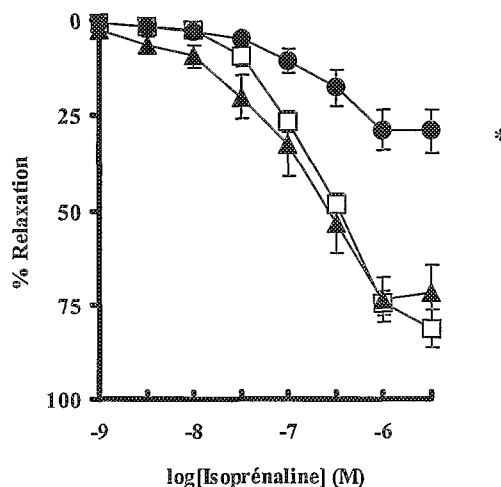


Figure 3a : Courbes concentration-relaxation cumulatives au SR 58611A sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, n=11), après incubation en présence de H₂O₂/EDTA/Fer²⁺ (cercles pleins, n=5) ou en présence de H₂O₂/EDTA/Fer²⁺ + déféroxamine (triangles pleins, n=5). * P < 0,05 différence significative par rapport au contrôle.

Figure 3a : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to SR 58611A alone (opened squares, n=11), after incubation in the presence of H₂O₂/EDTA/Fer²⁺ (closed circles, n=5) or in the presence of H₂O₂/EDTA/Fer²⁺ + deferoxamine (closed triangles, n=5). * P < 0.05 significant difference from controle.

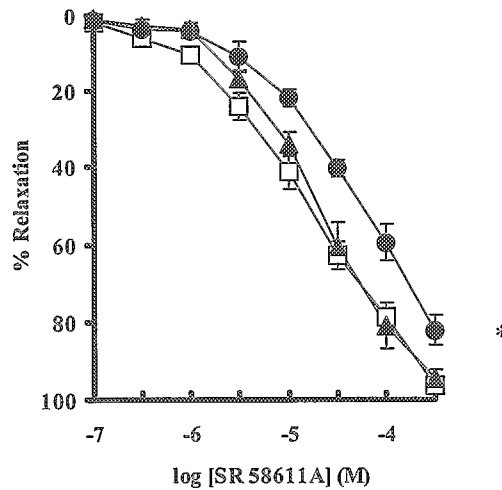
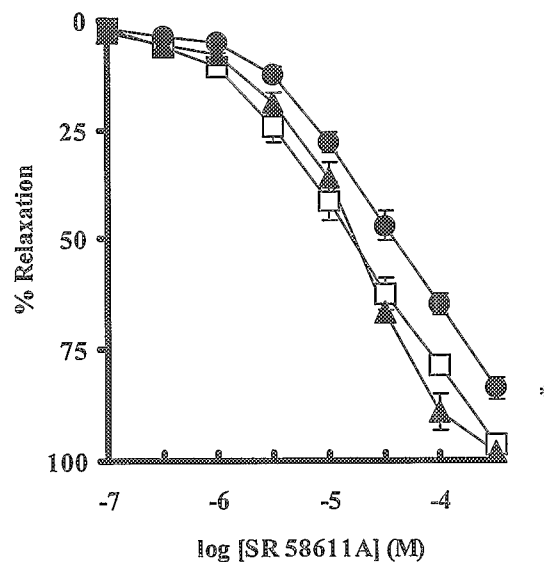


Figure 3b: Courbes concentration-relaxation cumulatives au SR 58611A sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, n=11), après incubation en présence de Xanthine/Xanthine oxydase (cercles pleins, n=7) ou en présence de Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (triangles pleins, n=5). * P < 0,05 différence significative par rapport au contrôle.

Figure 3b: Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to SR 58611A alone (opened squares, n=11), after incubation in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase (closed circles, n=7) or in the presence of Xanthine/Xanthine oxydase + SOD (closed triangles, n=5). * P < 0.05 significant difference from controle.



3. Effets de l'endotoxine d' *E. coli* sur la relaxation β -AR (Effect of endotoxin on β -AR-induced relaxation)

L'incubation des anneaux de VDC avec l'endotoxine d'*E. coli* diminue fortement et significativement la relaxation à l'isoprénaline (Figure 4) ($P < 0.05$ vs contrôle déterminé par ANOVA). Cette altération est totalement rétablie en présence de SOD ou de déféroxamine. Similairement, la vasodilatation induite par le SR 58611A est significativement diminuée en présence d'endotoxine (Figure 5) ($P < 0.05$ vs contrôle déterminé par ANOVA). Le pré-traitement des VDC par la SOD ou par la déféroxamine rétablit cette relaxation.

Figure 4 : Courbes concentration-relaxation cumulatives à l'isoprénaline sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, $n=5$), après incubation en présence d'endotoxine (cercles pleins, $n=5$), en présence d'endotoxine + déféroxamine (triangles pleins, $n=5$) ou en présence d'endotoxine + SOD (losanges pleins, $n=5$). * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

Figure 4 : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to isoprenaline alone (opened squares, $n=5$), after incubation in the presence of LPS (closed circles, $n=4$), in the presence of LPS + deferoxamine (closed triangles, $n=5$) or in the presence of LPS + SOD (closed diamonds, $n=5$). * $P < 0,05$ significant difference from controle.

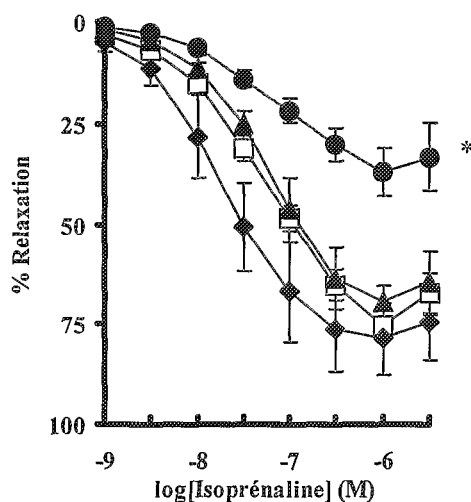
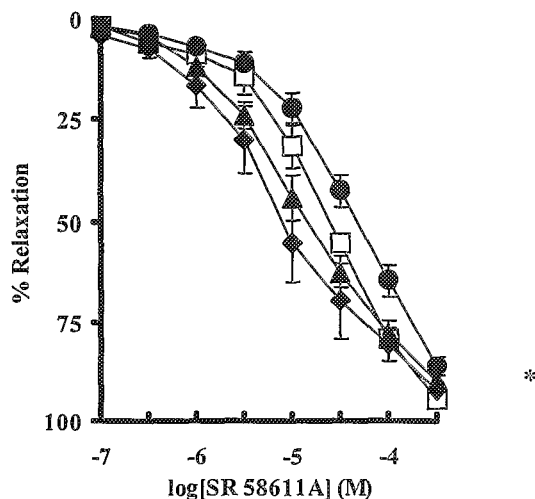


Figure 5 : Courbes concentration-relaxation cumulatives au SR 58611A sur des anneaux contrôles de VDC (carrés vides, $n=9$), après incubation en présence d'endotoxine (cercles pleins, $n=8$), en présence d'endotoxine + déféroxamine (triangles pleins, $n=5$) ou en présence d'endotoxine + SOD (losanges pleins, $n=5$). * $P < 0,05$ différence significative par rapport au contrôle.

Figure 5 : Cumulative concentration-relaxation curves in EDV to SR 58611A alone (opened squares, $n=9$), after incubation in the presence of LPS (closed circles, $n=8$), in the presence of LPS + deferoxamine (closed triangles, $n=5$) or in the presence of LPS + SOD (closed diamonds, $n=5$). * $P < 0.05$ significant difference from controle.



DISCUSSION

Les résultats de notre travail montrent que la vasodilatation induite par la stimulation des récepteurs β -AR est altérée en présence de l'endotoxine d'*E coli* et que cette altération est médiée par la production des anions superoxydes et/ou des radicaux hydroxyles.

Il est bien documenté que les endotoxines ne présentent aucun effet toxique direct et que leurs effets soient la conséquence de la production de facteurs secondaires. Leur action oxydative a été rapportée dans les vaisseaux de rat (Brandes et coll. 1999) et de porc (Javesghani et coll. 2003) et semble impliquer l'augmentation de l'expression de la xanthine oxydase et de la NAD(P)H oxydase vasculaires, deux principales enzymes intervenant dans la production d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène. Dans les VDC, ou dans le système vasculaire chez le cheval, la production des RLO endotoxine-dépendante n'a pas encore été documentée à ce jour. Dans la présente étude, l'incubation des VDC en présence d'endotoxine d'*E coli* semble générer des anions superoxydes et des radicaux hydroxyles qui sont neutralisés par la SOD et la déféroxamine respectivement. Les systèmes X/XO et H₂O₂/EDTA/Fe⁺⁺ provoquent une altération de la relaxation à l'acétylcholine connue être principalement médiée par la libération du NO endothélial dans les VDC. D'autre part, la diminution de la relaxation β -AR induite par l'endotoxine d'*E coli* est restaurée par la SOD et la déféroxamine. Ainsi, il peut être suggéré à partir de ces résultats que les RLO, principalement les anions superoxydes et les radicaux hydroxyles, générés pendant l'incubation par l'action endotoxinique, jouent un rôle dans la dysfonction β -AR par diminution de la production et/ou de la libération du NO endothélial. Cette suggestion est compatible avec nos résultats préalablement publiés (Malle et coll. 2003) et qui montrent notamment que la vasodilatation β -AR est en partie médiée par la libération du NO endothélial. D'autre part, les résultats de cette étude ne permettent pas d'exclure une altération de la relaxation endothélium-indépendante par un mécanisme indépendant de l'inactivation du NO. En effet, la vasodilatation induite par l'isoprénaline, principalement indépendante de l'endothélium, est plus altérée que celle induite par l'activation β -AR. Ceci suggère probablement une altération de la voie de l'AMPc. D'autres expériences sur des VDC désendothélialisées sont nécessaires pour élucider le rôle des RLO générés par l'endotoxine dans la modification de la composante endothélium-indépendante de la relaxation β -AR.

Le processus d'ischémie reperfusion dans la fourbure équine n'a pas été encore largement étudié chez le cheval, mais quelques études ont montré que la production des RLO pourrait participer à la destruction du tissu épidermique lors la fourbure par induction de l'activité des métalloprotéinases (Faliros et coll. 2003). Il pourrait, cependant, être suggéré que leur production exagérée directement par les endotoxines et indépendamment du processus de reperfusion, soit potentiellement impliquée dans la réduction des phénomènes vasodilatateurs lors de la fourbure aiguë.

Bien que l'utilisation du DMSO, neutralisant des RLO, dans le traitement de la fourbure n'a pas fait l'objet d'études contrôlées (Brumbaugh et coll. 1999), les résultats de notre travail et les arguments physiopathologiques et/ou pharmacologiques actuellement existants étayent l'usage des anti-oxydants dans la thérapeutique de la fourbure aiguë équine en association avec les thérapeutiques couramment mises en place.

Afin de valider l'implication des RLO dans l'altération de la relaxation β -AR dans les VDC, la mesure de l'activité de la NAD(P)H ainsi que la détermination de la formation des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles seront évaluées dans des expériences *in vitro* ultérieurement. De plus, des études *in vivo* doivent évaluer l'implication des espèces réactives de l'oxygène dans la modification du débit sanguin digité (suivie par Doppler) induite par l'endotoxine après administration des neutralisants des RLO.

Compte tenu du rôle controversé des endotoxines dans la reproduction des modifications physiopathologiques et cliniques de la fourbure aiguë, les études pharmacologiques décrivant les réponses des vaisseaux digités incubés en présence d'endotoxines ou prélevés sur des chevaux préalablement traités par des endotoxines doivent être considérées avec prudence.

CONCLUSION

Cette étude démontre pour la première fois une action oxydative de l'endotoxine d'*E. coli* dans l'altération de la vasodilatation β -AR (β 1, β 2 et β 3-AR) et qui est médiée par la production des RLO dans les VDC. L'altération de la vasodilatation induite par les endotoxines, mécanisme connu dans l'initiation de la fourbure aiguë, pourrait être le résultat d'une action oxydative qui reste à évaluer dans des études *in vivo*. Ce mécanisme pourrait intervenir en plus des RLO générés par le processus de reperfusion et supporte davantage le rôle potentiel des antioxydants dans le traitement de la fourbure équine.

Bien que la vasodilatation dans les VDC implique un rôle majeur des récepteurs β -AR, les agonistes β -AR ne sont pas encore utilisés dans le traitement de la fourbure équine. L'enseignement pratique à tirer de ce travail est que le traitement de la fourbure par des agents vasodilatateurs pourrait s'avérer insuffisant s'il n'est pas associé à des anti-oxydants.

RÉFÉRENCES (REFERENCES)

Bailey, S.R. and Elliott, J. The role of prostanoids and nitric oxide in endotoxin-induced hyporesponsiveness of equine digital blood vessels. *Equine Vet. J.*, 1999, **31**, 212-218.

Baxter, G.M., Tackett, R.L., Moore, J.N. Reactivity of equine palmar digital arteries and veins to vasodilating agents. *Vet. Surg.* 1989, **18**(3):221-226.

Brandes, R.P., Koddenberg, G., Gwinner, W., Kim, D., Kruse, H.J., Busse, R., Mugge, A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension.* 1999, **33**(5):1243-9.

Brumbaugh, G.W., Sumano Lopez, H., Hoyas Sepulveda, M.L. The pharmacologic basis for the treatment of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1999 **15** (2):345-362.

Elliott, J. and Soydan, J. Characterization of beta-adrenoceptors in equine digital veins: implications of the modes of vasodilatory action of isoxsuprine. *Equine Vet. J.*, 1995, **19**, 101-107.

Falirros, R.R., Stokes, A.M., Eades, S.C., Kim, D.Y., Paulsen, D.B. and Moore, R.M. Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. *Am. J. Vet. Res.* 2004, **65**, 578-585.

Hood, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1999, **15**(2):321-43.

Javesghani, D., Hussain, S.N., Scheidel, J., Quinn, M.T., Magder, S.A. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock.* 2003, **19**(5):486-93.

Malle M, Gogny M, Gautier F, Bucas V, Desfontis J-C. Evaluation of Beta 3-adrenoceptor mediated relaxation in intact and endotoxin-treated equine digital veins. 2003, *Am. J. Vet. Res.* **64**, 708-714.

Moore, J.N. and Allen, D. The Pathophysiology of acute laminitis. *Vet. Med.* 1996, **91**, 936-939.