

**Aus der Klinik für Pferde  
Allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Immunmodulatorische Inhalationstherapie bei Pferden mit RAO:  
Eine Dosis-Wirkungs-Studie sowie eine Vergleichsuntersuchung  
zu einer inhalativen Beclometason-Therapie**

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

**vorgelegt von  
Carolin Annabelle Christa Zimmermann  
Tierärztin aus Lahr im Schwarzwald**

**Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4013**



Aus der Klinik für Pferde  
Allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Immunmodulatorische Inhalationstherapie bei Pferden mit RAO:  
Eine Dosis-Wirkungs-Studie sowie eine Vergleichsuntersuchung  
zu einer inhalativen Beclometason-Therapie**

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

vorgelegt von  
Carolin Annabelle Christa Zimmermann  
Tierärztin  
aus Lahr im Schwarzwald

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4013

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. Heidrun Fink  
Dritter Gutachter: PD Dr. Friederike Stumpff

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

horses; lungs; airway obstruction (MeSH); beclomethasone (MeSH); inhalation;  
bronchoscopy; percussion; auscultation; blood gases; cytokines; interleukins

Tag der Promotion: 05.04.2018

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: 978-3-86387-889-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

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 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Diese Dissertation wurde finanziell unterstützt durch die DFG*

*(Deutsche Forschungsgemeinschaft GE'2044/4-1).*



Für meine Familie



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Chronische Erkrankungen der Atemwege bei Pferden</b> .....	<b>3</b>
1.1.	Recurrent Airway Obstruction (RAO) .....	3
1.1.1.	Nomenklatur .....	3
1.1.2.	Ätiologie der RAO .....	4
1.1.3.	Pathophysiologie der RAO .....	7
1.1.4.	Klinische Symptome bei RAO .....	8
1.1.5.	Therapie der RAO .....	10
1.2.	Inflammatory airway disease (IAD) .....	14
1.3.	Summer pasture associated recurrent airway obstruction (SPRAO) .....	17
1.4.	Equines Asthma Syndrom .....	17
<b>2.</b>	<b>Immunologie</b> .....	<b>20</b>
2.1.	Immunologie der RAO .....	20
2.2.	Regulatorische T-Zellen .....	25
2.2.1.	Regulatorische T-Zellen bei Equiden .....	26
<b>3.</b>	<b>Wirkungsmechanismen von Kortikosteroiden</b> .....	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>CpG-ODN (Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxy-nukleotide)</b> .....	<b>29</b>
4.1.	Wirkmechanismen der CpG-Behandlung .....	32
4.2.	Therapeutische Anwendungen von CpG ODN beim Menschen .....	34
4.3.	Therapeutische Anwendungen von CpG ODN bei Pferden .....	35
<b>5.</b>	<b>GNP (Gelatinenpartikel)</b> .....	<b>38</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Ziele der Studie</b> .....	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Studiendesign</b> .....	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>Patienten</b> .....	<b>43</b>
<b>4.</b>	<b>Inhalationen</b> .....	<b>43</b>
4.1.	Verwendete CpG-ODN .....	43
4.2.	Herstellung der GNP .....	44

4.3.	Beladung der GNP mit CpG-ODN.....	44
4.4.	Kortisontherapie .....	45
4.5.	Inhalationssystem .....	45
4.6.	Durchführung der Inhalationen .....	46
<b>5.</b>	<b>Klinische Studie .....</b>	<b>48</b>
5.1.	Allgemeine Untersuchung.....	48
5.2.	Spezielle Untersuchung des Respirationstrakts.....	48
5.2.1.	Auskultation der Atemwege.....	49
5.2.2.	Rückatmungsprobe.....	49
5.2.3.	Lungenperkussion .....	49
5.2.4.	Arterielle Blutgasmessung .....	50
5.2.5.	Messung des Interpleuraldrucks.....	51
5.2.6.	Bronchoskopie.....	52
5.2.7.	Tracheobronchialesekret (TBS) .....	55
5.2.8.	Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	56
5.2.9.	Klinisches Scoring.....	59
5.2.10.	HOARSI (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index) .....	61
<b>6.</b>	<b>Kontrolle der Therapieverträglichkeit.....</b>	<b>63</b>
6.1.	Kontrolle des Allgemeinbefindens .....	63
6.2.	Differentialblutbild.....	64
6.3.	Fibrinogen .....	64
6.4.	Protokoll Abbruchkriterien .....	65
<b>7.</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen .....</b>	<b>65</b>
7.1.	Zytokinbestimmungen.....	65
7.2.	Magnetic cell sorting (MACS).....	67
7.3.	mRNA-Bestimmungen.....	73
<b>8.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>Vergleich zu vorhergehenden Studien .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Patienten und Untersuchungen.....</b>	<b>77</b>
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse der klinischen Studie .....</b>	<b>77</b>

---

2.1.	Ergebnisse Allgemeinuntersuchung.....	77
2.1.1.	Atemfrequenz (AF) in Ruhe.....	77
2.1.2.	Atemtyp.....	81
2.1.3.	Nasenausfluss.....	84
2.2.	Ergebnisse spezielle Lungenuntersuchung.....	87
2.2.1.	Auskultation der Atemwege.....	87
2.2.2.	Rückatmungsprobe.....	90
2.2.3.	Lungenperkussion.....	90
2.2.4.	Arterielle Blutgasmessung.....	90
2.2.4.1.	Sauerstoffpartialdruck (PaO <sub>2</sub> ).....	90
2.2.4.2.	Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz (AaDO <sub>2</sub> ).....	93
2.2.5.	Messung des Interpleuraldrucks.....	96
2.2.6.	Bronchoskopie.....	99
2.2.6.1.	Menge des Trachealschleims.....	99
2.2.6.2.	Viskosität des Trachealschleims.....	102
2.2.7.	Neutrophile Granulozyten in der BAL.....	105
2.2.8.	Klinisches Scoring.....	108
2.2.9.	HOARSI.....	111
<b>3.</b>	<b>Therapieverträglichkeit.....</b>	<b>113</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen.....</b>	<b>114</b>
4.1.	Ergebnisse der Zytokinmessungen.....	114
4.1.1.	Interleukin-4.....	114
4.1.2.	Interleukin-10.....	116
4.1.3.	Interleukin-17.....	119
4.1.4.	Interferon- $\gamma$ .....	121
4.1.5.	Interferon- $\alpha$ .....	124
4.2.	Ergebnisse der mRNA Analyse aus CD4-Lymphozyten.....	124
4.2.1.	FoxP3 (Treg).....	124
4.2.2.	TGF- $\beta$ (Wirkung auf Th1).....	126
4.2.3.	T-bet (Th1).....	128
4.2.4.	GATA-3 (Th2).....	130
4.2.5.	IL-8.....	132

<b>5.</b>	<b>Effekte der Behandlungen auf klinische und labordiagnostische Parameter – Vergleich zu vorhergehenden Studien .....</b>	<b>135</b>
5.1.	Vergleich der Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die klinischen Parameter.....	135
5.2.	Vergleich der Effekte der verschiedenen Behandlungen auf labordiagnostische Parameter.....	137
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>139</b>
<b>1.</b>	<b>Diskussion der Studienziele.....</b>	<b>139</b>
<b>2.</b>	<b>Diskussion des Studiendesign.....</b>	<b>140</b>
<b>3.</b>	<b>Diskussion der Patienten .....</b>	<b>142</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion der Inhalationen.....</b>	<b>144</b>
4.1.	Beclometason .....	144
4.2.	GNP .....	145
<b>5.</b>	<b>Diskussion der klinischen Studie .....</b>	<b>146</b>
5.1.	Diskussion der Therapieverträglichkeit .....	146
5.2.	Diskussion der Untersuchungsmethoden .....	147
5.2.1.	Allgemeinuntersuchung .....	147
5.2.2.	Messung des Interpleuraldrucks.....	148
5.2.3.	BAL und TBS.....	148
5.2.4.	Weitere Untersuchungsmöglichkeiten .....	149
5.3.	Diskussion der klinische Ergebnisse der Studie.....	150
5.3.1.	Atemfrequenz in Ruhe .....	150
5.3.2.	Auskultation .....	151
5.3.3.	Atemtyp, klinisches Scoring und Interpleuraldruckmessung.....	151
5.3.4.	Arterielle Blutgasmessungen.....	153
5.3.5.	Bronchoskopie und Nasenausfluss.....	154
5.3.6.	Atemwegsentzündung .....	157
5.3.7.	HOARSI.....	158
<b>6.</b>	<b>Diskussion der labordiagnostischen Untersuchungen .....</b>	<b>159</b>
6.1.	Diskussion der Zytokin-Ergebnisse .....	160
6.1.1.	Interleukin-4.....	160
6.1.2.	Interleukin-10 .....	160

---

6.1.3.	Interleukin-17 .....	161
6.1.4.	Interferon- $\gamma$ .....	162
6.1.5.	Interferon- $\alpha$ .....	163
6.1.6.	FoxP3 (Treg) .....	163
6.1.7.	TGF- $\beta$ (Wirkung auf Th1) .....	165
6.1.8.	T-bet (Th1).....	165
6.1.9.	GATA-3 (Th2) .....	166
6.1.10.	IL-8.....	167
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung der Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick .....</b>	<b>168</b>
7.1.	Zusammenfassung der Bedeutung der klinischen Ergebnisse .....	168
7.2.	Zusammenfassung der Bedeutung der immunologischen Ergebnisse .....	169
7.3.	Ausblick .....	169
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>173</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>177</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>181</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>207</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsprotokolle.....</b>	<b>207</b>
1.1.	Protokoll Allgemeine Untersuchung/Aufzeichnungsplan.....	207
1.2.	Protokoll Spezielle Lungenuntersuchung.....	209
1.3.	Protokolle zytologische Untersuchungen.....	210
1.4.	Abbruchkriterien/Protokoll zur Kontrolle der Verträglichkeit.....	212
1.5.	HOARSI.....	221
<b>2.</b>	<b>Materialliste .....</b>	<b>223</b>
2.1.	Verwendete Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	223
<b>3.</b>	<b>Ergebnis-Tabellen .....</b>	<b>225</b>
3.1.	Patientendaten .....	225
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>229</b>
<b>XI.</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>231</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AaDO <sub>2</sub>	Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz
Abb.	Abbildung
ACVIM	American College of Veterinary Medicine
AF	Atemfrequenz
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin, Cytidin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
COB	Chronisch obstruktive Bronchitis
Cohen's d	Effektstärke zur Bezeichnung der Größe eines statistischen Effekts.
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CpG-all	Zusammenfassung aller Pferde, die mit CpG behandelt wurden (CpGsd+CpGdd)
CpGdd	Cytosin-Phosphat-Guanosin double dose (Untersuchungsgruppe, die die doppelte CpG Dosis von 375µg CpGs je Inhalation verabreicht bekommen hat)
CpG-GNP	Gelatinenanopartikel-gebundene Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide
CpGsd	Cytosin-Phosphat-Guanosin single dose (Untersuchungsgruppe, die die einfache CpG Dosis von 187,5µg CpGs je Inhalation verabreicht bekommen hat)
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (double stranded)
EIPH	Exercise-induced pulmonary hemorrhage
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere (et alii)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FoxP3	Forkhead-box Protein P3
g	Beschleunigung

G	Guanin, Guanosin
GATA-3	Transacting T-cell specific transcription factor
ggr.	geringgradig
GNP	Gelatinenanopartikel
hgr.	hochgradig
HPW	Highly purified water
i.v.	intravenös
IAD	Inflammatory airway disease
IBH	Insect Bite Hypersensitivity
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL4RA	Interleukin 4 Rezeptor alpha
KFZ	Kapilläre Füllungszeit
kg	Kilogramm
Kortisongruppe	Untersuchungsgruppe, die das inhalative Kortikosteroid Beclometason in einer Dosierung von 1600µg pro Inhalation verabreicht bekommen hat
L	Liter
MACS	Magnetic cell sorting
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MHS	Multiple Hypersensitivität
mgr.	mittelgradig
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
NF-κB	Nuclear factor-κB
nm	Nanometer

ODN	Oligodeoxynukleotide
p	Signifikanzniveau
P	Phosphat
PaCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Phosphodiester
pg	Pikogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PS	Phosphothioester
RAO	Recurrent airway obstruction
Real Time PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RU	Reference Unit
SD	Standardabweichung
SP-RAO	Summer pasture-recurrent airway obstruction
ss	Single stranded
Tab.	Tabelle
T-bet	Th1-specific transcription factor
TBS	Tracheobronchialsekret
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
US1	Untersuchung 1 (vor der ersten Behandlung)
US2	Untersuchung 2 (am Tag nach der letzten Behandlung)
US3	Untersuchung 3 (8 Wochen nach der letzten Behandlung, Langzeitevaluierung)

# I. EINLEITUNG

Die Recurrent airway obstruction (RAO) ist eine chronische Erkrankung der unteren Atemwege bei Pferden mit multifaktorieller Genese. Die Krankheit wird unter anderem bedingt durch Hyperreagibilität des Immunsystems auf bestimmte Allergene. Bei diesen Allergenen spielen v.a. Schimmelpilzsporen, organische Stäube und Endotoxine, die insbesondere in Heu und Stroh vorkommen, eine wichtige Rolle. Da es sich um eine sehr weit verbreitete Erkrankung in der Pferdepopulation handelt, an der bis zu 50% der Pferde leiden und bei einem Großteil der Patienten sowie deren Besitzer ein sehr hoher Leidensdruck herrscht, besteht ein großes Interesse daran, neben den bisher gängigen Therapeutika, die vor allem die Symptome bekämpfen, eine Behandlungsoption zu finden, die die Erkrankung auf immunologischer Ebene beeinflussen kann.

Eine Therapieoption bieten unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN). Das sind kurze DNA-Stränge, die aufgrund der Frequenz der Motive und dem Methylierungsgrad, Ähnlichkeit mit der DNA von Bakterien bzw. Viren besitzen und somit vom Körper als fremd erkannt werden. Diese CpG-ODN können durch die Simulation einer Infektion, das Immunsystem weg von einer, bei Allergien dominierenden Th2-, hin zu einer spezifischen Th1-geprägten Immunantwort, lenken. Um die Aufnahme der CpGs in die Zellen verbessern zu können und vor einem vorzeitigen Abbau der DNA durch Nukleasen zu schützen, werden als Trägersystem Gelatinenanoartikel (GNP) verwendet.

Vorhergehende Studien (KLIER et al. 2011, 2015a, 2015b) konnten den immunmodulatorischen Effekt einer inhalativen Behandlung mit CpG-GNP bei Pferden, die an RAO leiden, feststellen. Hier wurde zuerst die optimale CpG-Klasse ausfindig gemacht, dann die Inhalationen unter Placebokontrolle getestet und in einer weiterführenden Studie der Effekt der CpGs in Kombination mit Allergenen untersucht. In der aktuellen Studie wurden RAO-Pferde in drei unterschiedliche Behandlungsgruppen unterteilt. Dabei erhielt eine Gruppe eine einfache CpG-Dosis, die bereits in den vorhergehenden Studien eingesetzt worden war, die zweite Gruppe die doppelte Dosis und die dritte Gruppe im Vergleich dazu eine

herkömmliche Inhalationstherapie mit Kortison.

Ziel der Studie war es, neben der Bestätigung der bisher gewonnenen Resultate aus den Studien von Klier und Kollegen (2011, 2015a, 2015b), den Dosis-Wirkungs-Effekt zu evaluieren sowie die CpG-Therapie direkt mit einer antiinflammatorischen Inhalationstherapie mit einem Kortikosteroid (Beclometason) zu vergleichen. Dafür wurden zahlreiche klinische sowie immunologische Parameter analysiert.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Chronische Erkrankungen der Atemwege bei Pferden**

#### **1.1. Recurrent Airway Obstruction (RAO)**

Die Recurrent airway obstruction (auf Deutsch: wiederkehrende Verengung der Atemwege) ist eine bei Pferden sehr häufig auftretende chronische Erkrankung des Respirationstraktes. In einigen Studien wird beschrieben, dass ca. 10-20% der Pferde in kühlen und gemäßigten Klimazonen an RAO leiden (HOTCHKISS et al., 2007). In anderen Quellen geht man davon aus, dass sogar bis zu 50% der Pferde in Stallhaltung RAO haben (RUSH and MAIR, 2004, BRACHER et al., 1991). Ähnlich dem Asthma bei Menschen ist die Erkrankung gekennzeichnet durch Entzündung, Hyperreagibilität und Obstruktion der Atemwege (LECLERE et al., 2011b). Es liegen keine Prädispositionen für ein Geschlecht oder bestimmte Rassen vor, jedoch scheint die Inzidenz der Erkrankung mit höherem Alter anzusteigen. Das heißt in einem Großteil der Fälle sind die Patienten sieben Jahre und älter (DIXON et al., 1995, DAVIS and RUSH, 2002, COUETIL et al., 2016). Andere Autoren beschreiben in Prävalenz Studien, sogar schon ab einem Alter von fünf Jahren das Auftreten von RAO (HOTCHKISS et al., 2007, HOTCHKISS et al., 2006).

Die Krankheit zeichnet sich durch Phasen der Exazerbation aus, in denen eine Verschlechterung der typischen Symptome wie regelmäßiges Husten, Nasenausfluss, erhöhte Ruheatemfrequenz, Leistungsintoleranz oder Dyspnoe eintreten (COUETIL et al., 2016). In Remissionsphasen hingegen kann es fast zum vollständigen Rückgang der klinischen Symptomatik sowie zur Regeneration des Gewebes kommen (DAVIS and RUSH, 2002).

##### **1.1.1. Nomenklatur**

Es gibt verschiedene Bezeichnungen für die unterschiedlichen Krankheitsbilder chronischer equiner Atemwegserkrankungen. Der über Jahre hinweg verwendete Begriff equine COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) wurde 1971 von Sasse eingeführt, jedoch gilt der Terminus mittlerweile als veraltet, da sich die Erkrankung, v.a. hinsichtlich der Ätiologie beim Pferd deutlich von der bei

Menschen vorkommenden COPD-Erkrankung unterscheidet (ROBINSON, 2001, SASSE, 1971).

Seit der Einführung des Begriffs wurde ein enormes Wissen über die equinen inflammatorischen obstruktiven Erkrankungen der Atemwege hinzugewonnen und es ist heute bekannt, dass die Krankheit mehr Ähnlichkeit mit humanem Asthma besitzt, als mit COPD beim Menschen. Insbesondere da bei der humanen COPD das Rauchen als eine der Hauptursachen für die Entwicklung der Erkrankung gilt (ROBINSON, 2001). Außerdem handelt es sich beim Menschen um eine progressiv fortschreitende Krankheit, wohingegen bei Equiden die Symptome reversibel sein können (COUETIL et al., 2016). Die Reversibilität der RAO weist somit eher Parallelen zu humanem Asthma auf. Sowohl bei RAO, als auch bei Asthma kommt es, u.a. aufgrund von reaktivem Bronchospasmus zur Verengung der Atemwege (DAVIS and RUSH, 2002).

Im angelsächsischen Sprachraum wird bei hochgradiger Ausprägung der Erkrankung auch von „Heaves“ oder „broken wind“ gesprochen (LECLERE et al., 2011b). Diese Bezeichnungen sind mit dem deutschen Begriff „Dämpfigkeit“ zu vergleichen. Im deutschsprachigen Raum spricht man bei der RAO-Erkrankung häufig von „Chronisch Obstruktiver Bronch(iol)itis“ (COB) was eine genauere Beschreibung der Erkrankung hinsichtlich Lokalisation und Pathogenese erlaubt (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

### **1.1.2. Ätiologie der RAO**

Bei der Recurrent airway obstruction handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Die Hauptursachen sind in der Umwelt bzw. Haltung der Pferde zu finden, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich bei RAO um eine Domestikationskrankheit handelt (LECLERE et al., 2011b).

Die Symptome werden infolge einer allergischen Reaktion auf Stallstaub ausgelöst (LECLERE et al., 2011b). In Heu- und Strohstaub befinden sich mehr als 50 unterschiedliche Typen von Allergenen (Abb. 1) (ROBINSON, 2001). Insbesondere Schimmelpilzsporen, wie beispielsweise *Aspergillus fumigatus* oder *Faenia rectivirgula* haben ein sehr hohes Allergenpotential. Aber auch Vorratsmilben, wie z.B. *Lapidoglyphus destructor* sowie bakterielle Endotoxine

spielen eine Rolle als Krankheitsverursacher. Hinzu kommen weitere Faktoren, wie anorganische Stäube (z.B. Silikate), kalte und trockene Luft sowie reizende Gase (z.B. Ammoniak). Zahlreiche Gräserpollen können außerdem mit in den Ursachenkomplex hineinspielen (LECLERE et al., 2011b, ROBINSON, 2001).



**Abbildung 1:** Heu mit grobsinnlichem Schimmelbefall.

Neben den Ursachen in der Umwelt der Pferde, spielt auch eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle (GERBER et al., 2014). Dabei wird unter anderem ein Polymorphismus auf dem IL4RA Locus des equinen Chromosoms 13 bei der Entstehung der Krankheit verantwortlich gemacht (SOLBERG et al., 2004). In bestimmten Warmblut-Zuchtlinien wurde bei einer erhöhten Anzahl an Pferden, die an RAO leiden, der genannte Polymorphismus detektiert (MARTI et al., 1991, GERBER et al., 2008).

Jedoch wird in neueren Studien eine polygenetische Ursache für die Vererbung der RAO als sehr wahrscheinlich angesehen (GERBER et al., 2009). Dabei wurden bei zwei Warmblut-Familien, die jeweils aus einem Vererber hervorgingen, ein 4,1- bzw. ein 5,5-fach höheres Risiko zur Entwicklung einer RAO-Erkrankung beschrieben (GERBER et al., 2009). Nachkommen des Hengstes 1 folgten dabei einem scheinbar autosomal rezessiven Erbgang während die Nachkommen des Hengstes 2 auf einen autosomal dominanten Vererbungsweg schließen lassen. (GERBER et al., 2009). Diese Erkenntnisse stützen die These, dass eine heterogene

Gruppe von Genen für die RAO ursächlich ist (GERBER et al., 2009).

Es wird beschrieben, dass bei Pferden, die an RAO leiden, außerdem eine genetische multiple Hypersensitivität (MHS) vorliegt (KEHRLI et al., 2015). Das bedeutet, dass bei diesen Patienten ein erhöhtes Risiko besteht, dass neben der Atemwegserkrankung weitere Krankheiten, wie Sommerexzem (IBH = Insect bite hypersensitivity) oder Urtikaria auftreten können (CUNNINGHAM and DUNKEL, 2008).

Bei Pferden, in deren Stammbaum eine hohe Prävalenz für RAO aufzufinden ist, kann gleichzeitig eine erhöhte natürliche Resistenz gegenüber Parasiten, wie beispielsweise Strongyloiden, vorkommen (NEUHAUS et al., 2010). Ähnliche Resultate wurden beim Menschen beobachtet, wo ebenfalls eine genetische Veranlagung zur Entwicklung von Asthma bzw. Atopie in Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber parasitärer Erkrankungen gebracht wird (BARNES et al., 2005).

In einer Studie aus dem Jahr 2015 wurde bei Pferden, die die an RAO litten, ein 13-fach erhöhtes Risiko ermittelt, zusätzlich ebenfalls IBH zu entwickeln. Außerdem zeigten die betroffenen Pferde signifikant öfter eine Abwesenheit von Nematodeneiern im Kot (KEHRLI et al., 2015).

Dies deutet darauf hin, dass ein genetischer Zusammenhang zwischen diesen Krankheiten besteht, dabei fällt der Verdacht auf einen single nucleotide polymorphism (SNP BIEC2-224511), dessen Zusammenhang mit RAO bereits beschrieben wurde, jedoch sind die Kausalitäten noch nicht vollständig geklärt (KEHRLI et al., 2015). Aber es konnte bestätigt werden, dass bei Equiden genauso wie bei anderen Spezies (u.a. beim Menschen), eine Assoziation zwischen den Hypersensitivitätsreaktionen unterschiedlicher Organsysteme besteht. Der Die Interleukin-4 Rezeptor  $\alpha$ -chain (IL4RA) wurde beim Mensch ebenfalls als eines der „Kandidatengene“ identifiziert, die bei atopischer Dermatitis, Rhinitis und Asthma eine Rolle spielen (KEHRLI et al., 2015, KURT et al., 2011). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass sowohl bei Menschen, als auch bei Pferden eine Veranlagung zu einer „allergischen Prädisposition“ auftreten kann (KEHRLI et al., 2015, KURT et al., 2011).

### 1.1.3. Pathophysiologie der RAO

Die wiederkehrende Verengung der Atemwege wird einerseits verursacht durch die reversiblen Pathomechanismen Bronchospasmus, Dys- und Hyperkrinie sowie andererseits den irreversiblen Umbauvorgängen in den Atemwegen („airway remodelling“) (LECLERE et al., 2011b). Infolge der Reizung der Schleimhäute durch Allergene tritt zeitverzögert (ca. 3-5 Stunde nach Exposition) eine Konstriktion der Bronchien auf (BRAZIL et al., 2005, LECLERE et al., 2011b). Ausgelöst wird die Verengung der Atemwege entweder direkt oder indirekt durch Entzündungsmediatoren wie Histamin.

Hypersekretion und Dyskrinie entstehen dadurch, dass das Epithel der kleinen Atemwege umgebaut wird. V.a. in den Bronchiolen werden die physiologisch vorkommenden sekretorischen Zellen der unteren Atemwege (Keulenzellen bzw. früher Clarazellen genannt) durch mukus-produzierende Becherzellen ersetzt (DAVIS and RUSH, 2002). Infolge von entzündlichen Ödemen, Migration von neutrophilen Granulozyten, sowie Epithelproliferation kommt es zu Umbauvorgängen in den Atemwegen, was als „Airway Remodeling“ bezeichnet wird (LECLERE et al., 2011a). Dabei spielt v.a. Proliferation der glatten Muskulatur der Atemwege eine wichtige Rolle (LECLERE et al., 2011a). In einer Studie von LECLERE et al. (2011) konnte man in Lungenbiopsieproben von RAO-Pferden, die doppelte Masse an glatter Muskulatur feststellen, wie bei lungengesunden Pferden (LECLERE et al., 2011a).

Die Entzündung der Atemwege wird lumenseitig dominiert von neutrophilen Granulozyten, während sich submukosal vor allem Lymphozyten, Mastzellen, Plasmazellen und zum Teil eosinophile Granulozyten befinden (HOROHOV, 2000, DAVIS and RUSH, 2002). Die Neutrophilen können Mediatoren, wie Elastase, freie Sauerstoffradikale und Leukotrien-B4 freisetzen, wodurch es zur Schädigung des Gewebes kommt. Außerdem führt die Hypersekretion der Drüsen in den Atemwegen zu einer vermehrten Schleimproduktion mit einer veränderten Zusammensetzung des Mukus. Diese Faktoren bewirken, dass es zur Exazerbation der Erkrankung kommen kann (LAVOIE et al., 2001).

Brochospasmus, exzessive Schleimproduktion, Entzündungsprozesse sowie das „Airway Remodeling“ führen in ihrer Gesamtheit, insbesondere bei hochgradig betroffenen Patienten, zur pulmonalen Hyperinflation („Überblähung der Lunge“)

(LECLERE et al., 2011b, MCPHERSON and THOMSON, 1983). Dafür ist v.a. das Phänomen des „Air trappings“ verantwortlich. Dies bezeichnet einen übermäßigen Lufteinschluss in der Lunge, der nicht abgeatmet werden kann, was zu einer dynamischen Überblähung der Lunge führt (COUETIL, 2009). Das „Platzen“ von Alveolenwänden, aufgrund dessen es zur Entstehung eines Lungenemphysems kommen kann, tritt eher selten auf (LECLERE et al., 2011b).

Während Exazerbationsphasen können eine Erhöhung des Lungenwiderstands sowie eine verminderte dynamische Compliance gemessen werden (LECLERE et al., 2011b, WILLOUGHBY and MCDONELL, 1979). Dabei geht man davon aus, dass das reduzierte Residualvolumen, neben der Bronchokonstriktion, durch Einlagerung von Mukus, Entzündungszellen und Umbauprozesse in den Wänden der Atemwege verursacht wird (LECLERE et al., 2011b, ROBINSON et al., 1996). Daher kann die Verminderung des Lungenvolumens auch durch die Gabe von Bronchodilatoren nicht vollständig aufgehoben werden (LECLERE et al., 2011b, ROBINSON et al., 1996). Außerdem kommt es in Folge der genannten Ursachen (Mukus, Entzündung, Airway Remodeling) zu Ventilationsstörungen der Alveolen sowie zu Perfusionsstörungen durch verminderten Blutfluss. Deshalb tritt, v. a. in Phasen der Exazerbation, ein Ungleichgewicht des Ventilations/Perfusions-Verhältnisses auf (LECLERE et al., 2011b). Dies bedeutet eine Beeinträchtigung der Diffusion, also des Gasaustausches in der Lunge, die zu Hypoxämie führen kann. Klinisch stellt sich das als angestregte Atmung erhöhter Frequenz, mit verlängerter abdominaler Kontraktion sowie Kontraktion der Zwischenrippenmuskulatur dar. Dies dient der Forcierung der Expiration (LECLERE et al., 2011b, ROBINSON et al., 2000).

### **1.1.4. Klinische Symptome bei RAO**

Verursacht durch eine Neutrophilen-geprägte Entzündung der Atemwege, Bronchokonstriktion und Hyperkrinie sind die wichtigsten klinische Symptome der RAO chronischer Husten, mukopurulenter Nasenausfluss, eine erhöhte Atemfrequenz (in Ruhe und unter Belastung), eine verstärkt abdominalbetonte Atmung sowie Leistungsschwäche (DAVIS and RUSH, 2002). Insbesondere bei hochgradigem, länger anhaltendem Krankheitsverlauf kann, aufgrund pulmonaler Hyperinflation bzw. in selten Fällen aufgrund eines Lungenemphysems, eine Vergrößerung des Lungenfeldes mittels Perkussion festgestellt werden (DAVIS

and RUSH, 2002, LECLERE et al., 2011b).

Zusätzlich können bei Pferden mit RAO Abweichungen der arteriellen Blutgaswerte, des Sauerstoffpartial- sowie des Kohlendioxidpartialdruckes ( $\text{PaO}_2$  und  $\text{PaCO}_2$ ) auftreten (GRABNER and FEY, 2005). In Ruhe sollte der  $\text{PaO}_2$  auf Höhe des Meeresspiegels bei  $100 \pm 5$  mmHg liegen (DAVIS and RUSH, 2002, GRABNER and FEY, 2005). Ein erniedrigter  $\text{O}_2$ -Partialdruck bei normalem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck wird als Partialinsuffizienz bezeichnet. Aufgrund der besseren Diffusionseigenschaften des  $\text{CO}_2$  kann dieser Wert auch bei Umbauprozessen in der Lunge länger im Normalbereich gehalten werden. Wenn zusätzlich auch der Kohlendioxidpartialdruck außerhalb des Normbereiches liegt, spricht man von einer Globalinsuffizienz (FEY et al., 2005). Jedoch weisen nicht alle Pferde, die an RAO leiden, verminderte Blutgaswerte auf. Bis zu 25% der Patienten können einen physiologischen Wert erreichen (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010).

Bei betroffenen Pferden sind erhöhte Mengen an zähem Schleim in den Atemwegen zu beobachten, welche mittels Tracheo- bzw. Bronchoskopie ermittelt werden können (GERBER et al., 2000).

Außerdem ist ein weiteres wichtiges Hilfsmittel zur Diagnosestellung der RAO der Nachweis der Zellzusammensetzung in der Lunge durch Bronchoalveoläre Lavage (BAL), einer Spülprobe aus den tiefen Atemwegen (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Dabei kann bei RAO, als wichtigster Indikator für eine Entzündung in den tiefen Atemwegen, ein erhöhter Anteil an neutrophilen Granulozyten, festgestellt werden (LECLERE et al., 2011b). Bei einem gesunden Pferd sollte der Anteil an Neutrophilen maximal bei 5% liegen (LECLERE et al., 2011b). Im Falle einer RAO-Erkrankung in Exazerbation sind Werte von mindestens 25% neutrophilen Granulozyten in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) beschrieben (LECLERE et al., 2011b). Die restlichen Anteile der BAL-Zellen machen hauptsächlich Alveolarmakrophagen und Lymphozyten aus, deren prozentualer Anteil eine untergeordnete Rolle spielt (MAY and GEHLEN, 2009). Im Vergleich zu histologischen Untersuchungen der Atemwege bietet die BAL-Untersuchung eine gute Übereinstimmungen hinsichtlich der Analyse der tiefen Lungenabschnitte (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). In seltenen Fällen sind neben einem erhöhten Anteil an Neutrophilen in der BAL ebenfalls eosinophile Granulozyten oder Mastzellen in gesteigertem Maße aufzufinden (ROBINSON,

2001).

Häufig werden Proben des Tracheobronchialsekrets (TBS) zur Diagnostik herangezogen. Jedoch besteht nur eine geringe Korrelation zwischen den zytologischen Ergebnissen der TBS- und der BAL-Proben sowie zwischen den TBS-Proben und den histopathologischen Untersuchungen von Lungenbiopsien (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Da die TBS-Analyse hauptsächlich eine Bewertung der oberen Atemwege zulässt, gilt die zytologische Auswertung des Tracheobronchialsekrets nicht als adäquates Mittel für die Diagnosestellung von inflammatorischen Erkrankungen der tiefen Atemwege. Bei der Bewertung von infektiösen Krankheiten der Atemwege kann die TBS-Analyse hingegen, v.a. wenn ein Trans-Tracheal-Wash durchgeführt wird, hilfreich sein (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010).

Im Gegensatz zur Neutrophilen-dominierten Entzündung der Atemwege bei der RAO, treten bei Menschen mit Asthma überwiegend eosinophile Granulozyten auf (DAVIS and RUSH, 2002). Wobei auch bei einem geringen Anteil an asthmatischen Patienten ein neutrophilen-geprägter Phänotyp auftreten kann (HOROHOV et al., 2009).

#### **1.1.5. Therapie der RAO**

Zum heutigen Zeitpunkt ist keine Möglichkeit zur Heilung der RAO bekannt (LECLERE et al., 2011b). Als wichtigster Ansatz zur Linderung der Erkrankung sind Veränderungen in den Haltungsbedingungen bzw. in der Umgebung des Pferdes hervorzuheben (ROBINSON, 2001). Hierbei ist besonders die Offenstallhaltung bzw. Weidehaltung mit möglichst viel Zugang zu frischer Luft ideal für Pferde, die an RAO leiden. In zahlreichen Studien konnte bei RAO-Pferden eine Remission erreicht werden, allein durch das dauerhafte Verbringen der Pferde auf eine Weide (ROBINSON et al., 2000, GERBER et al., 2000).

Falls die Möglichkeit des ständigen Aufenthalts auf der Weide nicht gegeben ist, ist eine staub- und allergenreduzierte Haltung empfehlenswert. Das Einstreuen mit entstaubten Sägespänen ist eine sehr effektive Methode, die Allergenbelastung zu reduzieren (VANDENPUT et al., 1998). Nicht Empfohlen ist hingegen die Verwendung von sehr fein zerkleinertem Sägemehl aus dem Sägewerk, da hier sehr kleine Partikel inhaliert werden können und es sich häufig um eine Vermischung

verschiedener Holzarten handelt, deren Zuordnung und dadurch auch die Bewertung deren Allergenpotentials meist nicht möglich ist (FLEMING, 2008). Weitere Optionen stellen zerkleinertes Papier oder Pappe als Einstreu oder die Verwendung von Gummimatten dar (THOMSON and MCPHERSON, 1984, KIRSCHVINK et al., 2002). Da die Inspiration von aerogenen Allergene aus dem Heu eine der Hauptursachen für Exazerbationen ist, ist ein weiterer Eckpfeiler in der Verbesserung der Haltungsbedingungen die Fütterung von qualitativ hochwertigem, staubarmem Heu (WOODS et al., 1993). Um die Einatmung von allergenen Partikel zu reduzieren, kann das Heu in Wasser eingeweicht oder idealerweise bedampft werden (JAMES et al., 2010). Als Alternativen zu Heu können auch Heulage oder Heucobs verfüttert werden (KIRSCHVINK et al., 2002, WILLIAMSON and DAVIS, 2007). Neben den Optimierungen von Einstreu und Fütterung ist außerdem eine Verbesserung des Stallklimas durch Ventilation sinnvoll (COUETIL, 2009).

Zur medikamentösen Therapie wird vor allem eine antiinflammatorische Behandlung mit Glukokortikoiden empfohlen (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Die Kortikosteroide können entweder systemisch oder lokal per Inhalation verabreicht werden (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009, COUËTIL et al., 2005). Als systemische Behandlung werden Dexamethason (0,05-0,1 mg/kg i.v. alle 24h), welches einen sehr guten antientzündlichen Effekt zeigt, sowie Prednisolon (1,1-2,2 mg/kg per os alle 24h), welches nur in Verbindung mit verbesserten Haltungsbedingungen eine zufriedenstellende Wirkung zeigt, sehr häufig angewendet (RUSH et al., 1998, DAVIS and RUSH, 2002).

Auch die inhalative Therapie mit Kortikosteroiden ist eine gängige Methode zur Behandlung der RAO (WILLIAMSON and DAVIS, 2007). Ein großer Vorteil der inhalativen Kortikosteroide, im Vergleich zur systemischen Anwendung ist, dass die Gefahr von unerwünschten Nebenwirkungen, z.B. Immunsuppression, bei der topischen Applikation als sehr viel geringer einzustufen ist (DAVIS and RUSH, 2002). Zur inhalativen Behandlung sind insbesondere die Wirkstoffe Beclometason und Fluticason zu nennen. In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Dosierungen der Medikamente auf ihre Wirksamkeit getestet. Beclometason wurde in den Dosierungen 500µg, 1320µg und 3750µg jeweils zwei Mal täglich verabreicht, untersucht (RUSH et al., 1998, AMMANN et al., 1998). Dabei waren

vor allem bei der mittleren und der hohen Dosierung innerhalb weniger Tage positive Resultate hinsichtlich des klinischen Scorings ersichtlich (WILLIAMSON and DAVIS, 2007). Fluticason (1980 $\mu$ g, 2x/Tag) zeigte in einer Placebo-kontrollierten Studie einen sehr guten Effekt (COUËTIL et al., 2005). Fluticason ist stark lipophil und verbleibt daher von den verfügbaren aerosolen Kortikosteroiden am längsten in der Lunge, was es zu einem sehr potenten Wirkstoff macht. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Nebenwirkungen bei Fluticason sehr gering, da es eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit (<2%) sowie einen sehr hohen First-Pass-Effekt (99%) besitzt (DAVIS and RUSH, 2002).

Neben der antiinflammatorischen Therapie können außerdem Bronchodilatoren zur Reduktion der Atemwegsobstruktion eingesetzt werden. Von einer alleinigen Therapie mit Bronchodilatoren, ohne zusätzliche Haltungsoptimierung, sollte jedoch abgesehen werden, da durch die Erweiterung der Bronchien sonst eine vermehrte inhalative Aufnahme von Allergenen gefördert wird (COUËTIL et al., 2016). Am effektivsten werden Bronchodilatoren in Kombination mit einer antiinflammatorischen Therapie eingesetzt.

Als Notfallmedikamente können Anticholinergika, wie beispielsweise Atropin (5-7 mg bei einem 450kg schweren Pferd) verwendet werden. Sie bewirken eine Reduktion der Atemwegsobstruktion, jedoch ist die therapeutische Anwendung, aufgrund der gastrointestinalen Nebenwirkungen, wie z.B. Ileus, sehr begrenzt und wird v.a. bei lebensbedrohlicher Atemwegsobstruktion eingesetzt (MURPHY et al., 1980, DAVIS and RUSH, 2002). Ipratropiumbromid (90-180 $\mu$ g), ein Anticholinergikum und verneblungsfähiges Derivat von Atropin, zeigt über einen kurzen Zeitraum von vier bis sechs Stunden eine Verbesserung der Atemwegssymptomatik (ROBINSON et al., 1993).

$\beta_2$ -Sympathomimetika bewirken eine Relaxation der glatten Muskulatur durch Inhibition deren Konstriktion. Der dahinterstehende Mechanismus ist einerseits die Freilassung von Stickstoffmonoxid von inhibitorischen, nichtadrenergen, nichtcholinergen Nerven (iNANC) sowie andererseits die Freisetzung von inhibitorischen Prostaglandinen wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PgE<sub>2</sub>) von der Mukosa (ROBINSON, 2001). Während einer akuten Phase der Exazerbation funktioniert die iNANC-vermittelte Relaxation nicht und es kommt anstatt einer Inhibition zu

einer Stimulation der Konstriktion der glatten Muskulatur (ROBINSON, 2001).  $\beta_2$ -Agonisten können in kurzwirksame- und langwirksame Wirkstoffe unterteilt werden. Der Einsatz von kurzwirksamen, aerosolen  $\beta_2$ -adrenergen Agonisten (z.B. Albuterol, Pirbuterol und Fenoterol) ist aufgrund der nur kurz anhaltenden Wirkung ausschließlich als Notfallmedikament sinnvoll (RUSH et al., 1999, DAVIS and RUSH, 2002).

Langwirksame Bronchodilatoren können in Kombination mit Kortikosteroiden zur Stabilität des Patienten beitragen, wenn sie zwei bis drei Mal täglich angewendet werden. Zur Inhalation geeignet ist der Wirkstoff Salmeterol (210 $\mu$ g), ein Analogon von Albuterol, mit einer längeren Wirkungsdauer von bis zu acht Stunden (HENRIKSON and RUSH, 2001). Clenbuterol ist ein weiterer  $\beta_2$  Agonist, der häufig in der Therapie der RAO eingesetzt wird, jedoch findet man in der Literatur nur wenige Studien, die eine gute Wirkung nachweisen. In einer Studie von Robinson konnte bei einer Dosierung von 0,8 $\mu$ g/kg alle 12 Stunden ein positiver Effekt auf die klinischen Symptome nachgewiesen werden (ROBINSON, 2000). Es konnte festgestellt werden, dass der Wirkstoff nicht nur relaxierend auf die glatte Muskulatur der Atemwege, sondern auch mukokinetisch wirkt (ROBINSON, 2000, TURGUT and SASSE, 1989). Clenbuterol gehört zu den selektiven  $\beta_2$ -Agonisten, aber bei zu hoher Dosierung können zusätzlich  $\beta_1$ -Adrenozeptoren aktiviert werden, was unerwünschte Nebenwirkungen wie Tachykardie, Schwitzen und Unruhe hervorrufen kann (ROBINSON, 2000). Da es außerdem tokolytisch wirkt, sollte es nicht bei Stuten kurz vor dem Geburtstermin angewandt werden.

Eine weitere Therapieoption sind Mastzellstabilisatoren, die die Degranulation von Mastzellen verhindern, indem sie zur Stabilisierung der Membran beitragen. Dadurch wird ein Freiwerden von Entzündungsmediatoren, wie Histamin, verhindert. Zur Gruppe der Mastzellstabilisatoren gehört u.a. die Cromoglicinsäure, welche inhalativ verabreicht wird, bei der aber eher ein präventiver, als einen therapeutischer Effekt nachgewiesen wurde (SOMA et al., 1987, NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

Zusätzlich zu den bisher genannten Behandlungsmethoden kann außerdem die Sekretolyse mit schleimlösenden Medikamenten wie Dembrexin oder Acetylcystein unterstützt werden (MATTHEWS et al., 1988, BREUER and

BECKER, 1983). Ergänzend zu einer staubarmen Haltung, führte in einer Studie eine zusätzliche Supplementierung des Futters mit Omega-3-Fettsäuren über zwei Monate zu einer Verbesserung der klinischen Symptome, der Lungenfunktion sowie der Entzündung in den Atemwegen bei Pferden mit RAO und IAD (NOGRADI et al., 2015). In einer Studie aus dem Jahr 2015 wurde mit dem Wirkstoff Tamoxifen, einem selektiven Östrogen Rezeptor Modulator, ein weiterer Therapieansatz getestet. Dabei konnten die neutrophilen Granulozyten in der BAL vermindert und der klinische Status der Pferde verbessert werden (PEREZ et al., 2015).

### **1.2. Inflammatory airway disease (IAD)**

Die Kriterien für eine IAD-Erkrankung wurden im Consensus Statement des American College of Veterinary Medicine (ACVIM) von 2007 sowie in der überarbeiteten, aktualisierten Form, dem Revised IAD Consensus Statement, aus dem Jahr 2016 festgehalten (COUETIL et al., 2007, COUETIL et al., 2016). Demzufolge können, im Gegensatz zur RAO, Pferde jeder Altersklasse an IAD leiden. Typischerweise sind die Pferde jung bis hin zum mittleren Alter. In der Regel leiden sie an Symptomen wie Leistungsinsuffizienz, Trainingsschwäche sowie gelegentlichem Husten. Die Erkrankung kann bei Pferden aller Rassen auftreten und nicht nur, wie früher vermutet, hauptsächlich bei Rennpferden. Genauso wie bei RAO, tritt bei IAD häufig eine starke Akkumulation von Schleim in den Atemwegen auf. Einer der wichtigsten Unterschiede, der die IAD von der RAO abgrenzt, ist, dass IAD-Patienten in Ruhe keine erhöhte Atemfrequenz oder Ruhedyspnoe zeigen. Außerdem haben Pferde, die an RAO leiden meist eine Leistungsintoleranz, die das Maß an Leistungsminderung, wie sie bei IAD auftreten kann, meist deutlich überschreitet. Die klinischen Anzeichen der Erkrankung treten über einen Zeitraum von mindesten vier Wochen auf und können sich sowohl mit, als auch ohne Therapie wieder verbessern (Tab. 1) (COUETIL et al., 2016).

Zur Unterscheidung zwischen IAD und RAO kann eine „Antigenchallenge“ mit schimmeligem Heu durchgeführt werden. Die Allergen-Exposition würde bei IAD-Pferden, im Gegensatz zu RAO-Pferden, keine erhöhte Ruheatemfrequenz verursachen (COUETIL et al., 2001). Diese Methode sollte jedoch nur zu wissenschaftlichen und nicht zu diagnostischen Zwecken angewandt werden.

In mehreren Studien wurde der negative Einfluss von IAD auf die Leistungsfähigkeit beschrieben (COUETIL et al., 2016). Bei Vollblutrennpferden wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer Neutrophilie in der BAL-Flüssigkeit und schwachen Leistungen bei Rennen festgestellt (COUËTIL, 2007). Die Leistungsminderung wird verursacht durch Dys- und Hyperkrinie, Schleimhautödeme sowie Bronchospasmus, welche zu Hypoxämie führen können. Insbesondere wenn von Sportpferden Höchstleistungen abverlangt werden, wirken sich diese pathologischen Veränderungen in Form einer reduzierten Leistungsfähigkeit aus.

Da Leistungsinsuffizienz jedoch auch andere Ursachen haben kann, sollten andere mögliche Ätiologien, wie z.B. orthopädische, kardiale oder muskuläre Probleme ausgeschlossen werden. Die Symptome der IAD sind, ähnlich wie bei RAO, relativ unspezifisch. Für eine Diagnosestellung müssen daher andere Erkrankungen ausgeschlossen werden. Symptome einer Infektion, wie Fieber oder Abweichungen im Blutbild, die auf ein infektiöses Geschehen hinweisen können, sollten dazu überprüft werden (COUETIL et al., 2016).

Die Ätiologie der IAD ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die Hauptursachen bei der Entwicklung der IAD nicht-infektiöser Natur sind. Stallhaltung gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren, da hier hohe Staubkonzentrationen herrschen (MCGORUM et al., 1998, COUETIL et al., 2016). Als Verursacher gelten zahlreiche organische und anorganische Partikel sowie Endotoxine, Milben, Pflanzenanteile, ultrafeine Partikel mit einem Durchmesser von  $<100\text{nm}$ , Schadgase und anorganische Stäube. Im Vergleich zu RAO ist für IAD die Rolle der einzelnen Komponenten jedoch noch nicht vollständig geklärt (COUETIL et al., 2016).

Für die Diagnose der IAD gibt vor allem die BAL-Analyse einen wichtigen Hinweis. Zusätzlich kann ein Lungenfunktionstest sinnvoll sein, da in zahlreichen Studien ein negativer Einfluss von IAD auf die Lungenfunktion sowohl unter Belastung als auch in Ruhe festgestellt werden konnte (SANCHEZ et al., 2005). Unabhängig von der Art der BAL-Gewinnung stimmen zytologische Ergebnisse mit erhöhten Anteilen an Neutrophilen ( $> 10\%$ ), Mastzellen ( $> 5\%$ ) und vermehrt Eosinophilen Granulozyten ( $> 5\%$ ) mit einer IAD-Diagnose überein (COUETIL et al., 2016). Als physiologische Werte in der BAL bei einer Gesamtzellzahl an

kernhaltigen Zellen von  $\leq 530$  cells/ $\mu$ L werden für Neutrophile  $\leq 5\%$ , Eosinophile  $\leq 1\%$  und metachromatische Zellen  $\leq 2\%$  beschrieben (COUETIL et al., 2016).

Es gibt, anhand der Klinik und der Zytologie gemessen, drei verschiedene Phänotypen, wie sich IAD darstellen kann: neutrophile, metachromatische und eosinophile IAD. Beim neutrophil-dominierten Phänotyp, der v.a. bei älteren Pferden ( $>7$  Jahre) auftritt, werden häufig Husten und das Vorhandensein von Trachealschleim beschrieben. Beim metachromatischen Phänotyp treten als charakteristische Symptome v.a. Hyperreagibilität der Atemwege und subklinische Atemwegsobstruktionen auf. Die eosinophile IAD ist seltener und kommt überwiegend bei jüngeren Pferden ( $<5$  Jahren) vor. Bei diesem Phänotyp wird häufig eine Hyperreagibilität der Atemwege beobachtet (COUETIL et al., 2016).

Der wichtigste Schritt für die Therapie der IAD ist laut ACVIM Consensus Statement die Verbesserung der Haltungsbedingungen. Zusätzlich können, ähnlich der RAO-Behandlung, antiinflammatorische Medikamente zum Einsatz kommen, allerdings ist bisher nur eine begrenzte Anzahl evidenz-basierter Resultate einer solchen Behandlung von IAD vorhanden (COUETIL et al., 2007).

Eine systemische antiinflammatorische Therapie kann zum Beispiel mit Prednisolon (1,1-2,2mg/kg PO, 1 x täglich) oder Dexamethason (0,05mg/kg PO bzw. 0,04mg/kg IV oder IM) erfolgen (COUETIL et al., 2016). Auch inhalative Kortikosteroide, wie Fluticason (1-6 $\mu$ g/kg alle 12h) oder Beclometason (1-8 $\mu$ g/kg alle 12 h) werden häufig zur Behandlung der IAD eingesetzt. Insgesamt sind die Therapieansätze ähnlich der Behandlung der RAO (COUETIL et al., 2016). V.a. bei der Mastzell-dominierten Form der IAD können außerdem Mastzellstabilisatoren eingesetzt werden (HARE et al., 1994).

Bei Rennpferden wurde zudem eine Reduktion der Atemwegsentszündung bei oraler low-dose Interferon- $\alpha$  Gabe festgestellt (MOORE et al., 1996). Vor einer immunsuppressiven Therapie sollte jedoch immer eine infektiöse Ursache ausgeschlossen werden. Eine Behandlung mit Bronchodilatoren sollte nur nach Haltungsoptimierung und in Kombination mit antiinflammatorischen Medikamenten erfolgen.

Eine Verbesserung der Symptomatik sollte unter Therapie schon nach wenigen Tagen zu erkennen und nach ca. zwei Wochen vollständig eingetreten sein

(COUETIL et al., 2007).

### **1.3. Summer pasture associated recurrent airway obstruction (SPRAO)**

Die Sommerweide-assoziierte Form der RAO (auch SPAOPD genannt) ist eine saisonal, hauptsächlich im Sommer, auftretende Erkrankung der Atemwege, die v.a. Pferde betrifft, die sich viel auf der Weide aufhalten. Die Krankheit wird ausgelöst als Antwort auf Aeroallergene, die über die eingeatmete Luft in die Atemwege aufgenommen werden, welche sich von den Stall-assoziierten Allergenen, die bei RAO ursächlich sind, unterscheiden (COSTA et al., 2006). Die Erkrankung ist vor allem im Süden der USA beschrieben (COSTA et al., 2006). Klinisch lässt sich die SPRAO nicht von der RAO unterscheiden (COUETIL et al., 2016).

Die klinischen Symptome variieren sehr stark. Es können sich milde respiratorische Anzeichen bis hin zu lebensbedrohlichen Episoden mit anfallsartigem Husten, Giemen und angestrenzter Atmung zeigen. Phasen der Exazerbation treten insbesondere bei erhöhten Außentemperaturen und hoher Luftfeuchtigkeit auf (COSTA et al., 2006). In einer Studie aus den USA sind gleichzeitig mit der Verschlechterung der Symptomatik ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von Pilzsporen, vor allem der Gattungen *Basidiospora*, *Nigospora* und *Curvularia* sowie von Gräserpollen aufgefallen, jedoch ist die Kausalität der Aeroallergene noch nicht eindeutig geklärt (COSTA et al., 2006).

Im Gegensatz zur RAO sollten bei Pferden, die an SPRAO leiden, die Haltungsbedingungen dahingehend verändert werden, dass die Patienten im Stall gehalten werden und nur eine möglichst kurze Zeit auf der Weide verbringen sollten. Dies dient dazu die Exposition mit aerogenen Allergenen so gering wie möglich zu halten. Therapeutisch können die gleichen Medikamente, die bei der RAO Anwendung finden, eingesetzt werden (COSTA et al., 2006).

### **1.4. Equines Asthma Syndrom**

Im ACVIM Consensus Statement „Inflammatory Airway Disease of Horses – Revised Consensus Statement“ aus dem Jahr 2016 wird die Möglichkeit genannt in Zukunft die bereits beschriebenen chronischen Atemwegserkrankungen, RAO, SPRAO und IAD unter dem Begriff des „Equines Asthma Syndroms“ zusammenzufassen (Tab. 1, COUETIL et al., 2016). Da sowohl hinsichtlich der

Diagnostik, als auch der Therapie der verschiedenen Allergie-bedingten Atemwegserkrankungen sehr viele Überschneidungen vorliegen, erscheint eine allumfassende Nomenklatur sinnvoll. Dabei kann IAD als milde bis mittelgradige Ausprägung bezeichnet werden und RAO sowie SPRAO als die hochgradigen Formen des Equinen Asthma Syndroms (COUETIL et al., 2016).

Es gibt Pferde, die ausgehend von einer IAD, eine RAO entwickeln können. Jedoch sollte man nicht davon ausgehen, dass IAD-Patienten zwangsläufig eine RAO entwickeln, da bei einem Großteil der IAD-Patienten eine Heilung möglich ist. Es besteht zwar der Verdacht, dass das Risiko zur Ausprägung einer RAO bei Pferden, die zuvor milde respiratorische Symptome gezeigt hatten, größer ist, aber eine definitive Bestätigung für einen Übergang von einer IAD zu einer RAO liegt zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vor (COUETIL et al., 2016).

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der typischen Merkmale des Equinen Asthma Syndroms (COUETIL et al., 2016).

<b>Equines Asthma Syndrom</b>			
	<b>Eigenschaften</b>	<b>IAD</b> (ggr.-mgr. equines Asthma)	<b>RAO oder SPARAO</b> (hgr. equines Asthma)
<b>Klinische Präsentation</b>	Alter	hauptsächlich <b>junge bis mittelalte Pferde</b> ; kann in jedem Alter auftreten	meistens: Pferde <b>älter als 7 Jahre</b>
	Klinisches Bild	<b>Atmung in Ruhe normal</b> , gelegentliches Husten, Leistungsfähigkeit vermindert, chronische Symptome (> 4 Wochen)	<b>Atmung in Ruhe vermehrt angestrengt</b> , regelmäßiges bis häufiges Husten, Leistungsintoleranz, Art und Schweregrad der Symptome können im Verlauf variieren
	Zeitlicher Verlauf	häufig spontane Verbesserung oder Verbesserung unter Therapie, <b>Rezidivgefahr gering</b>	hält häufig für Wochen oder Monate an, bevor eine Diagnose gestellt wird; normalerweise sind mit Optimierung der Haltungsbedingungen oder Therapie Verbesserungen zu erzielen; <b>Aber: nur eine Linderung der Symptomatik und keine Heilung möglich</b>
	Vorgeschichte	Stallhaltung; genetische Prädisposition noch nicht erforscht	Staub oder Allergene im Stall bzw. auf der Weide ausgesetzt; z.T. familiäre Vorgeschichte von equinem Asthma; klinische Symptome eventuell saisonal
<b>Diagnostische Bestätigung</b>	Endoskopie der Atemwege	Überschuss an <b>Schleim</b> im Tracheobronchialbereich (Score: >1 bei Rennpferden, >2 bei Sport- und Freizeitpferden); andere Differentialdiagnosen sollten ausgeschlossen werden	Überschuss an <b>Schleim</b> im Tracheobronchialbereich; andere Differentialdiagnosen sollten ausgeschlossen werden
	Zytologie der Atemwege	geringgradig erhöhte Anteile an <b>Neutrophilen, Eosinophilen und Metachromatischen Zellen</b> in der BALF	<b>mittel- bis hochgradig</b> erhöhte Anteile an <b>Neutrophilen</b> in der BALF
	Lungenfunktion	keinen Hinweis auf verminderten Luftstrom bei Messung mit Oesophagus-Ballon-Katheter ( <b>DPmax &lt;10 cmH2O</b> ), jedoch bei sensitiveren Methoden möglich; Hyperresponsivität der Atemwege	mittel- bis hochgradig vermindertes Luftstrom während der Exazerbation ( <b>DPmax &gt;15 cmH2O</b> ); reversibel mit Bronchodilatoren oder Optimierung der Umwelt; Hyperresponsivität der Atemwege

## 2. Immunologie

### 2.1. Immunologie der RAO

RAO ist eine Erkrankung, bei der die betroffenen Pferde auf aerogene Aufnahme von Allergenen (u.a. organische Stäube, Schimmelpilzsporen, v.a. aus dem Heu, Gräserpollen, Endotoxine) mit einer Entzündung der Atemwege reagieren (LUNN and HOROHOV, 2010). Circa vier bis sechs Stunden nach Allergen-Kontakt treten Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge sowie Obstruktion der Atemwege auf. Die Obstruktion wird hervorgerufen durch Bronchospasmus und eine vermehrte Produktion von zähem Schleim (HOROHOV et al., 2005). Es gibt Hinweise dafür, dass es sich bei RAO um Hypersensitivitätsreaktionen vom gemischten Typ handelt. Eine Rolle scheint dabei die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I (Soforttyp) zu spielen, da in manchen Studien erhöhte IgE-Konzentrationen sowohl in der BAL, als auch allergen-spezifische IgE festgestellt wurden. Jedoch ist bei der RAO nicht das typische Bild einer Typ I-Reaktion vorzufinden, da die Effekte erst einige Stunden nach Allergenexposition auftreten (LUNN and HOROHOV, 2010, SCHMALLENBACH et al., 1998). Daher geht man davon aus, dass auch eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III eine Rolle in der Pathogenese von RAO spielt (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2010). Bei der Typ III-Reaktion handelt es sich um eine Immunkomplex-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion, bei der IgG die Produktion von proinflammatorischen Faktoren aktiviert, welche wiederum die Migration von Neutrophilen in das betroffene Gebiet fördern (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2010, HENRÍQUEZ et al., 2014).

Die Hypothese zur Entstehung von RAO besagt, dass die Erkrankung ausgelöst wird durch eine Anomalie des Immunsystems, bei der der Körper auf Inhalation von Antigenen mit einer übermäßigen Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen reagiert (LAVOIE et al., 2001, KLEIBER et al., 2005). T-Lymphozyten spielen sowohl bei humanem Asthma als auch bei der RAO-Erkrankung von Pferden eine wichtige Rolle. Die Ergebnisse verschiedener Studien hinsichtlich der Zytokinprofile und des Phänotyps der T-Lymphozyten sind jedoch nicht einheitlich. Einige Studien belegen eine vorherrschende Allergie-vermittelnde Th2-Immunantwort, die im Zusammenhang mit der klinischen Exazerbation der RAO steht, während gleichzeitig die proinflammatorischen Th1-Zytokine

herunterreguliert werden (CORDEAU et al., 2004). Dabei war die Expression wichtiger Vertreter der Th2-Zytokine, wie IL-4 und IL-13, erhöht. IL-4 und IL-13 regulieren die Produktion von IgE-Antikörpern. Diese sind maßgeblich an einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I, die ca. 2-4 Stunden nach der Exposition auftritt, und somit an der Entstehung der RAO beteiligt (HOROHOV et al., 2005). Jedoch spricht vieles dafür, dass bei RAO nicht nur eine Typ I Hypersensitivitätsreaktion alleine vorliegt.

Bei GIGUERE et al. (2002) konnte bei einem Anstieg sowohl von IL-4 als auch von den Th1-Zytokinen IFN- $\gamma$ , IL-8 (chemotaktisch wirksam für Neutrophile), IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  eine gemischte Th1/Th2 Immunantwort festgestellt werden. Dies konnte in einer weiteren Studie von AINSWORTH und Kollegen belegt werden (GIGUERE et al., 2002, AINSWORTH et al., 2003).

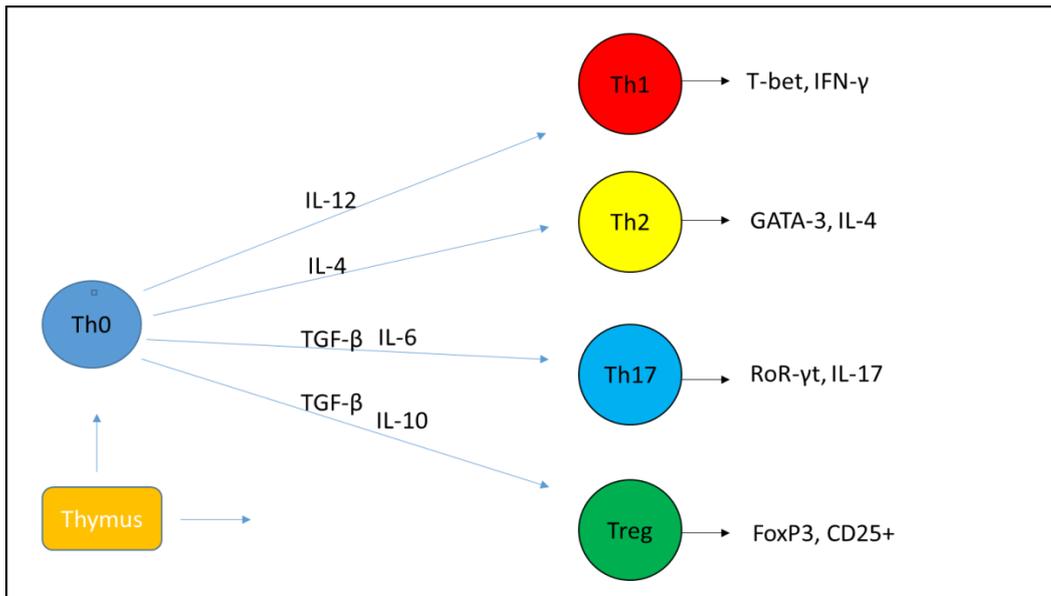
Nach Exposition von RAO-Pferden mit schimmeligem Heu war in einer Studie von CORDEAU et al. (2004) IL-5, ein weiteres Th2-Zytokin, ebenfalls erhöht, jedoch konnte dieses Ergebnis bei HOROHOV et al. (2005) nicht reproduziert werden. IL-5 spielt bei der Entstehung von humanem und murinem Asthma eine wichtige Rolle, da das Zytokin ein Botenstoff der eosinophilen Entzündungsreaktion ist (WILLS-KARP, 1999). Bei Pferden mit RAO ist jedoch nur selten eine Eosinophilie zu beobachten, hier dominiert eine neutrophile Entzündung der unteren Atemwege (DIXON et al., 1995, HOROHOV et al., 2005).

Obwohl die Immunologie der RAO bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann man von einem Ungleichgewicht der Th1/Th2-Immunantwort ausgehen, wobei die Verschiebungstendenz hin zu einer Th2-Immunreaktion geht (HOROHOV et al., 2009). Die Ursache der variierenden Ergebnisse könnte auch an Unterschieden im Studienaufbau zu finden sein. Bei den Studien von GIGUERE (2002) und LAVOIE (2001), die eine Dominanz der Th2-Immunantwort aufwiesen, wurden die Untersuchungen durchgeführt, wenn die Pferde deutliche klinische Symptome einer Atemwegsobstruktion zeigten (LAVOIE et al., 2001, GIGUERE et al., 2002). Während die Studien von KLEIBER (2005) und AINSWORTH (2006), die weder eine eindeutige Th1- noch eine eindeutige Th2-Immunreaktion feststellen konnten, zu einem früheren Zeitpunkt (24 bzw. 48 Stunden nach Antigen-Exposition) bei undeutlicher Symptomatik, stattfanden (KLEIBER et al., 2005, AINSWORTH et al., 2006).

Auch eine Beteiligung von IL-17, einem Th17-Zytokin, in der Pathogenese der RAO wurde festgestellt (AINSWORTH et al., 2009). IL-17 wird von aktivierten T-Zellen sezerniert und unterstützt indirekt die Reifung, Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (DEBRUE et al., 2005). In einem Vergleich zwischen gesunden Pferden und RAO-Patienten konnte nach Allergen-Exposition eine erhöhte Expression von IL-17 in der BAL von RAO Pferden determiniert werden (DEBRUE et al., 2005). In einer weiteren Studie wurde in den Mediastinallymphknoten von Pferden, die an RAO leiden, ebenfalls eine erhöhte IL-17 Konzentration festgestellt, was auf eine Beteiligung der Th17-Immunantwort im Verlauf der RAO spricht (KORN et al., 2015).

Eine entscheidende Schutzfunktion gegenüber Allergien wird regulatorischen T Zellen (Tregs) zugeschrieben, welche das Zytokin IL-10 produzieren, das einen wichtigen Einfluss als Gegengewicht zur allergievermittelnden Th2-Immunantwort inne hat (Abb. 2) (HAWRYLOWICZ and O'GARRA, 2005, KLIER et al., 2011). Die regulatorische Funktion der Tregs wird außerdem durch das Zytokin TGF- $\beta$  vermittelt. Diesem Zytokin werden Einflüsse auf zahlreiche immunologische Reaktionen zugeschrieben, u.a. eine direkte antiinflammatorische Wirkung auf Th1-Zellen sowie der Einfluss auf Heilungsprozesse und Fibrosierung von Gewebe. Auch bei Asthma bzw. RAO kann eine vermehrte Expression von TGF- $\beta$  zu einer bronchialen Fibrose führen (KLINKE, 2007a, DESJARDINS et al., 2004).

In einer Studie von Desjardins konnte in der BAL von gesunden und RAO-Pferden jedoch keine Unterschiede in der TGF- $\beta$ -Konzentration festgestellt werden (DESJARDINS et al., 2004).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Entwicklung verschiedener T-Lymphozyten (=thymus-derived lymphocytes) und ihre Botenstoffe. Dabei werden die Einflüsse der Zytokine, ausgehend vom naiven Th0-Lymphozyt, auf die Ausbildung der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen (Th1, Th2, Th17 und Treg) aufgezeigt. Außerdem werden die für jede T-Lymphozyten-Subpopulation spezifischen Transkriptionsfaktoren (T-bet für Th1; GATA-3 für Th2; RoR- $\gamma$ t sowie FoxP3 für Treg) sowie die von den jeweiligen T-Zell-Typen typischerweise produzierten Zytokine (IFN- $\gamma$  von Th1; IL-4 von Th2; IL-17 von Th17) bzw. Oberflächenmarker (CD25+ bei Treg) dargestellt.

Zusammenfassend werden den nachfolgenden Zytokinen und Transkriptionsfaktoren die entsprechenden Funktionen innerhalb der Immunreaktion zugeschrieben (WAGNER and FREER, 2009, LUNN and HOROHOV, 2010):

- **IL-4** ist ein Zytokin der Th2-Immunantwort. Es induziert die Reifung von B-Zellen sowie die Produktion von IgE-Antikörpern. Außerdem kann es neben Lymphozyten auch von anderen Zelltypen, wie Mastzellen, Eosinophilen oder Basophilen gebildet werden (CORDEAU et al., 2004).
- **IL-10** wirkt sowohl regulatorisch als auch antiinflammatorisch und wird hauptsächlich von Tregs produziert. IL-10 wirkt als Gegengewicht zur allergievermittelnden Th2-Immunantwort (HAWRYLOWICZ and O'GARRA, 2005).

- **IL-17** ist ein inflammatorisches Zytokin, das von Th17-Zellen gebildet wird. AINSWORTH et al. konnten eine Beteiligung von IL-17 in der Pathogenese der RAO herausfinden. Dabei geht man davon aus, dass das Zytokin an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (AINSWORTH et al., 2009). Außerdem wirkt IL-17 chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile Granulozyten (DEBRUE et al., 2005).
- **IFN- $\gamma$**  ist eines der wichtigsten Zytokine der Th1-Immunantwort. Es unterstützt außerdem die Abwehr intrazellulärer Pathogene durch Induktion der zellulären Immunreaktion. Neben den Th1-Zellen kann IFN- $\gamma$  auch von zytotoxischen Zellen und Makrophagen produziert werden (WAGNER and FREER, 2009, CORDEAU et al., 2004).
- **IFN- $\alpha$**  wirkt als anti-virales Zytokin und wird daher insbesondere bei der Bekämpfung viraler Infektionen freigesetzt. Eine wichtige Aufgabe ist auch die Induktion zytotoxischer Zellen. Es kann von fast allen Zellen gebildet werden, jedoch sind plasmazytoide dendritische Zellen als Hauptproduzent von IFN- $\alpha$  zu benennen (WAGNER and FREER, 2009, LUNN and HOROHOV, 2010).
- **FoxP3** ist ein Transkriptionsfaktor spezifisch für Tregs. Dieser wird beim Menschen als Marker für nicht aktivierte regulatorische T-Zellen beschrieben (SAKAGUCHI et al., 2009).
- **T-bet** ist ein insbesondere für Th1-Lymphozyten spezifischer Transkriptionsfaktor. Heutzutage geht man davon aus, dass T-bet darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Koordination der Typ-1-Immunantwort inne hat (LAZAREVIC et al., 2013).
- **GATA-3** wird als ein für Th2-Lymphozyten spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben. Bei der humanen Asthma-Erkrankung konnte bei einem Th2-dominierten Phänotyp eine entscheidende Rolle für den Transkriptionsfaktor GATA-3 festgestellt werden (KRUG et al., 2015).
- **IL-8** ist eine Zytokin, das als Vermittler inflammatorischer Prozesse dient und vor allem bei der chemotaktischen Rekrutierung von Neutrophilen eine wichtige Rolle spielt (GIGUERE et al., 2002).

- **TGF- $\beta$**  ist ein Zytokin, das daran beteiligt ist die regulatorische Funktion der Tregs zu vermitteln (SHAMJI and DURHAM, 2011). Außerdem werden TGF- $\beta$  u.a. ein direkter antiinflammatorischer Einfluss auf Th1-Zellen sowie auf Heilungsprozesse und Fibrosierung von Gewebe zugesprochen (DESJARDINS et al., 2004).

Sowohl bei Pferden in einem Alter über 20 Jahren, als auch bei geriatrischen Menschen tritt ein Phänomen auf, das als „Inflamm-aging“ bezeichnet wird. Dabei sind proinflammatorische Zytokine in den PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) in erhöhtem Maße vorzufinden (HANSEN et al., 2015). In einer aktuellen Studie von Hansen und Kollegen wurde jedoch ein altersabhängiger Abfall von IL-1 $\beta$  und IL-8 in der BAL festgestellt (HANSEN et al., 2014). Das bedeutet, dass das Zytokinbild in der Lunge eher auf einen Abfall der proinflammatorischen Zytokine hinweist und damit unabhängig vom Zytokinprofil des peripheren Bluts ist (HANSEN et al., 2014).

## **2.2. Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind eine Subpopulation der T-Lymphozyten, denen bei einer Reihe verschiedener Säugerspezies, u.a. bei Menschen, eine immunregulatorische Aktivität zugeschrieben wird (ROBBIN et al., 2011). Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken, war diese Zellpopulation früher unter dem Namen T-Suppressor Zellen bekannt. Ihre Funktion besteht darin, die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren. So wurde in verschiedenen humanmedizinischen Studien bestätigt, dass Tregs vor der Entwicklung allergischer und asthmatischer Krankheiten schützen und ihre Funktion während der aktiven Erkrankung beeinträchtigt ist (HAWRYLOWICZ, 2005). Außerdem wird ihnen eine Rolle bei der Beseitigung von chronischen Erkrankungen zugeschrieben (ALUVIHARE et al., 2004, ASKENASY et al., 2008, OZDEMIR et al., 2009)

Erzielt wird der Effekt der Tregs durch eine Anzahl verschiedener Mechanismen. Dazu zählen die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ , genauso wie der direkte Zell-Zell-Kontakt und Zytolyse (SHAMJI and DURHAM, 2011). Des Weiteren wirken sie beeinflussend auf Effektor-T-Zellen und modulierend auf die Funktion dendritischer Zellen (MIYARA and SAKAGUCHI,

2007).

Regulatorische T Zellen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es die natürlichen Tregs (nTregs), welche im Thymus geprägt werden, zum anderen die induzierbaren Tregs (iTregs), welche durch Antigenstimulation aus konventionellen CD4<sup>+</sup> Zellen generiert werden. Um regulatorische T-Zellen bei Menschen und Mäusen von normalen CD4<sup>+</sup> Zellen unterscheiden zu können, wurden eine Kombination verschiedener spezifischer sowohl intrazellulärer als auch Zelloberflächenmarker ausfindig gemacht (SAKAGUCHI et al., 2009) Dazu gehören der Transkriptionsfaktor FOXP3, der T-Zellmarker CD4 und das Membranmolekül CD25. Bei menschlichen T-Zellen sind noch weitere Marker bekannt, um Tregs genauer identifizieren zu können (SAKAGUCHI et al., 2009). FOXP3 wird beim Menschen als Marker speziell für nicht aktivierte regulatorische T-Zellen gesehen (SAKAGUCHI et al., 2009).

### **2.2.1. Regulatorische T-Zellen bei Equiden**

Im Vergleich zu anderen Spezies ist beim Pferd noch nicht sehr viel bekannt zu den Charakteristika der equinen Tregs (ROBBIN et al., 2011). Von WAGNER et al. (2008) wurden CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Zellen identifiziert, die nach Angaben der Autoren, im Pferd Zellen des Phänotyps T regulatory 1 (TR1) repräsentieren sollen (WAGNER et al., 2008). Es ist sehr wahrscheinlich, dass Tregs beim Ausgang zahlreicher Erkrankungen der Equiden eine bedeutende Rolle spielen. Dazu gehören u.a. die Entwicklung allergischer Atemwegserkrankungen und die Regeneration von viralen Infektion, wie z.B. mit Equiden Herpes Viren (EHV) sowie die Regeneration von Endotoxämien, die im Rahmen von Koliken auftreten können (DRISCOLL et al., 2008).

In einer Studie an gesunden Pferden wurde eine Altersabhängigkeit bezüglich des Vorkommens von Tregs im peripheren Blut festgestellt. Der durchschnittliche prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen liegt bei Pferden bei 2,2% der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Bei Equiden, die älter sind als 15 Jahre, ist der Anteil an FOXP3 positiven CD4<sup>+</sup> Zellen mit 1,5% signifikant niedriger als der bei jungen Pferden im Alter von 6 Jahren und jünger (2,7%) (ROBBIN et al., 2011). In Bezug auf das Geschlecht, ebenso wie im Vergleich zwischen Pferden und Ponys, liegen laut ROBBIN und Kollegen (2011) keine Unterschiede vor.

In einer Studie von HENRIQUEZ et al. (2014) wurden Tregs von RAO-Pferden sowohl im Blut, als auch in der BAL vor und nach Antigen-Challenge mit *Aspergillus fumigatus* bestimmt. Nach der Allergen-Exposition wurden im Vergleich zum Ausgangswert signifikant höhere Werte für Tregs in der BAL gemessen. Dabei wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen sowohl auf den Membranmarker CD25, als auch auf den Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie auf die Kombination beider Marker untersucht (HENRÍQUEZ et al., 2014). Es ist wahrscheinlich, dass die verschiedenen Subpopulationen der Tregs (CD4<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup> und CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) auftreten, da unterschiedliche Mechanismen den Anstieg der Tregs vermitteln. Zu den Mechanismen gehören das selektive Rekrutieren von nTregs, die lokale Generierung von iTregs oder die Expression von IL-2 Rezeptoren bei T-Effektor-Zellen, die lokal aktiviert werden (HENRÍQUEZ et al., 2014).

In einer weiteren Studie von HAMZA und Kollegen (2012) wurden Lymphozyten von gesunden und von IBH-Pferden in-vitro mit Insekten-Antigen stimuliert. Dabei war die FoxP3-Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen bei gesunden Pferden signifikant höher, als bei IBH-Pferden. Dies spricht dafür, dass Pferde, die an allergischer Dermatitis leiden, eine verminderte Fähigkeit haben, Tregs zu produzieren (HAMZA et al., 2012).

### **3. Wirkungsmechanismen von Kortikosteroiden**

Kortikosteroide wirken immunmodulatorisch durch Einwirkungen sowohl auf das angeborene, als auch auf das adaptive Immunsystem (LUNN and HOROHOV, 2010). Ihre antiinflammatorische Wirkung auf das angeborene Immunsystem können Kortikosteroide entfalten, indem sie an die im Zytoplasma befindlichen Steroidrezeptoren ankoppeln. Sie nehmen dadurch direkten Einfluss auf das im Nukleus befindliche Genom, indem sie die Transkription bestimmter Gene induzieren bzw. regulieren (LUNN and HOROHOV, 2010).

Dabei haben Kortikosteroide hemmenden Einfluss auf die Transkription zahlreicher Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5 und IL-8) und vermindern somit bestimmte Entzündungsreaktionen. Außerdem wird die Synthese

von NO (Stickoxiden) reduziert. Aufgrund der Reduktion der Synthese von Phospholipase A2 und Cyclooxygenase Typ 2 sowie einer verstärkten Produktion von Lipocortin-1, wird die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen gehemmt (LUNN and HOROHOV, 2010).

Ein weitere Wirkungsweise der Kortikosteroide ist ein hemmender Einfluss auf die Produktion von Adhäsionsmolekülen und somit eine reduzierte Emigration von Leukozyten aus den Blutgefäßen in die Entzündungsgebiete. Außerdem wird die Produktion von Endonukleasen gesteigert, was fördernd auf die Apoptose von Lymphozyten und Eosinophilen wirkt (LUNN and HOROHOV, 2010).

Kortikosteroide haben aber auch komplexe Effekte auf das adaptive Immunsystem. Dabei beeinflussen sie die Produktion von Antikörpern. Sie unterdrücken die Produktion von Antigen-spezifischen IgG<sub>a</sub> sowie IgG<sub>b</sub> Immunglobulinen und unterstützen die IgG(T) Antwort. Die Wirkstoffklasse hat außerdem hemmenden Einfluss auf Th1-vermittelte Immunantworten sowie Immunreaktionen vom Th2-Typ. Durch reduzierte Expression von Intergrinmolekülen, wie Selektin und Integrin hemmen Kortikosteroide die Migration von Neutrophilen (LUNN and HOROHOV, 2010).

Bei der Anwendung von Kortikosteroiden sollte man jedoch, neben den positiven Effekten der Immunsuppression, nicht das erhöhte Risiko negativer Nebenwirkungen, wie opportunistische (virale, bakterielle oder mykotische) Infektionen außer Acht lassen. Weitere unerwünschte Wirkungen können Flüssigkeitsretention oder Wundheilungsstörungen sein. Deshalb sollte vor allem eine systemische hochdosierte oder langanhaltende Therapie mit Kortikosteroiden stets mit Vorsicht angewandt werden (LUNN and HOROHOV, 2010).

Bei der Therapie von Asthma bzw. RAO ist der wesentliche Wirkmechanismus der Kortikosteroide die Inhibition der Rekrutierung von Entzündungszellen. Dazu gehören z.B. Neutrophile sowie zahlreiche allergie-vermittelnde Mediatoren (u.a. Zytokine), die in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen (GIGUERE et al., 2002). Neben dem direkten Einfluss von Kortikosteroiden auf die Aktivierung von Glukokortikoid-Rezeptoren, können diese auch indirekt durch die Hemmung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B wirken (GIGUERE et al., 2002).

In einer Studie von GIGUERE aus dem Jahr 2002 wurden die Auswirkungen einer inhalativen Fluticason-Therapie auf die Zytokinprofile von gesunden und RAO-Pferden getestet. Alle Probanden befanden sich zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung in Remission bzw. ohne Kontakt zu schimmelbefallenem Heu, die zweite Untersuchung fand nach Allergen-Exposition und die dritte nach der Behandlung mit Fluticason statt. RAO-Pferde zeigten in der Exazerbation wesentlich höhere IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ -Werte als gesunde Pferde und als vor der Provokation. IL-8 mRNA Expression, IL-4 sowie IFN $\gamma$  war bei RAO-Pferden höher als bei gesunden. Die Therapie mit Fluticason führte zur Normalisierung der klinischen Symptome, der Neutrophilen in der BAL und einem signifikantem Rückgang der IL-4 mRNA Expression sowie einem Anstieg des IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnisses in der BAL (GIGUERE et al., 2002).

#### **4. CpG-ODN (Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide)**

Die Prävalenz von Asthma beim Menschen ist in den vergangenen 30-40 Jahren stark angestiegen. Eine Hypothese zur Entstehung von Asthma besagt, dass die Erkrankung assoziiert ist mit einem verminderten Kontakt zu Bakterien oder bakteriellen Produkten in der frühen Kindheit (KLINE, 2007a). Einige Studien zeigen, dass Kinder, die mehrere ältere Geschwister haben, auf einem Bauernhof aufwachsen oder schon früh außerhalb des Elternhauses betreut werden, ein geringeres Risiko zur Entwicklung einer atopischen Erkrankung haben (KLINE, 2007a, KAISER, 2015).

Ausgehend von der „Hygiene-Hypothese“ besteht daher die Theorie, dass bakterielle DNA modulierend auf das Immunsystem wirkt (KLINE, 2007a). Der Unterschied von prokaryotischer DNA zur Säuger-DNA liegt in der Frequenz der Cytosin-Guanin Dinukleotide (CpG)-Motive sowie deren Methylierungsgrad.

Oligodeoxynukleotide (ODNs), die spezielle Basensequenzmotive (CpG ODN) beinhalten, können vom Immunsystem von Säugern als fremd erkannt werden und rufen bestimmte Effekte als Schutzmechanismus vor der scheinbar eindringenden Bakterien-DNA hervor (KLINE, 2007a). Diese CpG-Motive, wie sie in der DNA

von Viren oder Bakterien vorkommen, sind außerdem nicht methyliert und werden daher vom Körper als fremd erkannt (LATZ et al., 2004b). Die Erkennung dieser Motive durch das Immunsystems von Säugern führt zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr (LATZ et al., 2004b).

Spezielle Muster der mikrobiellen DNA sind dafür verantwortlich, dass das Immunsystem von Säugern potentielle Pathogene, wie Viren oder Bakterien als fremd erkennt (ZWIOREK et al., 2008, KRIEG et al., 1995). Dabei kann das angeborene Immunsystem sogenannten PAMPs (pathogen-associated-molecular-patterns), also bestimmte molekulare Muster, mithilfe von „pattern recognition receptors“ detektieren (KLINE and KRIEG, 2008). Ein solches PAMP und somit ein Schlüssel-Warnsignal für den Körper sind CpG-ODN (CpG-reiche unmethylierte DNA-Sequenzen), welche ihre Wirkung sowohl natürlich bei Kontakt mit Bakterien oder Viren, als auch mit synthetisch hergestellte CpG-ODN entfalten können (ZWIOREK et al., 2008). Der „pattern recognition receptor“ für die Erkennung von CpGs ist der in Endosomen lokalisierte Toll-Like receptor-9 (TLR-9) (KRIEG, 2002, KLINE and KRIEG, 2008). In einer Studie an Mäusen mit und ohne TLR-9-Gen, die CpG-ODN erhielten, zeichnete sich eine deutliche Entzündungsreaktion bei den Tieren mit vorhandenem Rezeptorgen, im Gegensatz zu den Mäusen ohne Rezeptor, ab (KNUEFERMANN et al., 2007). Daraus resultierte die Schlussfolgerung, dass die Erkennung der CpG-ODN-Sequenzen am TLR-9 erfolgt (KNUEFERMANN et al., 2007).

Im Genom von Säugern liegt Cytosin in der Regel methyliert vor, dadurch bzw. durch Umkehrung des Cytosin-Guanin Dinukleotids (GC) wird der TLR-9 davor geschützt durch körpereigene DNA aktiviert zu werden (KRIEG, 2002). Man geht jedoch auch davon aus, dass nicht nur die Methylierung, sondern auch die Lokalisation der TLR-9 im Endosom ein wichtiger Faktor ist, warum die eigene DNA „toleriert“ wird und es durch sie nicht zu einer ständigen Aktivierung des Rezeptors kommt (LATZ et al., 2004a, KRIEG, 2002).

Die CpG-ODN steigern die Produktion von Zytokinen der Th1-Immunantwort sowie von Tregs und unterdrücken somit die Th2-spezifischen Zytokine, welche eine Allergie-vermittelnde Immunantwort hervorrufen würden (KLINE, 2007a). Deshalb werden CpGs, entweder allein oder als Adjuvans für immunstimulatorische Therapieansätze und als Behandlungsmöglichkeiten für

atopische bzw. allergische Erkrankungen untersucht (KLINE, 2007a).

CpG werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen in verschiedene Klassen eingeteilt (Tab. 2). Bei verschiedenen CpG-Klassen wurden speziesspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit festgestellt (RANKIN et al., 2001, ZWIOREK et al., 2008).

**Tabelle 2:** Darstellung der verschiedenen CpG-Klassen (In Großbuchstaben: Nukleotide mit Phosphothioester Rückgrat; in Kleinbuchstaben: Nukleotide mit Phosphodiester-Rückgrat) (ZWIOREK et al., 2008).

CpG Klasse	Prototyp	Sequenz	Spezies-spezifität	Funktion
<b>A Klasse</b>	ODN 2216	5'GggggacgatcgtcGGG GGg3 <sup>a</sup>	human	- bindet an humanen TLR9 - stimuliert die Produktion von IFN- $\alpha$ und - $\beta$ in plasmazytären DC - schwach in der Aktivierung von B-Zellen
<b>B Klasse</b>	ODN 2006	5'TCGTCGTTTTGTC GTTTTGTCGTT 3 <sup>a</sup>	human	- aktivieren teilweise und induzieren die Maturation von plasmazelluläre DC - können die IFN- $\alpha$ und - $\beta$ Produktion nicht aktivieren, können B-Zellen aktivieren
	ODN 1826	5'TCCSATGACGTT CCTGACGTT 3 <sup>a</sup>	murin	s.o.
<b>C Klasse</b>	ODN M362	5'TCGTCGTCGTTTCG AACGACGTTGAT 3 <sup>a</sup>	intermediär	- intermediär zwischen A- und B-Klasse - kann die Sekretion von IFN- $\alpha$ und - $\beta$ in plasmazellulären DC aktivieren sowie die Proliferation von B-Zellen

Nicht nur die CpG-Klasse und somit die Basensequenz, sondern auch das Zuckerrückgrat der Nukleotide scheint hinsichtlich der speziesspezifischen Unterschiede in der Aktivierung des TLR-9 eine wichtige Rolle zu spielen (HAAS et al., 2008, KRIEG, 2002). Natürliche CpG-Motive besitzen ein Phosphodiester-Zuckerrückgrat, wohingegen synthetisch hergestellte CpGs an ein Phosphothioester-Zuckerrückgrat gebunden sind (HAAS et al., 2008). In einer Studie von HAAS et al. (2008) konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung des TLR-9s stark vom jeweiligen Zuckerrückgrat abhängig ist, das an die CpGs

gebunden ist sowie dass ein 2`Desoxyriboserrückgrat essentiell für die Einschaltung des Rezeptors ist.

Eine Studie von KLINMAN (2004) beschreibt die möglichen Anwendungsgebiete, bei denen der Einsatz von CpGs sinnvoll sein könnte. Dabei werden theoretisch mögliche Einsatzgebiete von CpGs beleuchtet. Man vermutet, dass CpGs einen positiven bzw. unterstützenden Effekt u.a. auf den Schutz des Immunsystems, bei der Behandlung von Krebs, zur Verbesserung der Immunantwort bei Impfungen sowie zur Erlangung einer verminderten Immunantwort bei Allergien haben könnten.

#### **4.1. Wirkmechanismen der CpG-Behandlung**

Durch die Therapie mit CpG-ODN wird sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort aktiviert (FLAMINIO et al., 2007). Die Aktivierung erfolgt durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle sowie die anschließende intrazelluläre Bindung der CpGs an die TLR-9 Rezeptoren (KRIEG, 2002). In der Folge kommt es zur Produktion zahlreicher Zytokine und chemotaktisch wirksamer Botenstoffe (KRIEG, 2002) (Abb. 3). TLR-9 Rezeptoren kommen beim Pferd in Neutrophilen der Lunge, bronchialen Epithelzellen, Zellen des Endothels von Kapillaren sowie in Makrophagen vor (SCHNEBERGER et al., 2009).

Wenn zusätzlich zu den CpGs gleichzeitig Antigen-Kontakt vorhanden ist, erzeugen die B-Lymphozyten vermehrt antigenspezifische Antikörper und es kommt außerdem zur Ausbildung von Gedächtniszellen, welche bei erneutem Antigenkontakt eine acht- bis zehnfach erhöhte Ausschüttung von Antikörpern bewirken (LUNN and HOROHOV, 2010). Aus plasmazytoiden, dendritischen Zellen (PDC) gehen antigenpräsentierende Zellen (APC) hervor (WARREN et al., 2000). Diese APC induzieren die vermehrte Produktion von Th1-Zytokinen sowie eine verstärkten Aktivierung von „major histocompatibility complex I and II“ (MHC I und II) (WARREN et al., 2000). Dabei bewirkt eine Präsentation eines Antigens auf dem MHC-I-Rezeptor eine Aktivierung zytotoxischer CD8+Zellen (zelluläre Immunantwort). Die Präsentation von Antigen durch den MHC-II-Rezeptor veranlasst die Bindung von CD4+Zellen, die die Synthese von Antikörpern induzieren (humorale Immunantwort) (KRIEG et al., 1995).

Ein weiterer Effekt, der durch die Therapie mit CpG-ODN erzielt wird, ist der sogenannte „Isotypenswitch“ der Immunglobuline (FONSECA and KLINE, 2009). Dabei werden statt der bei Allergien vorherrschenden IgE, vermehrt IgG2-Immunglobuline produziert, welche bei der Bekämpfung von Bakterien eine Rolle spielen. Diese IgG2-Subtypen konkurrieren nun mit den IgE um die gemeinsame Bindungsstelle an den Mastzellen (FONSECA and KLINE, 2009). Besetzt IgG2, anstelle von IgE die Bindungsstelle, kommt es nicht zur Degranulation der Mastzelle und somit auch nicht zur Freisetzung von Histamin durch Exozytose. Dadurch wird eine Allergiereaktion vom Typ 1 (Soforttyp) verhindert (FONSECA and KLINE, 2009, KLIER, 2011). Bei Pferden, die an RAO leiden, ist die Rolle, die IgE in der Pathogenese der Erkrankung spielt, bisher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (VAN DER HAEGEN et al., 2005).

Infolge der Aktivierung durch die benannten Mechanismen des angeborenen Immunsystems über den TLR-9 werden die Effekte des erworbenen Immunsystems verstärkt (KLINE and KRIEG, 2008).

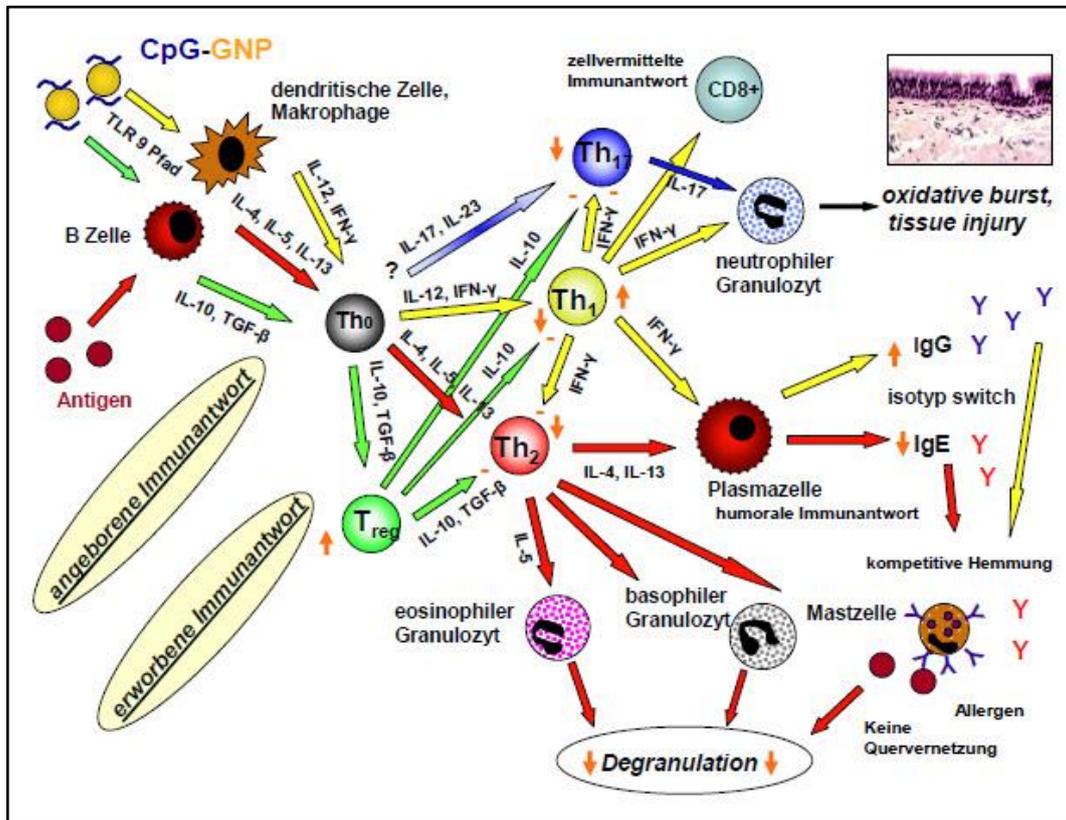
Durch das Zusammentreffen von CpG-ODN auf noch undifferenzierten CD4+T-Lymphozyten (Th 0) werden diese aktiviert. Dabei spielen unterschiedliche immunologische Pfade eine Rolle (BOHLE, 2002). Es erfolgt eine Aktivierung von Tregs, welche in der Lage sind die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren (HAWRYLOWICZ, 2005, MOSEMAN et al., 2004). Dabei wird das antiinflammatorische Zytokin IL-10 produziert, welches neben der inhibitorischen Wirkung auf Th2-Zytokine (z.B. IL-4), auch Th1-Zytokine (IFN- $\gamma$ ) hemmend beeinflussen kann (TAYLOR et al., 2006, VAN SCOTT et al., 2000). Außerdem bewirkt IL-10 eine periphere Toleranz des Körpers gegenüber T-Lymphozyten (TAYLOR et al., 2006).

Neben den Tregs werden durch den Kontakt mit CpG-Motiven auch Th1-Lymphozyten induziert. Vermittelt durch die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 kommt es zu einer vermehrte Freisetzung von IFN- $\gamma$ , einem wichtigen Th1-Zytokin (BOHLE, 2002). IFN- $\gamma$  wiederum wirkt hemmend auf die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (FONSECA and KLINE, 2009).

Die Behandlung mit CpG-ODN bewirkt eine Reduktion der profibrotischen Umbauvorgänge in der Lunge, einerseits durch eine verminderte TGF- $\beta$ 1-Expression, aufgrund der Unterdrückung der Th2-Immunantwort und andererseits

durch eine Reduktion der Anzahl an Myofibroblasten (KLINE, 2007a).

Die beschriebenen Wirkmechanismen sind entscheidend für den immunmodulatorischen Effekt der CpGs, weg von einer allergie-vermittelnden Th2-Immunantwort, hin zu einer zellulären Th1-Immunreaktion (KLINE, 2007b).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Effekte, die CpGs auf das Immunsystem bewirken können (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. John Klier, Klinik für Pferde, LMU München).

#### 4.2. Therapeutische Anwendungen von CpG ODN beim Menschen

Da Asthma bei Menschen in Industrieländern in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat und die Ursache mit verminderten Infektionen durch bakterielle und parasitäre Erreger in der frühen Kindheit in Verbindung gebracht werden, wurde am Maus-Modell der Effekt unmethylierter CpG-ODN getestet (BRAMAN, 2006, BRAUN-FAHRLANDER and LAUENER, 2003, KLINE, 2007a). In einer Studie konnte die allergie-vermittelte Th2-Immunantwort bei Mäusen mit Asthma durch Inhalation von Allergenen plus CpG-Motive reduziert werden. Das Ergebnis

zeigte, dass Eosinophilie, Th2-Zytokine, IgE-Produktion und bronchiale Hyperreagibilität in den Atemwegen durch die Therapie vermindert werden konnten (KLINE et al., 1998).

Die Hypothese, dass CpG-ODN das Immunsystem in Richtung einer Th1-Immunantwort stimulieren können, konnte so in einem Tiermodell bestätigt werden (BOHLE, 2002). Deshalb wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um den Einsatz von CpGs bei atopischen Krankheiten des Menschen zu testen (KLINE, 2007b). In einer Studie von SENTI et al. (2009) wurden CpGs der A-Klasse gemeinsam mit Allergen-Extrakt von Hausstaubmilben subkutan bei allergischen Patienten verabreicht. Dabei konnten Sicherheit, Toleranz und klinischer Effekt der Therapie festgestellt werden. Nach 10-wöchiger Behandlung waren die Patienten weitestgehend symptomfrei und der Effekt hielt über mindestens 38 Wochen nach Therapieende an (SENTI et al., 2009).

In einem Review von FARROKHI et al. (2017) wurden mehrere Studien, in denen Menschen mit allergisch-bedingten Erkrankungen, wie z.B. Asthma oder allergische Rhinitis, mit CpG-ODN behandelt wurden, betrachtet. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Einsatz von CpG-ODN eosinophile Entzündungen, die Th2-Immunantwort (u.a. IL-4 und IL-5) sowie IgE-Niveaus reduzieren konnten. Gleichzeitig konnten T-regs induziert und eine Th1-Immunantwort verstärkt werden (FARROKHI et al., 2017).

#### **4.3. Therapeutische Anwendungen von CpG ODN bei Pferden**

Neue therapeutische Möglichkeiten in der Immuntherapie mit CpG-ODN wurden auch in der Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen von Equiden (z.B. bei RAO, als Impfadjuvans oder bei der Therapie von immundefizienten Fohlen) bereits untersucht (KLIER, 2011, KLIER et al., 2015b, BEHRENS and GERSHWIN, 2015, COHEN et al., 2014).

In einer Studie aus dem Jahre 2011 wurden verschiedene CpG-Motive bezüglich ihres immunmodulatorischen Einflusses auf BAL-Zellen sowohl von gesunden als auch von an RAO-erkrankten Pferden, getestet (KLIER et al., 2011). Dabei resultierte, dass CpGs der A-Klasse 2216 den besten immunmodulatorischen Effekt, weg von einer Allergie-vermittelnden Th2-, hin zu einer zellvermittelten Th1-Immunantwort, hatten (Th-2/Th1-Shift) (KLIER et al., 2011). Deshalb

entschied man sich in einer anschließenden in vivo Studie, in der sowohl gesunde, als auch RAO-Pferde behandelt wurden, für diese CpG-Sequenz, die an Gelatinenanoartikel (GNP) als Trägersystem gebunden wurde (KLIER et al., 2012). Es wurden vor und nach insgesamt 5 Inhalationsbehandlungen BAL-Proben gewonnen und dabei konnte eine Hochregulation des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 festgestellt werden sowie eine Verbesserung der klinischen Symptomatik (KLIER et al., 2012).

In einer Folgestudie erhielten 24 RAO-Pferde insgesamt fünf Inhalationen, entweder mit Placebo oder mit der Kombination aus CpG-ODN-GNP und wurden drei Mal klinisch untersucht (vor Therapie, im Anschluss an die letzte Behandlung und nach vier Wochen) (KLIER et al., 2015b). Dabei konnte bei der CpG-Therapie, im Gegensatz zur Placebo-Gruppe, in zahlreichen klinischen Parametern signifikante Ergebnisse erzielt werden und auch hinsichtlich des Langzeiteffekts erhob man vielversprechende Ergebnisse (KLIER et al., 2015b).

Weiterführend wurden in einer anschließenden Studie 20 RAO-Pferde in zwei Behandlungsgruppe unterteilt, wobei eine Hälfte CpG-GNP allein und die zweite Hälfte der Patienten CpG-GNP in Kombination mit Allergenen inhaliert bekamen. Für jedes Pferd wurden zwei individuelle Allergene ausgewählt, die anhand eines funktionellen in vitro Tests sowie mithilfe der Anamnese bestimmt wurden (KLIER et al., 2015a). Sowohl die Behandlung mit CpG-GNP, als auch die Kombination mit den spezifischen Allergenen wies signifikante Verbesserungen in zahlreichen klinischen Parametern, wie Interpleuraldruck, arterielle Blutgase und Menge des Trachealschleims auf. Diese Befunde konnten sowohl direkt nach der letzten von sieben Inhalationen sowie im Abstand von 6 Wochen nach der Behandlung, erhoben werden. Jedoch zeigte sich im direkten Vergleich zwischen den zwei Gruppen kein signifikanter Vorteil bei der Therapie mit den Allergenen (KLIER et al., 2015a). Dies deutet auf eine allergenunabhängige Immunmodulation durch die CpG-Behandlung hin (KLIER et al., 2015a).

Nicht nur in der Therapie von RAO, sondern auch als Adjuvans von Impfstoffen fiel das Interesse der Forschung auf CpG-ODN. Es gibt Pferde, die Allergien gegen bestimmte Komponenten (z.B. non-target Proteine) von Impfstoffen entwickeln können und im Falle einer Impfung mit einer IgE-vermittelten Immunantwort auf die Adjuvantien reagieren (BEHRENS and GERSHWIN, 2015). In einer Studie aus

dem Jahr 2015 wurde der Effekt von CpGs der B Klasse als Impfadjuvans einer West Nile Virus Impfung getestet (BEHRENS and GERSHWIN, 2015). Dabei konnte man mithilfe des CpG-Zusatzes erhöhte Zahlen an Tregs sowie eine verminderte IgE-vermittelte Immunantwort feststellen. Daraus resultierte das Ergebnis, dass insbesondere bei Pferden, die zu einer pro-allergischen Immunantwort neigen, CpGs ein sinnvoller Zusatz von Impfungen zum Schutz vor einer Typ I Immunreaktion sein könnten (BEHRENS and GERSHWIN, 2015).

Bei der Impfung mit einem Totimpfstoff des equinen Influenza Virus (EIV) wurden einem Teil der Patienten zusätzlich CpG-ODN (0,25mg/Pferd) injiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Zusatz von CpG-ODN 2007 (B Klasse) zur Vakzine die antigen-spezifische Antikörperantwort verstärkte. Daraus wurde gefolgert, dass CpGs die Wirkung von Impfstoffen gegen infektiöse Viruserkrankungen unterstützen könnten (LOPEZ et al., 2006).

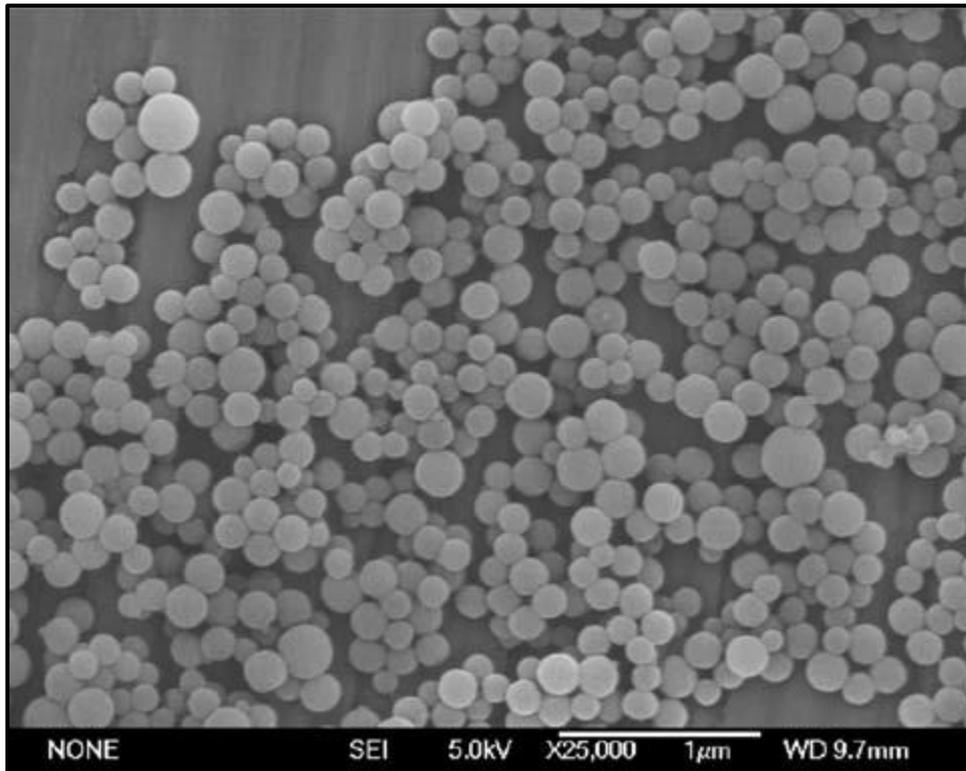
Fohlen besitzen bei der Geburt noch kein vollständig ausgebildetes Immunsystem und die unspezifische Immunabwehr, des angeborenen Immunsystems spielt eine wichtige Rolle in der der Abwehr von Infektionskrankheiten (LIU et al., 2009, COHEN et al., 2014). Untersuchungen von neutrophilen Granulozyten bei Fohlen, die intramuskulär mit CpGs behandelt wurden zeigen, dass CpG-ODN sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem unterstützen könnten (COHEN et al., 2014).

Man geht davon aus, dass Fohlen häufig unter Infektionen mit *Rhodococcus equi* leiden, da sie noch nicht in der Lage sind IFN- $\gamma$  zu produzieren und die Erkennung der Pathogene durch TLR-Rezeptoren noch nicht vollständig funktioniert (KAUR et al., 2013). In einer anderen Studie konnte jedoch die Infektion mit *Rhodococcus equi* trotz Impfung mit VapA-spezifischem Antikörper plus CpG ODN nicht verhindert werden (LOHMANN et al., 2013). Eine wahrscheinliche Ursache für Unfähigkeit der Impfung vor einer Infektion mit *R. equi* zu schützen ist, dass durch die Impfung nur eine ungenügende Stimulation der IFN- $\gamma$  und der VapA-spezifischen systemischen Antikörper Produktion erreicht werden konnte (LOHMANN et al., 2013).

## **5. GNP (Gelatinenopartikel)**

Die direkte therapeutische Applikation von DNA ist nur in sehr wenigen Ausnahmefällen sinnvoll, da aufgrund enzymatischen Abbaus und elektrostatischer Abstoßung durch die negativ geladenen Zellwände, keine effiziente Aufnahme von DNA in die Zellen erfolgt (ZWIOREK et al., 2005). Deshalb wird für die Aufnahme von DNA in Körperzellen ein Trägersystem benötigt.

Eine Möglichkeit für ein solches Trägersystem stellen Gelatinenopartikel (GNP) dar (Abb. 4). Diese werden aus Gelatine des Typs A hergestellt, welche aus der Haut von Schweinen (175 Bloom) gewonnen wird. Typ A bedeutet, dass ein thermischer und säurekatalysierter Aufschluss der Schweinehaut durchgeführt wird (BABEL, 1996). Als stabiles, kolloidales Trägersystem können die GNP, durch ihre positive Ladung, DNA elektrostatisch an sich binden (ZWIOREK et al., 2008). Große Vorteile der GNP liegen darin, dass sie biologisch abbaubar, biologisch verträglich und immunologisch inaktiv sind (ZWIOREK et al., 2008). Auch von der US Food and Drug Administration (FDA) wurde Gelatine als generell sicher eingestuft („Generally Recognized as Safe“) (ZWIOREK et al., 2008). Außerdem verstärken sie die spezifische Zellaufnahme und bewirken eine bessere intrazelluläre Verteilung (ZWIOREK et al., 2005, BOURQUIN et al., 2008, FUCHS et al., 2012).



**Abbildung 4:** Darstellung von Gelatinenanopartikeln mittels Rasterelektronenmikroskop (ZWIOREK et al., 2008).

Um die Aufnahme der CpG-ODN in die Zellen zu verbessern und sie vor Degeneration durch Nukleasen zu schützen, fungieren Gelatinenanopartikel durch sterische Abschirmung als potentes Trägersystem (ZWIOREK et al., 2008). Eine 5%ige Beladung (Verhältnis: 1:20) der GNP mit CpG-ODN wurde als ideal eingestuft (ZWIOREK et al., 2008). Bei diesem Verhältnis kann eine stabile Verbindung durch elektrostatische Anziehung mit den CpGs gewährleistet werden, ohne dass es zu Aggregationen kommt (ZWIOREK et al., 2008).

Um die pulmonale Verwendung von CpG gebunden an GNP zu testen, wurde die Kombination der beiden entweder mittels Dosieraerosol oder Ultraschallvernebler bei BAL-Lymphozyten von Pferden untersucht. Dabei waren die vernebelten CpG-GNP in der Lage, die Produktion von IL-10 der Lymphozyten in vitro zu erhöhen (FUCHS et al., 2012). Somit war eine neue Möglichkeit für eine immunstimulatorische Inhalationstherapie geschaffen. Die Anwendung einer CpG-GNP Verbindung zur inhalativen Behandlung von Pferden, die an RAO leiden, brachte in vorhergehenden Studien vielversprechende Ergebnisse hervor (KLIER et al., 2011, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a).



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Ziele der Studie**

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive, randomisierte, doppelverblindete klinische Feldstudie, durchgeführt bei Pferden, die an RAO leiden. Die Randomisierung erfolgte mittels einer geschichteten Zufallsverteilung. Die Ziele bestanden darin, in einer Dosis-Wirkungsstudie zwei verschiedene Dosierungen der CpG-GNP-Inhalationstherapie anzuwenden, um einen Vergleich zu haben, ob die bisher verwendete Dosierung der idealen Dosierung entspricht oder ob mit einer höheren Dosis, eine Verbesserung der Wirkung erreicht werden kann (Klinische Studie der Phase IIb). Außerdem galt es, die Behandlung im Vergleich zu einer konventionellen Inhalationstherapie mit einem Kortikosteroid zu untersuchen. Die Behandlungen wurden sowohl in Hinblick auf Wirkung, als auch auf Verträglichkeit getestet sowie die Langzeitwirkung zwei Monate nach der letzten Inhalation evaluiert. Die doppelte Verblindung bedeutet in dieser Studie, dass weder die Patientenbesitzer noch der untersuchende Tierarzt wussten welche Medikation die Pferde erhalten haben.

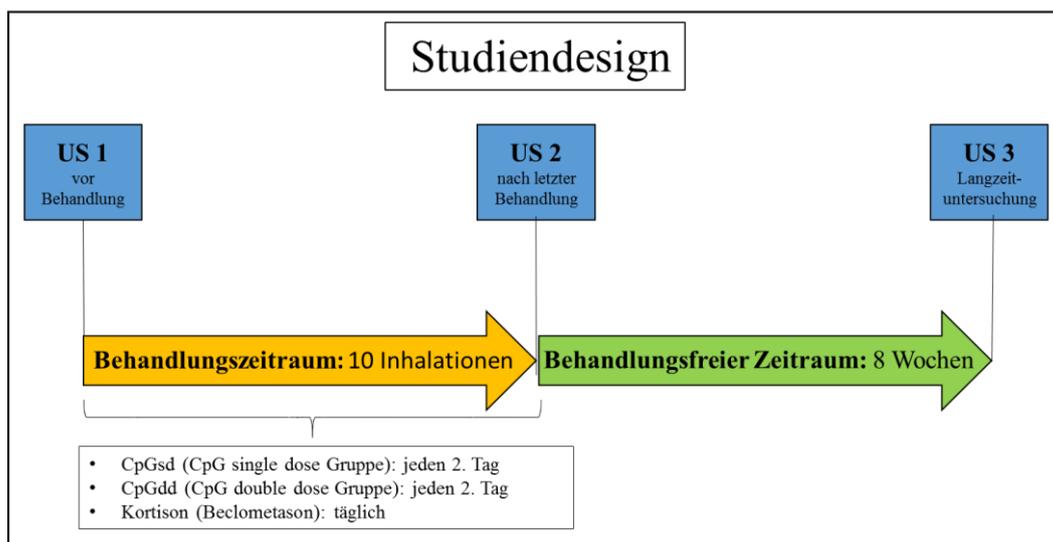
#### **2. Studiendesign**

Insgesamt wurden 29 RAO-kranke Pferde in die Studie integriert. Die Patienten wurden in drei Gruppen unterteilt. Die Zuteilung der Patienten in die verschiedenen Gruppen erfolgte im Sinne einer geschichteten Zufallsverteilung, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der unterschiedlichen Rassen, Altersklassen sowie Haltungsformen in die drei Gruppen gewährleisten zu können.

Die Patienten in Gruppe 1 (n=11), genannt CpG single dose (CpGsd), erhielten CpG-GNP in der bereits in vorhergehenden Studien verwendeten Dosierung von 187,5µg CpGs pro Inhalation. Die zweite Gruppe (n=9) bekam Inhalationen mit der doppelten Dosierung von 375µg CpGs je Inhalation verabreicht (CpG double dose=CpGdd). Pferde der Gruppe 3 (n=9) wurden mit Beclometason, einem inhalativem Kortikosteroid, in einer Dosierung von 1500µg (RUSH et al., 2000) pro Inhalation behandelt (Kortisongruppe). Die variierende Anzahl an Pferden pro

Behandlungsgruppe kam durch „Drop-out“, also dem Ausscheiden einzelner Patienten im Verlauf der Studie, zustande. Aufgrund studienunabhängiger Ursachen, wie fehlender Compliance der Besitzer oder der Verabreichung von Medikamenten zur Behandlung anderer Erkrankungen konnten die Gruppengrößen nicht einheitlich gestaltet werden. Insgesamt erhielten alle Pferde 10 Inhalationen. Die beiden CpG-Gruppen wurden, in Anlehnung an vorhergehende Studien (KLIER, 2011, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a), jeden zweiten Tag behandelt. Die Kortison-Therapie erfolgte täglich, da aufgrund der Wirkdauer von Beclometason etablierte Protokolle eine tägliche (1-2 x tägliche) Inhalation empfehlen (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

Alle Patienten wurden insgesamt drei Mal untersucht. Die erste Untersuchung (US1), die zur Evaluierung des Schweregrades der Erkrankung und als Ausgangswert vor der Behandlung diente, wurde zwei Tage vor der ersten Inhalation durchgeführt. Die zweite Untersuchung (US2) zur Bewertung des Therapieerfolges erfolgte zwei Tage nach der letzten Inhalation und die finale Untersuchung (US3), zur Kontrolle des Langzeiteffekts, fand acht Wochen nach der letzten Behandlung statt (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Studie.

### **3. Patienten**

Die Durchführung der Studie wurde im Rahmen eines Tierversuches von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 55.2-1-54-2532-207-13). Außerdem gaben alle Pferdebesitzer, nach umfangreicher Aufklärung, ihre schriftliche Zustimmung für die Teilnahme ihres Pferdes an der Studie.

Es wurden insgesamt 29 an RAO erkrankte Pferde im Alter zwischen 7 und 30 Jahren (mittleres Alter: 19 Jahre) in die klinische Feldstudie aufgenommen. Die Pferdebesitzer wurden über die Klinik für Pferde der LMU München auf die Studie aufmerksam. Zum Teil gehörten die Pferde bereits zuvor zum Patientenklientel der Klinik. Alle Probanden konnten anhand der Befunde der klinischen Untersuchung und des Besitzer-Fragebogens HOARSI, als mindestens mittelgradig an RAO erkrankt, eingestuft werden (LAUMEN et al., 2010). Die teilnehmenden Pferde zeigten seit mindestens einem Jahr bis hin zu 20 Jahren (Durchschnitt ca. 7,3 Jahre), wiederkehrende klinische Symptome einer RAO. Für die Aufnahme in die Studie musste der Abstand zur letzten Behandlung der Atemwege oder zu einer Kortikosteroid-Therapie aufgrund anderer Ursachen mindestens vier Wochen zurückliegen. Alle Pferde verblieben während der Dauer des gesamten Versuches in ihren Heimatställen, in ihrer gewohnten Umgebung und an den bestehenden Haltungsbedingungen (Einstreu und Fütterung) sowie der reiterlichen Nutzung wurden keine Änderungen vorgenommen.

Es wurde für jeden Patienten eine eingehende Anamnese, vor allem hinsichtlich des Verlaufs der Atemwegsproblematik, der Haltungsbedingungen und der Leistungsbereitschaft erhoben. Diese wurde mittels eines standardisierten Untersuchungsprotokolls dokumentiert (IX. Anhang, Kapitel 1.1., S.201f).

### **4. Inhalationen**

#### **4.1. Verwendete CpG-ODN**

Als CpGs wurden einzelsträngige ODNs der A-Klasse vom Typ 2216 CpG-ODN (5`G\*G\*GGGACGATCGTCG\*G\*G\*G \*G\*G-3`) verwendet (Biomers GmbH, Ulm, Deutschland), wobei die mit \* markierten Basen ein Phosphothioesterrückgrat und die unmarkierten Basen ein Phosphodiesterückgrat besitzen. Es wurden CpGs

der A-Klasse gewählt, da in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden konnte, dass diese in besonderem Maße die Stimulation von BAL-Zellen des Pferdes bewirken konnten (KLIER, 2011).

#### **4.2. Herstellung der GNP**

Die Gelatinenanopartikel wurden unter aseptischen Bedingungen von Apothekerin Katharina Geh (Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, LMU München) unter Optimierung der von Coester et al. bereits etablierten Produktionsmethode hergestellt (COESTER et al., 2000, ZWIÖREK et al., 2008, GEH et al., 2016).

Die GNP wurden mittels eines fortschrittlichen Ein-Schritt Desolvations-Protokolls hergestellt (GEH et al., 2016). Dazu wurde Gelatine vom Typ A, mit einer Gelierkraft von 175 Bloom, gewonnen aus Schweinehaut, verwendet. Unter Zuhilfenahme von Aceton und Glutaraldehyd konnten sich die GNP zuerst formieren und dann durch Entstehung von Kreuzverbindungen stabilisieren. Im Anschluss wurde die Oberfläche der GNP mit einer positiven Ladung versehen (ZWIÖREK et al., 2008). Sowohl die Partikelgröße, als auch das Zetapotential der Nanopartikel wurden unter Zuhilfenahme einer Zetasizers ZS Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) analysiert und die Ausbeute an gewonnen GNP im Anschluss gravimetrisch gemessen.

#### **4.3. Beladung der GNP mit CpG-ODN**

Die Beladung der Gelatinenanopartikel mit den CpG-ODN erfolgte in der sterilen Werkbank. Für die CpGs wurden 187,5µg CpGs mit 3,75mg GNP in einem Gesamtvolumen von 2,5ml High purified water (HPW) gelöst. Die Konzentration der CpG ODN betrug somit 0,075 mg/ml und die der GNP 1,5mg/ml. Dies entspricht einem Verhältnis von 1 zu 20 (5%ige Beladung). Die zweifache Menge aller Komponenten wurde für die CpGdd verwendet. Dementsprechend wurden 375µg CpG und 7,5mg GNP in 5ml HPW gelöst. Bei einer Temperatur von 22°C wurde die Lösung, unter sanftem Schütteln bei 300mm auf einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) für 90min inkubiert (KLIER et al., 2011).

Mit Hilfe eines Spektrophotometers wurde anschließend stichprobenartig die Effizienz der Beladung der CpGs auf die GNP kontrolliert. Bei einer Wellenlänge von 260nm wurden sowohl die unbeladenen GNP, als auch die CpG-GNP

gemessen und im Anschluss die prozentuale Ladungskapazität errechnet. Hierbei wurde eine Mindestanforderung festgelegt, die besagt, dass mindestens 98% der GNPs mit CpGs beladen sein sollten. Dieser Wert konnte konstant erreicht werden.

Zur Qualitätskontrolle der CpG-GNP-Formulierung wurden Größe und Verteilung der Partikel bestimmt. Die hergestellten GNP wiesen eine monodisperse Größenverteilung ( $PDI < 0,1$ ) und hydrodynamische Durchmesser zwischen 176,6 nm ( $\pm 1,01$  nm) und 312,4 nm ( $\pm 2,96$  nm) auf (Resultate ermittelt von Katharina Geh, Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, LMU Munich). Nach der Beladung mit CpGs wurde erneut gemessen und dabei lag die Größenverteilung etwas niedriger ( $PDI 0,38 \pm 0,09$ ) und die hydrodynamischen Durchmesser bei ca. 50 nm etwas höher. Die niedrigere Größenverteilung nach Beladung kann durch Ausbildung von einer geringen Anzahl an Aggregaten (ca. 4-5  $\mu\text{m}$ ) auftreten, was in diesem Umfang keinerlei Einfluss auf die Wirksamkeit hat.

#### **4.4. Kortisontherapie**

Die Effekte der CpG-GNP Therapie sollten mit einer herkömmlichen Therapie bei RAO verglichen werden. Eine häufig eingesetzte Behandlungsmethode stellt eine inhalative antiinflammatorisch wirksame Anwendung von Kortikosteroiden dar. Da auf dem deutschen Markt kein tiermedizinisches inhalatives Kortikosteroid für die Anwendung mit einem Vernebler zur Verfügung stand, wurde das humanmedizinische Produkt Sanasthmax 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Suspension (Chiesi GmbH, Hamburg) in einer Dosierung von 1600 $\mu\text{g}$  Beclometason pro Pferd je Inhalation gewählt (Umwidnungskaskade) (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Die Patienten der Kortisongruppe erhielten die Inhalationen gemäß etablierter Therapieempfehlungen täglich, an 10 aufeinanderfolgenden Tagen (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Die Behandlung erfolgte 1x täglich, da u.a. NIEDERMEIER und GEHLEN bei vielen Pferden auch eine 1x tägliche Anwendung als ausreichend beurteilten (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009, HOFFMAN, 1997). Die Anzahl an Inhalationsbehandlungen lag somit sowohl bei der Beclometason-, als auch bei den 2 CpG-Gruppen bei insgesamt 10 Mal.

#### **4.5. Inhalationssystem**

Als Inhalationssystem für die verabreichten Inhalations-Therapien wurde als Spacer der Equine Haler<sup>TM</sup> (Equine Healthcare ApS, Dänemark) in Kombination

mit dem Vernebler Aeroneb® Go Micropump Nebulizer (INSPIRATION Medical GmbH, Bochum) verwendet (Abb. 6). Diese Kombination wurde bereits in vorhergehenden Studien getestet und erfolgreich eingesetzt (KLIER, 2011, KLIER et al., 2015b). Die Leistung des Aeroneb® Go Verneblers liegt bei einer durchschnittlichen Partikelgröße von 3,6µm aerodynamischer Durchmesser (MMAD). Der Aeroneb® Go funktioniert durch seine Schwingmembran wie eine elektronische Mikropumpe. Dadurch wird ein Niedriggeschwindigkeit-Aerosol produziert, was eine gute Verteilung des Inhalats in der Lunge gewährleistet. Es werden Tröpfchen einheitlicher Größe gebildet und das verabreichte Medikament bleibt während der Verneblung unversehrt (VECELLIO et al., 2009).



**Abbildung 6:** Das Inhalationssystem: eine Kombination aus dem Spacer, Equine Haler™ (Equine Healthcare ApS, Dänemark) sowie dem Vernebler, Aeroneb® Go Micropump Nebulizer (INSPIRATION Medical GmbH, Bochum).

Sowohl die CpG-GNP-Therapien als auch die Behandlung mit Beclometason wurde mittels desselben Verneblersystems sowie desselben Spacers verabreicht, um eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Therapieformen erreichen zu können. Jede Behandlungsgruppe (CpGsd, CpGdd und Kortison) bekam die Medikation mithilfe einer eigenen Kombination aus Equine Haler™ plus Aeroneb® Go verabreicht, um die Reinhaltung der jeweiligen Therapieform gewährleisten zu können.

#### 4.6. Durchführung der Inhalationen

Die Inhalationsbehandlungen wurden in den Heimatställen der Pferde ohne

Anwendung von Zwangsmaßnahmen durchgeführt (Abb. 6 und 7). Die Anwendung der Therapiemaßnahme wurde von allen Probanden gut toleriert, da die Verneblung der Medikamente mittels Ultraschallvernebler geräuschlos erfolgt und die Handhabung des Equine Halers<sup>TM</sup> sehr flexibel mit der Bewegung des Pferdekopfes möglich ist.



**Abbildung 7:** Verabreichung einer Inhalationsbehandlung mittels Equine Haler<sup>TM</sup> (Spacer) in Kombination mit dem Ultraschallvernebler AERONEB® Go (KLIER, 2011). Der Spacer wird vollständig auf eine Nüster aufgesetzt. Um eine noch tiefer Inspiration zu forcieren, kann die andere Nüster mit einer Hand bedeckt werden. Die Behandlungsdauer liegt bei ca. 5-10 Minuten pro Behandlung.

Das Inhalationsschema sah insgesamt 10 Inhalationen pro Pferd vor. Dabei wurden die Patienten, die die CpG-Therapie (CpGsd und CpGdd) erhielten, in Anlehnung an die Therapieprotokolle vorhergehender Studien, jeden zweiten Tag inhaliert

(KLIER, 2011, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a). Das 2-Tages-Intervall wurde gewählt, da CpGs in in-vivo Studien eine Stabilität von bis zu 48h zeigten (MUTWIRI et al., 2004). Die Gesamtzahl an Inhalationen wurde im Vergleich zu den vorangegangenen Studien allerdings auf insgesamt 10 Inhalationen erhöht (Klier et al., 2015; Klier et al., 2011). Die Kortisongruppe erhielt tägliche Inhalationen (alle 24 Stunden), an 10 aufeinanderfolgenden Tagen (Rush et al., 2000). Die Behandlungen erfolgten im Zeitraum von Anfang April bis Ende August 2015. Pferde aller drei Gruppen wurden zeitlich parallel behandelt, um mögliche saison- und wetterabhängige Einflussfaktoren auf die Ergebnisse so gut wie möglich ausschließen zu können.

## **5. Klinische Studie**

### **5.1. Allgemeine Untersuchung**

Alle Patienten wurden eingehend klinisch untersucht. Dabei wurden die folgenden Parameter bewertet und mittels eines standardisierten Protokolls dokumentiert (IX. Anhang, Kapitel 1.1., S.201f): Haltung, Verhalten, Habitus, Ernährungszustand und Pflegezustand. Außerdem wurde sowohl die Atemfrequenz (AF) als auch der Atemtyp beurteilt, wobei eine Frequenz von 8-16 Atemzügen und ein costoabdominaler Atemtyp als physiologisch beurteilt wurde. Die rektale Temperatur wurde gemessen (Normbereich: 37,0°-38,0°C) und die Pulsfrequenz (Normbereich: 28-40) ausgezählt sowie das Herz zum Ausschluss kardialer Erkrankungen auskultiert. Es wurden die Mandibularlymphknoten palpirt und auf mögliche Größenveränderungen und Schmerzreaktionen hin getestet, um Anzeichen einer möglichen Infektion ausschließen zu können. Es fand eine Beurteilung des Nasenausflusses statt, wobei es als physiologisch angesehen wurde, wenn kein Nasenausfluss vorhanden war bzw. höchstens wenige Tropfen eines klaren, wässrigen Sekrets auftraten. Des Weiteren wurde die Auslösbarkeit von Husten mittels Druckausübung auf die erste Trachealspange getestet (GLITZ and DEEGEN, 2002).

### **5.2. Spezielle Untersuchung des Respirationstrakts**

Die Ergebnisse der speziellen Lungenuntersuchung wurden in einem

standardisierten Protokoll dokumentiert (IX. Anhang, Kapitel 1.2., S.203f).

### **5.2.1. Auskultation der Atemwege**

Bei allen Patienten wurde eine Übersichtauskultation der Lunge durchgeführt. Dafür wurde das Lungenfeld beidseits auf Höhe der *Bifurkation tracheae*, im kranioventralen sowie im kaudodorsalen Bereich der Lunge mithilfe eines Stethoskops (Littmann Classic, 3M Deutschland GmbH, Neuss) abgehört. Außerdem wurde die Trachea kranial im Bereich des Kehlkopfs und kaudal davon vor dem Eintritt in den Brustkorb auskultiert.

Zur Bewertung der Auskultationsbefunde wurde das Bewertungssystem nach Robinson herangezogen (ROBINSON, 2001). Die Bewertungsskala reicht von einem physiologischen Auskultationsbefund (Grad 0) bis hin zu deutlichen Atemnebengeräuschen wie Giemen oder Rasseln (Grad 4) (ROBINSON, 2001):

- 0 = physiologischer Auskultationsbefund
- 1 = geringgradige Abweichungen des Auskultationsbefunds
- 2 = mittelgradige Abweichungen des Auskultationsbefunds
- 3 = hochgradige Abweichungen des Auskultationsbefunds
- 4 = Giemen oder Rasseln

### **5.2.2. Rückatmungsprobe**

Für die Rückatmungsprobe wurde den Pferden für ca. 1-2 Minuten eine Tüte über die Nüsterngegend gelegt, um eine Forcierung der Atmung zu provozieren. Bei der gleichzeitig stattfindenden Auskultation der Lunge und der Luftröhre können gegebenenfalls Atemnebengeräusche leichter wahrgenommen werden (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Auf diesem Wege wurde außerdem die Atemerholung anhand der Anzahl der Atemzüge, die das Pferd benötigt, um wieder zum ursprünglichen Atemmuster zurückzukehren, bewertet. Als physiologische Erholungszeit wurden 4 Atemzüge zugrunde gelegt. Die Rückatmungsprobe gab zusätzlich Hinweis darauf, ob das Pferd die vermehrte CO<sub>2</sub>-Aufnahme gut kompensieren konnte oder ob schon nach kurzer Zeit Husten oder Anzeichen von Dyspnoe auftraten (DIXON et al., 1995).

### **5.2.3. Lungenperkussion**

Unter Zuhilfenahme eines Plessimeters sowie eines Perkussionshammers wurden die Lungenfelder der Pferde auf beiden Seiten perkutiert. Dabei wurden die

Schallqualität und die Größe des Lungenfeldes beurteilt. Als physiologische Lungengrenzen wurden der 16. Interkostalraum auf Höhe des Hüfthöckers, der 14. Interkostalraum auf Höhe des Sitzbeinhöckers, die Interkostalräume 9 bis 11 auf Höhe des Schultergelenks sowie der 6. Interkostalraum auf der Höhe des Ellbogengelenks zugrunde gelegt. Vor allem im kaudodorsalen Bereich des Lungenfeldes kann bei einer zugrundeliegenden Hyperinflation (Überblähung) der Lunge bzw. einem Lungenemphysem, verursacht durch „Air trapping“, eine Vergrößerung des Lungenfeldes festgestellt werden (Abb. 8) (DAVIS and RUSH, 2002).



**Abbildung 8:** Vergrößertes Lungenfeld (ca. eine Hand breit verbreitert), evaluiert durch Lungenperkussion.

#### 5.2.4. Arterielle Blutgasmessung

Zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks ( $\text{PaO}_2$ ) und des Kohlendioxidpartialdrucks ( $\text{PaCO}_2$ ) wurde den Patienten arterielles Blut

abgenommen. Die Entnahme erfolgte an der *Arteria carotis communis* auf der rechten Körperseite. Als Normwerte wurden für den O<sub>2</sub>-Partialdruck 100mmHg (+/-5) sowie für den CO<sub>2</sub>-Partialdruck 40mmHg(+/-5) festgelegt (GRABNER and FEY, 2005, ROBINSON, 2001). Die gewonnenen Proben wurden direkt im Anschluss an die Gewinnung mit einem mobilen Blutgasgerät (Irma TRUpoint, Keller Medical GmbH, Bad Soden) analysiert.

Unter Berücksichtigung des jeweils vorherrschenden Barometerdrucks wurde außerdem die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz (AaDO<sub>2</sub>) berechnet (GRABNER and FEY, 2005). Diese dient dazu, anhand der bestehenden Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke, unter Berücksichtigung der gegebenen äußeren Bedingungen, die Erkrankung in unterschiedliche Schweregrade einteilen zu können.

Einteilung der COB anhand des AaDO<sub>2</sub> nach Grabner (GRABNER and FEY, 2005):

- Latent COB: <10 mmHg (5,4 ± 5 mmHg)
- Geringgradig COB: 10-15 mmHg
- Mittelgradig COB: 15-25 mmHg
- Hochgradig COB: >25 mmHg

Die Formel zur Berechnung der arterioalveolären Sauerstoffdifferenz (AaDO<sub>2</sub>) lautet wie folgt:

$$\mathbf{AaDO_2 = P_{AO_2} - PaO_2}$$

$$P_{AO_2} = (P_B - 47 \text{ Torr}) \times 0,2095 - PaCO_2$$

$$P_B = \text{aktueller Barometerdruck in Torr (1 Torr} \approx 1\text{mmHg; 1 Torr} \approx 133,3 \text{ Pa)}$$

Der aktuelle Luftdruck des jeweiligen Standorts zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde der Internetseite „<http://www.wetteronline.de>“ entnommen.

### **5.2.5. Messung des Interpleuraldrucks**

Die Messung des Interpleuraldrucks erfolgte indirekt mithilfe einer Sonde (ösophagealer Ballonkatheter), die über den ventralen Nasengang in den Ösophagus

bis auf Höhe der Herzbasis eingeführt wurde. Bei der Untersuchung wird die Druckdifferenz zwischen In- und Expiration gemessen (DEEGEN and KLEIN, 1987). Für die Durchführung der Interpleuraldruckmessungen wurde ein Venti-Graph (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim) verwendet. Die Bestimmung des Interpleuraldrucks erfolgte idealerweise am unsedierten Pferd (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Indirekte Lungendruckmessung (Interpleuraldruckmessung) mittels Venti-graph (Boehringer Ingelheim, Deutschland) am nicht-sedierten Pferd.

Bei der Untersuchung wird die Atmung in Ruhe bewertet, in dem über einen Zeitraum von ca. 10 regelmäßigen Ein- und Ausatmungen von dem Gerät eine atemsynchrone Kurve aufgezeichnet wird (DEEGEN and KLEIN, 1987). Werte, die über 10cmH<sub>2</sub>O lagen, wurden als erhöht eingestuft.

#### **5.2.6. Bronchoskopie**

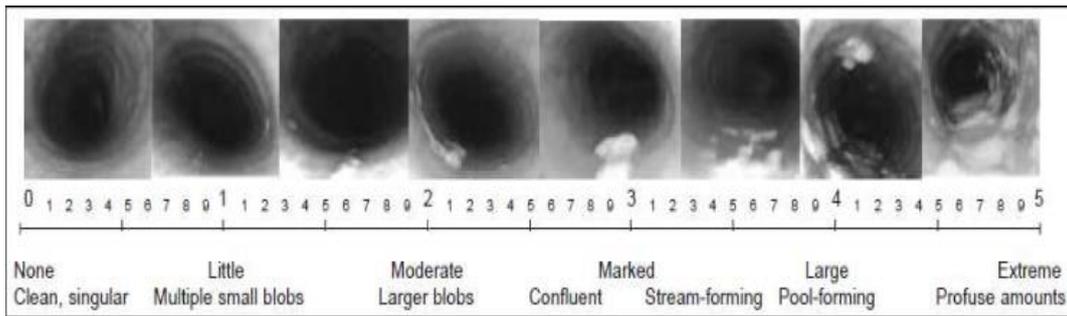
Vor der Bronchoskopie wurden die Pferde mit einer Kombination aus den Wirkstoffen Detomidin (Cepesedan 10mg/ml, CP-Pharma, Burgdorf) in der Dosierung 0,01mg/kg und Butorphanol (Alvegesic 10mg/ml, CP-Pharma, Burgdorf) in der Dosierung 0,01-0,02mg/kg sediert. Die Endoskopie der Atemwege erfolgte unter Zuhilfenahme eines Endoskops (Olympus Deutschland GmbH,

Hamburg), welches über den ventralen Nasengang zunächst bis auf Höhe des Kehlkopfs vorgeschoben wurde. Hierbei wurde insbesondere beurteilt, ob im Bereich des Waldeyerschen Rachenringes, des Kehlkopfs oder der *Apertura nasomaxillaris* Hinweise auf Erkrankungen der oberen Atemwege vorlagen. Im Anschluss wurde eine Tracheoskopie bis zur Aufzweigung der Trachea in die Hauptbronchien durchgeführt (Abb. 10).



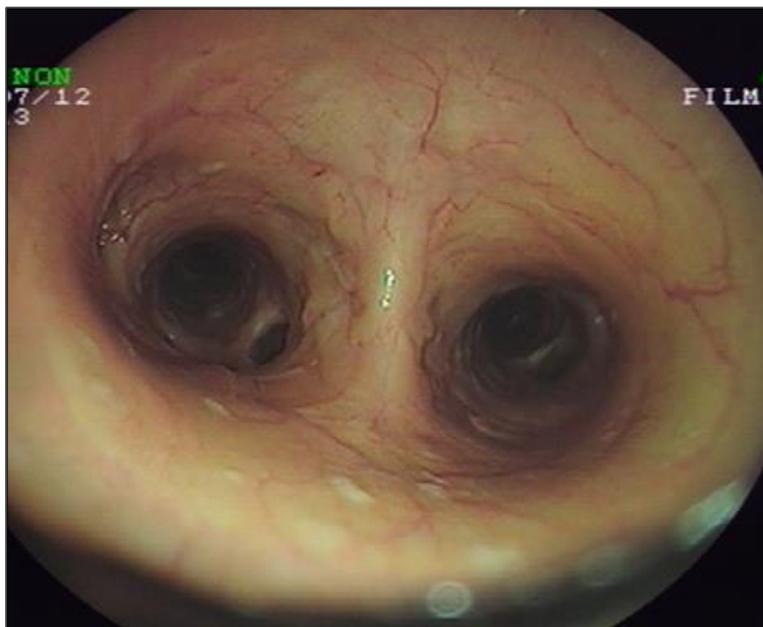
**Abbildung 10:** Endoskopie der Atemwege bei einem sedierten Pferd.

Dabei wurde nach einem Scoring-System, beschrieben von Gerber, sowohl die Menge, als auch die Viskosität des Mukus in der Luftröhre bestimmt (GERBER et al., 2004). Das Bewertungssystem für die Schleimmenge beinhaltet die Bandbreite von 0 bis 5 (0 = frei von Schleim oder vereinzelt Schleim, 1 = kleine oder mehrere kleine Tropfen, 2 = mittelgroße oder große Tropfen, 3 = deutlicher oder zusammenfließender Schleim, 4 = große konzentrierte Schleimansammlungen, 5 = hochgradige oder übermäßige Mengen an Schleim) (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Scoringssystem zur Einordnung der endoskopischen Ergebnisse für die Menge an Schleim in der Trachea (GERBER et al., 2004).

Neben dem Schleim in der Trachea wurde im Zuge der endoskopischen Untersuchung außerdem die *Carina tracheae*, also die Scheidewand zwischen den beiden Hauptbronchien begutachtet (Abb. 12). Als physiologisches Erscheinungsbild wird eine messerrückenscharfe Kontur des Septums angenommen, jedoch besteht laut KOCH und Kollegen keine Korrelation zwischen einer Verbreiterung des Septums und dem Schweregrad der Entzündung in den unteren Atemwegen (KOCH et al., 2007). Da es außerdem Hinweise darauf gibt, dass die *Carina tracheae* mit zunehmendem Alter breiter wird, spielte dieser Aspekt in der Bewertung der endoskopischen Untersuchung nur eine untergeordnete Rolle.



**Abbildung 12:** Endoskopiebild einer hochgradig verbreiterten *Carina tracheae*; ebenfalls zu erkennen sind vereinzelte Schleimauflagerungen.

### **5.2.7. Tracheobronchialsekret (TBS)**

Ein sterilisierbarer Spülkatheter (Absaug-/Spülkatheter 230cm, 2,3mm; Wieser GmbH, Egenhofen) wurde über den Arbeitskanal des Endoskops eingeführt, um gezielt Proben des Trachealschleimes aus dem distalen Bereich der Luftröhre entnehmen zu können.

Die gewonnenen TBS-Proben wurden direkt im Anschluss an die Entnahme auf einem Objektträger ausgestrichen, um danach mit Wright-Giemsa-Färbung gefärbt zu werden. Im Anschluss erfolgte eine zytologische Beurteilung des TBS (Abb. 13).

In den TBS-Ausstrichen wurden Qualität und Quantität der folgenden Parameter bewertet (GRABNER and FEY, 2005, MAY and GEHLEN, 2009) (Protokoll: IX. Anhang, Kapitel 1.3., S.205):

#### **Neutrophile Granulozyten:**

- Hoher Anteil gibt Hinweis auf den Grad der Entzündung, v.a. in den oberen Atemwegen

#### **Alveolarmakrophagen:**

- Schaumigkeit als Anzeichen für Aufnahme von Surfactant
- Anzeichen für Chronizität der Erkrankung

#### **Curschmann Spiralen:**

- Sekretaussüsse kleiner Bronchien
- Anzeichen für Bronchokonstriktion (Abb. 13)

#### **Eosinophile Granulozyten**

- Können Anzeichen einer allergisch bedingten Bronchitis sein
- Beim Pferd v.a. bei IAD, nur selten bei RAO oder bei Lungenwurmbefall

#### **Mastzellen:**

- Können Anzeichen einer allergisch bedingten Bronchitis sein
- Beim Pferd v.a. bei IAD, selten bei RAO

#### **Bakterien:**

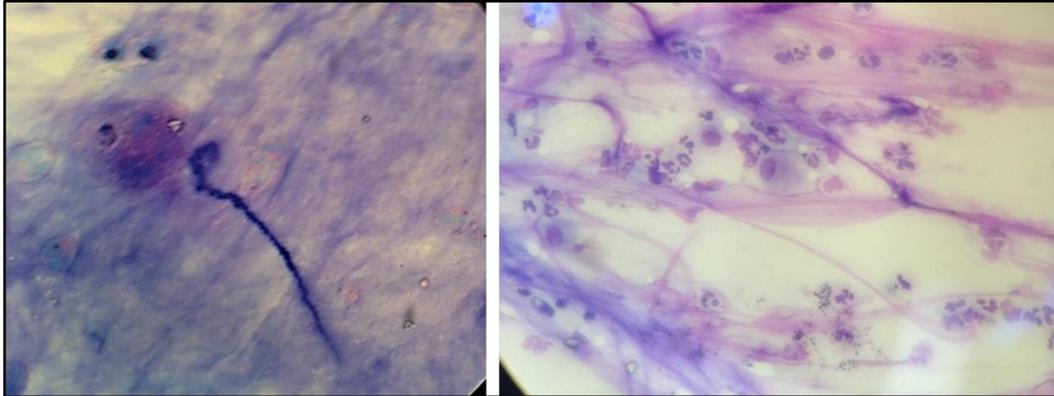
- Hinweis auf gestörte mukozilliäre Clearance der Atemwege
- Entnahmebedingte Kontamination möglich
- Differentialdiagnose (DD): bei bakteriellen Infektionen der Atemwege

### Hyphen und Konidien:

- Hinweis auf gestörte mukozilliäre Clearance der Atemwege
- DD: Pilzinfektionen

### Becherzellen:

- Erhöhtes Vorkommen als Anzeichen für Dyskrinie



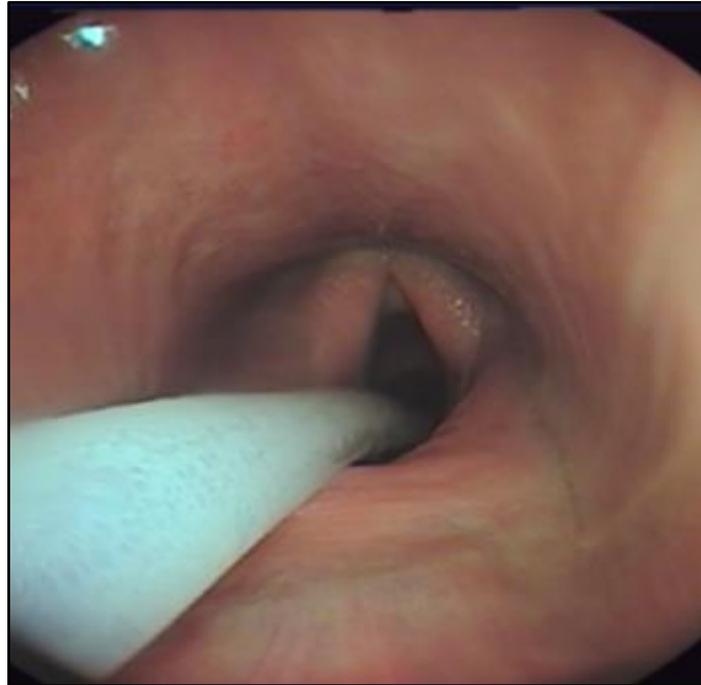
**Abbildung 13:** Mikroskopische Untersuchungen eines mit Wright-Giemsa gefärbten Tracheobronchialsekrets. Linkes Bild: Curschmann-Spirale, rechtes Bild: ggr. Anteil polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten, außerdem zu erkennen sind Alveolarmakrophagen sowie Mukus.

Bei der zytologischen Untersuchung des Tracheobronchialsekrets handelt es sich um eine semiquantitative Bewertung. Das typische Zellbild einer TBS-Probe eines Pferdes, das an RAO bzw. COB leidet, weist einen hohen Anteil an Neutrophilen, schaumige Alveolarmakrophagen und eventuell Curschmann-Spiralen auf (GRABNER and FEY, 2005) (Abb. 13).

#### 5.2.8. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Bei den Patienten wurde im Rahmen aller drei Untersuchungen eine Bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Im Vorfeld der Probennahme wurde bei jedem Pferd 40ml eines Lokalanästhetikums (Lidocain) gemischt mit 20ml steriler NaCl-Lösung über das Endoskop, auf Höhe der *Bifurcatio tracheae* eingegeben. Ziel dessen war es, den möglicherweise auftretenden Hustenreiz, durch lokale Betäubung der Hustenrezeptoren, eindämmen zu können (WESTERMANN et al., 2005). Für die Entnahme der BAL wurde ein steriler BAL-Katheter (Bronchoalveolar-Lavage-Spülkatheter, 300cm; Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn) unter endoskopischer Kontrolle so weit wie möglich in die

Bronchien verbracht (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Einführen des BAL-Katheters unter endoskopischer Sichtkontrolle; hier zu sehen: dorsale Verlagerung des weichen Gaumens (dorsal displacement of the soft palate = DDSP).

Sobald ein weiteres Vorschieben des Katheters nicht mehr möglich war, wurde der Katheter, durch Insufflierung von ca. 10-15ml Luft in den Cuff, geblockt. Jedem Pferd wurden 250ml sterile, physiologische Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl) vollständig eingegeben und anschließend die Spüllösung wieder aspiriert (Abb. 15).

Nach der Gewinnung der Probe wurde deren Gesamtvolumen bestimmt. Ca. 10ml der BAL-Flüssigkeit wurden direkt im Anschluss an die Entnahme bei 300g für 6 Minuten zentrifugiert und danach der zellfreie Überstand abgenommen, um ihn in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Die restliche Probe wurde für die Dauer des Transports auf Eis gelagert.



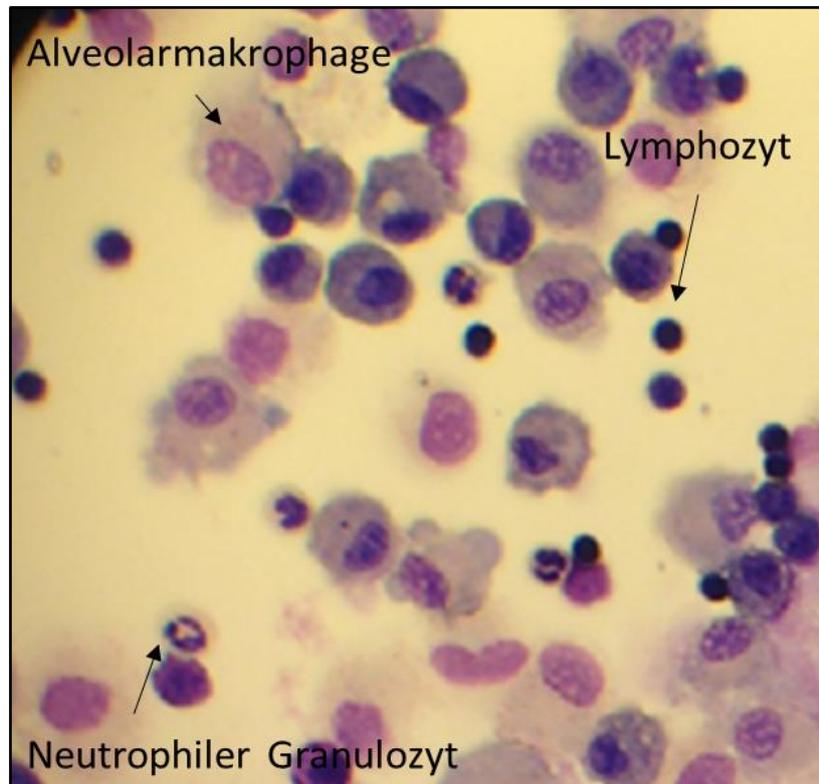
**Abbildung 15:** Durchführung einer bronchoalveolären Lavage bei einem sedierten Pferd; Absaugen der Spülflüssigkeit mithilfe von Unterdruck.

Für die zytologische Auswertung der BAL wurde unter Zuhilfenahme einer Zytocentrifuge (Hettich Zentrifugen, Rotofix 32A, Tuttlingen) ein Zytospin angefertigt, wobei die Zellen direkt in Form eines Monolayers auf den Objektträger übertragen werden (GRABNER and FEY, 2005). Im Anschluss wurde der Objektträger unter Zuhilfenahme einer Färbemaschine (Slide Stainer, Bayer, Hematek, Diagnostic Europe Limited, Dublin) mit einem Wright-Giemsa Staining gefärbt. Zur Beurteilung der Zytologie der BAL wurden mindestens 400 Zellen ausgezählt und anschließend die prozentualen Anteile berechnet (Abb. 16).

Folgende Werte werden als physiologische Anteile für die Zusammensetzung des BALF-Differenzialzellbilds zugrunde gelegt (GRABNER and FEY, 2005, MISKOVIC et al., 2007):

- < 5% Neutrophile Granulozyten
- < 2% Mastzellen
- < 1% Eosinophile Granulozyten
- ca. 60% Makrophagen
- ca. 35% Lymphozyten
- Wenige bis keine Epithelzellen

Die zytologischen Ergebnisse wurden mittels eines standardisierten Protokolls dokumentiert (IX. Anhang, Kapitel 1.3., S.204).



**Abbildung 16:** Zytologisches Bild einer BAL (v.a. Alveolarmakrophagen und Lymphozyten, geringer Anteil an Neutrophilen).

### 5.2.9. Klinisches Scoring

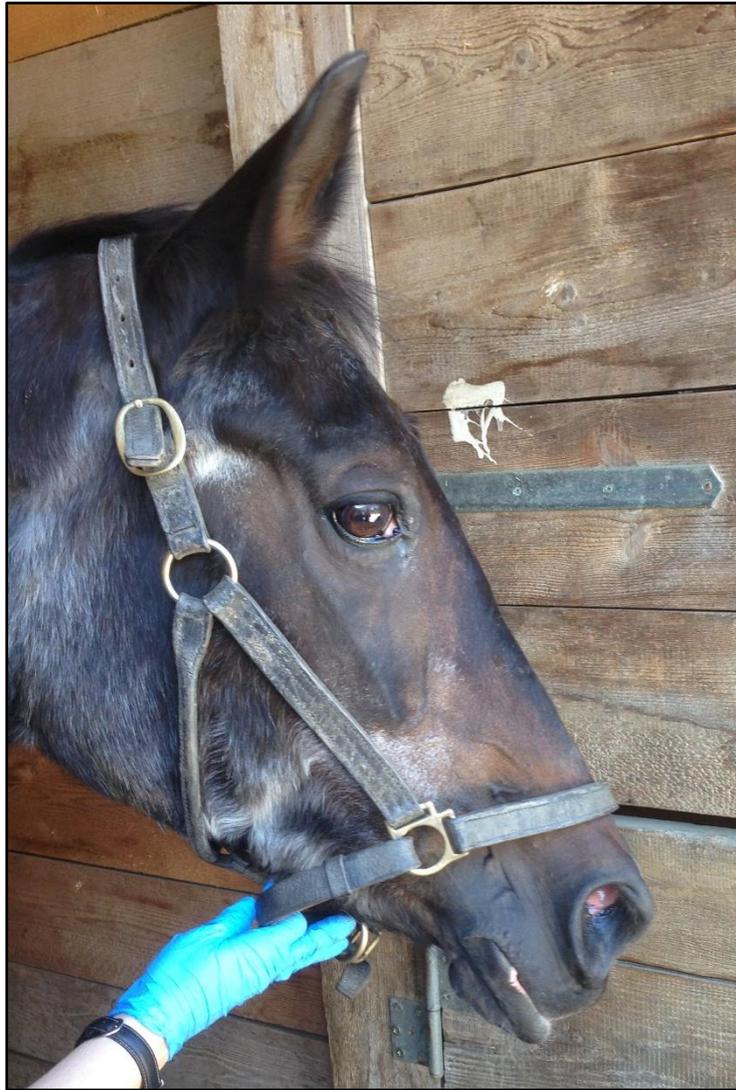
Als klinisches Scoring wurde unter anderem ein Bewertungsschema nach Robinson, eine Kombination der Parameter „Nüsternblähen“ und „Atemtyp“ zugrunde gelegt (Tab. 3) (ROBINSON et al., 2000). Dabei erfolgte für „Nüsternblähen“ eine Einstufung in eine Skala von 1 bis 4. Hier wurde bei einer physiologischen Bewegung der Nüstern der Wert 1 vergeben und als höchster Wert, bei hochgradigem Aufblähen der Nüstern bei jeder Atmung, der Wert 4 vergeben (Abb. 17).

Beim Atemtyp reichte die Bewertungsskala ebenfalls von 1 bis 4, wobei bei der Einstufung in Grad 1 keine abdominale Komponente der Atmung auffällig war und die Zuordnung in Grad 4 bei einer hochgradig abdominal betonten Atmung erfolgte. Der „Total Clinical Score“ setzt sich aus der Summe der beiden Faktoren

zusammen (ROBINSON et al., 2000, RUSH et al., 1998).

**Tabelle 3:** System der Punktevergabe für den Total Clinical Score nach ROBINSON et al. (2000).

	<b>Scoring</b>
<b>Nüsternblähen</b> (Nasal Flare)	<b>1</b> = kein Nüsternblähen <b>2</b> = geringgradiges, gelegentliches Nüsternblähen <b>3</b> = mittelgradiges Nüsternblähen <b>4</b> = hochgradiges kontinuierliches Nüsternblähen während jeder Atmung
<b>Abdominale Bewegung</b> (Abdominal Movement)	<b>1</b> = keine abdominale Komponente bei der Atmung <b>2</b> = geringgradige abdominale Verstärkung der Bewegung <b>3</b> = mittelgradige abdominale Verstärkung der Bewegung <b>4</b> = hochgradig abdominal betonte Atmung
<b>Klinischer Gesamtwert</b> (Total Clinical Score = <b>TCS</b> ): <i>Summe aus der Punktzahl für Nüsternblähen und abdominaler Bewegung</i>	<b>2</b> = keine Anzeichen einer Atemwegsobstruktion <b>3 oder 4</b> = geringgradige Anzeichen einer Atemwegsobstruktion <b>5 oder 6</b> = mittelgradige Anzeichen einer Atemwegsobstruktion <b>7 oder 8</b> = hochgradige Anzeichen einer Atemwegsobstruktion



**Abbildung 17:** Hochgradiges Nüsterblähen.

#### **5.2.10. HOARSI (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index)**

Zur Beurteilung der Entwicklung der Erkrankung aus Sicht der Pferdebesitzer, wurde der Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index bestimmt (GERBER et al., 2011). Dieser wurde, unter Zuhilfenahme eines standardisierten Fragebogens, von den Pferdebesitzern vor der ersten Untersuchung (US1) sowie im Rahmen der letzten Untersuchung (US3) bestimmt, um ein Bild davon zu bekommen, wie die Besitzer die Entwicklung des Krankheitsverlaufs und somit auch den Therapieerfolg evaluieren (IX. Anhang, Kapitel 1.5., S.215f). Bewertet wurden dabei die Kriterien Husten, Auftreten von mukösem Nasenausfluss, die Atmung in Ruhe und unter Belastung, die Atemberuhigung, die Leistung sowie die Arbeitsmotivation der Pferde.

Anhand der vergebenen Punkte erfolgte eine Einteilung der Pferde in die verschiedenen HOARSI-Gruppen (Tab. 4). Dabei wurden Patienten, die HOARSI 1 zugeordnet wurden, nicht in die Studie aufgenommen, da bei Ihnen kein eindeutiges Auftreten einer chronischen Lungenerkrankung nachzuweisen war bzw. diese Pferde sich möglicherweise in Remission befanden. In HOARSI 2 können u.a. Patienten eingeteilt werden, die möglicherweise an IAD leiden. Eine Einteilung in HOARSI 3 und 4 bedeutet, dass klare Anzeichen einer RAO von den Besitzern wahrgenommen werden, wobei bei HOARSI 3 gering- bis mittelgradige Symptome und bei HOARSI 4 mittel- bis hochgradige Symptome auftreten.

**Tabelle 4:** Einteilung der Pferde in die verschiedenen HOARSI-Gruppen.

<b>HOARSI 1</b>	keine Anzeichen einer chronischen Atemwegserkrankung
<b>HOARSI 2</b>	geringgradige respiratorische Symptomatik: <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Nasenausfluss (mukös) vorhanden</li> <li>⇒ und/oder gelegentlicher Husten (IAD)</li> </ul>
<b>HOARSI 3</b>	mittelgradige respiratorische Symptomatik: <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ regelmäßig (1 x täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten</li> <li>⇒ keine Leistungsminderung</li> <li>⇒ und/oder angestrengte Atmung länger als zwei Monate bestehend (chronisch lungenerkrankte Pferde =&gt; RAO)</li> </ul>
<b>HOARSI 4</b>	hochgradige respiratorische Symptomatik: <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ regelmäßig (einmal täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten mit Hustenanfällen</li> <li>⇒ Leistungsminderung</li> <li>⇒ und/oder angestrengte Atmung für länger als acht Wochen (chronisch lungenerkrankte Pferde =&gt; RAO)</li> </ul>

## **6. Kontrolle der Therapieverträglichkeit**

### **6.1. Kontrolle des Allgemeinbefindens**

Die Kontrolle des Allgemeinbefindens erfolgte wie in Abschnitt 5.1. „Allgemeine Untersuchung“ beschrieben. Die Pferde wurden einer solchen Kontrolle im Rahmen aller drei Untersuchungen sowie vor jeder Inhalationsbehandlung unterzogen. Die Patienten wurde hinsichtlich der im Vorfeld festgelegten Abbruchkriterien (siehe Abschnitt 6.4 „Protokoll Abbruchkriterien“) evaluiert und eine Behandlung fand nur dann statt, wenn keine Abweichungen der Vitalparameter auftraten, die nicht in Zusammenhang mit der bereits bekannten Erkrankung standen (z.B. erhöhte Atemfrequenz).

Zusätzlich erfolgte durch die Besitzer eine tägliche Temperaturkontrolle sowie die Erstellung eines Tagebuchs, in dem mögliche Veränderung oder Auffälligkeiten der Pferde dokumentiert werden sollten (Abb. 18). Die Besitzer wurden eingehend über den Ablauf der Studie informiert sowie darauf aufmerksam gemacht, dass sie Veränderungen in Verhalten oder der Symptomatik der Erkrankung aufmerksam beobachten und umgehend melden sollten.

LMU Klinik für Pferde  
 Innere Medizin  
 Veterinärstraße 13  
 80539 München

**Besitzertagebuch - CPG Studie 2015**

**Pferd:**

Datum:

Temperatur	
Allgemeinbefinden	
Auffälligkeiten	

Datum:

Temperatur	
Allgemeinbefinden	
Auffälligkeiten	

Datum:

Temperatur	
Allgemeinbefinden	
Auffälligkeiten	

**Abbildung 18:** Besitzertagebuch zur Dokumentation der Körpertemperatur sowie möglicher Auffälligkeiten.

## 6.2. Differentialblutbild

Um mögliche Entzündungsreaktionen ausschließen zu können, wurde jedem Patienten im Rahmen der drei Untersuchungen durch Punktion der *Vena jugularis* Blut entnommen und in EDTA-Röhrchen abgefüllt. Daraus wurden Differentialblutbilder angefertigt, um zu beurteilen, ob Abweichungen vom physiologischen Blutbild vorliegen.

## 6.3. Fibrinogen

Zum Ausschluss systemischer Entzündungsreaktionen wurde im Rahmen der drei Hauptuntersuchungen aus Blutproben jeweils auch eine Bestimmung des Akute-Phase-Proteins Fibrinogens durchgeführt (GRABNER and FEY, 2005).

Die Funktion von Akute-Phase-Proteinen (APPs) besteht in der Erhöhung des Blutflusses sowie der Steigerung der Permeabilität von Blutgefäßen. Dadurch wird die Migration von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe gefördert. Außerdem

bewirken APPs eine Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsherd. Dabei aktivieren sie die weißen Blutkörperchen zur Zerstörung des Pathogens. Die Synthese der APPs findet in Hepatozyten statt (LUNN and HOROHOV, 2010).

#### **6.4. Protokoll Abbruchkriterien**

Um die Sicherheit der Patienten gewährleisten zu können, wurden im Vorfeld der Studie Verträglichkeitskriterien definiert, die im Falle eines Auftretens zum Abbruch der weiteren Behandlung im Rahmen der Studie führen. Diese sind im Protokoll der „Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0“ festgelegt (VCOG, 2011, WÄRTHNER, 2013, KLIER, 2011). Diese Vorlage wurde in modifizierter Form verwendet (WÄRTHNER, 2013), da es bisher für Pferde kein spezielles Protokoll gibt. Deshalb musste man auf dieses modifizierte Protokoll aus der Kleintiermedizin zurückgreifen. Dabei wurden, neben der Kontrolle des Allgemeinbefindens, Kriterien für systemische immunologische/allergische Reaktionen (u.a. Hypersensitivitätsreaktionen, Vaskulitis) sowie lokale Nebenwirkungen durch die Inhalationen (z.B. Rötungen, Schwellungen, Hustenreiz) als Abbruchgrund festgelegt. Außerdem hätten dermatologische Veränderungen und konstitutionelle Beeinträchtigungen (z.B. Fieber, Anorexie, Apathie o.ä.) vermerkt und diese hätten zum Abbruch der Behandlung geführt. Würde ein Patient Reaktionen 1. Grades oder schlimmer zeigen, würde das einen sofortigen Abbruch der Studientherapie bedeuten. Das vollständige Protokoll mit detaillierten Kriterien ist im Anhang zu finden (IX. Anhang, Kapitel 1.4., S.206ff).

## **7. Labordiagnostische Untersuchungen**

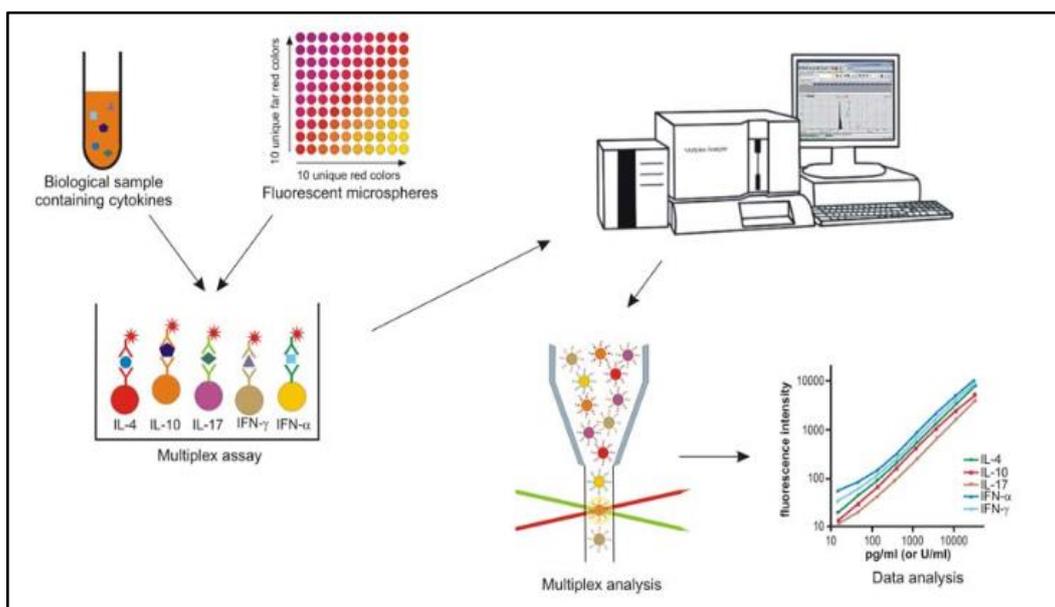
### **7.1. Zytokinbestimmungen**

10ml der gewonnenen BAL-Proben wurde unmittelbar nach der Gewinnung bei 300g für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 2ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Im Anschluss wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei einer Temperatur von -80° gelagert.

Im Cornell Animal Health Diagnostic Center (Cornell University, Ithaka, New York, USA) erfolgte die Analyse der Zytokine IL-4, IL-10, IL-17, IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels Multiplex Assay (WAGNER and FREER, 2009). Dazu wurden die Proben auf Trockeneis gekühlt nach Cornell versandt (TNT, Deutschland).

Mithilfe eines fluoreszenz-basierten Systems ist es bei dieser Analysemethode möglich mehrere Zytokine simultan in einer Probe zu messen (Abb. 19). Monoklonale Antikörper, die jeweils spezifisch sind für eines der Zytokine, werden individuelle an einen von fünf farbmarkierten Fluoreszenz-Beads gekoppelt. Dafür werden die zu analysierenden Proben mit den Anti-Zytokin-Beads inkubiert. Im Anschluss folgt der Nachweisschritt, bei dem die fünf fluorochrom-konjugierten Anti-Zytokin Antikörper hinzugegeben werden.

In einem Multiplex Analyzer werden die Farbausschläge der Bead-Farbe und des korrespondierenden Fluoreszenzfarbstoffs gemessen. Als Standard für die Quantifizierung jedes Zytokins wurden equine rekombinante Zytokin-IgG-Fusionsproteine verwendet und mit deren Hilfe die Werte für die Zytokine berechnet (WAGNER and FREER, 2009). Dabei können die Zytokine IL-4, IL-10, IL-17, IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  parallel detektiert werden, ohne dass gegenseitige Kreuzreaktionen oder Beeinflussungen der Ergebnisse auftreten (WAGNER and FREER, 2009).



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Zytokin-Analyse im Multiplex Assay (Quelle: Animal Health Diagnostic Center, Cornell University, Ithaka, New York, USA).

Für jedes Zytokin sind für die Messung im Multiplex Assay individuelle Nachweisgrenzen festgelegt (Tab. 5).

Im Vergleich zu einer Zytokin-Detektion mittels eines entsprechenden ELISAs, ist die Sensitivität des Multiplex Assay 13- bis 150-fach höher (WAGNER and FREER, 2009).

**Tabelle 5:** Individuelle Nachweisgrenzen für jedes Zytokin im Multiplex Assay.

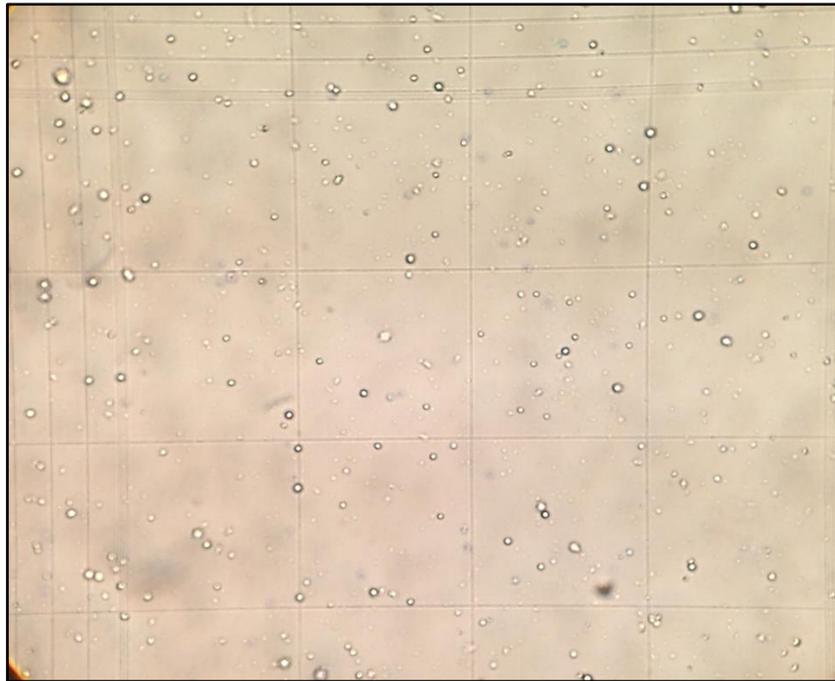
Zytokin	untere Nachweisgrenze	obere Nachweisgrenze
<b>IL-4</b>	40 pg/ml	80000 pg/ml
<b>IL-10</b>	15 pg/ml	35000 pg/ml
<b>IL-17</b>	10 U/ml	10000 U/ml
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	10 U/ml	5000 U/ml
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	12 pg/ml	30000 pg/ml

## 7.2. Magnetic cell sorting (MACS)

Die BAL-Flüssigkeiten wurden unmittelbar nach der Entnahme in 50ml Falcon-Tubes auf Eis gelagert und innerhalb von maximal 3 Stunden im Labor weiterverarbeitet.

Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 300g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf ca. 10ml verworfen und die Zellen in diesem Volumen resuspendiert.

Um die Probe von Mukus weitestgehend zu befreien, wurde die BAL durch eine einlagige sterile Gaze gefiltert. Anschließend wurden 50 $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und mit 50 $\mu$ l Trypanblau gemischt (KLEIBER et al., 2005). 10 $\mu$ l der entstandenen Flüssigkeit wurden daraufhin in eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved) gegeben und die Zellzahl zur Bestimmung der Gesamtzellzahl unter einem Mikroskop ausgezählt (Abb. 20) (HOROHOV et al., 2005).



**Abbildung 20:** Neubauer-Zählkammer: Die Zellen der BAL wurden angefärbt mit Trypanblau (Lebend-Tot-Färbung) und mikroskopisch untersucht. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden mindestens 3 verschiedene Felder (4x4) ausgezählt.

Die positive Selektion auf CD4-T-Lymphozyten erfolgte im Sinne des Magnetic cell sorting (MACS)-Protokolls der Firma Miltenyi Biotec (MILTENYI et al., 1990, HOROHOV et al., 2005)

Eine Hälfte der BAL-Probe wurde durch einen 100µm cell strainer gefiltert. Auf diesem Wege konnten Zellen größeren Durchmessers (>100µm) eliminiert werden. Basierend auf den unterschiedlichen Größen verschiedener Zelltypen, konnte durch die Filterung erreicht werden, dass sich nur noch überwiegend Lymphozyten in der Probe befanden (KLEIBER et al., 2005). Lymphozyten haben eine durchschnittliche Größe von ca. 10µm (GRABNER and FEY, 2005).

Die gefilterte Zellsuspension wurde mit 10ml MACS-Buffer (MACS BSA Stock Solution und autoMACS rinsing solution; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gewaschen, dann bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgenommen und verworfen.

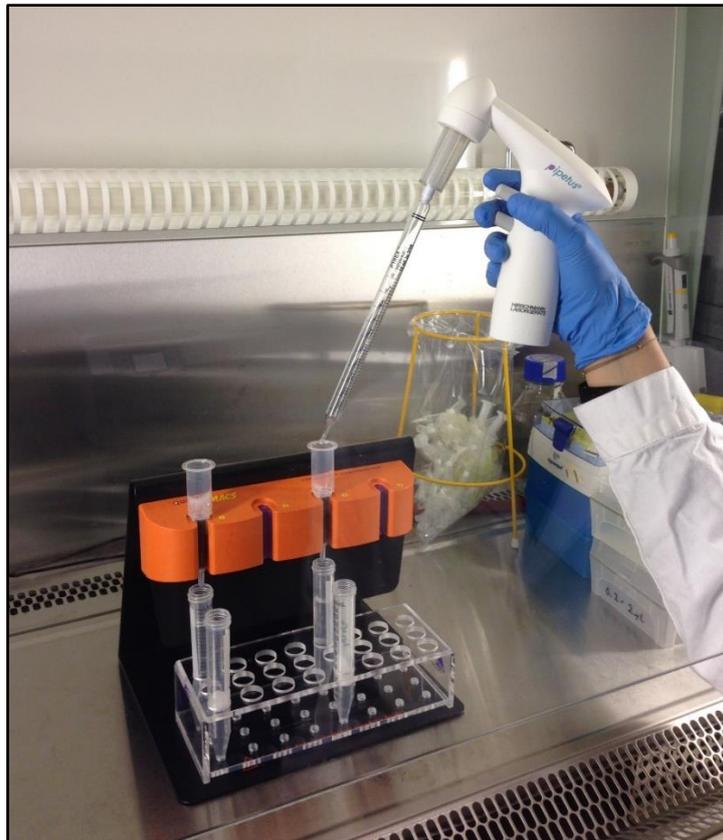
Das übriggebliebene Zellpellet wurde mit 10µl eines equinen CD4-Antikörpers (Mouse Anti Horse CD4: RPE, Monoclonal Antibody, Clone: CVS4, Isotype: IgG1; Firma Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim) für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurde 1ml MACS-Buffer hinzugegeben,

mithilfe einer Pipette gemischt und für 10 min bei 300g zentrifugieren und im Anschluss der Überstand verworfen.

80µl MACS-Buffer wurden zum Zellpellet hinzugegeben, unter Zuhilfenahme einer Pipette gemischt und anschließend mit 20µl MACS-Antikörper (anti-mouse IgG1 MicroBeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) in Suspension gebracht.

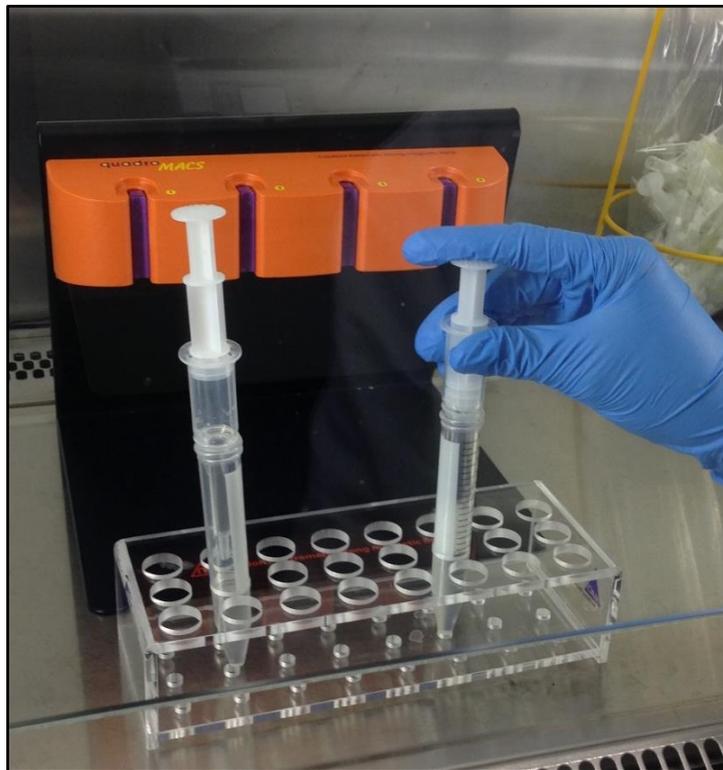
Die Probe inkubierte dann für 15 Minuten im Kühlschrank (4°C). Danach folgte ein weiterer Waschvorgang mit 1ml des MACS-Buffers und darauffolgender Zentrifugation für 10 Minuten bei 300g. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet mit 500µl MACS-Buffer resuspendiert.

Für die Zellseparation wurde das Quadro MACS™ Separator System zusammen mit den LS Columns der Firma Miltenyi Biotec GmbH verwendet (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Magnetic cell sorting – Positive Selektion auf CD4-Lymphozyten: Überführen der BAL-Zellsuspension in das Quadro MACS™ Separator System. Alle Zellen, die nicht an den magnetischen CD4-Antikörper gebunden waren, wurden in einem Falcon-Tube aufgefangen und somit aussortiert. Die magnetic beads-gekoppelten CD4-Zellen wurden aufgrund magnetischer Anziehung im Bereich des Magneten (orange) gehalten.

Zur Vorbereitung der Säulen wurden die LS Columns mit 3ml der MACS-Buffers gespült und die zu verwerfende Flüssigkeit in 15ml Falcon-Tubes aufgefangen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in die Säule hinein pipettiert, woraufhin ein dreimaliges Spülen mit jeweils 3ml MACS-Buffer folgte. Bevor ein neuer Spülvorgang gestartet werden konnte, musste die Säule frei von Flüssigkeit sein. Die verwendete LS Column wurde im Anschluss vom Magneten entfernt und auf ein neues 15ml Falcon-Tube aufgesetzt. Daraufhin wurden 5ml des MACS-Buffers hinein pipettiert und anschließend mittels des Spritzenstempels durch die Säule durchgedrückt (Abb. 22). Da in den vorhergehenden Schritten, die Zellen, die nicht an die CD4-Antikörper gebunden waren, entfernt wurden, befanden sich zu diesem Zeitpunkt nur noch die separierten CD4-T-Lymphozyten in der Suspension.



**Abbildung 22:** Nach Extraktion der CD4-negativen Zellen wurde die Säule vom Magneten (Quadro MACS™ Separator) losgelöst und die separierten CD4-Lymphozyten durch Druck auf den Kolben aus der Säule gespült.

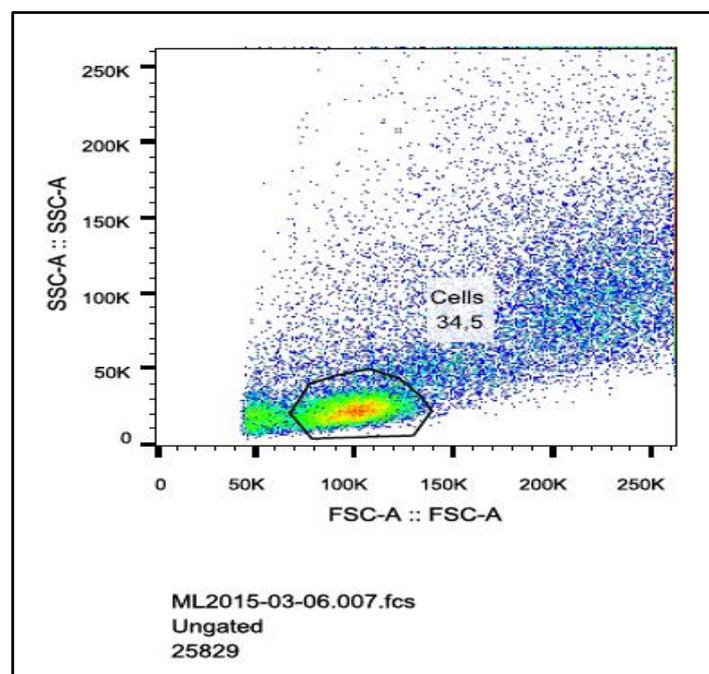
Für die Überführung der Zellen in das RNA-stabilisierende Medium (RNAlater; Quiagen GmbH, Hilden) wurde die Suspension für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Im weiteren Prozess wurde das Zellpellet mit 200µl PBS suspendiert und anschließend mit 1800µl RNAlater in

Suspension gebracht.

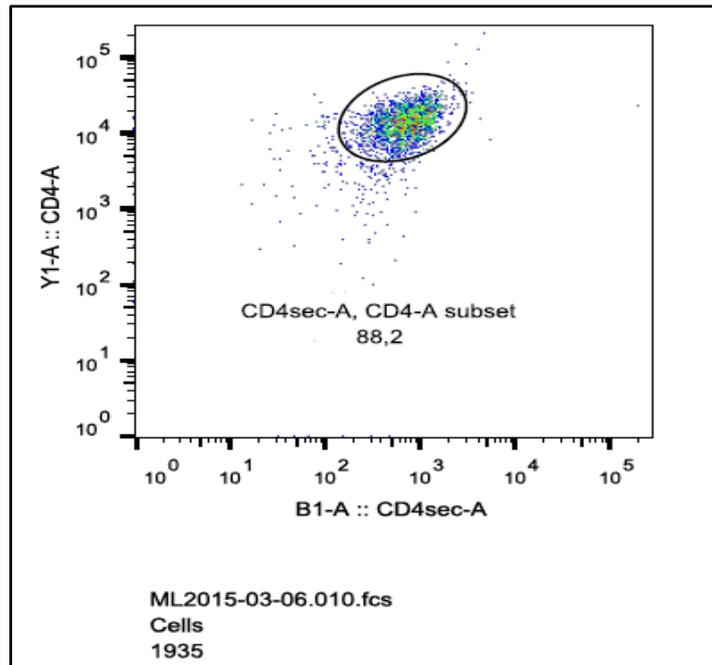
Über Nacht wurde die Probe im Kühlschrank bei 4°C in dem konservierenden Medium inkubiert, bevor sie auf vier Kryoröhrchen zu jeweils 500µl großen Proben aufgeteilt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Mittels Durchflusszytometrie (FACS-Gerät: MACSQuant® VYB, Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) wurde die Reinheit der CD4-Zellen, im Anschluss an die MACS-Separation, kontrolliert (Abb. 23-25). Diese Kontrollen erfolgten stichprobenartig und wurden bereits im Vorfeld der Studiendurchführung getestet.

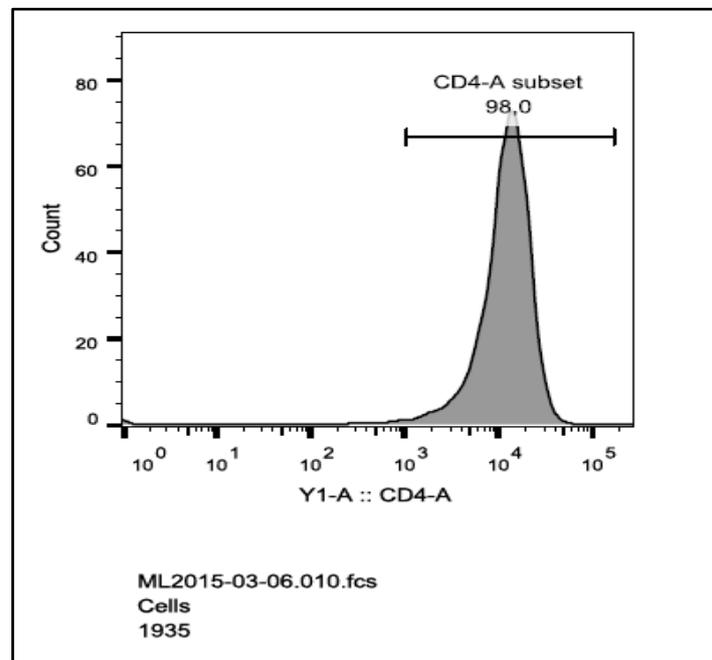
Dafür wurde ein FITC-Farbstoff, gekoppelt an einen CD4-Antikörper (FITC-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG Antikörper; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet, um die Reinheit der Auftrennung testen zu können (KLEIBER et al., 2005). Die erfolgreiche Selektion auf CD4+ konnte dabei, mit einem Ergebnis von 98%, belegt werden (Abb. 25)



**Abbildung 23:** Ergebnis der Durchflusszytometrie unter Berücksichtigung aller BAL-Zellen mittels Forward Scatter (X-Achse) und Sideward Scatter (Y-Achse) (Angefertigt in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Lehmann, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München).



**Abbildung 24:** Ergebnisse der FACS Analyse, dargestellt werden die mit FITC gefärbten CD4- Zellen. Die Zellpopulation von Interesse ist umkreist (Angefertigt in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Lehmann, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München).



**Abbildung 25:** Ergebnis der FACS-Analyse: 98% der gefärbten Zellen gehören der CD4+-Zellpopulation an (Angefertigt in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Lehmann, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München).

### 7.3. mRNA-Bestimmungen

Die quantitative Analyse der mRNA aus den mittels MACS selektierten CD4-Lymphozyten erfolgte im Gluck Center, Kentucky (USA) durch Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction). Dafür wurden die Proben mittels eines gekühlten Versands (Medpak Thermo, TNT, Troisdorf) verschickt.

Dabei wurden die mRNA der Transkriptionsfaktoren FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3), T-bet (=Th-1 specific T-box transcription factor), GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor) und der Zytokine IL-8 und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor-  $\beta$ ) bestimmt (HOROHOV et al., 2005, SOBOLL HUSSEY et al., 2011, EL ABBAS et al., 2012):

Zuerst erfolgte die Isolation der mRNA nach dem im Folgenden beschriebenen Schema. Die BAL-Zellen wurden auf zwei Alliquots zu jeweils 900 $\mu$ l aufgeteilt und im Anschluss bei 15000g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-stabilisierende Medium (RNAlater) entfernt. Zum übriggebliebenen Zellpellet wurde Trizol (acid guanidinium thiocyanate-phenol Dissociations Buffer) hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren (CHOMCZYNSKI and SACCHI, 1987). Die Isolation der RNA erfolgte dann mittels der standardisierten Phenol-Chlorophorm RNA Isolationstechnik (HOROHOV et al., 2005).

Im nächsten Schritt wurde RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Mithilfe spezifischer Primer, basierend auf den Sequenzen für die jeweiligen equinen Transkriptionsfaktoren bzw. Zytokine sowie auf der Sequenz einer endogenen Kontrolle („Haushaltsgen“, B-Gus) wurden die korrespondierenden cDNAs amplifiziert (BEADLE et al., 2002, HOROHOV et al., 2005). Die Real Time PCR Methode (ABI Systems 7500 Real-Time PCR Instrument, Foster City, USA) ermöglichte außerdem durch die Verwendung der thermostabilen Taq DNA-Polymerase eine quantitative Evaluierung der entsprechenden cDNAs. Dabei wurden mithilfe einer thermostabilen Taq Polymerase 40-Zyklen der PCR durchlaufen und die dabei entstehende Fluoreszenz-Intensität gemessen. Korrigiert werden die Werte rechnerisch mithilfe der Ergebnisse der mRNA eines „Haushaltsgens“ (HOROHOV et al., 2005). Als finale Ergebnisse werden die lnRQ-Werte (logarithmischer Wert der Relativen Quantifizierung) für jeden der untersuchten Parameter (FoxP3, T-bet, GATA-3, IL-8 und TGF- $\beta$ ) dargestellt.

## 8. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der klinischen Ergebnisse sowie der Resultate für die Zytokine wurde das Programm Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Um den Verlauf der Ergebnisse innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen bestimmen zu können (zwischen US1 und US2 bzw. zwischen US1 und US3), wurde ein Wilcoxon matched-pairs Test (nicht-parametrische Daten innerhalb einer Gruppe) angewandt. Dieser Test wird verwendet, wenn die Voraussetzungen für ein parametrisches Verfahren nicht gegeben sind. Er wird bei abhängigen Stichproben eingesetzt und stellt das nichtparametrische Äquivalent des t-Tests dar (ROWE, 2012). Mit dem Mann-Whitney-U-Test (auch „Wilcoxon rank-sum test“ genannt) wurde der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen berechnet (z.B. Kortison mit CpGsd oder CpGdd). Der Mann-Whitney-U-Test wird verwendet, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test für unabhängige Stichproben nicht erfüllt sind. Der Test kann angewandt werden, wenn die Daten nicht normalverteilt sind. Voraussetzung ist jedoch eine Ordinalskalierung der Daten. Der Mann-Whitney-U-Test kann auch bei einer kleinen Anzahl an Stichproben und bei einem Vorkommen von Ausreißern angewandt werden (ROWE, 2012).

Die statistische Auswertung der mRNA Ergebnisse erfolgte mithilfe der Version 7 des Graph Pad Prism Programms. Dabei wurden die Tests ANOVA- und Kruskal-Wallis angewandt. ANOVA (steht für "Analysis of variance") wird angewandt als eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung und untersucht, ob sich die Mittelwerte mehrerer abhängiger Gruppen bzw. Stichproben unterscheiden (ROWE, 2012). Der Kruskal-Wallis-Test (auch "H-Test" genannt) testet bei unabhängige Stichproben, ob sich deren zentrale Tendenzen unterscheiden (ROWE, 2012).

p-Werte, die  $< 0,05$  liegen, wurden als statistische signifikant angesehen. Es wurden außerdem Einteilungen in gering-, mittel und hochgradig signifikant vorgenommen (\* = 0,05-0,01; \*\* = 0,009-0,001; \*\*\*  $\leq 0,001$ ). Die erhobenen Daten wurden anhand der Mittelwerte und die Standardabweichung in Klammern ( $\pm$  SD) dargestellt.

Zusätzlich konnte durch Bestimmung von Effektgrößen (Cohen's d) der Effekt der jeweiligen Behandlung auf die verschiedenen Parameter (z.B. Atemfrequenz,

Anteil an Neutrophilen in der BAL usw.) errechnet werden. Dabei ist ein  $d > 0,8$  als großer klinischer Effekt einzustufen. Nimmt das Cohen's d Werte zwischen 0,2 und 0,5 an, deutet das auf einen kleinen bzw. zwischen 0,5 und 0,8 auf einen mittleren klinischen Effekt hin.

## **9. Vergleich zu vorhergehenden Studien**

Um die Ergebnisse unsere Studie mit den Ergebnissen vorhergehender Studien vergleichen zu können, wurden Effektgrößen (Cohen's d) verwendet. Die Anzahl an Inhalationen wurde im Vergleich zu den vorhergehenden Untersuchungen auf 10 erhöht wurde und eine erhöhte Dosis eingesetzt (KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a).



## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Patienten und Untersuchungen**

Insgesamt nahmen an der Studie 29 Pferde teil. Das mittlere Alter betrug 19 Jahre und die Pferde gehörten 11 verschiedenen Rassen an. 15 der Patienten wurden in einem Offenstall gehalten, 13 in einer Außenbox und ein Pferd in einer Innenbox (IX. Anhang, Kapitel 3.1., S.219ff).

Eine doppelte-Verblindung wurde dadurch gewährleistet, dass weder die Patientenbesitzer, noch der Untersucher wussten, welche Therapie das jeweilige Pferd erhalten hatte.

### **2. Ergebnisse der klinischen Studie**

#### **2.1. Ergebnisse Allgemeinuntersuchung**

Alle Probanden der Studie litten, laut Vorbericht, seit mindestens einem Jahr bis hin zu 20 Jahren an chronischen Atemwegsproblemen mit Phasen der Exazerbation sowie der Remission und waren alle über 7 Jahre alt (COUETIL et al., 2016). Als Einschlusskriterien wurden die Parameter Ruheatemfrequenz ( $>16$ ), Nasenausfluss, Husten, Lungenperkussion, arterielle Blutgaswerte, Interpleuraldruck, Bronchoskopie (Schleimmenge und Viskosität) und die zytologischen Ergebnisse der BAL herangezogen (GERBER et al., 2004). Im Anschluss an die erste Untersuchung konnte bei allen Pferden der Befund einer RAO bestätigt werden. Abgesehen von den Veränderungen des Respirationstrakts, war das Allgemeinbefinden aller teilnehmenden Pferde ungestört.

##### **2.1.1. Atemfrequenz (AF) in Ruhe**

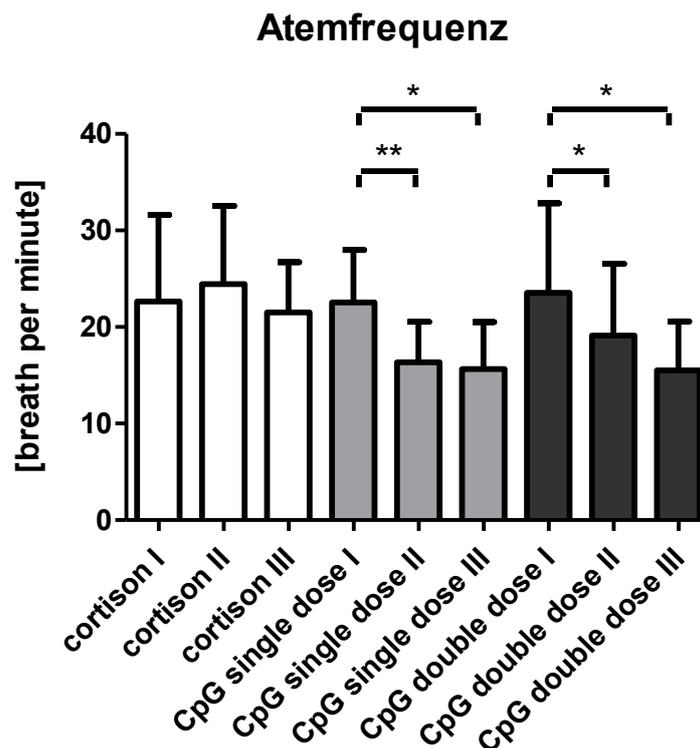
Der Mittelwert aller Pferde bei der ersten Untersuchung (US1) lag bei 22,9 ( $\pm 7,6$ ) Atemzügen pro Minuten [bpm].

Bei der „Kortisongruppe“ wurde eine Ruheatemfrequenz bei US1 von 22,7bpm ( $\pm 8,9$ ) festgestellt. Diese erhöhte sich bei US2 auf 24,4bpm ( $\pm 8,1$ ) und war im Rahmen von US3 mit 21,5bpm ( $\pm 5,2$ ) leicht zurückgegangen (Abb. 26). Somit konnte unter Kortisontherapie weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,2189$ ), noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,4076$ ) eine signifikante Verbesserung der

Ruheatemfrequenz erzielt werden.

Bei der CpG single dose (CpGsd) starteten die Patienten bei US1 im Mittel mit einer Atemfrequenz von 22,5bpm ( $\pm 5,5$ ). Der Wert reduzierte sich bei der zweiten Untersuchung (US2) auf 16,4bpm ( $\pm 4,1$ ) und fiel in der Langzeitbetrachtung (US3) auf 15,6bpm ( $\pm 4,9$ ). In der statistischen Auswertung war die Senkung der Ruheatemfrequenz als signifikant ( $p=0,0065$ ) und die Verbesserung hin zu US3 ( $p=0,0440$ ) ebenfalls als signifikant zu verzeichnen.

Die Pferde der CpG double dose (CpGdd) wiesen bei US1 einen Mittelwert von 23,6bpm ( $\pm 9,3$ ) auf, was sich bei US2 direkt im Anschluss an die letzte Behandlung auf 19,1bpm ( $\pm 7,4$ ) signifikant reduzierte ( $p=0,0243$ ). Im Zuge von US3 konnte eine signifikante Verbesserung ( $p=0,0220$ ) der Ruheatemfrequenz auf einen Mittelwert von 15,5bpm ( $\pm 5,1$ ) festgestellt werden.



**Abbildung 26:** Ergebnisse der Ruheatemfrequenz [bpm] aller drei Therapieregime bei den Untersuchungen 1 (I), 2 (II) und 3 (III) (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau, CpGdd (n=9): schwarz).

Sowohl CpGsd, als auch CpGdd konnten eine Senkung der Ruheatemfrequenz erzielen, wohingegen bei der „Kortisongruppe“ ein leichter Anstieg der AF verzeichnet wurde (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Veränderung der Atemfrequenz in Ruhe [%] bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3), angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

<b>Untersuchungs- verlauf</b>	<b>Cortison</b>	<b>CpG single dose</b>	<b>CpG double dose</b>
US1–US2	+20,8% ( $\pm$ 54,6)	-24,4% ( $\pm$ 21,7))	-15,6% ( $\pm$ 24,1)
US1–US3	+2,7% ( $\pm$ 26,4)	-26,0% ( $\pm$ 36,7)	-30,8% ( $\pm$ 23,8)

Bei der Gegenüberstellung des Therapieerfolgs der verschiedenen Behandlungsformen konnte CpGsd signifikant ( $p=0,0051$ ) und CpGdd signifikant ( $p=0,0343$ ) die Ruheatemfrequenz im Vergleich zur Kortisontherapie verbessern (Tab. 7).

Bezogen auf den Langzeiteffekt (US3) wurde eine signifikante Verbesserung der Ruheatemfrequenz zu Gunsten von CpGsd, verglichen mit der Kortisongruppe ( $p=0,0079$ ) festgestellt. Auch die CpGdd erzielte im Vergleich zur „Kortisongruppe“ eine signifikante Senkung der Ruheatemfrequenz ( $p=0,0131$ ).

Zwischen den beiden CpG-Behandlungsgruppen lag weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,3091$ ), noch hinsichtlich der Langzeitwirkung (US3) ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,4341$ ) vor.

**Tabelle 7:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf die Ruheatemfrequenz unter Bestimmung des p-Wertes.

<b>Untersuchungsverlauf</b>	<b>Therapien im Vergleich</b>	<b>p-Wert (Ruheatemfrequenz)</b>
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,0051
	Cortison - CpG double dose	0,0343
	CpG single - CpG double dose	0,3091
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0079
	Cortison – CpG double dose	0,0131
	CpG single – CpG double dose	0,4341

Da zwischen den beiden CpG-Gruppen keine signifikanten Unterschiede messbar waren, wurde außerdem eine Gegenüberstellung aller CpG-Pferde mit der „Kortisongruppe“ vorgenommen. Dabei stellte sich ein signifikanter Vorteil zu Gunsten der CpG-Therapie, sowohl zwischen US 1 und US2 ( $p=0,0058$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $p=0,0035$ ) dar.

Es wurden außerdem die Effektgrößen der jeweiligen Therapieformen berechnet (Tab. 8). Dabei war zwischen US1 und US2 bei der CpGsd ( $d=1,256$ ) ein großer klinischer Effekt und bei der CpGdd ein mittlere Effekt zu verzeichnen. Die Kortisongruppe hingegen konnte keinen klinischen Effekt ( $d=-0,199$ ) bewirken. Eine ähnliche Tendenz liegt hinsichtlich der Langzeittherapie vor, da hier sowohl bei CpGsd ( $d=1,334$ ), als auch bei CpGdd ( $d=1,061$ ) ein klinischer Effekt großer Relevanz vorlag, wobei die Beclometason-Inhalation keinen klinischen Effekt ( $d=0,161$ ) aufweisen konnte.

**Tabelle 8:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die Atemfrequenz in Ruhe.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,199
	CpG single dose	1,256
	CpG double dose	0,535
US 1 – US 3	Cortison	0,161
	CpG single dose	1,334
	CpG double dose	1,061

### 2.1.2. Atemtyp

Bei der ersten Untersuchung wurde bei 27 der 29 Probanden eine verstärkt abdominale Atmung festgestellt (alle außer Nr. 1 und Nr. 11).

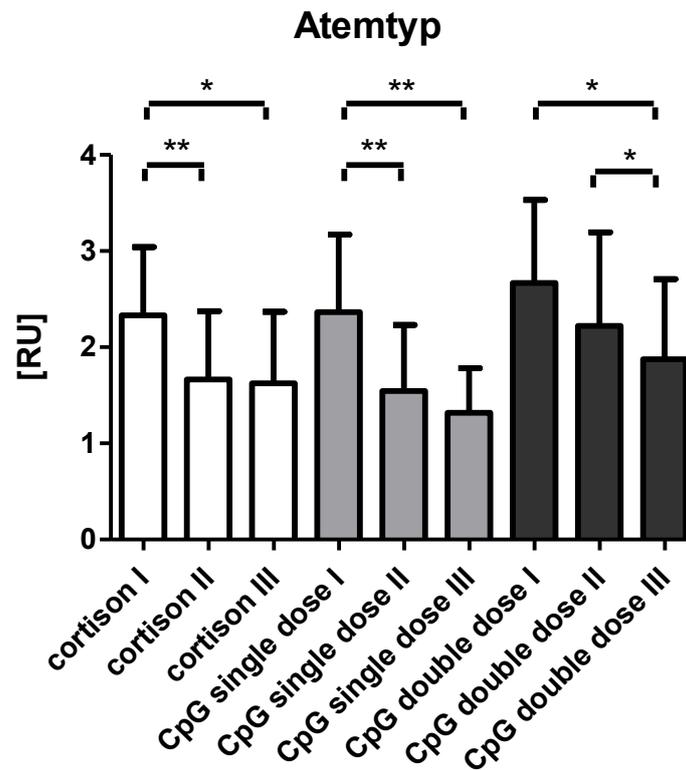
Zur Beurteilung des Atemtyps wurde eine Bewertungsskala von Grad 1 (ohne abdominale Komponente) bis hin zu Grad 4 (hochgradig abdominal betonte Atmung) zugrunde gelegt (ROBINSON et al., 2000).

Der Ausgangswert der „Kortisongruppe“ lag im Mittel bei 2,3RU ( $\pm 0,7$ ) und erfuhr eine signifikante Verbesserung ( $p=0,0098$ ) auf 1,7RU ( $\pm 0,7$ ) bei US2 (Abb. 27). Im Rahmen der US3 wurde eine signifikante Reduktion ( $p=0,0107$ ) auf einen Mittelwert von 1,6RU ( $\pm 0,7$ ) erzielt.

Bei der CpGsd-Gruppe lag der Basiswert für das Scoring des Atemtyps bei 2,4 RU ( $\pm 0,8$ ) und wurde durch die Behandlung hinsichtlich US2 signifikant ( $p=0,0042$ ) auf 1,5RU ( $\pm 0,7$ ) gesenkt. Die Langzeitevaluierung bei US3 wies einen Wert von 1,3RU ( $\pm 0,5$ ) auf und erfuhr somit ebenfalls eine statistisch signifikante Verbesserung ( $p=0,0061$ ).

Die CpGdd-Gruppe hatte bei der Bewertung des Atemtyps im Mittel einen Ausgangswert von 2,7RU ( $\pm 0,9$ ), was bei US2 nicht signifikant ( $p=0,0647$ ) auf 2,2 RU ( $\pm 1,0$ ) gemindert wurde. Bei US3 lag der Mittelwert bei 1,9 RU ( $\pm 0,8$ ) und es gab dabei eine signifikante Verbesserung, sowohl ausgehend von US1 ( $p=0,0359$ ),

als auch im Verlauf zwischen US2 und US3 ( $p=0,0263$ ).



**Abbildung 27:** Bewertungen des Atemtyps [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Alle Therapieregime konnten eine Verbesserung des Atemtyps erzielen (Tab. 9).

**Tabelle 9:** Veränderung der Atemtyps in Ruhe [%] bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1-US2	-27,8% ( $\pm 22,0$ )	-32,6% ( $\pm 23,7$ )	-15,7% ( $\pm 31,9$ )
US1-US3	-37,5% ( $\pm 17,3$ )	-40,5% ( $\pm 22,4$ )	-31,3% ( $\pm 23,9$ )

Im Vergleich der drei Behandlungsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Effekts auf den Atemtyp festgestellt werden (Tab.

10).

**Tabelle 10:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf den Atemtyp, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Atemtyp)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,3313
	Cortison - CpG double dose	0,2173
	CpG single - CpG double dose	0,1198
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,2538
	Cortison – CpG double dose	0,2563
	CpG single – CpG double dose	0,1740

Auch bei der Gegenüberstellung aller CpG-Probanden mit der „Kortisongruppe“ konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse errechnet werden, weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,9026$ ) noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,9557$ ).

Bezüglich der Wirkung auf den Atemtyp konnte zwischen US1 und US2 sowohl bei der „Kortisongruppe“ ( $d=0,845$ ), als auch bei der CpGsd ( $d=1,196$ ) ein großer klinischer Effekt erreicht werden (Tab. 11). Eine ähnliche Tendenz war auch in Hinblick auf die Langzeitwirkung zu beobachten, da hier ebenfalls durch die Kortison- ( $d=0,967$ ) und die CpGsd-Therapie ( $d=0,967$ ) ein Effekt großer klinischer Relevanz erzielt wurde.

**Tabelle 11:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf den Atemtyp.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,845
	CpG single dose	1,196
	CpG double dose	0,293
US 1 – US 3	Cortison	0,967
	CpG single dose	1,670
	CpG double dose	0,471

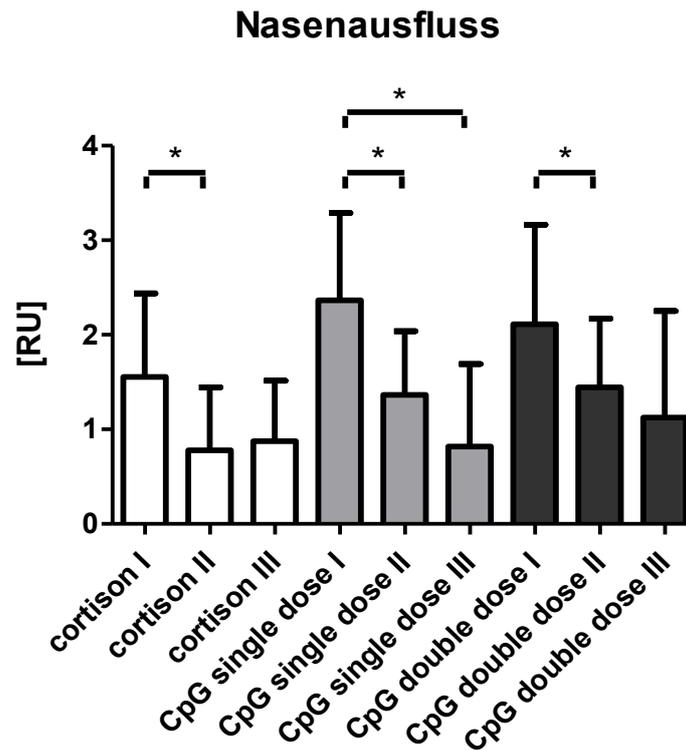
### 2.1.3. Nasenausfluss

Bei der ersten Untersuchung lag bei 27 der insgesamt 29 Patienten Nasenausfluss vor. Eine Ausnahme davon bildeten lediglich die Probanden Nr. 3 und Nr. 24. Für die Bewertung des Nasenausflusses wurde ein Scoring von 0-3 zugrunde gelegt (0=kein Nasenausfluss, 3=hgr. muköser Nasenausfluss).

Die „Kortisongruppe“ startete mit einem Mittelwert von 1,6RU ( $\pm 0,9$ ), was bei US2 signifikant ( $p=0,0486$ ) auf 0,8RU ( $\pm 0,7$ ) sank (Abb. 28). Im Rahmen von US3 konnte kein signifikantes Ergebnis ( $p=0,0947$ ) für die Reduktion auf 0,9RU ( $\pm 0,6$ ) erhoben werden.

Der Ausgangswert für die CpGsd-Gruppe lag bei 2,4 RU ( $\pm 0,9$ ). Dieser Wert erfuhr eine statistisch signifikante Verbesserung, sowohl in Hinblick auf US2 ( $p=0,0104$ ) mit 1,4RU ( $\pm 0,7$ ), als auch auf US3 ( $p=0,0115$ ), wo ein Ergebnis von 0,8RU ( $\pm 0,9$ ) festgestellt wurde.

Bei CpGdd konnte eine signifikante Reduktion ( $p=0,0477$ ) des Nasenausflusses vom Ausgangswert 2,1RU ( $\pm 1,1$ ) auf 1,4RU ( $\pm 0,7$ ) bei US2 erzielt werden. Bei der Langzeitevaluierung lag mit 1,1RU ( $\pm 1,1$ ) ein erniedrigter Mittelwert ohne statistischen Signifikanz ( $p=0,1449$ ) vor.



**Abbildung 28:** Bewertungen des Nasenausflusses [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, festgestellt jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen. (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Bei allen Behandlungsregimen war eine Reduktion des Nasenausflusses zu verzeichnen (Tab.12).

**Tabelle 12:** Veränderung der Nasenausflusses bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3) angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1–US2	-29,6% ( $\pm$ 80,3)	-33,3% ( $\pm$ 53,8)	-14,8% ( $\pm$ 68,4)
US1–US3	-33,3% ( $\pm$ 38,8)	-54,5% ( $\pm$ 62,0)	-31,3% ( $\pm$ 100,2)

Im Vergleich der verschiedenen Therapieformen waren keine statistisch signifikante Unterschiede zu verzeichnen (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf den Nasenausfluss unter Bestimmung des p-Wertes.

<b>Untersuchungsverlauf</b>	<b>Therapien im Vergleich</b>	<b>p-Wert (Nasenausfluss)</b>
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,3641
	Cortison - CpG double dose	0,1718
	CpG single - CpG double dose	0,2789
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0872
	Cortison – CpG double dose	0,2093
	CpG single – CpG double dose	0,3491

Diese Tendenz war ebenfalls bei der Zusammenfassung aller CpG-Patienten in der Gegenüberstellung mit der „Kortisongruppe“ zu erkennen, da hier sowohl zwischen US1 und US2 ( $p=0,4577$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $p=0,1904$ ) keine signifikanten Unterschiede vorlagen.

In der Betrachtung der Effektgrößen konnten zwischen der ersten und der zweiten Untersuchung sowohl mit der Kortison- ( $d=1,023$ ), als auch der CpGsd-Therapie ( $d=1,243$ ) große klinische Effekte festgestellt werden (Tab. 14). Bei CpGdd wurde ein mittlere klinischer Effekt ( $d=0,7599$ ) bestimmt.

In der Langzeitevaluierung acht Wochen nach der letzten Inhalation konnten alle angewandten Behandlungsregime, Kortison ( $d=0,901$ ), CpGsd ( $1,787$ ) sowie CpGdd ( $d=0,909$ ) einen großen klinischen Effekt bewirken.

**Tabelle 14:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf den Nasenausfluss.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	1,023
	CpG single dose	1,243
	CpG double dose	0,759
US 1 – US 3	Cortison	0,901
	CpG single dose	1,787
	CpG double dose	0,909

## 2.2. Ergebnisse spezielle Lungenuntersuchung

### 2.2.1. Auskultation der Atemwege

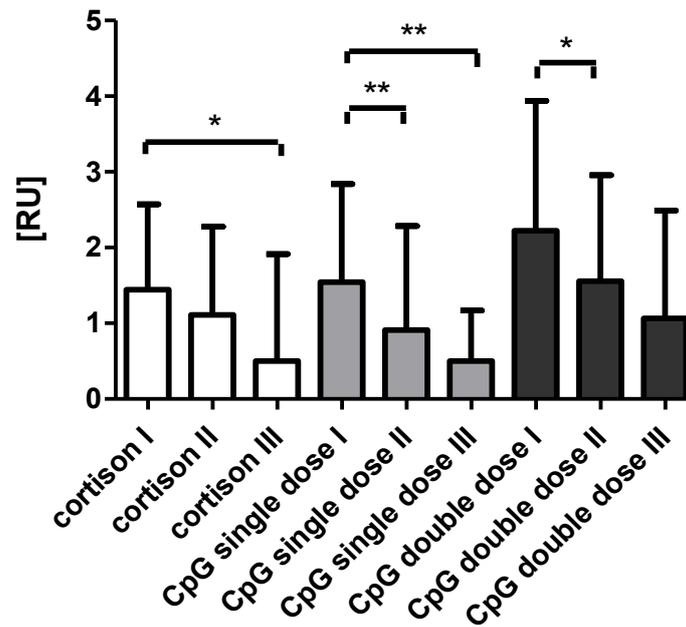
Ein Parameter, der im Zuge der speziellen Lungenuntersuchung evaluiert wurde, war die Auskultation der Lunge. Bei 26 der 29 teilnehmenden Pferde konnte bei der Erhebung der Basiswerte ein unphysiologischer Auskultationsbefund erhoben werden.

Bei der „Kortisongruppe“ konnte der Ausgangswert für die Auskultation von 1,4RU ( $\pm 1,1$ ) nicht signifikant ( $p=0,1165$ ) auf einen Mittelwert von 1,1RU ( $\pm 1,2$ ) reduziert werden (Abb. 29). Bei US 3 sank der Wert signifikant ( $p=0,0305$ ) auf 0,5RU ( $\pm 1,4$ ).

Bei CpGsd-Gruppe konnte der Mittelwert von US1 mit 1,5RU ( $\pm 1,3$ ) auf ein Ergebnis von 0,9RU ( $\pm 1,4$ ) bei US2 signifikant verbessert werden ( $p=0,0054$ ). Ebenfalls hoch signifikant gesenkt ( $p=0,0071$ ) wurde der Wert für den Auskultationsbefund in der Langzeitevaluierung mit 0,5RU ( $\pm 0,7$ ).

Die Auskultationsbefunde der CpGdd-Gruppe entwickelten sich mit einer signifikanten Reduktion ( $p=0,0284$ ) von 2,2RU ( $\pm 1,7$ ) bei US1 auf 1,6RU ( $\pm 1,4$ ) bei US2. Bei US3 hingegen konnte mit einem Wert von 1,1RU ( $\pm 1,4$ ) keine signifikante Veränderung hinsichtlich des Langzeiteffekts ( $p=0,0545$ ) festgestellt werden.

## Auskultation



**Abbildung 29:** Bewertung der Auskultationsbefunde [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Alle drei Behandlungsformen konnten eine Verbesserung der Auskultationsergebnisse bewirken (Tab. 15).

**Tabelle 15:** Verlauf des Auskultationsergebnisse bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3) angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1-US2	-22,2% ( $\pm$ 61,8)	-52,3% ( $\pm$ 48,0)	-25,0% ( $\pm$ 37,0)
US1-US3	-87,5% ( $\pm$ 35,4)	-65,9% ( $\pm$ 39,2)	-42,2% ( $\pm$ 48,6)

Beim Vergleich des Therapieerfolgs zwischen den drei Behandlungsformen war der Langzeiteffekt der Kortisontherapie auf die Auskultationsbefunde signifikant besser ( $p=0,0386$ ), als der der CpGdd (Tab. 16). In den weiteren Vergleichen der

Therapieformen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

Bei der Gegenüberstellung der CpG-all-Gruppe mit der Kortisontherapie konnte hinsichtlich des Langzeiteffekts eine signifikante Verbesserung ( $p=0,0343$ ) der Auskultationsbefunde auf Seiten der CpG-Therapie festgestellt werden.

**Tabelle 16:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf den Lungenauskultationsbefund unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Auskultation)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,1478
	Cortison - CpG double dose	0,4631
	CpG single - CpG double dose	0,1323
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0626
	Cortison – CpG double dose	0,0386
	CpG single – CpG double dose	0,1699

Ein großer klinischer Effekt ist bei der Auswertung des Langzeiteffekts (US3) der einfachen CpG-Dosis zu verzeichnen ( $d=0,973$ ) (Tab. 17). Mittlere klinische Effekte können, in Hinblick auf US3, sowohl bei der Kortisongruppe ( $d=0,710$ ), als auch bei der CpGdd ( $d=0,702$ ) erhoben werden.

**Tabelle 17:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die Ergebnisse der Lungenauskultation.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,261
	CpG single dose	0,449
	CpG double dose	0,385
US 1 – US 3	Cortison	0,710
	CpG single dose	0,973
	CpG double dose	0,702

### **2.2.2. Rückatmungsprobe**

Bei einigen Pferden war die Durchführung der Rückatmungsprobe aufgrund von Unwilligkeit nicht möglich (Nr. 7, 13, 15, 16). Bei drei weiteren Pferden wurden aus Rücksicht auf eine möglicherweise auftretende Dyspnoe von der Untersuchung abgesehen (Nr. 18, 22 und 27). Die Rückatmungsprobe lag vor der Behandlung bei keinem der Pferde im Normbereich von unter 4 Atemzügen bis zum Wiedererlangen der Ruheatmung nach Abnahme der Tüte. Da sich eine einheitliche, objektive Auswertung der Rückatmungsprobe zur Kontrolle des Therapieerfolgs als schwierig darstellt, wurde diese Methode vor allem unterstützend angewandt, um einen besseren Gesamtüberblick über den Gesundheitszustand der Pferde erlangen zu können. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nicht durchgeführt.

### **2.2.3. Lungenperkussion**

Eine Abweichung des physiologischen Lungenfeldes mittels Lungenperkussion wurde bei 25 von 29 Pferden ermittelt (physiologisches Lungenfeld: Nr. 11, 14, 16 und 17). Da innerhalb des relativ kurzen Untersuchungszeitraums von maximal 12 Wochen keine Veränderungen des Lungenfeldes zu erwarten sind, wurde dieser Test nur im Rahmen der ersten Untersuchung (US1) zur Einstufung der Erkrankung und nicht bei den Folgeuntersuchungen durchgeführt.

### **2.2.4. Arterielle Blutgasmessung**

#### **2.2.4.1. Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>)**

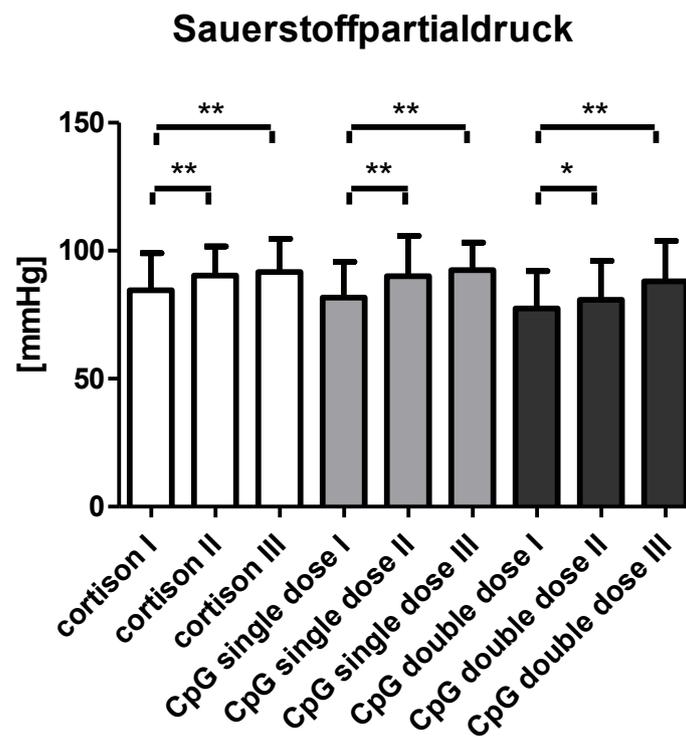
Bei der arteriellen Blutgasmessung konnte bei allen drei Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie der Sauerstoffpartialdruck im Mittel gesteigert werden (Abb. 30).

Bei der „Kortisongruppe“ steigerte sich der mittlere Ausgangswert signifikant ( $p=0,0039$ ) von 83,5mmHg ( $\pm 13,6$ ) auf 90,0mmHg ( $\pm 10,8$ ) bei US2. Bei US3 lag der PaO<sub>2</sub> im Mittel bei 91,7mmHg ( $\pm 12,2$ ) und wies somit einen signifikanten Anstieg auf ( $p=0,0078$ ).

Bei der CpGsd lag der Mittelwert bei der Basisuntersuchung bei 81,66mmHg ( $\pm 13,4$ ) und stieg bei US2 statistisch signifikant ( $p=0,0049$ ) auf 90,0mmHg ( $\pm 15,1$ ) an. Mit einem Wert von 92,47mmHg ( $\pm 10,4$ ) konnte der PaO<sub>2</sub> bei US3 ebenfalls

signifikant verbessert werden ( $p=0,0029$ ).

Die CpGdd startete mit einem Ausgangswert von 77,8mmHg ( $\pm 13,7$ ), welcher sich signifikant ( $p=0,0488$ ) auf 80,8mmHg ( $\pm 14,4$ ) bei US2 erhöhte. Bei US3 lag der Wert durchschnittlich bei 88,0mmHg ( $\pm 14,7$ ) und stieg somit auch in der Langzeitevaluierung statistisch signifikant an ( $p=0,0078$ ).



**Abbildung 30:** Bewertung des Sauerstoffpartialdruck [mmHg] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Im Mittel stiegen die Werte aller drei Behandlungsgruppen für den PaO<sub>2</sub> sowohl zwischen US1 und US2, als auch zwischen US1 und US3 an (Tab. 18).

**Tabelle 18:** Die Tabelle zeigt den relativen Anstiegs des Sauerstoffpartialdrucks der unterschiedlichen Therapiegruppen, jeweils zwischen der ersten und zweiten sowie zwischen der ersten und der dritten Untersuchung. Es sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD) angegeben.

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1–US2	+7,7% ( $\pm$ 7,2)	+10,6% ( $\pm$ 9,9)	+4,3% ( $\pm$ 6,1)
US1–US3	+10,6% ( $\pm$ 6,9)	+15,4% ( $\pm$ 17,9)	+14,6% ( $\pm$ 9,7)

Beim Vergleich des Erfolgs der verschiedenen Therapieregime konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 19).

Auch die Gegenüberstellung der Kortison- mit der CpG all-Gruppe wies weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,4531$ ), noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,1904$ ) signifikante Unterschiede auf.

**Tabelle 19:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf den Sauerstoffpartialdruck unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (PaO <sub>2</sub> )
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,2235
	Cortison - CpG double dose	0,1254
	CpG single - CpG double dose	0,0552
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,2957
	Cortison – CpG double dose	0,1641
	CpG single – CpG double dose	0,3705

Bei der Evaluierung der Effektgrößen lag bei der CpGsd hinsichtlich der Langzeitwirkung ein Effekt großer klinischer Relevanz ( $d=0,856$ ) vor (Tab. 20). Mittlere klinische Effekte konnten zwischen US1 und US2 bei der Therapie mit der CpGsd ( $d=0,555$ ) sowie zwischen US1 und US3 sowohl bei der Kortisongruppe ( $d=0,514$ ), als auch bei der CpGdd ( $d=0,697$ ) verzeichnet werden.

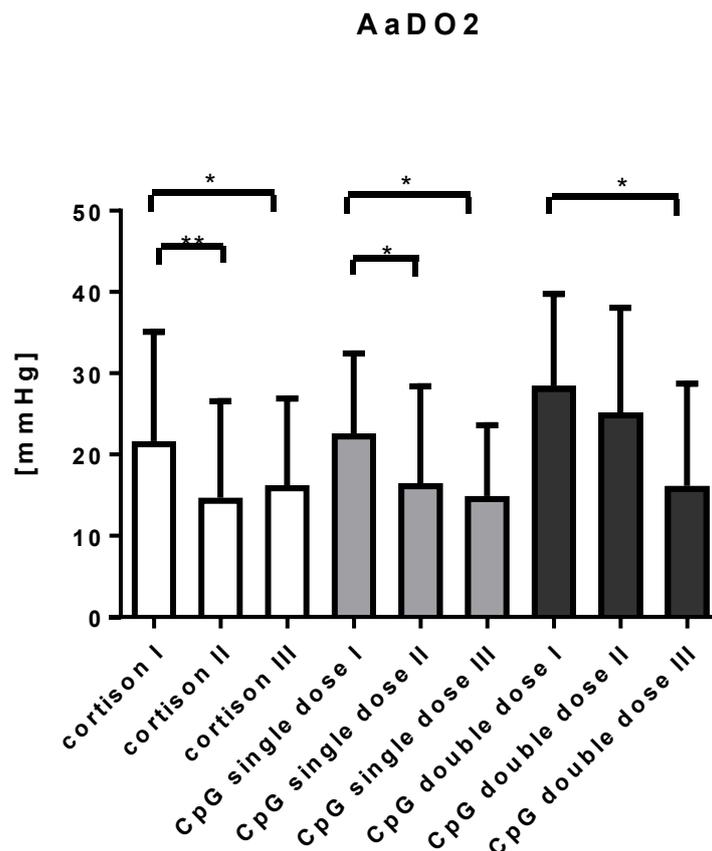
**Tabelle 20:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf den Sauerstoffpartialdruck zwischen US1 und US2 sowie zwischen US1 und US3.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf PaO <sub>2</sub>	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,438
	CpG single dose	0,555
	CpG double dose	0,221
US 1 – US 3	Cortison	0,514
	CpG single dose	0,856
	CpG double dose	0,697

#### 2.2.4.2. Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz (AaDO<sub>2</sub>)

Neben dem Sauerstoffpartialdruck wurde zusätzlich in Abhängigkeit des vorherrschenden Luftdrucks zum Zeitpunkt der Untersuchung die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz berechnet.

Im Rahmen der Kortisontherapie konnten sowohl zwischen US1 und US2 ( $p=0,0020$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $p=0,0234$ ) signifikante Verbesserungen erzielt werden (Abb. 31). Bei der CpGsd lag zwischen US1 und US2 ( $p=0,0131$ ) sowie zwischen US1 und US3 ( $p=0,0322$ ) eine signifikante Verbesserung vor. Die CpGdd wies eine statistisch signifikante Reduktion des AaDo<sub>2</sub>-Wertes bei der Langzeituntersuchung auf ( $p=0,0156$ ), wohingegen die Senkung von US1 zu US2 nicht signifikant war ( $p=0,0645$ ).



**Abbildung 31:** Bewertung der arterioalveolären Sauerstoffdifferenz [mmHg] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd (n=9): schwarz).

Die AaDO<sub>2</sub> konnte bei allen drei Therapieformen gesenkt werden (Tab. 21).

**Tabelle 21:** Mittelwerte des relativen Veränderung der arterioalveolären Sauerstoffdifferenz der unterschiedlichen Therapiegruppen, jeweils zwischen US1 und US2 sowie US1 und US3. Angeben sind die Mittelwerte (±SD).

Untersuchungsverlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1 – US2	-41,0% (±26,5)	-27,7% (±41,1)	-12,6% (±22,6)
US1 – US3	-24,4% (±28,7)	-30,1% (±53,2)	-49,0% (±37,9)

Zwischen den verschiedenen Behandlungsregimen konnten bezüglich des Effekts auf die AaDO<sub>2</sub> keine statistisch signifikanten Unterschiede bestimmt werden (Tab.

22). Eine Ausnahme davon bildet die Gegenüberstellung der Kortisongruppe mit der CpGdd, da hier zwischen US1 und US2 ein statistisch signifikanter Vorteil ( $p=0,0122$ ) aufseiten der Kortisontherapie liegt.

Im Vergleich von CpG-all mit der Kortisongruppe konnte eine signifikant bessere Langzeitwirkung ( $p=0,0422$ ) aufseiten der CpG-Therapie festgestellt werden.

**Tabelle 22:** Hier werden die drei Therapieformen bezüglich deren Auswirkung auf den AaDO2 miteinander verglichen.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (AaDO2)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,2712
	Cortison - CpG double dose	0,0122
	CpG single - CpG double dose	0,1617
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0633
	Cortison – CpG double dose	0,0803
	CpG single – CpG double dose	0,3863

Bei der Bestimmung der Effektgrößen fallen besonders die Langzeiteffekte der beiden CpG-Gruppen auf (Tab. 23). Dabei wies sowohl die CpGsd ( $d=0,829$ ), als auch die CpGdd ( $d=1,030$ ) einen großen klinischen Effekt auf. Im Gegensatz dazu war bei der Kortisontherapie bei US3 nur ein kleiner klinischer Effekt ( $d=0,441$ ) zu verzeichnen. Bei US2, direkt im Anschluss an die Behandlung, lag bei der Kortisongruppe ( $d=0,549$ ) sowie bei der CpGsd ein mittlerer klinischer Effekt vor.

**Tabelle 23:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die AaDO<sub>2</sub> zwischen US1 und US2 sowie zwischen US1 und US3.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,549
	CpG single dose	0,562
	CpG double dose	0,271
US 1 – US 3	Cortison	0,441
	CpG single dose	0,829
	CpG double dose	1,030

### 2.2.5. Messung des Interpleuraldrucks

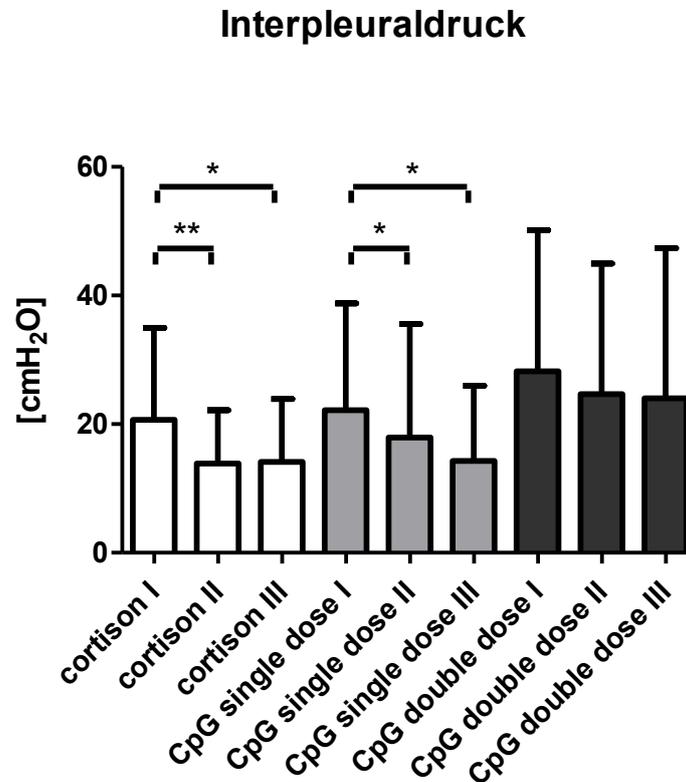
Mittels indirekter Lungendruckmessung wurde der Interpleuraldruck bestimmt. Der Mittelwert aller teilnehmenden Patienten lag bei 23,6cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 17,5) und somit über dem physiologischen Interpleuraldruck von <10cmH<sub>2</sub>O.

Beim Großteil der Patienten (21 von 29 Pferden) erfolgte die Untersuchung ohne Sedierung, jedoch war das nicht bei allen Patienten möglich, da einige Pferde Abwehrreaktionen beim Vorschieben der oesophagealen Sonde zeigten. Bei diesen Patienten wurde die Interpleuraldruckmessungen deshalb dann bei allen drei Untersuchungen direkt nach einer leichten Sedierung durchgeführt.

Die „Kortisongruppe“ wies bei US1 einen Ausgangswert von 20,7cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 14,3) auf, der sich signifikant ( $p=0,0078$ ) auf 13,9cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 8,3) bei US2 reduzierte (Abb. 32) Auch bei US3 lag eine signifikante Reduktion ( $p=0,0343$ ) des Interpleuraldrucks auf 14,1 cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 9,8) vor.

Die CpGsd bewirkte eine signifikante Senkung ( $p=0,0206$ ) des Ausgangswerts von 22,2cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 16,6) auf 17,9cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 17,7) bei US2. Bei US3 lag der Mittelwert für den Interpleuraldruck bei 14,3cmH<sub>2</sub>O ( $\pm$ 11,7) und hatte somit sowohl bezogen auf US1 ( $p=0,0361$ ), als auch auf US2 ( $p=0,0225$ ) eine signifikante Reduktion erfahren.

Bei der CpGdd lag der Wert für den Interpleuraldruck bei US1 bei 28,2 cmH<sub>2</sub>O ( $\pm 21,9$ ) und konnte nicht signifikant ( $p=0,1158$ ) auf 24,7cmH<sub>2</sub>O ( $\pm 20,3$ ) bei US2 gesenkt werden. Auch die Reduktion auf 24,0cmH<sub>2</sub>O ( $\pm 23,4$ ) bei US3 war statistisch nicht signifikant ( $p=0,3264$ ).



**Abbildung 32:** Ergebnisse der Interpleuraldruckmessung [cmH<sub>2</sub>O] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Alle drei Behandlungsformen konnten eine Reduktion des Interpleuraldrucks erzielen (Tab. 24).

**Tabelle 24:** Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Veränderung der Werte für den Interpleuraldruck der unterschiedlichen Therapiegruppen, jeweils zwischen der ersten und zweiten sowie der ersten und der dritten Untersuchung.

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1 – US2	-30,0% ( $\pm 21,1$ )	-20,3% ( $\pm 27,3$ )	-6,8% ( $\pm 42,9$ )
US1 – US3	-30,3% ( $\pm 25,9$ )	-29,7% ( $\pm 48,0$ )	-4,9% ( $\pm 54,2$ )

Therapievergleichend konnten keine signifikanten Vorteile bei einer der Behandlungsformen hinsichtlich des Interpleuraldrucks festgestellt werden (Tab. 25).

Auch bei der Zusammenfassung aller CpG-Pferde (CpG-all) konnte weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,0971$ ), noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,4472$ ) signifikante Unterschiede bei der Gegenüberstellung mit der Kortisontherapie evaluiert werden.

**Tabelle 25:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf die indirekte Lungendruckmessung unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Interpleuraldruck)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,1611
	Cortison - CpG double dose	0,1077
	CpG single - CpG double dose	0,4247
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,1711
	Cortison – CpG double dose	0,1911
	CpG single – CpG double dose	0,1076

Keine der Therapieformen konnte einen großen klinischen Effekt erzielen (Tab. 26). Jedoch lag zwischen US1 und US2 ein mittlerer klinischer Effekt bei der Kortisontherapie ( $d=0,581$ ) vor. Eine ähnliche Tendenz konnte sowohl bei der Kortisongruppe ( $d=0,532$ ) als auch bei der CpGsd-Gruppe ( $d=0,551$ ) bezüglich der Langzeitwirkung festgestellt werden.

**Tabelle 26:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf den Interpleuraldruck zwischen US1 und US2 sowie zwischen US1 und US3.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,581
	CpG single dose	0,251
	CpG double dose	0,166
US 1 – US 3	Cortison	0,532
	CpG single dose	0,551
	CpG double dose	0,186

## 2.2.6. Bronchoskopie

### 2.2.6.1. Menge des Trachealschleims

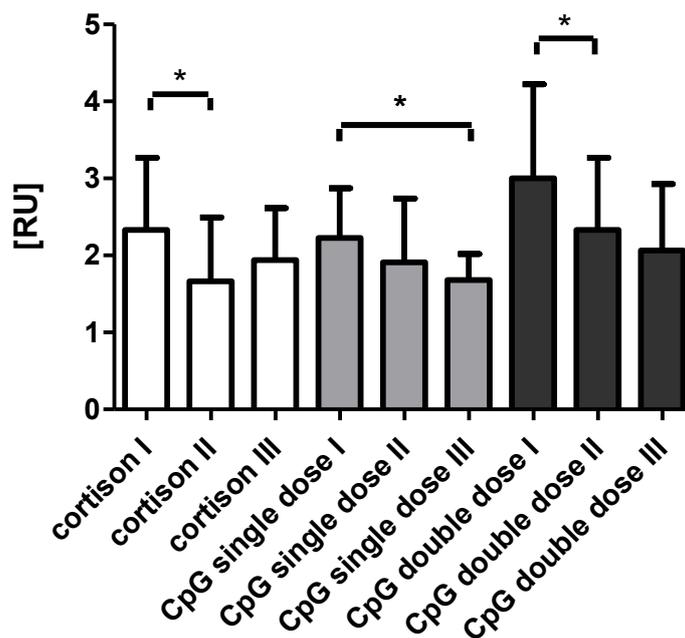
Im Zuge der endoskopischen Untersuchung der Atemwege wurde mittels des Scorings nach Gerber die Menge des Trachealschleims bewertet (GERBER et al., 2004).

Die Kortisongruppe wies einen Ausgangswert für die Trachealschleimmenge von 2,3RU ( $\pm 0,9$ ) auf (Abb. 33). Dieses Ergebnis konnte bei US2 signifikant ( $p=0,0267$ ) auf 1,7RU ( $\pm 0,7$ ) reduziert werden. Bei US3 stieg der Wert auf 1,9RU ( $\pm 0,7$ ) an und war somit in Hinblick auf den Langzeiteffekt nicht signifikant ( $p=0,0533$ ).

Bei CpGsd lag der Wert für US1 bei 2,2RU ( $\pm 0,7$ ) und reduzierte sich statistisch nicht signifikant ( $p=0,1097$ ) auf 1,9RU ( $\pm 0,8$ ) bei US2. Eine statistisch signifikante Verbesserung ( $p=0,0486$ ) konnte im Rahmen von US3 auf einen Mittelwert von 1,7RU ( $\pm 0,3$ ) erzielt werden.

Der Ausgangswert für die Mukusmenge lag bei CpGdd bei 3,0RU ( $\pm 1,2$ ), was bei US2 statistisch signifikant ( $p=0,0289$ ) auf 2,3RU ( $\pm 0,9$ ) gesenkt werden konnte. Bei der Langzeituntersuchung sank der Wert nicht signifikant ( $p=0,0731$ ) auf 2,1RU ( $\pm 0,9$ ).

### Menge des Trachealschleims



**Abbildung 33:** Ergebnisse der Menge des Trachealschleims [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd (n=9): schwarz).

Alle drei Behandlungsregime konnte eine Reduktion der Schleimmenge in der Trachea erzielen (Tab. 27).

**Tabelle 27:** Mittelwerte des relativen Abfalls der Menge des Mukus in der Luftröhre der unterschiedlichen Therapiegruppen, jeweils zwischen der ersten und zweiten sowie der ersten und der dritten Untersuchung. Angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1 – US2	-26,6% ( $\pm$ 36,6)	-11,4% ( $\pm$ 41,1)	-18,8% ( $\pm$ 24,1)
US1 – US3	-16,1% ( $\pm$ 14,1)	-18,3% ( $\pm$ 27,5)	-28,2% ( $\pm$ 30,6)

Im Wirkungsvergleich der verschiedenen Therapieformen konnten keine signifikanten Unterschiede auf die Ergebnisse für den Parameter „Menge des Trachealschleims“ eruiert werden (Tab. 28).

Auch der Vergleich der CpG-all mit der Kortisontherapie konnte sowohl zwischen US1 und US2 ( $p=0,5000$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $p=0,1058$ ) keine deutlichen Unterschiede der Behandlungsformen aufzeigen.

**Tabelle 28:** Therapieformen im Vergleich auf die Auswirkung auf die Menge an Trachealschleim unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Menge an Trachealschleim)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,4848
	Cortison - CpG double dose	0,4647
	CpG single - CpG double dose	0,3799
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,2097
	Cortison – CpG double dose	0,0824
	CpG single – CpG double dose	0,2911

Einen großen klinischen Effekt konnten sowohl die CpGsd ( $d=0,964$ ), als auch die CpGdd ( $d=0,841$ ) in der Langzeitevaluierung verzeichnen (Tab. 29). Zwischen US1 und US2 konnte man bei der Kortison- ( $d=0,677$ ) sowie bei der CpGdd-Gruppe ( $d=0,660$ ) einen klinischen Effekt mittlerer Relevanz feststellen.

**Tabelle 29:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die Menge des Trachealschleims zwischen US1 und US2 sowie zwischen US1 und US3.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d) -
US 1 – US 2	Cortison	0,677
	CpG single dose	0,402
	CpG double dose	0,660
US 1 – US 3	Cortison	0,483
	CpG single dose	0,964
	CpG double dose	0,841

### **2.2.6.2. Viskosität des Trachealschleims**

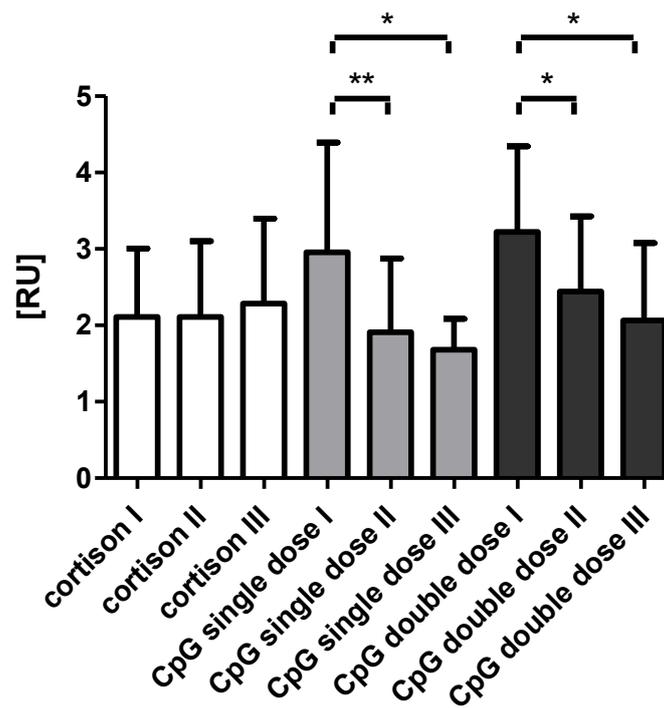
Zur Evaluierung der Viskosität des Mukus in der Trachea wurde ein Scoring-System von Gerber angewandt (GERBER et al., 2004).

Die Kortisongruppe wies bei US1 einen Mittelwert von 2,1RU ( $\pm 0,9$ ) auf und blieb bei US2 mit 2,1RU ( $\pm 1,0$ ) ohne signifikante Veränderung ( $p=0,4651$ ) (Abb. 34). Bei US3 stieg der Wert für die Viskosität des Trachealschleims mit 2,3RU ( $\pm 1,1$ ) nicht signifikant ( $p=0,4615$ ) an.

Bei CpGsd reduzierte sich der Mittelwert für US1 von 3,0RU ( $\pm 1,4$ ) signifikant ( $p=0,0084$ ) auf 1,9RU ( $\pm 1,0$ ) bei US2. In der Langzeitbewertung erfuhr der Wert eine signifikante Senkung ( $p=0,0356$ ) auf 1,7RU ( $\pm 0,4$ ).

Die CpGdd-Therapie bewirkte eine signifikante Reduktion ( $p=0,0107$ ) von 3,2RU ( $\pm 1,1$ ) bei US1 auf 2,4RU ( $\pm 1,0$ ) bei US2. Bei US3 hatte sich das Ergebnis für die Viskosität mit 2,1RU ( $\pm 1,0$ ) ebenfalls signifikant ( $p=0,0411$ ) verbessert.

### Viskosität des Trachealschleims



**Abbildung 34:** Ergebnisse der Viskosität des Trachealschleims [RU], die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd (n=9): schwarz).

Die beiden CpG-Gruppen konnten eine Verbesserung der Viskosität des Trachealschleims erzielen, wohingegen bei der Kortisongruppe eine Verschlechterung des Parameters verzeichnet wurde (Tab. 30).

**Tabelle 30:** Mittelwerte des relativen Veränderung der Viskosität des Mukus in der Luftröhre der unterschiedlichen Therapiegruppen, jeweils zwischen der ersten und zweiten sowie der ersten und der dritten Untersuchung. Angeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1 – US2	+12,7% ( $\pm$ 74,0)	-28,3% ( $\pm$ 39,4)	-22,3% ( $\pm$ 18,5)
US1 – US3	+4,8% ( $\pm$ 53,6)	-19,0% ( $\pm$ 66,8)	-28,1% ( $\pm$ 41,1)

Im Vergleich der verschiedenen Therapieformen ist zwischen US1 und US2 ein signifikanter Vorteil ( $p=0,0237$ ) der CpGsd gegenüber der Kortisontherapie zu erkennen (Tab. 31). Der Langzeiteffekt ist, verglichen mit der Kortisontherapie, sowohl bei der CpGsd ( $p=0,0404$ ) als auch bei der CpGdd ( $p=0,0405$ ) signifikant besser. Zwischen den beiden CpG-Dosierungen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

Bei der Gegenüberstellung der CpG-all mit der Kortisongruppe lag zwischen US1 und US2 ( $p=0,0174$ ) sowie zwischen US1 und US3 ( $p=0,0213$ ) ein statistisch signifikanter Vorteil auf Seiten der CpG-Behandlung vor.

**Tabelle 31:** Unter Bestimmung des p-Werts werden die verschiedenen Behandlungsformen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Viskosität des Schleimes in der Trachea miteinander verglichen.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Mukusviskosität)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,0237
	Cortison - CpG double dose	0,0534
	CpG single - CpG double dose	0,1432
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0404
	Cortison – CpG double dose	0,0405
	CpG single – CpG double dose	0,4669

Bei der Bestimmung der Effektgrößen konnte bei der CpGsd sowohl zwischen US1 und US2 ( $d=0,896$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $d=1,230$ ) ein großer klinischer Effekt festgestellt werden (Tab. 32). Die CpGdd erzielte bezogen auf US2 ( $d=0,765$ ) sowie in Hinblick auf die Langzeitevaluierung bei US3 ( $d=0,765$ ) einen mittleren klinischen Effekt. Bei der Kortisongruppe hingegen war zwischen US1 und US2 kein Effekt ( $d=0,000$ ) bzw. eine negativer Effekt hinsichtlich US3 ( $d= -0,200$ ) zu verzeichnen.

**Tabelle 32:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die Viskosität des Trachealschleims zwischen US1 und US2 sowie zwischen US1 und US3.

Untersuchungsverlauf	Therapieform	Effektgrößen (d) - Mukusviskosität
US 1 – US 2	Cortison	0,000
	CpG single dose	0,896
	CpG double dose	0,765
US 1 – US 3	Cortison	-0,200
	CpG single dose	1,230
	CpG double dose	0,765

### 2.2.7. Neutrophile Granulozyten in der BAL

Bei der zytologischen Auswertung der Bronchoalveolären Lavage lag, als Marker für Entzündung in der Lunge, das Hauptaugenmerk auf dem prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl.

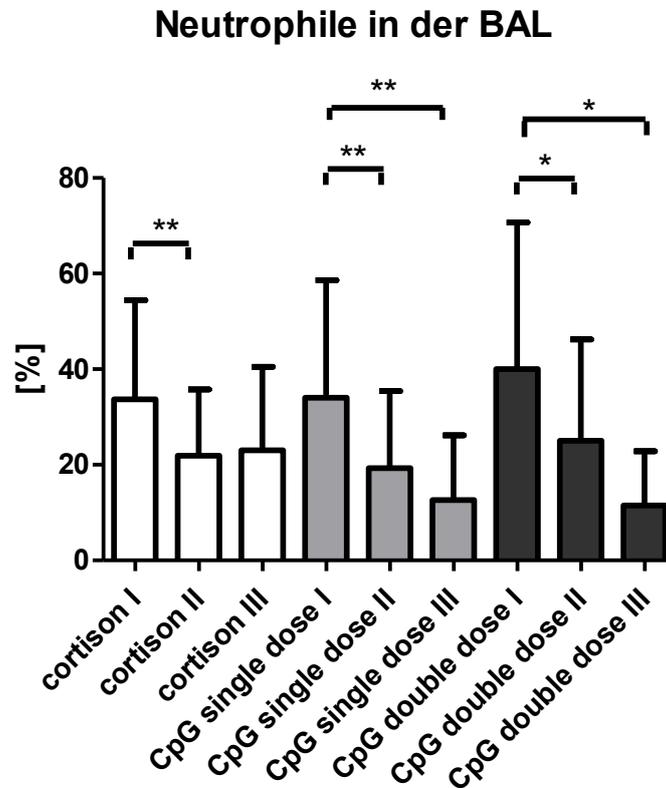
Alle Patienten hatten bei der ersten Untersuchung einen Basiswert für den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten, der den als physiologisch eingestuften Wert von < 5%, überschritt.

Bei der Kortisongruppe wurde der Mittelwert für die Neutrophilen von 33,7% ( $\pm 19,6$ ) bei US1 auf 21,8% ( $\pm 13,0$ ) bei US2 signifikant gesenkt ( $p=0,0098$ ) (Abb. 35). Im Rahmen von US3 konnte mit einem Wert von 23,0% ( $\pm 17,5$ ) keine signifikante Verbesserung festgestellt werden ( $p=0,0797$ ).

Bei CpGsd konnte ein signifikanter Abfall ( $p=0,0019$ ) an Neutrophilen von 34,0% ( $\pm 23,4$ ) bei US1 auf 19,1% ( $\pm 15,4$ ) im Rahmen von US2, festgestellt werden. Mit einem Ergebnis von 13,1% ( $\pm 12,3$ ) bei US3 wurde ebenfalls hinsichtlich der Langzeitwirkung eine signifikante Reduktion ( $p=0,0019$ ) der Entzündungszellen erzielt.

Der Mittelwert der Neutrophilen konnte bei der CpGdd-Gruppe von 39,9% ( $\pm 28,9$ ) bei US1 signifikant ( $p=0,0292$ ) auf 25,0% ( $\pm 20,1$ ) bei US2 gesenkt werden. Eine

signifikante Reduktion ( $p=0,0156$ ) auf 11,5% ( $\pm 10,8$ ) wurde auch bei US3 festgestellt.



**Abbildung 35:** Ergebnisse des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten in der BAL [%] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Alle Behandlungsformen konnten im Mittel eine Reduktion des Neutrophilenanteils in der BAL bewirken (Tab. 33).

**Tabelle 33:** Veränderung des Anteils an Neutrophilen in der BAL [%] bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3), angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

<b>Untersuchungs-verlauf</b>	<b>Cortison</b>	<b>CpG single dose</b>	<b>CpG double dose</b>
US1–US2	-31,8% ( $\pm$ 31,0)	-43,3% ( $\pm$ 21,4)	-33,9% ( $\pm$ 46,9)
US1–US3	-11,4% ( $\pm$ 92,4)	-61,3% ( $\pm$ 26,0)	-62,2% ( $\pm$ 31,4)

Bei der Beurteilung des Einflusses auf den Anteil an Neutrophilen in der BAL, konnten zwischen US1 und US2 keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Therapieformen festgestellt werden (Tab. 34). Hinsichtlich der Langzeitwirkung fiel eine signifikante Verbesserung ( $p=0,0338$ ) bei der CpGsd im Vergleich zur Kortisontherapie auf.

Auch bei der Gegenüberstellung der CpG-all und der Kortisongruppe lag bei der Bewertung des Langzeiteffekts ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,0213$ ) zu Gunsten der CpG-Therapie vor.

**Tabelle 34:** Unter Bestimmung des p-Werts werden die verschiedenen Behandlungsformen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den Anteil an Neutrophilen in der BAL miteinander verglichen.

<b>Untersuchungsverlauf</b>	<b>Therapien im Vergleich</b>	<b>p-Wert (Neutrophile)</b>
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,2974
	Cortison - CpG double dose	0,4317
	CpG single - CpG double dose	0,3262
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0338
	Cortison – CpG double dose	0,0517
	CpG single – CpG double dose	0,4121

In Hinblick auf den Langzeiteffekt konnten sowohl bei CpGsd ( $d=1,064$ ), als auch bei CpGdd ( $d=1,232$ ) Effektgrößen von großer klinischer Relevanz errechnet werden (Tab. 35). Bei der Kortisongruppe ( $d=0,555$ ) lag der Wert bei US3 in einem

Bereich, der als mittlerer klinischer Effekt eingestuft wird. Zwischen US1 und US2 konnten bei Kortison ( $d=0,669$ ), CpGsd ( $d=0,715$ ) und bei CpGdd ( $d=0,568$ ) Effektgrößen mittlerer klinischer Relevanz bestimmt werden.

**Tabelle 35:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die Neutrophilen in der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf Neutrophilen	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,669
	CpG single dose	0,715
	CpG double dose	0,568
US 1 – US 3	Cortison	0,555
	CpG single dose	1,064
	CpG double dose	1,232

### 2.2.8. Klinisches Scoring

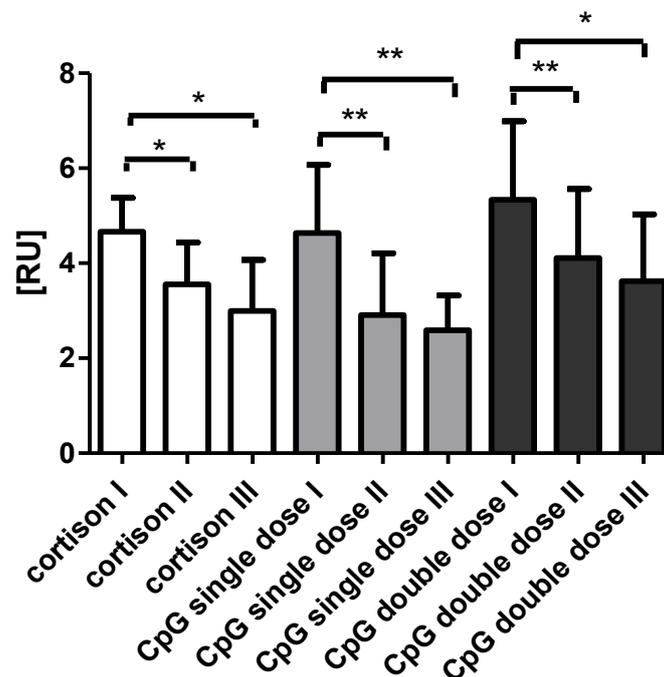
Für die Berechnung des klinischen Scorings wurde die Summe der beiden Kriterien Nüsternblähen und Atemtyp zugrunde gelegt (ROBINSON et al., 2000).

Die Kortisongruppe wurde bei US1 mit einen Mittelwert von 4,7RU ( $\pm 0,7$ ) bewertet, was bei US2 signifikant ( $p=0,0153$ ) auf 3,6RU ( $\pm 0,9$ ) gesunken war (Abb. 36). Auch hinsichtlich US3 war der Abfall auf 3,0RU ( $\pm 1,1$ ) statistisch signifikant ( $p=0,0103$ ).

Der Ausgangswert der CpGsd für das klinische Scoring von 4,6RU ( $\pm 1,4$ ) konnte bei US2 statistisch signifikant ( $p=0,0026$ ) auf 2,9RU ( $\pm 1,3$ ) reduziert werden. Mit einem Ergebnis von 2,6RU ( $\pm 0,7$ ) bei US3 wurde bezüglich des Langzeiteffekts ebenfalls eine signifikante Verbesserung ( $p=0,0032$ ) erzielt.

Die CpGdd wies einen Ausgangswert von 5,3RU ( $\pm 1,7$ ) auf. Bei US2 war der Wert signifikant ( $p=0,0100$ ) auf 4,1RU ( $\pm 1,5$ ) gesunken. Im Rahmen von US3 wurde ein Mittelwert für das klinische Scoring von 3,6RU ( $\pm 1,4$ ) bestimmt und somit lag auch hier eine signifikante Reduktion ( $p=0,0199$ ) vor.

## Klinisches Scoring



**Abbildung 36:** Ergebnisse des Klinischen Scorings [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd(n=9): schwarz).

Jede der drei angewandten Therapieformen konnte eine Reduktion des klinischen Scorings erzielen (Tab. 36).

**Tabelle 36:** Veränderung des klinischen Scorings [%] bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US2) sowie der ersten und dritten Untersuchung (US1-US3), angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1-US2	-23,1% ( $\pm$ 19,4)	-37,0% ( $\pm$ 18,8)	-22,6% ( $\pm$ 16,7)
US1-US3	-38,3% ( $\pm$ 13,2)	-42,8% ( $\pm$ 11,1)	-34,1% ( $\pm$ 17,9)

Im Vergleich zwischen den drei Behandlungsformen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Einflusses auf das klinische Scoring festgestellt

werden (Tab. 37).

Auch in der Gegenüberstellung aller CpG-Patienten (CpG-all) mit der Kortisongruppe konnte weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,2157$ ), noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,4459$ ) signifikante Unterschiede erhoben werden.

**Tabelle 37:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf das klinische Scoring unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (Klinisches Scoring)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,0775
	Cortison - CpG double dose	0,4465
	CpG single - CpG double dose	0,0533
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,3055
	Cortison – CpG double dose	0,3721
	CpG single – CpG double dose	0,1664

Zwischen US1 und US2 konnten sowohl bei der Kortisontherapie ( $d=1,376$ ), als auch bei der CpGsd ( $1,244$ ) große klinische Effekte erzielt werden (Tab. 38). Bei CpGdd lag ein mittlerer klinischer Effekt ( $d=0,749$ ) vor.

Bezogen auf die Langzeitevaluierung konnten alle Behandlungsformen einen großen klinischen Effekt erreichen. Einen Wert  $>0,8$  wiesen Kortison ( $d=1,897$ ), CpGsd ( $d=1,757$ ) sowie CpGdd ( $d=1,757$ ) auf.

**Tabelle 38:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf das klinische Scoring.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf das klinische Scoring	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	1,376
	CpG single dose	1,244
	CpG double dose	0,749
US 1 – US 3	Cortison	1,897
	CpG single dose	1,757
	CpG double dose	1,085

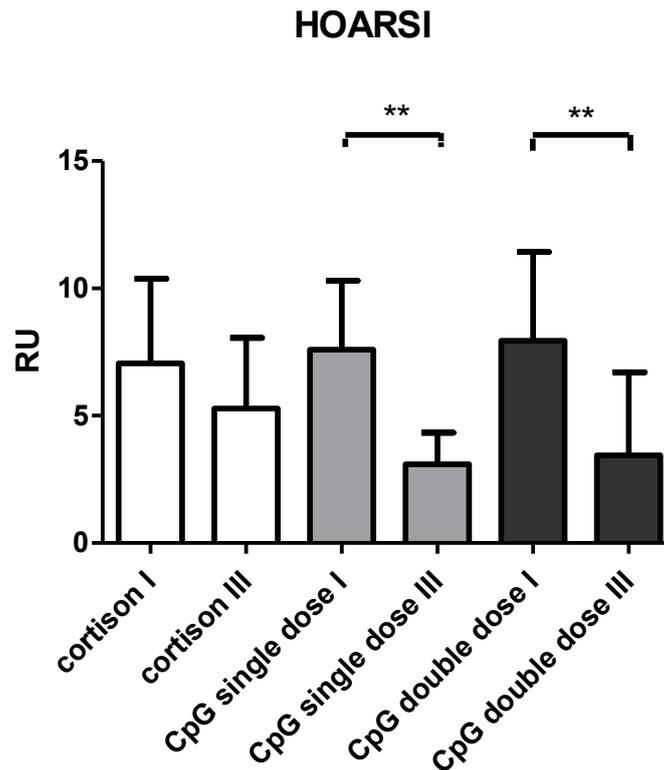
### 2.2.9. HOARSI

Mittels des standardisierten HOARSI (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index)- Fragebogens wurden die Bewertungen der Pferdebesitzer bezüglich des Gesundheitszustands und der Wirkung der Therapie auf die RAO-Pferde vor der ersten sowie acht Wochen nach der letzten Behandlung erhoben. Die Patientenbesitzer waren verblindet und wussten somit nicht, welche Therapie ihr Pferd erhalten hatte.

Laut Besitzereinschätzung lag der Ausgangswert des HOARSI-Scorings der Kortisongruppe bei 7,1RU ( $\pm 3,3$ ) und erfuhr eine statistisch nicht-signifikante Reduktion ( $p=0,0680$ ) auf 5,3RU ( $\pm 2,8$ ) bei US3 (Abb. 37).

Der Mittelwert der CpGsd-Gruppe sank signifikant ( $p=0,0038$ ) von 7,6RU ( $\pm 2,7$ ) bei US1 auf 3,1RU ( $\pm 1,2$ ) bei US3.

Bei der CpGdd reduzierte sich der Ausgangswert der Besitzereinschätzung von 7,9RU ( $\pm 3,5$ ) signifikant ( $p=0,0089$ ) auf einen Wert von 3,9RU ( $\pm 3,2$ ) bei US3.



**Abbildung 37:** Ergebnisse des HOARSI-Fragebogens [RU] bei den verschiedenen Behandlungsformen, die jeweils im Rahmen der drei Untersuchungen festgestellt wurden (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau und CpGdd (n=9): schwarz).

Alle drei Behandlungsformen konnten eine Reduktion des HOARSI-Scorings im Verlauf zwischen US1 und US3 erreichen (Tab. 39).

**Tabelle 39:** Veränderung der HOARSI-Evaluierung [RU] bei den drei Therapieformen, jeweils zwischen der ersten und zweiten (US1-US3), angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$ SD).

Untersuchungs-verlauf	Cortison	CpG single dose	CpG double dose
US1-US3	-20,0% ( $\pm$ 40,9)	-56,5% ( $\pm$ 20,3)	-56,2% ( $\pm$ 26,2)

Im Vergleich zwischen der Kortisontherapie und der CpGsd lag ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0137$ ) zu Gunsten der CpG-Therapie vor (Tab. 40). Die CpGdd schnitt in der Besitzerevaluierung ebenfalls statistisch signifikant besser ( $p=0,0271$ ) als die Kortisontherapie ab. Zwischen den beiden CpG-Dosierungen konnten keine

Unterschiede festgestellt werden ( $p=0,3549$ ).

Im Vergleich zwischen CpG-all und der Kortisongruppe konnte ein signifikanter Vorteil auf Seiten der CpG-Behandlung festgestellt werden ( $p=0,0074$ ).

**Tabelle 40:** Die drei Therapieformen im Vergleich auf ihre Auswirkung auf die Besitzerevaluierung mittels HOARSI unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (HOARSI)
US1-US3	Cortison - CpG single dose	0,0137
	Cortison - CpG double dose	0,0271
	CpG single - CpG double dose	0,3549

Bei der Evaluierung der Effektgrößen lag sowohl bei der CpGsd ( $d=2,135$ ), als auch bei der CpGdd ( $d=1,189$ ) ein großer klinischer Effekt vor (Tab. 41). Bei der Kortisongruppe konnte ein mittlerer klinischer Effekt ( $d=0,589$ ) errechnet werden.

**Tabelle 41:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf das HOARSI-Scoring.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf HOARSI	Effektgrößen (d)
US1-US3	Cortison	0,589
	CpG single dose	2,135
	CpG double dose	1,189

### 3. Therapieverträglichkeit

Keines der behandelten Pferde wies Anzeichen einer Therapieunverträglichkeit auf, sowohl bei den beiden CpG-Gruppen, als auch bei der Kortisongruppe.

Bei der Kontrolle der Blutbilder und des Fibrinogen-Wertes waren keine Hinweise auf unerwünschte Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit der Behandlung stehen, zu erkennen.

Außerdem zeigte keines der Pferde Veränderungen, die den Abbruchskriterien des zugrunde gelegten Protokolls entsprochen hätten.

## **4. Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen**

### **4.1. Ergebnisse der Zytokinmessungen**

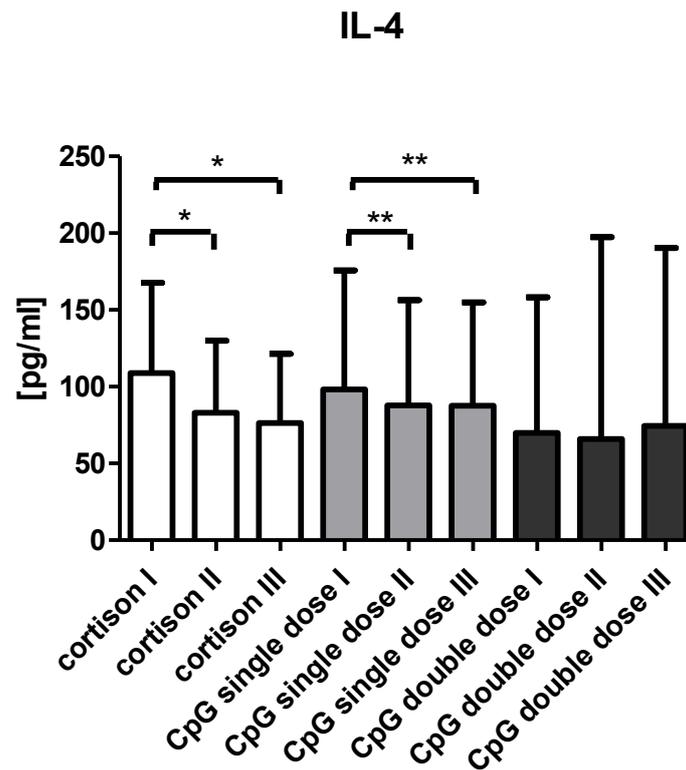
#### **4.1.1. Interleukin-4**

Für IL-4 konnten im Multiplex Assay keine Ergebnisse bestimmt werden. Deshalb wurden die IL-4-Konzentrationen zusätzlich mithilfe eines Sandwich-ELISAs kontrolliert.

Der mittlere Ausgangswert der IL-4-Konzentration der BAL betrug bei der Kortisongruppe 108,8pg/ml ( $\pm 58,7$ ) und erfuhr eine statistisch signifikante Reduktion ( $p=0,0371$ ) auf 82,9pg/ml ( $\pm 46,9$ ) bei US2 (Abb. 38). Im Rahmen von US3 war die Konzentration ebenfalls signifikant ( $p=0,0117$ ) auf 76,4pg/ml ( $\pm 44,9$ ) gesunken.

Die CpGsd-Gruppe hatte bei US1 einen Mittelwert für die IL-4-Konzentration von 98,3pg/ml ( $\pm 77,4$ ), der sich bei US2 statistisch signifikant ( $p=0,0039$ ) auf 87,9g/ml ( $\pm 68,4$ ) reduzierte. Mit einem Wert von 87,6pg/ml ( $\pm 67,3$ ) war ebenfalls der Langzeiteffekt bei US3 signifikant ( $p=0,0039$ ) reduziert.

Bei der CpGdd lag der mittlere Ausgangswert bei 69,9pg/ml ( $\pm 88,4$ ), dieser reduzierte sich statistisch nicht signifikant ( $p=0,3125$ ) auf 66,0pg/ml ( $\pm 131,4$ ) bei US2. Bei US3 war die IL-4-Konzentration auf 74,4pg/ml ( $\pm 115,8$ ) nicht signifikant ( $p=0,5000$ ) angestiegen.



**Abbildung 38:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die IL-4 Konzentrationen (in pg/ml) in der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz). Zur Analyse wurde ein Sandwich-ELISA verwendet.

Im Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsregimen konnte nur zwischen der Kortisongruppe und der CpGsd im Verlauf zwischen US1 und US2 ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,0214$ ) festgestellt werden (Tab. 42). Bei der Gegenüberstellung der CpG-all mit der Kortisongruppe konnte zwischen US1 und US2 kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,1899$ ) evaluiert werden. Zwischen US1 und US3 ( $p=0,0290$ ) lag hingegen ein statistisch signifikanter Vorteil aufseiten der CpG-Behandlung vor.

**Tabelle 42:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die IL-4-Konzentration in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (IL-4)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,1434
	Cortison - CpG double dose	0,3613
	CpG single - CpG double dose	0,3613
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,0214
	Cortison – CpG double dose	0,1344
	CpG single – CpG double dose	0,0770

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnten bei der Kortisontherapie mittlere klinische Effekte zwischen US1 und US2 ( $d=0,487$ ) sowie zwischen US1 und US3 ( $d=0,615$ ) festgestellt werden (Tab. 43).

**Tabelle 43:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die IL-4-Konzentration in der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf IL-10	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,487
	CpG single dose	0,143
	CpG double dose	0,035
US 1 – US 3	Cortison	0,615
	CpG single dose	0,147
	CpG double dose	-0,044

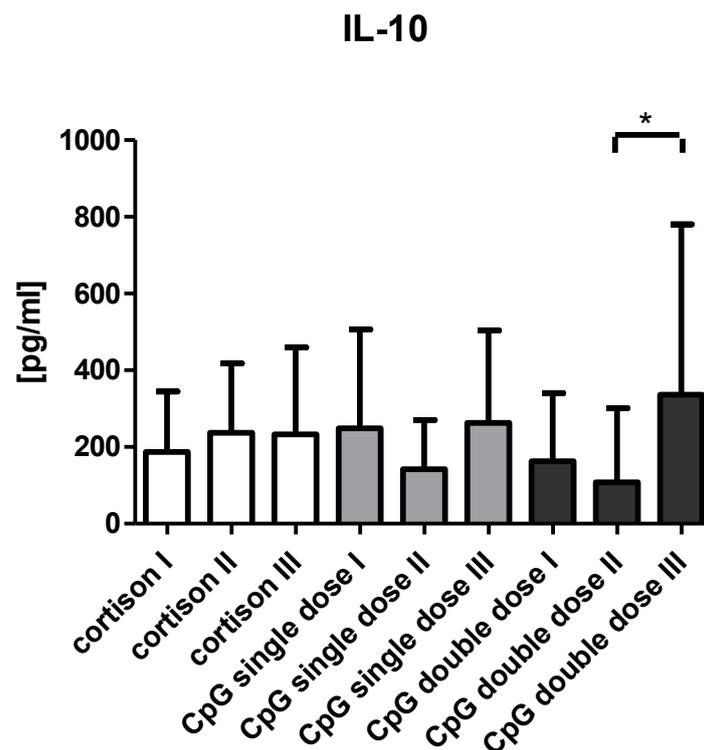
#### 4.1.2. Interleukin-10

Mittels Multiplex Assay wurden im Überstand der BAL-Spülflüssigkeit die Konzentrationen des Zytokins IL-10 gemessen.

Bei der Kortisongruppe lag der mittlere Ausgangswert für die IL-10 Bestimmung bei 186,94pg/ml ( $\pm 157,8$ ) und steigerte sich nicht signifikant ( $p=0,1250$ ) auf 236,83pg/ml ( $\pm 181,5$ ) bei US2 (Abb. 39). Im Rahmen von US3 wurde ein Wert von 232,94pg/ml ( $\pm 226,8$ ) gemessen. Dies war ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,5000$ ) verändert in Bezug auf US1.

Die CpGsd-Gruppe startete mit einem Mittelwert von 249,1pg/ml ( $\pm 256,99$ ) bei US1. Dieses Resultat sank statistisch nicht signifikant ( $p=0,1162$ ) auf einen Wert von 142,3pg/ml ( $\pm 128,3$ ) bei US2. Im Rahmen von US3 stieg das Ergebnis nicht signifikant ( $p=0,2158$ ) auf 288,2pg/ml ( $\pm 238,0$ ) an.

Bei der CpGdd-Gruppe lag der Ausgangswert im Mittel bei 164,6pg/ml( $\pm 176,1$ ) und sank nicht signifikant ( $p=0,3203$ ) auf 108,3pg/ml( $\pm 193,1$ ). Bei der Langzeitevaluierung stieg die IL-10-Konzentration auf 336,0pg/ml( $\pm 444,7$ ) an, dies war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,1563$ ). Lediglich der Anstieg von US2 zu US3 wies einen statistisch signifikanten Wert auf ( $p=0,0234$ ).



**Abbildung 39:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die IL-10 Konzentrationen (in pg/ml) in der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz)

Im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Therapieregimen ergaben sich weder zwischen US1 und US2, noch zwischen US1 und US3 signifikante Unterschiede für die IL-10-Konzentrationen (Tab. 44).

Auch zwischen CpG-all und der Kortisongruppe fiel kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen US1 und US2 ( $p=0,1669$ ) sowie hinsichtlich des Langzeiteffekts ( $p=0,2367$ ) auf.

**Tabelle 44:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die IL-10-Konzentration in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (IL-10)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,0983
	Cortison - CpG double dose	0,3981
	CpG single - CpG double dose	0,5000
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,2414
	Cortison – CpG double dose	0,3227
	CpG single – CpG double dose	0,4021

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnte zwischen US1 und US2 ein positiver klinischer Effekt mittlere Größe bei der CpGsd ( $d=0,526$ ) sowie kleiner Größe bei der CpGdd ( $d=0,305$ ) evaluiert werden (Tab. 45). Ein negativer klinischer Effekt mittlere Relevanz konnte bei der CpGdd ( $d=-0,520$ ) hinsichtlich des Langzeiteffekts festgestellt werden.

**Tabelle 45:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die IL-10-Konzentration in der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf IL-10	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,293
	CpG single dose	0,526
	CpG double dose	0,305
US 1 – US 3	Cortison	-0,238
	CpG single dose	-0,054
	CpG double dose	-0,520

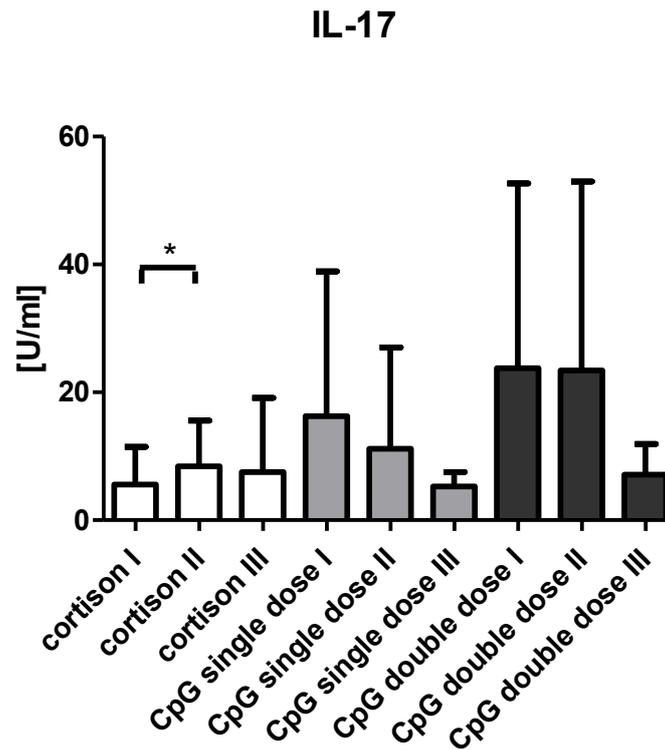
#### 4.1.3. Interleukin-17

In den BAL-Proben wurden die Konzentrationen für das Th-17 Zytokin IL-17 mittels Multiplex Assay bestimmt.

Der Mittelwert der Kortisongruppe lag bei US1 bei 5,6U/ml ( $\pm 5,9$ ) und steigerte sich bei US2 signifikant ( $p=0,0284$ ) auf 8,4U/ml ( $\pm 7,13$ ) (Abb. 40). Der Anstieg bei US3 auf 7,5U/ml ( $\pm 11,7$ ) war hingegen nicht signifikant ( $p=0,5000$ ).

Die CpGsd-Gruppe startete mit einem mittleren Ausgangswert für die IL-17 Konzentration von 16,3U/ml ( $\pm 22,7$ ). Bei US2 sank der Wert nicht signifikant ( $p=0,0862$ ) auf 11,2U/ml ( $\pm 15,9$ ). Obwohl die IL-17 Konzentration bei US3 mit 5,27U/ml ( $\pm 2,2$ ) im Mittel deutlich reduziert war, konnte diese Reduktion nicht als signifikant ( $p=0,0615$ ) erachtet werden.

Bei der CpGdd-Gruppe konnte bei US1 ein Mittelwert von 23,8U/ml ( $\pm 28,9$ ) festgestellt werden. Der Wert hatte sich mit einem Ergebnis von 23,4U/ml ( $\pm 29,5$ ) bei US2 kaum verändert ( $p=0,5000$ ). Eine deutliche, jedoch nicht signifikante Reduktion ( $p=0,1456$ ) auf 7,1U/ml ( $\pm 4,8$ ) erfuhr die IL-17 Konzentration hinsichtlich des Langzeiteffekts.



**Abbildung 40:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die IL-17 Konzentrationen (in U/ml) in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Dies erfolgte im Zuge der drei Untersuchungen. (Kortison (n=9): weiß, CpGsd (n=11): grau, CpGdd (n=9): schwarz).

Bezüglich des Einflusses der drei Behandlungsformen auf die IL-17-Konzentration konnte ein statistisch signifikanter Vorteil ( $p=0,0226$ ) aufseiten der CpGsd gegenüber der Kortisontherapie festgestellt werden (US1-US2) (Tab. 46).

Der Vergleich zwischen allen CpG-Patienten (CpG-all) mit der Kortisongruppe wies sowohl zwischen US1 und US2 ( $p=0,0886$ ), als auch hinsichtlich des Langzeiteffekts ( $p=0,1742$ ) keine signifikanten Unterschiede auf.

**Tabelle 46:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die IL-17-Konzentration in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (IL-17)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,0226
	Cortison - CpG double dose	0,4295
	CpG single - CpG double dose	0,3379
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,1651
	Cortison – CpG double dose	0,2797
	CpG single – CpG double dose	0,4506

Bei der Bestimmung der Effektgrößen fiel zwischen US1 und US2 bei der Kortisongruppe ein negativer Effekt ( $d=-0,439$ ) auf (Tab. 47). Bei der Langzeitevaluierung wiesen sowohl CpGsd ( $d=0,683$ ), als auch CpGdd ( $d=0,780$ ) mittlere klinische Effekte auf.

**Tabelle 47:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die IL-17-Konzentration in der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf IL-17	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,439
	CpG single dose	0,260
	CpG double dose	0,012
US 1 – US 3	Cortison	-0,214
	CpG single dose	0,683
	CpG double dose	0,780

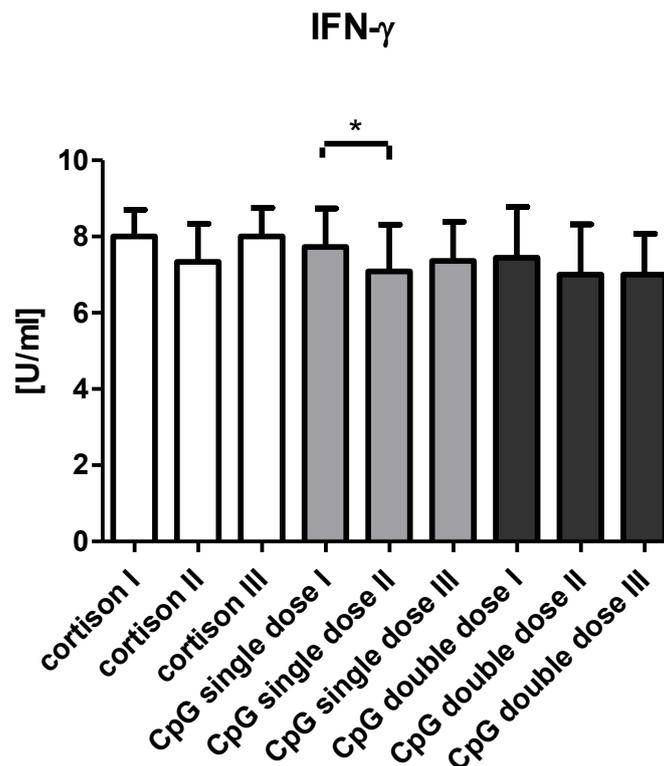
#### 4.1.4. Interferon- $\gamma$

Mittels Multiplex Assay wurden die Konzentrationen für das Zytokin IFN- $\gamma$  aus den BAL Proben gemessen.

Der Mittelwert für die IFN- $\gamma$ -Konzentration der Kortisongruppe lag bei US1 bei 8,0U/ml ( $\pm 0,7$ ) und sank statistisch nicht signifikant ( $p=0,1011$ ) auf 7,33U/ml ( $\pm 1,0$ ) bei US2 (Abb. 41). Mit einem Wert von 8,0U/ml ( $\pm 0,8$ ), im Rahmen von US3, war der Wert ebenfalls nicht signifikant verändert ( $p=0,4121$ ).

Bei der CpGsd-Gruppe reduzierte sich der Ausgangswert von 7,7U/ml ( $\pm 1,0$ ) signifikant ( $p=0,0209$ ) auf 7,1U/ml ( $\pm 1,2$ ) bei US2. Bei der Langzeitevaluierung wurde eine nicht signifikante Verminderung der IFN- $\gamma$ -Konzentration ( $p=0,1631$ ) auf 7,4U/ml ( $\pm 1,0$ ) verzeichnet.

Die CpGdd-Gruppe hatte bei US1 einen Mittelwert von 7,4U/ml ( $\pm 1,3$ ), der bei US2 statistisch nicht signifikant ( $p=0,1945$ ) auf 7,0U/ml ( $\pm 1,3$ ) gesunken war. Auch die Reduktion auf 7,0U/ml ( $\pm 1,1$ ) im Rahmen von US3 war nicht signifikant ( $p=0,3918$ ).



**Abbildung 41:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (in U/ml) in der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Therapievergleichend konnten keine signifikanten Unterschiede evaluiert werden (Tab. 48). Auch der Vergleich zwischen der Kortisongruppe und CpG-all wies weder zwischen US1 und US2 ( $p=0,4905$ ), noch zwischen US1 und US3 ( $p=0,3434$ ) signifikante Unterschiede auf.

**Tabelle 48:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die IFN $\gamma$ -Konzentration in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (IFN $\gamma$ )
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	0,4385
	Cortison - CpG double dose	0,4290
	CpG single - CpG double dose	0,4694
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,2940
	Cortison – CpG double dose	0,4787
	CpG single – CpG double dose	0,4171

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnten zwischen US1 und US2 sowohl die Kortisontherapie ( $d=0,773$ ), als auch die CpGsd ( $d=0,571$ ) einen mittleren klinischen Effekt erzielen (Tab. 49). CpGdd bewirkte in diesem Zeitraum einen kleinen klinischen Effekt ( $d=0,332$ ). Im Rahmen der Langzeitevaluierung wurde bei der CpGsd ( $0,363$ ) sowie der CpGdd ( $d=0,362$ ) ein kleiner klinischer Effekt festgestellt.

**Tabelle 49:** Vergleich der Effekte (Cohen´s d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die IFN $\gamma$ -Konzentration in der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf IFN $\gamma$	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,773
	CpG single dose	0,571
	CpG double dose	0,332
US 1 – US 3	Cortison	0,000
	CpG single dose	0,363
	CpG double dose	0,362

#### 4.1.5. Interferon- $\alpha$

Die Detektionsgrenze von mindesten 12pg/ml für Interferon- $\alpha$  konnte in den BAL-Proben nicht erreicht werden. Somit lagen zu diesem Parameter keine Ergebnisse vor.

#### 4.2. Ergebnisse der mRNA Analyse aus CD4-Lymphozyten

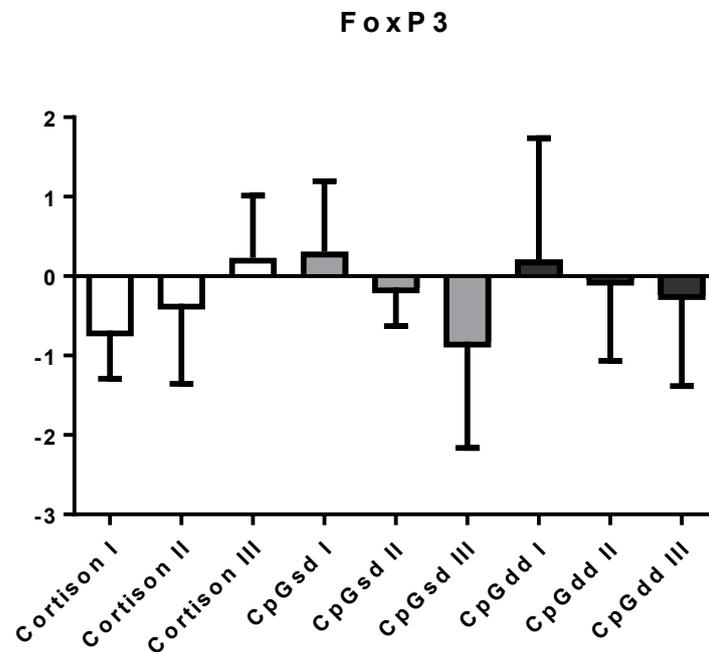
##### 4.2.1. FoxP3 (Treg)

Die mRNA Ergebnisse wurden mittels RealTime PCR bestimmt. Die Werte beziehen sich auf das „Housekeeping-Gen“ B-Gus, das zur Kalibrierung herangezogen wird. Zur Berechnung wurde der Logarithmus der RQ-Werte herangezogen.

Bei der Kortisongruppe lag der mittlere Ausgangswert für die FoxP3 Bestimmung bei -0,7 ( $\pm$ 0,6) und steigerte sich nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf -0,4 ( $\pm$ 1) bei US2 (Abb. 42). Der Anstieg auf 0,2 ( $\pm$ 0,8) bei US3 war ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,2944$ ) verändert in Bezug auf US1.

Die CpGsd-Gruppe startete mit einem Mittelwert von 0,3 ( $\pm$ 0,9) bei US1. Dieses Resultat sank statistisch nicht signifikant ( $p > 0,999$ ) auf einen Wert von -0,1 ( $\pm$ 0,5) bei US2. Im Rahmen von US3 reduzierte sich das Ergebnis nicht signifikant ( $p = 0,3510$ ) auf -0,8 ( $\pm$ 1,3).

Bei der CpGdd-Gruppe lag der Ausgangswert im Mittel bei 0,2 ( $\pm 1,5$ ) und sank nicht signifikant ( $p > 0,999$ ) auf -0,1 ( $\pm 1,0$ ). Bei der Langzeitevaluierung reduzierte sich der FoxP3-Wert statistisch nicht signifikant ( $p > 0,999$ ) auf -0,2 ( $\pm 1,1$ ).



**Abbildung 42:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die FoxP3-Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) errechnet (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Therapievergleichend konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Einflusses der Therapie auf die FoxP3-Expression evaluiert werden (Tab. 50). Im Vergleich der CpG-all mit der Kortisongruppe konnte ebenfalls, sowohl zwischen US1 und US2 ( $p > 0,9999$ ), als auch zwischen US1 und US3 ( $p = 0,2569$ ) keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

**Tabelle 50:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf den FoxP3-Wert in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (FoxP3)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	>0,9999
	Cortison - CpG double dose	>0,9999
	CpG single - CpG double dose	>0,9999
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	>0,9999
	Cortison – CpG double dose	0,3133
	CpG single – CpG double dose	>0,9999

Die Effektgrößenberechnung wies lediglich bei der Kortisongruppe zwischen US1 und US3 einen großen Effekt ( $d = -1,317$ ) auf (Tab. 51). Ein mittlerer Effekt wurde bei der CpGsd (US1-US2:  $d = 0,618$ ) evaluiert.

**Tabelle 51:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die FoxP3-expression in den CD4-Zellen der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf FoxP3	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,410
	CpG single dose	0,618
	CpG double dose	0,192
US 1 – US 3	Cortison	-1,317
	CpG single dose	1,013
	CpG double dose	0,314

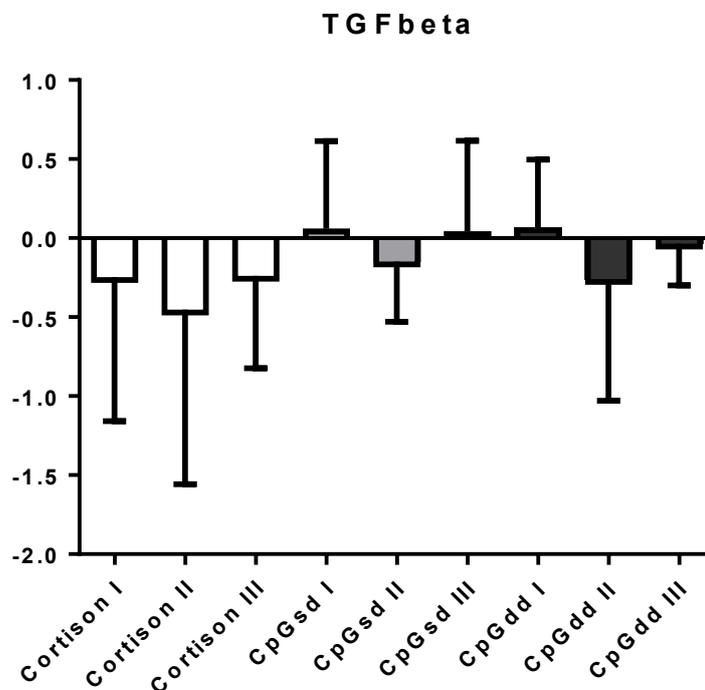
#### 4.2.2. TGF- $\beta$ (Wirkung auf Th1)

Die TGF- $\beta$ -mRNA-Konzentration aus CD4-Zellen wurde mittels Real Time PCR gemessen.

Der TGF- $\beta$ -Mittelwert der Kortisongruppe lag bei US1 bei  $-0,3 (\pm 0,9)$  und sank statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-4,5 (\pm 1,1)$  bei US2 (Abb. 43). Mit  $-0,2 (\pm 0,6)$ , im Rahmen von US3, war der Wert ebenfalls nicht signifikant verändert ( $p > 0,9999$ ).

Bei der CpGsd-Gruppe fiel der Wert für TGF- $\beta$  von  $0,1 (\pm 0,6)$  bei US1 auf  $-0,2 (\pm 0,4)$  bei US2 nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) ab. Auch die Erhöhung des Wertes auf  $0,0 (\pm 0,6)$  bei US3 war statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ).

Der CpGdd-Ausgangswert von  $0,1 (\pm 0,4)$  reduzierte sich hinsichtlich US2 statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-2,3 (\pm 0,8)$  an. Bei US3 lag der TGF- $\beta$ -Wert ebenfalls nicht signifikant verändert ( $p > 0,9999$ ) bei  $0,0 (\pm 0,3)$ .



**Abbildung 43:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die TGF- $\beta$ -Konzentrationen (in U/ml) in der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Therapievergleichend konnten keine signifikanten Unterschiede evaluiert werden (Tab. 52). Auch der Vergleich zwischen der Kortisongruppe und CpG-all wies weder zwischen US1 und US2 ( $p = 0,4906$ ) noch zwischen US1 und US3 ( $p = 0,0918$ ) signifikante Unterschiede auf.

**Tabelle 52:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die TGF- $\beta$ -Konzentration in den CD4-Zellen in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (TGF- $\beta$ )
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	>0,9999
	Cortison - CpG double dose	>0,9999
	CpG single - CpG double dose	>0,9999
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	>0,9999
	Cortison – CpG double dose	>0,9999
	CpG single – CpG double dose	>0,9999

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnten keine großen Effekte verzeichnet werden (Tab. 53). Sowohl die CpGsd ( $d=0,444$ ), als auch die CpGdd ( $d=0,529$ ) bewirkte zwischen US1 und US2 einen mittleren Effekt auf die Expression der TGF- $\beta$ -Expression.

**Tabelle 53:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die TGF- $\beta$ -Expression in den CD4-Zellen der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf TGF- $\beta$	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,198
	CpG single dose	0,444
	CpG double dose	0,529
US 1 – US 3	Cortison	-0,013
	CpG single dose	0,036
	CpG double dose	0,305

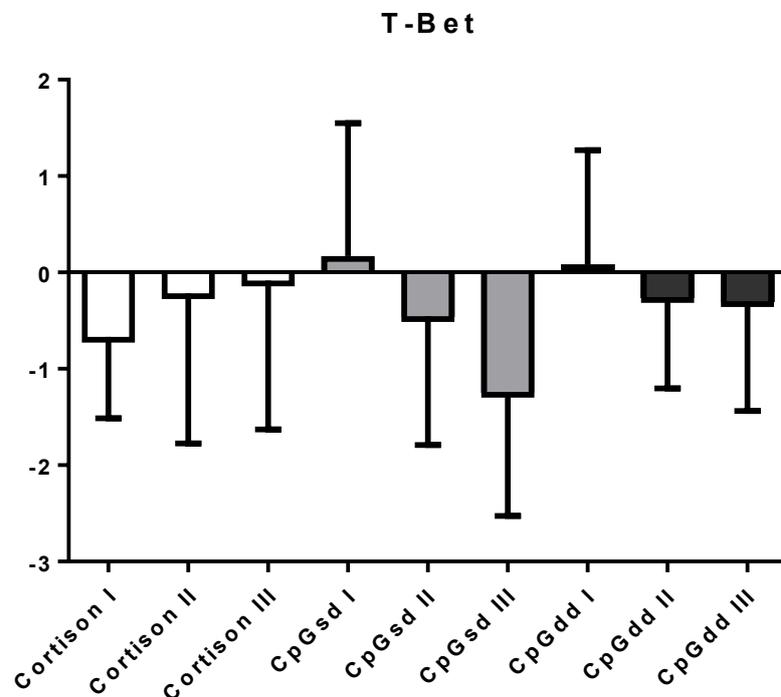
#### 4.2.3. T-bet (Th1)

Der Transkriptionsfaktor T-bet wurde mittels Real Time PCR in CD4-Zellen der BAL-Proben untersucht.

Bei der Kortisongruppe stieg der Ausgangswert von  $-0,7 (\pm 0,9)$  nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-0,2 (\pm 1,6)$  bei US2 (Abb. 44). Der Anstieg auf  $-0,1 (\pm 1,6)$  bei US3 war ebenfalls nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ).

Bei der CpGsd-Gruppe fiel der Wert für T-bet von  $0,2 (\pm 1,4)$  bei US1 auf  $-0,5 (\pm 1,3)$  bei US2 nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ). Auch die Reduktion des Wertes auf  $-1,2 (\pm 1,3)$  bei US3 war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,0924$ ).

Der CpGdd-Ausgangswert von  $0,1 (\pm 1,2)$  reduzierte sich hinsichtlich US2 statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-0,3 (\pm 1,0)$ . Bei US3 lag der T-bet-Wert ebenfalls nicht signifikant verändert ( $p > 0,9999$ ) bei  $-0,3 (\pm 1,1)$ .



**Abbildung 44:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die Expressionswerte des Transkriptionsfaktors T-bet in den CD4-Zellen der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Therapievergleichend konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsformen festgestellt werden (Tab. 54). Auch die Gegenüberstellung von CpG all und der Kortisongruppe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (US –US2:  $p > 0,9999$ ; US1-US3:  $p > 0,9999$ ).

**Tabelle 54:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die T-bet-Konzentration in den CD4-Zellen in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (T-BET)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	>0,9999
	Cortison - CpG double dose	>0,9999
	CpG single - CpG double dose	0,1673
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	0,9999
	Cortison – CpG double dose	0,9999
	CpG single – CpG double dose	0,9999

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnte bei der CpGsd hinsichtlich des Langzeiteffekts zwischen US1 und US3 ein großer Effekt ( $d=1,056$ ) auf die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet festgestellt werden (Tab. 55).

**Tabelle 55:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die T-BET-Expression der CD4-Zellen der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf T-bet	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,376
	CpG single dose	0,464
	CpG double dose	0,316
US 1 – US 3	Cortison	-0,472
	CpG single dose	1,056
	CpG double dose	0,326

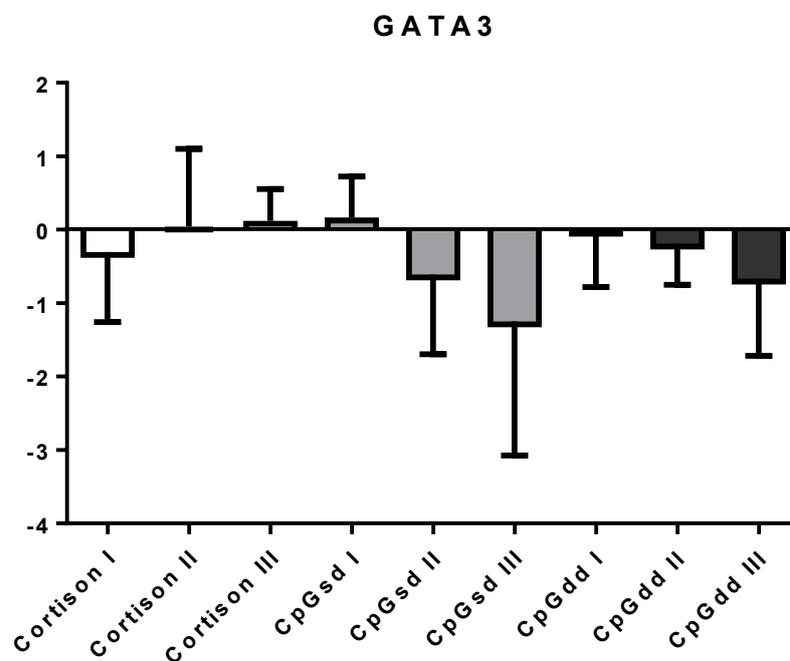
#### 4.2.4. GATA-3 (Th2)

Die Analyse der mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 erfolgte mithilfe von Real Time PCR.

Die Kortisongruppe hatte bei US1 einen Wert von  $-0,3 (\pm 1,0)$ , der sich bei US2 statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $0,0 (\pm 1,1)$  erhöhte (Abb. 45). Der Anstieg des Wertes bei US3 auf  $0,1 (\pm 0,4)$  war ebenfalls statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ).

Bei der CpGsd-Gruppe sank der Ausgangswert für GATA-3 von  $0,2 (\pm 0,6)$  nicht signifikant ( $p = 0,4143$ ) auf  $-0,6 (\pm 1,1)$ . Auch die Reduktion des Wertes auf  $-1,3 (\pm 1,8)$  bei US3 war nicht signifikant ( $p = 0,1791$ ).

Die CpGdd-Gruppe startete bei US1 mit einem Mittelwert von  $0,0 (\pm 0,8)$ , der bei US2 nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-0,2 (\pm 0,6)$  sank. Bei US3 war der GATA3-Wert mit  $-0,7 (\pm 1,1)$  ebenfalls nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) reduziert.



**Abbildung 45:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 in den CD4-Zellen der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Im Vergleich zwischen den Therapieformen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf die GATA-3-Expression evaluiert werden (Tab. 56). Zwischen CpG-all und der Kortisongruppe lagen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede vor (US1-US2:  $p > 0,9999$ ; US1-US3:  $p > 0,9999$ ).

**Tabelle 56:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die GATA-3 Expression in den CD4-Zellen in der BAL, unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (GATA-3)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	>0,9999
	Cortison - CpG double dose	>0,9999
	CpG single - CpG double dose	>0,9999
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	>0,9999
	Cortison – CpG double dose	>0,9999
	CpG single – CpG double dose	>0,9999

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnten zwischen US1 und US2 ein großer klinischer Effekt bei der CpGsd-Therapie ( $d=0,889$ ) evaluiert werden (Tab. 57). Mittlere Effekte wurden hinsichtlich des Langzeiteffekts bei Kortison ( $d=-0,545$ ), CpGsd ( $d=-0,790$ ) sowie CpGdd ( $d=-0,746$ ) bestimmt.

**Tabelle 57:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die GATA-3-Expression in den CD4-Zellen der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf GATA3	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	-0,338
	CpG single dose	0,889
	CpG double dose	0,267
US 1 – US 3	Cortison	-0,545
	CpG single dose	-0,790
	CpG double dose	-0,746

#### 4.2.5. IL-8

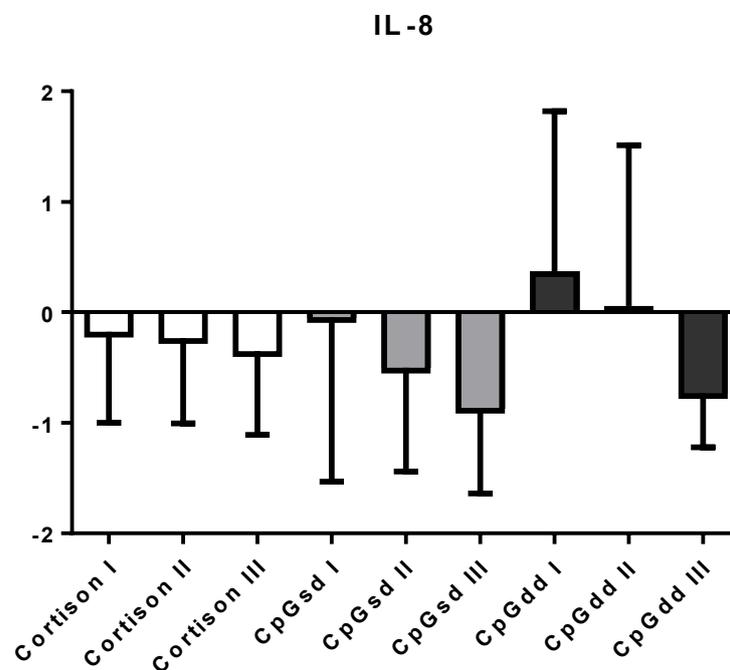
Die Analyse der mRNA des Zytokins IL-8 erfolgte mittels Real Time PCR.

Die Kortisongruppe hatte bei US1 einen Wert von  $-0,2 (\pm 0,8)$ , der sich bei US2

statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-0,2 (\pm 0,8)$  verringerte (Abb. 46). Die Reduktion des Wertes bei US3 auf  $-0,4 (\pm 0,8)$  war ebenfalls statistisch nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ).

Bei der CpGsd-Gruppe sank der Ausgangswert für IL-8 von  $0,0 (\pm 1,5)$  nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $-0,5 (\pm 0,9)$ . Auch die Reduktion des Wertes auf  $-0,9 (\pm 0,8)$  bei US3 war nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ).

Die CpGdd-Gruppe startete bei US1 mit einem Mittelwert von  $0,4 (\pm 1,5)$ , der bei US2 nicht signifikant ( $p > 0,9999$ ) auf  $0,1 (\pm 1,5)$  sank. Bei US3 war der IL-8-Wert mit  $-0,7 (\pm 0,5)$  ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,5219$ ) reduziert.



**Abbildung 46:** Es wurden bei allen drei Therapieformen die Expression Zytokins IL-8 in den CD4-Zellen der BAL-Flüssigkeit, im Zuge der drei Untersuchungen (I, II und III) bestimmt (Cortison=weiß, CpG single dose=grau, CpG double dose=schwarz).

Im Vergleich zwischen den Therapieformen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf die IL-8-Expression evaluiert werden (Tab. 58). Zwischen CpG all und der Kortisongruppe lagen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede vor (US1-US2:  $p > 0,9999$ ; US1-US3:  $p = 0,7027$ )

**Tabelle 58:** Vergleich des Einflusses der Therapieformen auf die IL-8 Konzentration in den CD4-Zellen der BAL unter Bestimmung des p-Wertes.

Untersuchungsverlauf	Therapien im Vergleich	p-Wert (IL-8)
US1 – US2	Cortison - CpG single dose	>0,9999
	Cortison - CpG double dose	>0,9999
	CpG single - CpG double dose	>0,9999
US1 – US3	Cortison – CpG single dose	>0,9999
	Cortison – CpG double dose	>0,9999
	CpG single – CpG double dose	>0,9999

Bei der Berechnung der Effektgrößen konnten zwischen US1 und US3 bei der CpGsd ( $d=0,690$ ) ein mittlerer und bei der CpGdd ( $d=0,990$ ) ein großer klinischer Effekt bestimmt werden (Tab. 59).

**Tabelle 59:** Vergleich der Effekte (Cohen's d) der unterschiedlichen Therapieformen auf die IL-8 Expression der CD4-Zellen aus der BAL.

Untersuchungsverlauf	Effekt auf IL-8	Effektgrößen (d)
US 1 – US 2	Cortison	0,062
	CpG single dose	0,369
	CpG double dose	0,213
US 1 – US 3	Cortison	0,212
	CpG single dose	0,690
	CpG double dose	0,990

## 5. Effekte der Behandlungen auf klinische und labordiagnostische Parameter – Vergleich zu vorhergehenden Studien

### 5.1. Vergleich der Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die klinischen Parameter

Die insgesamt größten Effekte, die durch die Kortisongruppe erzielt werden konnten, wurden beim klinischen Scoring erzielt (Tab. 60). Die CpGsd erzielte zwischen US1 und US2 den größten Effekt in der Reduktion der Atemfrequenz und hinsichtlich der Langzeitevaluierung bei der Einschätzung der Pferdebesitzer mittels HOARSI-Fragebogen. Bei der CpGdd-Gruppe wurde direkt im Anschluss an die letzte Behandlung der insgesamt größte Effekt auf die Reduktion des Nüsternblähens festgestellt. Bei der Langzeitkontrolle wurde der größte Effekt bei der Reduktion der Neutrophilen erzielt.

**Tabelle 60:** Langzeit-Effektgrößen der drei verschiedenen Therapieregime angeordnet absteigend vom Parameter des größten Effekts hin zum kleinsten.

<b>Kortison US1-US3</b>	<b>Effektgröße</b>	<b>CpGsd US1-US3</b>	<b>Effektgröße</b>	<b>CpGdd US1-US3</b>	<b>Effektgröße</b>
Klinisches Scoring	1,897	HOARSI	2,135	Neutrophile	1,232
Nüsternblähens	1,670	Nasenausfluss	1,787	HOARSI	1,189
Atemtyp	0,967	Klinisches Scoring	1,757	Nüsternblähens	1,107
Nasenausfluss	0,901	Atemtyp	1,670	Klinisches Scoring	1,085
Auskultation	0,710	Nüsternblähens	1,538	Atemfrequenz	1,061
HOARSI	0,589	Atemfrequenz	1,334	Mukusviskosität	1,043
Neutrophile	0,555	Mukusviskosität	1,230	AaDO2	1,030
Interpleuraldruck	0,532	Neutrophile	1,064	Nasenausfluss	0,909
PaO2	0,514	Auskultation	0,973	Mukusmenge	0,841
Mukusmenge	0,483	Mukusmenge	0,964	Auskultation	0,702
AaDO2	0,441	PaO2	0,856	PaO2	0,697
Mukusviskosität	0,200	AaDO2	0,829	Atemtyp	0,471
Atemfrequenz	0,161	Interpleuraldruck	0,551	Interpleuraldruck	0,186

Bei der Langzeitevaluierung konnte die CpGsd bei 12 von 13 Parametern (92%) einen Effekt erzielen, der als klinische hoch relevant eingestuft werden konnte. Die CpGdd bewirkte in diesem Zeitraum bei 9 von 13 Parametern (69%) einen großen klinischen Effekt, wohingegen die Kortisontherapie nur 4 von 13 (31%) Parametern mit einem großen klinischen Effekt beeinflussen konnte. Dies veranschaulicht in der Summe, wie wirksam die CpG-Therapie auf fast alle klinischen Parameter war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CpG-Behandlung im Vergleich zur bisher empfohlenen Standardtherapie mit einem inhalativen Kortikosteroid

(NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009) bessere Ergebnisse erzielen konnte.

Um die Auswirkung der Anzahl an Inhalationen vergleichen zu können, wurden die Effektgrößen der vorhergehenden Studien direkt im Anschluss an die letzte Behandlung herangezogen. In den Studien wurden die Pferde 5 Mal (KLIER et al., 2015b) bzw. 7 Mal (KLIER et al., 2015a) mit der einfachen CpG-Dosis behandelt (Tab. 61). 10 Inhalationen mit der CpGsd konnten, zwischen US1 und US2, in der eigenen Studie, bei 7 von 12 (58%) der klinischen Parameter einen Effekt großer klinischer Relevanz bewirken. In der Studie aus dem Jahr 2015, bei der insgesamt 5 Inhalationen durchgeführt wurden (KLIER et al., 2015b) konnte bei 72% (8 von 11) der Parameter ein großer klinischer Effekt festgestellt werden.

Hervorzuheben ist, dass bei der aktuellen Studie die Neutrophilen in der BAL effektiv reduziert werden konnten, wohingegen nach 7 bzw. 5 Inhalationen nur kleinere Effekte erzielt werden konnten (Neutrophile im TBS). Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die antiinflammatorische Wirkung (LECLERE et al., 2011b) nach häufigeren Inhalation besser entfalten kann.

**Tabelle 61:** Vergleich der Effektgrößen der CpGsd aus der aktuellen Studie (10 Inhalationen) mit zwei vorhergehende Studien, in denen die Pferde 7 bzw. 5 Inhalationsbehandlungen erhalten hatten. Die Ergebnisse beschreiben den Effekt, der zwischen US1 und US2 direkt nach der letzten Behandlung evaluiert wurde.

10 Inhalationen	Effektgröße	7 Inhalationen	Effektgröße	5 Inhalationen	Effektgröße
Atemfrequenz	1,256	Atemfrequenz	0,562	Atemfrequenz	0,637
Klinisches Scoring	1,244	Klinisches Scoring	k.A.	Klinisches Scoring	k.A.
Nasenausfluss	1,243	Nasenausfluss	0,714	Nasenausfluss	1,500
Nüsternblähen	1,229	Nüsternblähen	k.A.	Nüsternblähen	k.A.
Atemtyp	1,196	Atemtyp	0,759	Atemtyp	1,612
Mukusviskosität	0,896	Mukusviskosität	0,859	Mukusviskosität	1,320
Neutrophile	0,715	Neutrophile	-0,021	Neutrophile	0,335
AaDO2	0,562	AaDO2	0,000	AaDO2	0,978
PaO2	0,555	PaO2	0,217	PaO2	0,995
Auskultation	0,449	Auskultation	0,560	Auskultation	1,854
Mukusmenge	0,402	Mukusmenge	0,566	Mukusmenge	1,727
Interpleuraldruck	0,251	Interpleuraldruck	0,125	Interpleuraldruck	0,994

Auch in den vorangegangenen Studien wurden Langzeiteffekte bestimmt, jedoch wurde in der Studie, in der die Patienten 5 Inhalationen erhielten (KLIER et al., 2015b), bereits nach vier Wochen und in der 7-Inhalationen-Studie nach 6 Wochen getestet (KLIER et al., 2015a). Im direkten Vergleich kann man erkennen, dass bei der aktuellen Studie, acht Wochen nach der letzten Behandlung, mit 10 Inhalationen

bei 100% der Parameter mittlere bzw. große klinische Effekte erzielt wurden (Tab. 62). Nach 7 Inhalationen konnten, sechs Wochen nach der Behandlung, bei 80% der gemessenen Werte mittlere oder große klinische Effekte bestimmt werden. Bei der Studie, in der die Patienten 5 CpG-Inhalationen erhielten, wurden fünf Wochen im Anschluss an die letzte Inhalation bei 50% der Parameter mittlere bzw. große klinische Effekte festgestellt. Diese Resultate deuten darauf hin, dass häufigere Inhalationen bessere Langzeiteffekte erzielen konnten und dass diese dann auch über einen längeren Zeitraum (acht Wochen) hinweg anhaltend waren.

**Tabelle 62:** Vergleich der Effektgrößen der CpGsd aus der aktuellen Studie (10 Inhalationen) mit zwei vorhergehende Studien, in denen die Pferde 7 bzw. 5 Inhalationsbehandlungen erhalten hatten. Die Ergebnisse beschreiben den Effekt, der zwischen US1 und US3, nach einem behandlungsfreien Zeitraum, zur Evaluierung des Langzeiteffekts bestimmt wurde.

10 Inhalationen	Effektgröße	7 Inhalationen	Effektgröße	5 Inhalationen	Effektgröße
HOARSI	2,135	HOARSI	k.A.	HOARSI	k.A.
Nasenausfluss	1,787	Nasenausfluss	0,764	Nasenausfluss	1,268
Klinisches Scoring	1,757	Klinisches Scoring	k.A.	Klinisches Scoring	k.A.
Atemtyp	1,670	Atemtyp	1,183	Atemtyp	1,333
Nüsternblähen	1,538	Nüsternblähen	k.A.	Nüsternblähen	k.A.
Atemfrequenz	1,334	Atemfrequenz	1,025	Atemfrequenz	0,341
Mukusviskosität	1,230	Mukusviskosität	0,615	Mukusviskosität	1,177
Neutrophile	1,064	Neutrophile	0,119	Neutrophile	0,408
Auskultation	0,973	Auskultation	1,233	Auskultation	1,436
Mukusmenge	0,964	Mukusmenge	0,720	Mukusmenge	1,456
PaO2	0,856	PaO2	0,739	PaO2	0,224
AaDO2	0,829	AaDO2	0,588	AaDO2	0,389
Interpleuraldruck	0,551	Interpleuraldruck	0,337	Interpleuraldruck	0,291

## 5.2. Vergleich der Effekte der verschiedenen Behandlungen auf labordiagnostische Parameter

In der Betrachtung aller mittels Multiplex Assay gemessenen Zytokin-Ergebnisse kann man erkennen, dass zwischen US1 und US2 bei allen Behandlungsformen der größte Effekt auf das Zytokin IFN- $\gamma$  vorlag (Tab. 63). Hinsichtlich der Langzeitevaluierung (US1-US3) lag der größte Effekt bei der Kortisongruppe bei IL-4 vor (Tab. 64). Bei den beiden CpG-Gruppen wies IL-17 den größten Effekt auf.

**Tabelle 63:** Darstellung der Effektgrößen die bei den drei Therapieformen auf die verschieden Zytokine zwischen US1 und US2 festgestellt werden konnten.

Kortison US1-US2	Effektgröße	CpGsd US-1US2	Effektgröße	CpGdd US1-US2	Effektgröße
IFN- $\gamma$	0,773	IFN- $\gamma$	0,571	IFN- $\gamma$	0,332
IL-4	0,487	IL-17	0,26	IL-4	0,035
IL-10	0,293	IL-4	0,143	IL-17	0,012
IL-17	-0,439	IL-10	-0,526	IL-10	-0,305

**Tabelle 64:** Darstellung der Effektgrößen die bei den drei Therapieformen auf die verschieden Zytokine zwischen US1 und US3 festgestellt werden konnten.

Kortison US1-US3	Effektgröße	CpGsd US-1US3	Effektgröße	CpGdd US1-US3	Effektgröße
IL-4	0,615	IL-17	0,683	IL-17	0,780
IL-10	0,238	IFN- $\gamma$	0,363	IL-10	0,520
IFN- $\gamma$	0,000	IL-4	0,147	IFN- $\gamma$	0,362
IL-17	-0,214	IL-10	0,054	IL-4	-0,044

## V. DISKUSSION

### 1. Diskussion der Studienziele

Das erste Ziel der Studie war es die Wirksamkeit der CpG-Inhalation zu bestätigen und zu zeigen, ob eine Erhöhung der Anzahl der Inhalationen im Vergleich zu den vorhergehenden Studien einen besseren Effekt erzielen konnte. Dabei wurde anhand der Effektgrößen der Erfolg der Therapie auf die jeweiligen Parameter bewertet (KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a). In vorhergehenden Studien wurde bewertet, ob die Wirkung nach vier bzw. sechs Wochen noch anhält (KLIER et al., 2015a, KLIER et al., 2015b). Ein verlängerter Zeitraum von acht Wochen für die letzte Nachuntersuchung soll eine bessere Aussage bezüglich der anhaltenden Wirkung der Behandlung ermöglichen.

Mit dem Dosis-Wirkungsvergleich mit der CpGsd sowie der CpGdd konnte, nach der Überprüfung des Therapiekonzepts (Phase IIa) in der vorangegangenen Studie, der nächste Schritt in Richtung der idealen Therapiedosis der CpGs („Dose finding“, Phase IIb) gemacht werden (KLIER et al., 2015b). Eine ideale Dosierung sollte pharmakokinetischen Eigenschaften besitzen, die eine maximale Effektivität bei geringstmöglichen Nebenwirkungen hat (CERASOLI, 2006). Die doppelte CpG-Dosierung hat in der Mehrzahl der untersuchten Parameter keinen Vorteil gegenüber der einfachen CpG-Dosis gebracht. Daher scheint eine Erhöhung der Dosis nicht sinnvoll.

Da in einer placebo-kontrollierten Studie bereits der Erfolg der CpG-Behandlung nachgewiesen wurde, sollte in der aktuellen Studie der therapeutische Effekt der CpGs im Vergleich zu einer etablierten Kortisontherapie untersucht werden (KLIER et al., 2015b). Dabei war die Hypothese, dass die CpG-Behandlung aufgrund des Effekts auf das Immunsystem, eine mindestens gleichwertige Wirkung wie die Kortison-Inhalation erzielen kann und hinsichtlich des Langzeiteffekts Vorteile aufseiten der CpG-Behandlung liegen. Diese Hypothesen konnten verifiziert bzw. übertroffen werden, da bei einem Großteil der klinischen Parameter bei US2 sowohl die CpGsd (bei 90% der klinischen Parameter), als auch die CpGdd (bei 81% der klinischen Parameter) signifikante Ergebnisse bewirken konnten. Die Kortisontherapie hingegen konnte nur bei 72% der klinischen Parameter statistisch signifikante Ergebnisse aufweisen.

Auch bezüglich der Langzeitevaluierung konnte die aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Hier war mit der signifikanten Beeinflussung von 100% der klinischen Parameter bei der CpGsd und 67% bei der CpGdd, im Vergleich zu 54% bei der Kortisontherapie, ein klarer Vorteil in der therapeutischen Wirksamkeit aufseiten der CpG-Behandlung zu erkennen.

Des Weiteren sollten in der Studie die immunologischen Effekte auf relevante Zytokine und die mRNA-Expression der Th-1 und Th-2 Immunantwort sowie der regulatorischen T-Zellen evaluiert werden.

Auf immunologischer Ebene konnte nach der Behandlung mit CpGs signifikante Reduktionen des Th2-Zytokins IL-4 sowie des Th17-Zytokins IL-17 festgestellt werden. Auch wenn die Ergebnisse der mRNA-Auswertungen statistisch nicht signifikant waren, deutete auch hier eine Vielzahl der Ergebnisse auf eine tendenziell antiinflammatorische Wirkung durch die CpG-Therapie hin. Hier konnte u.a. die Tendenz einer Absenkung der IL-8- sowie der GATA-3-mRNA-Expression verzeichnet werden, was sowohl auf einen antiinflammatorischen, als auch einen immunmodulatorischen Effekt, weg von einer Th2-dominierten Immunantwort, hindeutet. Somit konnten z.T. die immunologischen Effekte der CpG-Therapie, ähnlich der Ergebnisse humanmedizinischer Studien, die den Effekt von CpG bei allergischen Erkrankungen untersucht haben, auch in der eigenen Studie gezeigt werden (FARROKHI et al., 2017)

## **2. Diskussion des Studiendesign**

Alle Patienten erhielten insgesamt 10 Inhalationen, dabei wurden beide CpG-Gruppen jeden zweiten Tag behandelt. Die Kortisontherapie erfolgte täglich. Da in den vorangegangenen CpG-Inhalationsstudien ein Therapieintervall von 48 Stunden angewandt wurde, wurde dieses Behandlungsschema auch in der aktuellen Studie beibehalten, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können (KLIER et al., 2012, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a). Man entschied sich ursprünglich für ein Behandlungsschema an jedem zweiten Tag, da in vitro Untersuchungen ergeben haben, dass CpGs eine Stabilität von 48 Stunden zeigten (MUTWIRI et al., 2004). Da die Anzahl an Inhalationen im Vergleich zu den

vorhergehenden Untersuchungen auf 10 erhöht wurde und außerdem eine Bewertung der erhöhten Dosis auf die Wirkung erfolgen sollte, schien es sinnvoll, den zeitlichen Abstand zwischen den Inhalationen beizubehalten. Jedoch wäre in zukünftigen Studien der Vergleich zu einer täglichen Inhalation eine weitere interessante Fragestellung.

Außerdem wäre, anstatt eines zeitlich begrenzten Behandlungszeitraums, der Effekt wiederholter Boosterungen, z.B. nach 3-4 Wochen bzw. symptomabhängig nach Bedarf, ein Aspekt, den es in der Zukunft noch weiter zu untersuchen gilt. Dieser Ansatz, dass wiederholte Stimulationen des Immunsystems mit CpGs auch den immunmodulatorischen Effekt durch Induktion von IL-10 boostern könnten, wird auch von Bohle 2002 angestoßen (BOHLE, 2002). Dies wäre aufgrund der nach der ersten Therapie vom Körper produzierten Gedächtniszellen sinnvoll, da es in Studien bei einem erneuten Kontakt mit den CpG-ODN, bei gleichzeitigem Kontakt zu Antigen, zu einer acht- bis zehnfach höheren Antikörperproduktion kam (LUNN and HOROHOV, 2010).

Da die Kortison-Inhalation, gemäß der gängigen Therapiestandards, täglich erfolgte (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009), war zwar die Anzahl an Inhalationen (10 Mal) bei allen Therapiegruppen gleich, jedoch wurde aufgrund des 48 Stunden Intervalls, der Zeitraum der CpG-Inhalationen dadurch auf 20 Tage ausgedehnt. Dies könnte als Vorteil zugunsten der CpG-Behandlung bewertet werden, aber hätte man die Kortisontherapie über einen äquivalenten Zeitraum von 20 Tagen hinweg verabreicht, hätten diese Pferde doppelt so viele Inhalationsbehandlungen (20 Mal) erhalten, wie die CpG-Gruppen. Außerdem wurde US2 bei allen Gruppen direkt nach 10 Inhalationen durchgeführt, weshalb der Effekt vergleichbar war.

Hinzukommt, dass ein Therapieintervall von 48 Stunden, wie es bei der CpG-Behandlung angewandt wurde, sowohl hinsichtlich der Kosten, als auch was die Anwenderfreundlichkeit betrifft, als positiv zu bewerten ist. Die empfohlenen Behandlungsregime bei Kortisoninhalationen, die bei den meisten Präparaten idealerweise alle 12 Stunden erfolgen, sind für viele Pferdebesitzer zeitlich oft nicht realisierbar (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009, COUETIL et al., 2016).

### **3. Diskussion der Patienten**

Da es sich bei der Studie um eine klinische Feldstudie handelte, wurden die Pferde unter ihren normalen Umweltbedingungen behandelt und untersucht. Um alleine den Einfluss der Therapie auf die Pferde bewerten zu können, wurden die Besitzer dazu angehalten, an den Haltungsbedingungen während der Studie keine Veränderungen vorzunehmen.

Idealerweise hätte die Untersuchung an einer homogenen Patientengruppe (z.B. nur Pferde der gleichen Rasse, im gleichen Stall, unter den gleichen Haltungsbedingungen, die das gleiche Futter erhalten) stattgefunden. Jedoch stand uns eine solche Pferdepopulation nicht zur Verfügung. Außerdem gewährleistet das angewandte Studiendesign und die heterogene Patientengruppe eine Beurteilung, ob die Therapie unter Feldbedingung Wirkung zeigt und damit den „Praxistest“ besteht.

Hinsichtlich des Alters ist die Patientengruppe als relativ homogen einzuschätzen, da es sich hauptsächlich um Pferde höheren Alters (86% waren 15 Jahre oder älter) handelte. Schon in einer frühen RAO-Studie wurde mit ansteigendem Alter eine erhöhte Prävalenz der Erkrankung beschrieben (MCPHERSON et al., 1979a). Da auch in Hinblick auf die immunologische Reaktion Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen bestehen, können aufgrund der Behandlung v. a. von älteren Patienten einheitlichere Ergebnisse erzielt werden (HANSEN et al., 2015).

In anderen RAO-Studien werden die Tests häufig an klinikeigenen Pferden durchgeführt, die nach „Allergenchallenge“ in Exazerbation versetzt wurden (ROBINSON et al., 2009). Eine mögliche Schwäche der Studie liegt darin, dass die behandelten Pferde sich nicht alle in der exakt gleichen Phase (Remission bzw. Exazerbation) im Verlauf der Erkrankung befanden. Jedoch wäre die Induktion einer Verschlechterung der Symptomatik im Vorfeld der Behandlung, z.B. durch Kontakt mit schimmeligem Heu oder Stroh, bei den teilnehmenden Patienten, einerseits aus Tierschutzaspekten, andererseits aus Sicht der Compliance der Pferdebesitzer nicht zu rechtfertigen.

In einer Folgestudie wäre eine Untersuchung an einer noch größeren Patientengruppe gut, um individuelle Schwankungen noch besser ausgleichen zu können.

Die ungleichmäßige Verteilung der Gruppengrößen der drei Behandlungsgruppen CpGsd (n=11), CpGdd (n=9) und Kortison (n=9) kam aufgrund des Ausfalls („drop-out“) einiger Patienten im Laufe der Studie zustande. Bedingt durch äußere Umstände fielen die Patienten Nr. 26 aus der CpGdd-Gruppe (Verkauf des Pferdes vor der letzten Untersuchung) und Nr. 1 aus der Kortisongruppe (andere Medikation im behandlungsfreien Zeitraum auf Wunsch der Besitzerin) aus. Aufgrund organisatorischer Gründe konnten die ausgefallenen Pferde nicht ersetzt werden. Idealerweise hätten alle Gruppen die gleiche Anzahl an Patienten beinhaltet.

Eine weitere Homogenität hinsichtlich des Patientenpools bestand darin, dass bei 79% der behandelten Pferde die Dauer der Erkrankung bei mindestens fünf Jahren lag und dass eine langzeitige Erkrankungsdauer wahrscheinlich schon zu Umbauvorgängen in den Atemwegen („Remodelling“) geführt hat und somit positive Effekte für therapeutisch Interventionen dadurch noch erschwert sein dürften (LECLERE et al., 2011b). Diese erschwerten Bedingungen trafen aber auf alle Behandlungsgruppen zu.

Bei 76% der Patienten beschrieben die Besitzer eine Saisonalität der Erkrankung. In einer Studie von McPherson hingegen konnten keine jahreszeitenabhängigen Veränderungen der Symptomatik festgestellt werden (MCPHERSON et al., 1979b). Von den 76% wiederum traten bei 95% der Pferde die saisonalen Symptome vermehrt im Frühling/Sommer auf. Eine mögliche Ursache für eine Häufung der Symptomatik im Frühjahr könnte eine schlechte Lagerung des Heu im Winter mit ansteigender Schimmelpilzproduktion im Frühjahr sein (FEY and OHNESORGE, 2006). Außerdem bestand die Option, dass bei einem Teil der Pferde möglicherweise nicht isoliert eine RAO-Erkrankung vorlag, sondern dass wie in anderen Studie auch beschrieben wurde, eine Kombination aus RAO und SPARAO auftrat (DIXON et al., 1995). Jedoch spielten auch andere Faktoren, wie z.B. hohe Außentemperaturen und eine erhöhte Staubbelastung im Frühjahr und Sommer eine wichtige Rolle (PIRIE et al., 2003), weshalb hier bei vielen Pferden eine Verschlechterung einzelner Symptome, wie z.B. der Atemfrequenz, auftrat.

Bei 24% der Pferde konnten die Besitzer keine jahreszeitenabhängige Veränderung der RAO-Symptome, wie Husten, Nasenausfluss oder Leistungsrückgang verzeichnen. Dies spricht dafür, dass bei diesen Patienten eine RAO, ohne Einfluss

saisonal-aufretender Allergen vorlag (DIXON et al., 1995) oder dass das Stallklima (z.B. durch die Heuqualität) keinen saisonalen Einflüssen unterlag (FEY and OHNESORGE, 2006).

48% der Pferde wurden laut Besitzereinschätzung in HOARSI 4 (hgr. respiratorische Symptomatik; hgr. RAO) eingeteilt. Davon war ein Großteil (64%) der Patienten in Boxenhaltung untergebracht. Höchstwahrscheinlich bestand bei diesen Pferden ein starker Zusammenhang zwischen der vermehrten Belastung durch aerogenen Allergene in der Stallhaltung und dem Schweregrad der Erkrankung (FLEMING, 2008). Da Pferde in Boxenhaltung einer verstärkten Allergenbelastung ausgesetzt sind, hätte bei diesen Pferden der Therapieerfolg, sowohl durch die CpG- als auch die Beclometason-Inhalationen, bei gleichzeitiger Verbesserung der Haltungsbedingungen, wahrscheinlich noch größer ausfallen können (FLEMING, 2008).

#### **4. Diskussion der Inhalationen**

Eine inhalative Verabreichung der Medikamente wurde gewählt, da bei dieser Applikationsart höhere Wirkspiegel in den Zielzellen der unteren Atemwege zu erreichen sind, als bei einer systemischen Anwendung (VAUGHN et al., 2006). Als Zielzellen gelten Zellen, die TLR-9 Rezeptoren besitzen. Das sind beim Pferd Neutrophile der Lunge, bronchiale Epithelzellen, Zellen des Endothels von Kapillaren sowie Makrophagen (SCHNEBERGER et al., 2009). Ein Vorteil der topischen, inhalativen Anwendung ist die lokal begrenzte Wirkung und die gezielte Anwendung am Ort der Pathogenese (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

##### **4.1. Beclometason**

Das inhalativ verwendete Glukokortikoid Beclometason (Sanasthmax® 400 Mikrogramm/ 1 ml, Chiesi GmbH, Hamburg) wurde ausgewählt, da Beclometason ein gut untersuchtes inhalatives Kortikosteroid ist, dass bei Pferden mit equinem Asthma häufig eingesetzt wird (AMMANN et al., 1998). Außerdem es ist in der Regel kostengünstiger als Fluticason und wird als gängiges inhalatives Therapeutikum bei Pferden mit Asthma empfohlen und eingesetzt (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

Hinzu kommt, dass das Arzneimittel für die Verwendung mittels Ultraschallvernebler in Deutschland verfügbar war und somit, bezüglich der Darreichungsform, der direkte Vergleich mit den CpG-Behandlungen möglich war. Auf dem deutschen Markt waren die anderen gängigen Wirkstoffe, wie z.B. Fluticason ausschließlich in Form eines Dosieraerosols verfügbar. Da sich die verschiedenen Verneblungssysteme (Ultraschallvernebler, Dosieraerosol) deutlich in ihrer Partikelgröße der Inhalate unterscheiden und somit auch die Eindringtiefe des Inhalats beeinflussen, wurde es als wichtig angesehen, die gleiche Darreichungsform anzuwenden. Partikel, die größer sind als 5 µm, verbleiben zu einem Großteil in den oberen Atemwegen und werden daher abgeschluckt (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Sehr kleine Partikel mit einer Größe <0,5µm gelangen sehr wahrscheinlich auch nicht bis in die Lungen, sondern werden direkt wieder ausgeatmet (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Daher wurde als Vernebler der AeronebGo-Ultraschallvernebler, mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 3,6µm gewählt, um eine möglichst ideale Sedimentierungsrate (zw. 1-5µm) in den unteren Atemwegen zu erreichen (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Da für die Anwendung des Equine Haler TM® (Equine Health Care, Denmark) eine bessere Sedimentationsrate (ca.8%) nachgewiesen werden konnte als bei anderen vergleichbaren Produkten und weil dieser ohne eine zusätzliche Atemmaske einfach angewendet werden konnte, hat man sich für diesen Spacer entschieden (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009).

Neben der 1 x täglichen Behandlung, wird in der Literatur häufig eine 2 x tägliche Anwendung (alle 12 Stunden) der Beclometason-Inhalationen beschrieben (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009). Dies war jedoch aufgrund des organisatorischen Aufwands nicht möglich, da sich die Pferde in ihren Heimatställen befanden und die Inhalationen durch die Tierärztinnen, Sabine Geuder und Carolin Zimmermann, selbst durchgeführt werden sollten, um sicherstellen zu können, dass die Behandlungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden. Außerdem wurde die 1 x tägliche Verabreichung der Beclometason-Inhalation von NIEDERMAIER und GEHLEN (2009) als in vielen Fällen ausreichend beschrieben.

#### **4.2. GNP**

Die GNP haben sich durch ihre Eigenschaften (biologisch abbaubar, biologisch

kompatibel und immunologisch inert), als sicheres und wirkungsvolles Trägersystem für die CpG-Inhalationen bewährt (ZWIÖREK et al., 2008, KLIER et al., 2011). Durch Veränderungen in der Herstellung der GNP konnte der bisherige Herstellungsprozess optimiert und effizienter gestalten werden. Somit konnte im Produktionsprozess ein Vielfaches an Gelatinenanoartikel gewonnen werden (GEH et al., 2016). Dies bedeutet einen wichtigen Schritt in Richtung einer kommerziellen Anwendung. Außerdem ist es geplant, die GNP in Zukunft in Form eines Lyophilisats herzustellen, um die Lagerung sowie die Anwendung erleichtern zu können. Das heißt, die GNP würden dann bereits fertig hergestellt und müssten zur Anwendung nur noch geschüttelt werden. Das Inhalat könnte zukünftig somit von den Besitzern selbständig angewandt werden und damit die Behandlung noch anwenderfreundlicher und einfacher gestaltet werden.

## **5. Diskussion der klinischen Studie**

Der Behandlungszeitraum erstreckte sich von April bis August 2015. Dadurch wurde versucht, im Rahmen der logistischen und personellen Möglichkeiten, alle Pferde möglichst zeitnah zu behandeln. Um Auswirkungen auf den Therapieeffekt durch saisonale Schwankungen möglichst ausschließen zu können, wurden die Patienten der drei Behandlungsregime parallel behandelt. Dadurch konnte verhindert werden, dass der Effekt der verschiedenen Behandlungsformen durch äußere Bedingung zu stark beeinflusst wurde. Da es sich um eine klinische Feldstudie handelte, konnten jedoch natürlich vorkommende tages- und witterungsabhängige Variationen, z.B. durch Temperaturschwankungen, Wetter, Pollenbelastung oder Unterschiede in der Futterqualität, nicht vollständig eliminiert werden. Z.B. saisonale Allergene, die tagesabhängigen Schwankungen unterliegen, können außerdem einen Einfluss sowohl auf klinischen, als auch auf immunologische Parameter, wie z.B. die Zytokinfreisetzung haben (PIRIE et al., 2003). Diese Bedingungen trafen jedoch auf alle Behandlungsgruppen gleichermaßen zu.

### **5.1. Diskussion der Therapieverträglichkeit**

Keines der 29 behandelten Pferde, wies Anzeichen unerwünschter Nebenwirkungen auf. Es traten bei keinem der Pferde Anzeichen auf, die laut des

festgelegten Protokolls für die Verträglichkeitskontrolle (IX. Anhang, Kapitel 1.4., S.206ff), den Abbruchkriterien entsprochen hätten. Auch im Rahmen der Allgemeinuntersuchung fiel keiner der Patienten, zu keinem Untersuchungszeitpunkt, mit einer erhöhten Körpertemperatur oder Abweichungen im Blutbild (inklusive Differentialblutbild) auf. Die gemessenen Fibrinogen-Werte wiesen ebenfalls keinen Hinweis auf eine, durch die Behandlung verursachte, Entzündungsreaktion auf. Diese Ergebnisse untermauern die in den vorhergehenden Studien gewonnenen Resultate, dass die Therapie mit CpG-GNP von den Patienten gut vertragen wird und unter der Therapie keinerlei Symptome einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion auftraten (KLIER et al., 2012, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a).

Im Rahmen der inhalativen Kortisontherapie mit Beclometason wurden ebenfalls keine unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt. Dies bestätigt die Beobachtungen vorhergehender Studien (LECLERE et al., 2011b, DAUVILLIER et al., 2011).

Da v.a. bei einer systemischen Anwendung von Kortikosteroiden beim Pferd unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können (DAUVILLIER et al., 2011), bei der inhalativen CpG-Therapie jedoch keinerlei Nebenwirkungen festgestellt werden konnten (KLIER et al., 2012, KLIER et al., 2015b), könnte hier ein großer Vorteil gegenüber dem Einsatz von Kortikosteroiden (v.a. bei systemischer Gabe) liegen. Auch wenn bei inhalativer Verabreichung von Kortison das Risiko von Nebenwirkungen sehr gering ist, bestehen dennoch bei vielen Pferdebesitzern Vorbehalte gegenüber dem Einsatz von Kortikosteroiden. Daher bietet die CpG-Therapie eine neue Alternative für Pferdebesitzer, um die Erkrankung ihrer Pferde zu behandeln. Insbesondere gilt dies für Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen (z.B. Cushing, Hufrehe), möglichst nicht mit Kortison behandelt werden sollten (PONGRATZ et al., 2010).

## **5.2. Diskussion der Untersuchungsmethoden**

### **5.2.1. Allgemeinuntersuchung**

Der durch GLITZ und DEEGEN (2002) beschriebene Untersuchungsgang zur Kontrolle des Allgemeinbefindens stellt eine bewährte Methode dar, um einen umfassenden ersten Eindruck zum Gesundheitszustand des Pferdes zu erlangen.

Rassenspezifische Abweichungen, z.B. bei der Atemfrequenz sollten jedoch berücksichtigt werden (IHMELS, 2012). Da bei Isländern physiologische Werte für die Ruheatemfrequenz höher liegen können, als bei anderen Rassen, wurden die 6 Patienten dieser Rasse deshalb mittels geschichteter Zufallsverteilung möglichst gleichmäßig in die drei Behandlungsgruppen verteilt (IHMELS, 2012). Zusätzlich wurden bei der geschichteten Zufallsverteilung Pferde in unterschiedlichen Haltungsformen geschichtet auf die drei Gruppen verteilt, um eine möglichst gleichmäßige Distribution gewährleisten zu können.

### **5.2.2. Messung des Interpleuraldrucks**

Die Messung des Interpleuraldrucks gibt einen Hinweis auf den Schweregrad der vorliegenden Bronchokonstriktion (DEEGEN and KLEIN, 1987). Die angewandte indirekte Interpleuraldruckmessung im Oesophagus liefert als einfache und praktikable Messmethode eine gute Möglichkeit zur Beurteilung der Lungenfunktion von Pferden und weist nur minimale Abweichungen im Vergleich zu einer etwas genaueren, jedoch deutlich invasiveren, direkten Interpleuraldruckmessung durch Thoraxpunktion auf (DEEGEN and KLEIN, 1987).

Bei 8 von 29 Patienten wurden die Interpleuraldruckmessungen bei allen drei Untersuchungen direkt nach einer leichten Sedierung durchgeführt. Die Sedierung könnte bei diesen Patienten zu einer geringen Abweichung aufgrund eines etwas veränderten Atemtyps geführt haben (DEEGEN and KLEIN, 1987). Nach einer Sedierung könnte eine unregelmäßigere Atmung mit teilweise etwas tieferen, gefolgt von flacheren Atemzügen auftreten. Eine Sedierung mit einem  $\alpha_2$ -Agonisten bewirkt außerdem eine Relaxierung der glatten Muskulatur der Atemwege hat und kann so den Interpleuraldruck etwas reduzieren. Laut Handbuch der Pferdepraxis haben  $\alpha_2$ -Agonisten, jedoch nur einen geringen Einfluss auf die respiratorische Tätigkeit (GASTHUYS and DE MOOR, 2005). Daher konnten die Ergebnisse der Interpleuraldruckmessungen, auch der sedierten Pferde, ebenfalls als aussagekräftig bewertet werden.

### **5.2.3. BAL und TBS**

Zur Evaluierung der Konzentration der zu messenden Parameter in der BAL wäre es hilfreich, einen Marker bestimmen zu können, anhand dessen man den Grad der

Verdünnung feststellen könnte. Es besteht die Möglichkeit interne (z.B. Urea oder Albumin) oder externe Marker zu messen, jedoch gehen die körpereigenen Moleküle schnell vom Körper in die instillierte Flüssigkeit über und sind somit kein adäquates Mittel, um die Konzentration bzw. die Verdünnungsrate bestimmen zu können (HASLAM and BAUGHMAN, 1999). Daher ist es laut eines Reports der European Respiratory Society wichtig, eine standardisierte Technik anzuwenden (HASLAM and BAUGHMAN, 1999). Deshalb wurde die BAL bei allen Pferden mit Hilfe eines standardisierten Protokolls durchgeführt (LÉGUILLETTE and LAVOIE, 2006). Da bei der zytologischen Auswertung der BAL v.a. die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellpopulationen bewertet werden, stellt hier die variable Verdünnung kein so großes Problem dar. Bei der Auswertung azellulärer Bestandteile wäre eine exaktere Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung jedoch von Vorteil (HASLAM and BAUGHMAN, 1999).

Einen Einfluss auf die Zellzusammensetzung scheint v.a. das eingegebene Volumen der sterilen Kochsalzlösung zu haben. Bei Instillation kleinerer Volumina (z.B. 50ml pro BAL) wurden höhere Zahlen an Mastzellen und Neutrophilen beobachtet als bei größeren Volumina von 300-500ml (SWEENEY et al., 1992). Die zytologische Untersuchung der BAL-Proben mittels eines standardisierten Protokolls stellt eine sichere und weltweit etablierte Methode zur Evaluierung des Entzündungsstatus der Lunge dar (COUETIL et al., 2016).

Der BAL wird eine bessere Aussagekraft zur Beurteilung des Grades der Entzündungsreaktion in der tiefen Lunge zugesprochen als dem Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Daher wurden in der vorliegenden Studie zur zytologischen Einschätzung des inflammatorischen Status der Lunge die BAL herangezogen. Diese Untersuchungsmethode gilt, neben den klinischen Ergebnissen, als einer der wichtigsten Parameter zur Evaluierung des Therapie-Effekts (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010).

#### **5.2.4. Weitere Untersuchungsmöglichkeiten**

Eine Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Pferde vor und nach Behandlung wäre ein weiteres interessantes Merkmal, um den Therapieerfolg zu evaluieren.

Allerdings wären solche zusätzlichen Untersuchungen sehr zeitintensiv und da RAO-Pferde zu einem großen Teil stark leistungsinsuffizient sind, ist die Beurteilung der Besitzer (HOARSI), die ihre Pferde über Jahre hinweg kennen, ein guter Messwert, um den Einfluss der Therapie auf die Leistung bewerten zu können (LAUMEN et al., 2010).

### **5.3. Diskussion der klinische Ergebnisse der Studie**

Aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie der Krankheit, konnten bei jedem Pferd individuelle Variationen der Symptomatik beobachtet werden (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Unterschiedliche Ausprägungen einzelner Untersuchungsparameter bei den verschiedenen Pferden lassen sich durch individuelle Variationen in der Stärke der Ausprägung einzelner Faktoren sowie verschiedene Phasen im Verlauf der Erkrankung begründen (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Das heißt, dass bestimmte Befunde in einer Remissionsphase anders ausgeprägt sind, als während einer Exazerbation.

#### **5.3.1. Atemfrequenz in Ruhe**

Die CpG-Inhalationen konnten, sowohl zwischen US1 und US2 als auch hinsichtlich des Langzeiteffekts einen signifikanten Vorteil gegenüber der Kortisontherapie aufweisen. Zwischen den beiden CpG-Behandlungsgruppen lag weder zwischen US1 und US2 noch hinsichtlich der Langzeitwirkung ein statistisch signifikanter Unterschied vor. Zwar ist die Ruheatemfrequenz ein Kriterium, das von äußeren Bedingungen, wie z.B. hohen Außentemperaturen beeinflusst werden kann, jedoch ist eine solch signifikante Reduktion durch die CpG-Inhalationen, als äußerst positives Ergebnis hinsichtlich des Leidensdrucks der Patienten zu bewerten. Da RAO-Pferde in Remission eine normale Atemfrequenz haben können, weist die Absenkung durch die Behandlung einen positiven Trend auf (LECLERE et al., 2011b). Da v.a. bei einem bereits über einen langen Zeitraum hinweg bestehenden chronischen Krankheitsgeschehen, Umbauvorgänge in der Lunge stattfinden (LECLERE et al., 2011b), ist es sehr wahrscheinlich, dass viele der Pferde an einer dauerhaften Partialinsuffizienz leiden und deshalb eine Wiedererlangung eines physiologischen Gasaustauschs, und somit einer physiologischen Atemfrequenz, relativ unwahrscheinlich ist (ROBINSON et al., 2000).

Auch die Effektgrößen sprechen dafür, dass hinsichtlich des Parameters „Atemfrequenz“ ein eindeutig messbarer klinischer Vorteil der CpG-Behandlung im Vergleich zur Kortisontherapie vorlag. Hinsichtlich der Dosierung wies die einfache CpG-Behandlung einen kleinen Vorteil gegenüber der CpGdd auf.

### **5.3.2. Auskultation**

Alle drei Therapieformen konnten die Auskultationsbefunde verbessern. Zwischen US1 und US2 war die Reduktion des Scorings bei der CpGsd und der CpGdd signifikant, bei der Kortisongruppe hingegen nicht. Bei der Langzeituntersuchung verbesserte sich der Auskultationsbefund bei der Kortison- sowie der CpGsd-Therapie signifikant. Nur bei der CpGdd-Gruppe konnte der Befund nicht signifikant verbessert werden. Die Auskultationsergebnisse können einen Eindruck bezüglich des Vorliegens einer Lungenerkrankung geben, diese Ergebnisse sollten aber in Zusammenhang mit anderen klinischen Befunden, wie der Atemfrequenz, dem Atemtyp, dem Interpleuraldruck, sowie der Sekretmenge in der Trachea gesehen werden, da zwischen verschiedenen Untersuchern Unterschiede in der Interpretation der Ergebnisse vorkommen können (BROOKS et al., 1993). Außerdem können Lungenkrankheiten auch dann vorliegen, wenn keine auskultatorischen Auffälligkeiten auftreten (GLITZ and DEEGEN, 2002).

Nichtsdestotrotz können die Befunde bezüglich der Langzeitwirkung (CpGsd-Therapie mit großem klinischen Effekt, Kortison und CpGdd mit mittleren klinischen Effekten) als positiv gewertet werden.

### **5.3.3. Atemtyp, klinisches Scoring und Interpleuraldruckmessung**

Der Atemtyp ist ein Maß für die expiratorische Atemtätigkeit und gibt einen klinischen Hinweis auf einen zugrundeliegenden Bronchospasmus sowie die Einengung der Atemwege (ROBINSON et al., 2000). Unter der Kortisontherapie, sowohl direkt nach der letzten Behandlung, als auch bei der Langzeituntersuchung konnte eine signifikante Verbesserung des Atemtyps festgestellt werden. Ebenfalls hoch signifikant konnte der Parameter durch die CpGsd-Therapie gesenkt werden. Die CpGdd-Gruppe erfuhr ebenfalls eine Absenkung des Scorings für den Atemtyp, wobei die Verbesserung zwischen US1 und US3 statistisch signifikant ausfiel. Da der Atemtyp jedoch als ein äußeres Erkennungszeichen für die Einengung der Atemwege gilt (ROBINSON et al., 2000), beschreiben die Ergebnisse, sowohl der

Kortison-, als auch der CpGsd-Therapie-Effekte von großer klinischer Relevanz.

Zusätzlich zum Atemtyp erfolgte außerdem eine Beurteilung des Nüsternblähens. Nüsternblähen ist eine Folge der vermehrten Atemtätigkeit sowie ein Mechanismus zur Reduktion des Atmungswiderstands (ROBINSON et al., 2000). Der „Total clinical score“ kann bei der klinischen Beurteilung des Schweregrads der Atemnot hilfreich sein (ROBINSON et al., 2000). Alle Therapieformen konnten sowohl zwischen US1 und US2, als auch hinsichtlich des Langzeiteffekts statistisch signifikante Verbesserungen des „Total clinical scores“ erzielen. Auch im Zusammenhang mit weiteren Lungenfunktionsuntersuchungen kann man daher bei den behandelten Pferden aller drei Gruppen eine Verminderung der Atemnot und dadurch eine Verbesserung des Allgemeinbefindens feststellen (ROBINSON et al., 2000).

In einem engen Zusammenhang mit dem Atemtyp sowie dem klinischen Scoring steht auch die Messung des Interpleuraldrucks. Bei dieser Untersuchung wird die Druckdifferenz zwischen In- und Expiration gemessen (DEEGEN and KLEIN, 1987). Der Atemtyp gibt einen äußerlichen Hinweis auf die expiratorische Atemtätigkeit und somit auf die zugrundeliegende Einengung der Atemwege (ROBINSON et al., 2000). Um die Einengung der Atemwege zu kompensieren und eine Hyperkapnie zu verhindern, steigt der Interpleuraldruck. Daher wird bei Bronchokonstriktion eine abdominal-forcierte Atemtätigkeit notwendig, bei der der expiratorische Druck deutlich verstärkt wird und in Folge dessen auch der Interpleuraldruck steigt (LECLERE et al., 2011b). Alle drei Behandlungsregime konnten sowohl kurz-, als auch langfristig eine Reduktion des indirekt-gemessenen Lungendrucks erzielen. Durch die Verbesserung des Interpleuraldrucks kann man von einem reduzierten Atemwegswiderstand mit Reduktion des Bronchospasmus ausgehen (LECLERE et al., 2011b). Dabei wiesen die Ergebnisse für die Kortisontherapie (-30,0% bei US1 und -30,3% bei US2) sowie für die CpGsd-Behandlung mit -20,3% (US1-US2) und -29,7% (US1-US3) signifikante Verbesserungen auf. Lediglich bei der CpGdd-Gruppe fielen die Resultate nicht signifikant aus, jedoch konnte auch hier der Interpleuraldruck insgesamt um 6,8% bzw. 4,9% gesenkt werden.

In der Gesamtheit aller Behandlungsgruppen lagen die abschließenden Mittelwerte für den Interpleuraldruck noch etwas oberhalb des als physiologisch geltenden

Bereichs von  $<10\text{cmH}_2\text{O}$ . Dies kann im Zusammenhang mit den stattfindenden Umbauvorgängen („Airway Remodeling“) in der Lunge stehen, die v.a. durch neutrophile Entzündungsreaktionen, Epithelproliferation und Proliferation der glatten Muskulatur entstehen (LECLERE et al., 2011b, LECLERE et al., 2011a). Diese Umbauvorgänge machen eine vollständige Regeneration des Gewebes, bei einem schon länger bestehenden Krankheitsgeschehen sehr unwahrscheinlich (ROBINSON et al., 2000). Da bei 79% der behandelten Pferde, die Erkrankung zum Zeitpunkt dieser Therapie bereits seit fünf Jahren oder länger bestand, muss man von zum Teil irreversiblen Schädigungen der Lunge ausgehen. Dies wäre, neben starken individuellen Schwankungen, eine mögliche Erklärung, warum trotz großen Verbesserungen der Interpleuraldruckwerte, eine Absenkung auf physiologische Werte eventuell gar nicht mehr möglich ist.

#### **5.3.4. Arterielle Blutgasmessungen**

Zur Evaluierung der Sauerstoffversorgung wurde der Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Bei allen drei Behandlungsformen konnte bei den  $\text{PaO}_2$ -Messungen sowohl direkt nach der letzten Inhalation, als auch bei der Evaluierung des Langzeiteffekts ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen den drei Therapieformen bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede. Zwar kann man laut LECLERE und Kollegen (2011) nicht von einer direkten Korrelation zwischen der Lungenfunktion und der mittels  $\text{PaO}_2$  gemessenen Hypoxämie sprechen, jedoch könnten die Steigerungen der  $\text{PaO}_2$ -Werte im Zusammenhang mit den erniedrigten Werten für den Interpleuraldruck, einen deutlichen Hinweis für eine Verbesserung der pulmonalen Ventilation geben (LECLERE et al., 2011b). Dies konnte auch die Berechnung der Effektgrößen bestätigen, da bei der Langzeitevaluierung alle Therapieformen klinisch relevante Effekte zeigten.

Bei der Langzeituntersuchung lag der Mittelwert der Kortisongruppe bei  $91,7\text{mmHg}$  ( $\pm 12,2$ ), bei CpGsd bei  $92,5\text{mmHg}$  ( $\pm 10,4$ ) und bei CpGdd bei  $88,0\text{mmHg}$  ( $\pm 14,7$ ) und erfuhr damit eine Steigerung um 10% nach der Beclometason Therapie und um jeweils 13% bei den beiden CpG-Gruppen. Die Mittelwerte zum Endzeitpunkt lagen somit nur gering unter dem physiologischen  $\text{PaO}_2$ -Wert von  $100 \pm 5\text{mmHg}$ . Eine vollständige Wiedererlangung der physiologischen Werte war jedoch aufgrund des bei einem Großteil der Patienten

langandauernden Krankheitsgeschehens und der dabei auftretenden „Airway Remodeling“-Vorgänge, als sehr unwahrscheinlich einzustufen, da eine vollständige Wiedererlangung der vollen Funktionsfähigkeit der Lunge bei chronischem Geschehen fast ausgeschlossen werden muss (ROBINSON et al., 2000).

Der PaO<sub>2</sub> kann, je nach Ort und Zeit der Messung, einigen Variationen unterliegen, da er vom vorherrschenden Barometerdruck abhängig ist. Dieser wiederum hängt von der geographischen Lage (Höhe über N.N.) sowie den Einflüssen durch das Wetter (Hochdruck- bzw. Tiefdrucklage) ab (GRABNER and FEY, 2005). Daher wurde zusätzlich zum PaO<sub>2</sub> in Abhängigkeit vom vorherrschenden Barometerdruck zum Zeitpunkt der Untersuchung die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz berechnet (GRABNER and FEY, 2005).

Bei der Kortisongruppe konnte der Ausgangswert im Vergleich zu US3 zwar um 25% auf 16,2mmHg gesenkt werden, diese Senkung des AaDO<sub>2</sub> wird aber gemäß der Einstufung nach GRABNER und FEY (2005) noch als mittelgradig an COB erkrankt eingestuft. Bei der CpGsd-Therapie konnte hingegen eine Verbesserung um 34% auf 14,9mmHg nachgewiesen werden und somit verbesserte sich die Einordnung von mittelgradige (15-25mmHg) in geringgradige (10-15mmHg) COB.

Sowohl der arterielle Sauerstoffpartialdruck, als auch die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz konnten durch die CpG-Inhalationen größere klinisch relevante Effekte hervorrufen, als die etablierte Beclometason-Therapie.

In einer vorhergehenden Studie konnte nach 5 Inhalation mit der einfachen CpG-Dosis kein statistisch signifikanten Langzeiteffekt nachgewiesen werden (KLIER et al., 2015b). In unserer Studie zeigte sich hingegen, dass eine Erhöhung der Anzahl an Inhalationen mit CpG-GNPs, auf insgesamt 10, ein deutlich positives Ergebnis sowohl auf den PaO<sub>2</sub>, als auch auf die AaDO<sub>2</sub> bewirken konnte. Dieser Effekt konnte außerdem langfristig nach einem Zeitraum von 8 Wochen noch festgestellt werden.

### **5.3.5. Bronchoskopie und Nasenausfluss**

Übermäßige Akkumulation von Schleim in den Atemwegen ist ein wichtiges Kennzeichen für RAO (DIXON et al., 1995, GERBER et al., 2000). Diese überschüssige Ansammlung von Mukus kann verursacht sein durch vermehrte

Sekretion oder eine verminderte mukozilliäre Clearance (GERBER et al., 2000). Zur Evaluierung des Einflusses der Behandlungen auf das Vorhandensein von Mukus und dessen Beschaffenheit wurde ein Scoring nach Gerber herangezogen (GERBER et al., 2004).

Sowohl kurz- als auch langfristig konnte bei allen drei Behandlungsformen eine Reduktion der endoskopisch evaluierten Schleimmenge festgestellt werden. 8 Wochen nach der letzten Inhalationsbehandlung war die Absenkung jedoch nur noch bei der CpGsd-Gruppe signifikant. Dies bedeutet, dass die Therapie mit CpGs, übereinstimmend mit den Ergebnissen vorhergehender Studien (KLIER et al., 2015b), durch die Reduktion der Mukusmenge eine Verbesserung der Symptome, wie Schleim-induzierter Husten oder Atemnot erzielen konnte, da diese in direkter Korrelation stehen (ROBINSON et al., 2003, LECLERE et al., 2011b). Dieser Effekt hielt zudem nicht nur kurzfristig an, sondern konnte auch nach einem Zeitraum von 8 Wochen nachgewiesen werden.

Die endoskopische Beurteilung der Schleimmenge gilt, obwohl eine gewisse subjektive Einschätzung des Untersuchers vorhanden ist, als gut nachvollziehbares Mittel mit einer geringen Variation innerhalb eines Untersuchers und zwischen unterschiedlichen Untersuchern („intra- and interobserver variance“) (GERBER et al., 2004).

Bei Pferden, die an RAO leiden, besteht eine hohe Korrelation zwischen der Akkumulation von Mukus und dem Prozentsatz an Neutrophilen in der BAL (GERBER et al., 2004). U.a. durch eine vermehrte Sekretion von Mucinen kann eine neutrophile Entzündung der Atemwege eine vermehrte Schleimproduktion fördern (TAKEYAMA et al., 2000, GERBER et al., 2004). Da eine pathologische Steigerung der Sekretmenge auch durch oxidative Prozesse neutrophiler Inflammation verursacht wird (GERBER et al., 2003), kann eine Absenkung der Mukusmenge daher auch als antiinflammatorische Wirkung durch die CpG-Behandlung interpretiert werden.

Die Reduktion der Schleimmenge hat auch positiven Einfluss auf die Verbesserung anderer klinischer Parameter, wie z.B. den Sauerstoffpartialdruck, da durch geringere Schleimmengen in den luftführenden Atemwegen, auch der Gasaustausch in der Lunge verbessert wird.

Neben der Menge an Schleim wurde auch die Schleimviskosität beurteilt. Da in der durchgeführten Studie die Beurteilung der Parameter stets durch den gleichen Untersucher stattfand, ist der Faktor der relativ hohen Varianz, die bei unterschiedlichen Untersuchern, in der Beurteilung der Mukusviskosität beschrieben ist, vernachlässigbar (GERBER et al., 2004). Außerdem beschreibt eine Studie von KELLER und Kollegen (2001), dass eine Zuordnung, ob Pferde schleimlösende Medikation erhalten haben oder nicht, eindeutig anhand der Schleimviskosität erfolgen kann (KELLER et al., 2001).

Im Gegensatz zur Therapie mit Beclometason, konnte nach den Inhalationen mit beiden CpG-Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Zähigkeit des Schleims verzeichnet werden. Bei klinischer Exazerbation der RAO verändert sich die Viskosität des Mukus hin zu einer vermehrten Zähigkeit des Schleims (GERBER et al., 2000), daher spricht eine Verbesserung der Viskosität dafür, dass die Therapie eine Erhöhung der mukoziliären Clearance bewirken konnte. Außerdem kann anhand der reduzierten Schleimmenge durch die CpG-Behandlung von einer Senkung der Mukus-Sekretion ausgegangen werden (GERBER et al., 2000). Auch in einer Studie von HERHOLZ et al. wurde eine positive Korrelation zwischen der Verminderung der Schleimviskosität und den Ergebnissen der Lungenfunktionsuntersuchungen festgestellt (HERHOLZ et al., 2002).

Neben der endoskopischen Beurteilung des Schleims in den Atemwegen wurde, als äußeres Anzeichen für ein vermehrtes Auftreten von Mukus, außerdem das Vorkommen bzw. die Beschaffenheit des Nasenausflusses bewertet. Im Rahmen der drei Behandlungsregime konnte bei allen Gruppen eine Reduktion des Nasenausflusses bewirkt werden. Die Ergebnisse dieses Parameters zeigten, dass alle drei Behandlungsformen direkt im Anschluss an die letzte Inhalation eine Reduktion erzielten. Allerdings war bei der Langzeitevaluierung nur noch das Ergebnis der CpGsd-Behandlung signifikant.

Die Tendenz der Reduktion des Nasenausflusses durch die Behandlungen stimmt mit den Befunden überein, die mithilfe der endoskopischen Untersuchungen erhoben wurden. Da das Auftreten von mukösem Nasenausfluss, v.a. im Zusammenhang mit gelegentlichem Husten, ein früher klinischer Indikator für ein erhöhtes Risiko einer RAO-Erkrankung sein kann (BOSSHARD and GERBER, 2014, RETTMER et al., 2015), kann der Parameter gut als Indikator für den Verlauf

der Erkrankung durch die Besitzer bzw. bei der klinischen Untersuchung herangezogen werden (LAUMEN et al., 2010).

### **5.3.6. Atemwegsentzündung**

Als wichtigstes Merkmal für eine Entzündung der unteren Atemwege wurde der Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Gesamtzellzahl der BAL bewertet (LECLERE et al., 2011b, AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Alle drei Behandlungsregime konnten den Anteil an Neutrophilen reduzieren. In Hinblick auf die Untersuchung direkt im Anschluss an die letzte Behandlung fiel die Reduktion bei allen drei Therapieregimen signifikant aus, bezüglich des Langzeiteffekts jedoch nur bei den beiden CpG-Gruppen. Dabei reduzierte sich der Anteil der Neutrophilen im Mittel bei der CpGsd-Gruppe von der ersten bis zur letzten Untersuchung um 39% und bei der CpGdd um 29%. Dies spricht dafür, dass die CpG-Therapie einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt erzielen konnte (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010). Als einer der wichtigsten Eckpfeiler in der Behandlung der RAO gilt die Reduktion der Entzündung in der Lunge. Eine erhöhte Akkumulation von Neutrophilen in den Atemwegen schafft u.a. durch oxidativen Stress ein Milieu, in dem vermehrte Schleimproduktion und Bronchospasmus gefördert werden (DAVIS and RUSH, 2002, LECLERE et al., 2011b). Es ist bekannt, dass eine Therapie mit Kortikosteroiden eine Reduktion des Anteils an Neutrophilen bewirken und dadurch eine Verbesserung der klinischen Symptome erreichen kann (DAVIS and RUSH, 2002, GIGUERE et al., 2002). Daher ist der durch die CpG-Behandlungen erzielte Effekt als besonders hoch einzuschätzen, da die Langzeitwirkung nicht nur gleichwertig, sondern sogar signifikant besser war, als bei der Kortisontherapie und diese bisher als effektivste Form der medikamentösen Therapie zur Kontrolle der klinischen Symptome der RAO galt (LECLERE et al., 2011b, WILLIAMSON and DAVIS, 2007). Dieser Aspekt könnte für die Zukunft ein wichtiges Argument für den Einsatz der CpG-Therapie darstellen, da mit dieser nicht nur eine kurzfristige, sondern durch die Modulation des Immunsystems auch eine langfristige Verbesserung des Entzündungsstatus in der Lunge erreicht werden kann. Dafür spricht auch, dass sowohl bei der CpGsd, als auch bei der CpGdd der Anteil an Neutrophilen im behandlungsfreien Zeitraum zwischen der US2 und der US3 noch weiter absank.

Die Mittelwerte für die Langzeituntersuchung lagen bei allen Gruppe (Kortison: 23,0% ( $\pm 17,5$ ); CpGsd: 13,1% ( $\pm 12,3$ ); CpGdd: 11,5% ( $\pm 10,8$ )) unterhalb des 25%-Anteils an Neutrophilen, der als pathognomonisch für RAO gilt (LECLERE et al., 2011b). Da außerdem keine Veränderungen hinsichtlich der Haltung der Pferde vorgenommen wurden, was als wichtigster Aspekt im Management der RAO bezeichnet wird (AINSWORTH and CHEETHAM, 2010, LECLERE et al., 2011b, WILLIAMSON and DAVIS, 2007), kann das gewonnene Ergebnis, v.a. durch die CpG-Inhalationen als klinisch höchst relevant bezeichnet werden. Die Relevanz der Ergebnisse wird außerdem durch die berechneten Effektgrößen bestätigt. Hier konnten bei der Langzeitevaluierung sowohl die CpGsd, als auch die CpGdd einen großen klinischen Effekt erzielen, die Kortisontherapie hingegen nur einen mittleren Effekt.

### **5.3.7. HOARSI**

Mittels des standardisierten HOARSI- (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index) Fragenbogens wurden die Besitzer vor der ersten und acht Wochen nach der letzten Behandlung, bezüglich der Symptomatik und der Leistungsfähigkeit befragt. Die Pferdebesitzer wussten dabei nicht, welche Therapie ihr Pferd erhielt. Die Kortisontherapie bewirkte zwar eine Reduktion des Mittelwerts des Scorings, allerdings war diese statistisch nicht signifikant. Sowohl bei der CpGsd-, als auch bei der CpGdd-Behandlung hingegen, bewerteten die Besitzer den Zustand ihrer Pferde, als hoch signifikant besser, als vor der Therapie.

In einer Studie von LAUMEN und Kollegen (2010) konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Besitzereinschätzung, bezüglich des Krankheitsstatus ihres Pferdes, und den Ergebnissen der Untersuchungen des Respirationstrakts festgestellt werden. GERBER et al. (2001) konnten in einer Untersuchung, in der sowohl Tierärzte als auch die Pferdebesitzer den Erfolg einer Behandlung einschätzten, feststellen, dass die Besitzer die Effektivität der Therapie insgesamt sogar besser einschätzen konnten, als die Tierärzte (GERBER et al., 2011). Daher wird die Beurteilung durch die Besitzer mittels HOARSI als ein Mittel eingeschätzt, das eine hohe Zuverlässigkeit und Aussagekraft besitzt (LAUMEN et al., 2010, RAMSEYER et al., 2007).

Da die Besitzer nicht wussten, welche Therapie ihr Pferd erhielt, waren die erzielten Resultate durch die CpG-Behandlung als höchst relevant einzuschätzen, da sich das

klinische Bild für die Besitzer merklich verbessern konnte und somit eines der wichtigsten Ziele der Behandlung erreicht wurde.

## **6. Diskussion der labordiagnostischen Untersuchungen**

Im ursprünglichen Studiendesign war vorgesehen, den direkten Einfluss der Therapieformen auf die Quantität der Tregs in der BAL mittels FACS (Fluoreszenz activated cell sorting) zu ermitteln. Jedoch war es in zahlreichen Vorversuchen nicht möglich, die bereits in einer Studie von HENRIQUEZ et al. (2014) publizierten Ergebnisse, unter Zuhilfenahme der gleichen Antikörper, zu reproduzieren. Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit eines direkten Nachweises von Tregs. Dafür werden die Zellen mit den charakteristischen Markern der Tregs (CD4, CD25, FoxP3) gekennzeichnet. Jedoch war nur für CD4 ein pferdespezifischer Antikörper (mouse anti-equine CD4: HB61A, VMRD, Inc., Pullman, USA) verfügbar und sowohl bei CD25 (goat anti-human CD25; R&D Systems, London, UK), als auch bei FoxP3 (rat anti-mouse Foxp3-PE; FJK-16s; eBioscience) musste man auf Antikörper anderer Spezies zurückgreifen (HENRÍQUEZ et al., 2014). Die nicht ganz ideale Übereinstimmung der Antikörper mit den equinen Zellen könnte eine mögliche Erklärung für das Misslingen des direkten Nachweises der Tregs mittels FACS sein.

Eine weitere mögliche Ursache könnten Varianzen in den Antikörper-Chargen sein, wobei zahlreiche Unterschiede einer Antikörper-Charge im Vergleich zu einer anderen Charge vorliegen können (VOSKUIL, 2014). Die Antikörper könnten inaktiviert worden sein, das Assay selbst oder das biologische Material könnte fehlerhaft sein, um nur einige Beispiele zu nennen, die die Qualität der Antikörper beeinflussen könnten (VOSKUIL, 2014).

Außerdem handelt es sich bei den Tregs um einen sehr kleinen Anteil (im Blut ca. 2%) an der gesamten T-Lymphozyten-Population, was den Nachweis noch zusätzlich erschwert (ROBBIN et al., 2011).

Es wurden, neben den bei HENRIQUEZ et al. (2014) verwendeten Antikörpern, auch andere Antikörper getestet, jedoch blieb auch hiermit der eindeutige Nachweis von Tregs erfolglos. Deshalb wurde in unserer Studie, anstellen der FACS-Analyse,

ein Nachweis von mRNA mittels Real Time PCR durchgeführt.

## **6.1. Diskussion der Zytokin-Ergebnisse**

### **6.1.1. Interleukin-4**

Da eine vorherrschende Th-2-Immunantwort u.a. dafür verantwortlich gemacht wird, dass RAO-Pferde auf bestimmte Allergene mit einer Exazerbation der Atemwegssymptomatik reagieren (CORDEAU et al., 2004), war ein Ziel der Studie zu zeigen, dass die Therapien eine Reduktion des Th2-Zytokins IL-4 bewirken können. Alle drei Therapieformen konnten direkt nach der Behandlung eine Senkung der IL-4-Konzentration in der BAL erzielen. Dabei sank der Mittelwert bei der Kortisongruppe signifikant und bei der CpGsd hoch signifikant. Diese Resultate stimmten überein mit den Ergebnisse aus einer Studie von GIGUERE et al. (2002), bei der eine inhalative Fluticason-Therapie ebenfalls eine Reduktion des allergie-vermittelnden Th2-Zytokins bewirken konnte.

Betrachtet man den Langzeiteffekt konnte auch hier bei der Kortisontherapie eine signifikante sowie bei der CpGsd-Gruppe eine hoch signifikante Reduktion der IL-4-Konzentration erzielt werden. Wie in einer vorhergehenden Studie bereits festgestellt wurde, besitzt die Behandlung mit CpGs möglicherweise das Vermögen IL-4 herunterregulieren zu können (KLIER, 2011). IL-4 wird auch eine Beteiligung an der Rekrutierung von Neutrophilen, einerseits durch chemotaktische Faktoren, andererseits durch die Stimulation der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen von Endothelzellen, zugesprochen (LECLERE et al., 2011b, HUANG et al., 2007). Daher steht die Reduktion der Neutrophilen durch die Behandlungen auch in einem positiven Kontext mit der Absenkung der IL-4-Konzentration in der BAL.

### **6.1.2. Interleukin-10**

Tregs wird eine entscheidende Schutzfunktion gegenüber Allergien zugeschrieben (ROBBIN et al., 2011). Diese Zellen produzieren das antiinflammatorische Zytokin IL-10, das einen wichtigen suppressiven Einfluss auf die allergie-vermittelnde Th2-Immunantwort hat (HAWRYLOWICZ and O'GARRA, 2005, KLIER et al., 2011). IL-10 wirkt u.a. inhibitorisch auf Th2-Zytokine wie IL-4 oder IL-5. Außerdem wird IL-10 eine inhibitorische Wirkung auf das proinflammatorische Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  zugeschrieben (TAYLOR et al., 2006, VAN SCOTT et al., 2000, SHAMJI and

DURHAM, 2011).

Die Kortisontherapie konnte im Verlauf der Untersuchungen im Mittel eine Steigerung der IL-10-Konzentration erreichen, wenn auch keine signifikante. Sowohl bei der CpGsd, als auch bei der CpGdd sank der Mittelwert im Verlauf zwischen US1 und US2 zunächst nicht signifikant ab und stieg, im Rahmen der Langzeitevaluierung, wiederum nicht signifikant bei beiden Gruppen auf einen höheren Wert als den Ausgangswert, an. Eine mögliche Erklärung für den späten Anstieg des Zytokins IL-10 ist, dass es bei immunmodulatorischen Therapien zu einem zeitverzögerten Eintreten der Immunmodulation kommen kann (SHAMJI and DURHAM, 2011).

In anderen Studien konnten sowohl beim Mensch (MOSEMAN et al., 2004), als auch bei Pferden (KLIER, 2011) eine Hochregulation der IL-10-Produktion durch Stimulation mit CpGs erzielt werden. Eine mögliche Erklärung des schwachen Anstiegs der IL-10-Konzentration könnte sein, dass es sich bei den teilnehmenden Patienten zum Großteil um Pferde höheren Alters (86% waren 15 Jahre oder älter) handelte. ROBBIN et al. (2010) beschreiben, dass bei Pferden höheren Alters weniger FoxP3 positive CD4+-Zellen gefunden werden konnten. Da diese als Indikator für Tregs gelten, könnte auch die Produktion von IL-10 hier aufgrund der gleichen Ursachen vermindert sein (ROBBIN et al., 2011). Dafür spricht außerdem, dass zwischen keinem der drei Therapieregime signifikante Unterschiede für die IL-10-Konzentrationen eruiert werden konnten.

### **6.1.3. Interleukin-17**

Das Th17-Zytokin IL-17 wurde untersucht, da ihm, aufgrund seiner chemotaktischen und aktivierenden Wirkung auf Neutrophile eine Rolle in der Pathogenese der RAO zugeschrieben wird (AINSWORTH et al., 2009, DEBRUE et al., 2005).

Bei der Kortisongruppe stieg der Mittelwert für die IL-17-Konzentration zwischen US1 und US2 signifikant sowie zwischen US1 und US3 nicht signifikant an. Eine mögliche Erklärung dafür, dass IL-17 unter der Kortisontherapie nicht gesunken ist, könnte sein, dass Kortikosteroide v.a. hemmend auf Th2-Zytokine (IL-4 und IL-5) sowie IL-8 wirken (LUNN and HOROHOV, 2010) und somit über andere Mechanismen wirken, als den Th17-vermittelten Weg. So lässt es sich auch

erklären, dass die IL-17-Konzentration zwischen US1 und US2 einen statistisch signifikanten Vorteil auf Seiten der CpGsd gegenüber der Kortisontherapie aufwies.

Beide CpG-Dosen konnten direkt im Anschluss an die letzte Inhalation eine geringe Reduktion und bezüglich des Langzeiteffekts jeweils eine deutliche Senkung des Mittelwerts für die IL-17-Konzentration bewirken. Obwohl die Werte bei der CpG-Behandlung nicht als statistisch signifikant betrachtet werden konnten, zeigte sich trotzdem eine deutliche Tendenz, dass die CpG-Inhalationen eine Reduktion des Zytokins IL-17 bewirken konnte. Da in einer Studie von DEBRUE und Kollegen (2005) eine erhöhte Expression von IL-17 in der BAL von RAO-Pferden nach Allergen-Exposition determiniert werden konnte, kann eine Reduktion der IL-17-Konzentration als ein positiver Behandlungserfolg bewertet werden. Die Kortisontherapie konnte hinsichtlich der IL-17-Konzentration keine klinisch relevanten Effekte bewirken. Im Gegensatz dazu konnten bei der Langzeitwirkung sowohl die CpGsd, als auch die CpGdd mit der Reduktion der IL-17-Konzentration Effekte mittlerer klinischer Relevanz erzielen.

Eine Senkung der IL-17-Konzentration, wie sie bei beiden CpG-Gruppen vorlag, könnte auch assoziiert sein mit der ebenfalls erzielten Reduktion des Anteils an neutrophilen Granulozyten in der BAL durch die CpG-Therapie und somit einer Verminderung der Entzündung in den unteren Atemwegen (AINSWORTH et al., 2009).

#### **6.1.4. Interferon- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  stellt einen wichtigen Vertreter der Th1-Zytokine dar (BOHLE, 2002). Bei der Kortisongruppe sank der Mittelwert für IFN- $\gamma$  zwischen US1 und US2 geringfügig ab, stieg in Hinblick auf US3 allerdings wieder an. Bei der CpGsd-Gruppe reduzierte sich der Ausgangswert direkt nach der letzten Behandlung signifikant. Bei der Langzeitevaluierung wurde ebenfalls eine Reduktion der IFN- $\gamma$ -Konzentration verzeichnet, jedoch war diese nicht signifikant. Auch die CpGdd-Gruppe bewirkte sowohl kurz-, als auch langfristig eine Reduktion des Zytokins, jedoch war diese weder zwischen US1 und US2, noch hinsichtlich US3 statistisch signifikant. Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu den von BOHLE (2002) festgestellten Resultaten, wo durch Stimulation mit CpGs eine vermehrte

Freisetzung des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  beschrieben wurde, welches inhibitorisch auf die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 wirken soll (FONSECA and KLINE, 2009). Da jedoch auch in einer Studie von LAVOIE-LAMOUREUX et al. (2012) im Blut von gesunden und RAO-Pferden keine Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration festgestellt werden konnten, scheint die Einordnung des Zytokins IFN- $\gamma$  in der Pathophysiologie der RAO noch nicht ganz geklärt zu sein.

Weitere Studien sowohl bei SPRAO- (BEADLE et al., 2002) und RAO-Pferden (GIGUERE et al., 2002), als auch bei Menschen, die an Asthma leiden (UMETSU and DEKRUYFF, 2006), konnten erhöhte IFN- $\gamma$  Expressionen in Phasen der Exazerbation feststellen. In einer Studie von HOROHOV war nach Antigen-Challenge ebenfalls IFN- $\gamma$ -mRNA bei RAO-Exazerbation erhöht (HOROHOV et al., 2005) Da IFN- $\gamma$  einerseits zur einer Verstärkung der chronischen Entzündung in der Lunge bei asthmatischen Erkrankungen beitragen kann (UMETSU and DEKRUYFF, 2006), und es andererseits im Zusammenspiel mit IL-10 und Tregs inhibitorisch auf die Th2-Immunantwort wirken kann (FONSECA and KLINE, 2009), müssen die gewonnen Resultate für IFN- $\gamma$  in Zusammenhang mit den Ergebnisse für die Marker der Tregs und den klinischen Ergebnissen betrachtet werden (HAWRYLOWICZ, 2005).

#### **6.1.5. Interferon- $\alpha$**

In keiner der BAL-Proben konnte IFN- $\alpha$  nachgewiesen werden. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist, dass IFN- $\alpha$  hauptsächlich als anti-virales Zytokin wirkt. Da bei Pferden, die chronisch an RAO leiden, eine virale Beteiligung sehr unwahrscheinlich ist, war auch nicht mit erhöhten Werte für IFN- $\alpha$  zu rechnen (WAGNER and FREER, 2009, LUNN and HOROHOV, 2010).

#### **6.1.6. FoxP3 (Treg)**

Die Messung der mRNA in CD4+-Zellen diente dazu, den Einfluss der Therapieformen auf die Aktivität von Tregs zu untersuchen.

Keines der drei Therapieregime konnte bei US2 oder bei US3 einen signifikanten Anstieg der FoxP3-mRNA bewirken. Diese Ergebnisse stimmen somit überein mit den Resultaten der Studie von EL ABBAS et al. (2012) in der RAO Pferde, im Gegensatz zu gesunden Kontrollpferden, auf „Antigenchallenge“ nicht mit einer signifikanten Hochregulation der FoxP3-Expression in der BAL reagierten.

Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass das „Reaktionsvermögen“ der Tregs bei RAO generell vermindert ist (EL ABBAS et al., 2012). Dafür würde außerdem sprechen, dass auch therapievergleichend keine statistisch signifikanten Unterschiede, bezüglich des Einflusses der Therapie auf die FoxP3-Expression, evaluiert werden konnten.

Einiges deutet auch darauf hin, dass FoxP3 nicht der ideale Marker ist, um die Aktivität der Tregs zu analysieren. Da der Transkriptionsfaktor beim Menschen als Marker für nicht aktivierte regulatorische T-Zellen beschrieben wird, besteht die Möglichkeit, dass FoxP3 auch beim Pferd eher eine Messgröße für nicht-aktivierte, als für aktivierte Tregs ist (SAKAGUCHI et al., 2009).

In einer in-vitro Studie bei Pferden mit Insect Bite Hypersensitivity (IBH) war die FoxP3-Expression nach Stimulation mit Antigen signifikant niedriger, als bei gesunden Pferden (HAMZA et al., 2012). Da es sich sowohl bei IBH, als auch bei RAO um Erkrankung handelt, denen eine allergische Genese zugrunde liegt, liegt die Annahme nahe, dass auch RAO-Pferd eine verminderte Fähigkeit haben Tregs zu produzieren und daher die FoxP3-Expression weder durch die CpG-, noch durch die Kortisontherapie signifikant gesteigert werden konnte.

Des Weiteren kommt hinzu, dass es sich bei den Patienten unserer Studie hauptsächlich um Pferde höheren Alters (86% waren 15 Jahre oder älter) handelte. In einer Studie von ROBBIN et al. (2011) wurde festgestellt, dass sogar bei gesunden Pferden, die älter als 15 Jahre sind, der Anteil an FoxP3 positiven CD4+ Zellen signifikant niedriger ist, als bei jüngeren Pferden. Daher kann man vermuten, dass die immunologische Reaktion der Tregs bei den untersuchten Pferden zusätzlich durch das hohe Alter reduziert war. Nicht nur bei Pferden, sondern auch bei älteren Menschen, die an Asthma leiden, wurde eine niedrigere FoxP3-mRNA-Expression beschrieben (VALE-PEREIRA et al., 2011).

Da zur Bestimmung von Tregs nicht FoxP3 alleine, sondern idealerweise eine Kombination aus FoxP3 und dem Marker CD25 aus CD4-T-Zellen evaluiert wird, eignet sich eine FACS-Analyse besser, um eine Aussage über die Aktivität von Tregs treffen zu können, als die mRNA-Bestimmung. So konnten in einer Studie von HENRÍQUEZ et al. (2014) in der BAL von RAO-Pferden mittels FASC nach Antigen-Challenge signifikant höhere Treg-Konzentrationen bestimmt werden, als

vor Stimulation.

#### **6.1.7. TGF- $\beta$ (Wirkung auf Th1)**

Die regulatorische Funktion der Tregs wird neben IL-10 u.a. auch durch das Zytokin TGF- $\beta$  vermittelt (SHAMJI and DURHAM, 2011). Diesem Zytokin werden Einflüsse auf zahlreiche immunologische Reaktionen zugeschrieben, u.a. eine direkte antiinflammatorische Wirkung auf Th1-Zellen sowie der Einfluss auf Heilungsprozesse und Fibrosierung von Gewebe (DESJARDINS et al., 2004).

Die TGF- $\beta$ -mRNA-Expression aus CD4-Zellen wurde mittels Real Time PCR gemessen. Dabei lag sowohl bei US2, als auch bei US3 bei keiner der drei Therapiegruppen eine signifikante Veränderung der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression vor. Auch in einer Studie von DESJARDINS et al. (2004) konnte nach Allergen-Challenge weder in der BAL von gesunden, noch von RAO-Pferden Unterschiede in der TGF- $\beta$ -Konzentration festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Stellenwert von TGF- $\beta$  in der Pathophysiologie der RAO noch nicht eindeutig geklärt ist und daher auch die Bedeutung des Einflusses der Therapie auf die TGF- $\beta$ -Expression nicht sicher ist (DESJARDINS et al., 2004). Beim Menschen konnte bei Asthma eine Verbindung zwischen einer vermehrten Expression von TGF- $\beta$  und dem Umbau der Lunge hingehend zu einer bronchialen Fibrose festgestellt werden (KLINE, 2007a), jedoch konnte dies beim Pferd bisher nicht bestätigt werden (DESJARDINS et al., 2004).

#### **6.1.8. T-bet (Th1)**

Eine wichtige Bedeutung für die Vermittlung der CpG-Wirkung könnte der Transkriptionsfaktor T-bet haben, da seine Aktivierung Th1-assoziierte Antikörper fördert und dabei gleichzeitig Th2-assoziierte Antikörper inhibiert (VOLLMER and KRIEG, 2009).

T-bet gilt in der Humanmedizin als „schicksalsentscheidender“ Faktor hin zu einer Th1-Immunantwort (ZIßLER and CHAKER, 2016). Dabei wird er maßgeblich von den Zytokinen IL-4 und IFN- $\gamma$  beeinflusst. Er kann als „Gegenspieler“ zum Transkriptionsfaktor GATA-3 betrachtet werden, da dieser durch die genannten Zytokin ebenfalls beeinflusst wird und bei Aktivierung eine Th2-dominierte Immunantwort induzieren kann (ZIßLER and CHAKER, 2016). Neben der früher beschriebenen alleinigen Wirkung auf Th1-Lymphozyten beschreiben neuere

Studie außerdem, dass T-bet eine wichtige Rolle bei zahlreichen Zellen, sowohl des erworbenen, als auch des angeborenen Immunsystems spielt (LAZAREVIC et al., 2013).

Zwar konnte keine der drei Therapieformen zwischen US1 und US2 bzw. in Hinblick auf US3 signifikante Veränderung der T-bet-Expression erzielen, jedoch kann man in der Tendenz bei der Kortisontherapie eher einen Anstieg von T-bet und bei den beiden CpG-Gruppen eine Reduktion erkennen.

Möglicherweise muss man die Ergebnisse für T-bet im Kontext mit den Resultaten des Th2-Zytokins IL-4 sehen. Hier konnten alle drei Therapieformen direkt nach der Behandlung eine signifikante Senkung der IL-4-Konzentration erzielen, analog zu den Resultaten einer Studie von GIGUERE, bei der eine inhalative Fluticason-Therapie ebenfalls eine Reduktion des allergie-vermittelnden Th2-Zytokins bewirken konnte (GIGUERE et al., 2002).

Die geringe Veränderung der Expression des Transkriptionsfaktors könnte, wie von VALE-PEREIRA et al. (2011) bei langandauerndem humanem Asthma beschrieben, auch damit zusammenhängen, dass auch bei Pferden, die schon über einen langen Zeitraum an RAO leiden (wie in der vorliegenden Studie), ein Defizit an T-bet auftritt.

### **6.1.9. GATA-3 (Th2)**

Bei humanem Asthma konnte bei einem Th2-dominierten Phänotyp eine entscheidende Rolle für den Transkriptionsfaktor GATA-3 festgestellt werden (KRUG et al., 2015). Daher wird GATA-3 bei Menschen auch bereits als Zielprotein in der Asthma-Therapie untersucht (KRUG et al., 2015). In einer Studie von COUETIL et al. (2006) konnte jedoch kein Unterschied in der GATA-3-Aktivität zwischen gesunden und RAO-Pferden erhoben werden.

Auch wenn die p-Werte nicht signifikant verändert waren, betrachtet man die Effektgrößen, konnte bei der CpGsd-Therapie zwischen US1 und US2 ein großer klinischer Effekt auf die GATA-3-Expression berechnet werden. Mittlere Effekte wurden hinsichtlich des Langzeiteffekts sowohl bei der CpGsd, als auch bei der CpGdd bestimmt. In der Tendenz kann also bei beiden CpG-Gruppen eine Reduktion von GATA-3, sowohl kurz-, als auch langfristig erkannt werden. Da GATA-3 ein wichtiger Einflussfaktor dafür ist, dass sich naive T-Zellen zu Th2-

Zellen differenzieren (VALE-PEREIRA et al., 2011), spricht die Reduktion von GATA-3 somit auch dafür, dass die CpG-Therapie möglicherweise eine Verminderung der Th2-dominierten Immunantwort erzielt (CORDEAU et al., 2004). Dafür könnte ebenfalls eine Senkung der IL-4 Werte sprechen (GIGUERE et al., 2002).

Eine nur geringe Veränderung in der GATA-3 Expression könnte wiederum auch im Zusammenhang mit dem hohen Alter der Studienteilnehmer stehen und der damit einhergehenden „Immunoseneszenz“, also einer altersbedingten Reduktion der Funktionalität des Immunsystems, die insbesondere in der Lungen nachgewiesen wurde (VALE-PEREIRA et al., 2011, HANSEN et al., 2015).

#### **6.1.10. IL-8**

Die mRNA-Expression des Zytokins IL-8, das als Entzündungsmediator dient und vor allem bei der chemotaktischen Rekrutierung von Neutrophilen eine Rolle spielt (GIGUERE et al., 2002), war bei allen drei Therapiegruppen sowohl direkt nach der letzten Inhalationsbehandlung, als auch hinsichtlich des Langzeiteffekts nicht signifikant verändert. Aber man kann bei allen drei Gruppen die Tendenz erkennen, dass die Expression von IL-8 durch die Behandlungen und auch darüber hinaus bei der Langzeitevaluierung reduziert wurde.

Bei Kortikosteroiden geht man davon aus, dass ein Teil ihrer Wirkung darauf beruht, dass sie hemmend auf die Expression u.a. von IL-8 einwirken (LUNN and HOROHOV, 2010). Diese Beobachtung konnte auch in der eigenen Studie gemacht werden.

Doch nicht nur die Kortisontherapie, sondern auch die CpG-Behandlungen bewirkten eine, zwar nicht signifikante, aber in der Tendenz klar erkennbare Reduktion der IL-8-mRNA-Expression in den CD4<sup>+</sup>-Zellen. In einer Studie von GIGUERE et al. (2002) konnte eine positive Korrelation zwischen der IL-8-Konzentration und dem Anteil an Neutrophilen festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in unserer Studie gemacht werden, da neben der tendenziellen Verminderung der IL-8-Expression, bei allen drei Therapieformen, ebenfalls signifikante Reduktionen der Neutrophilen erzielt wurden. Damit konnte eines der bedeutendsten Ziele in der Therapie der RAO, eine antiinflammatorische Wirkung, erreicht werden.

In verschiedenen Studien wurden bei RAO-Pferden höhere IL-8 Konzentrationen gemessen, als bei gesunden Kontrollpferden (GIGUERE et al., 2002, FRANCHINI et al., 2000). Da man davon ausgehen kann, dass eine starke Korrelation zwischen dem Zytokin IL-8 und der neutrophilen Entzündung besteht, können die Effekte, die die CpGsd und die CpGdd hinsichtlich des Langzeiteffekts bewirken konnten, als klinisch äußerst relevant betrachtet werden.

## **7. Zusammenfassung der Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick**

### **7.1. Zusammenfassung der Bedeutung der klinischen Ergebnisse**

In der zusammenfassenden Auswertung aller klinischen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die CpGsd direkt im Anschluss an die letzte Inhalation bei 90% der Parameter eine signifikante Verbesserung bewirkte. Bei der CpGdd-Therapie konnte in dem Zeitraum bei 81% der Parameter eine signifikante, positive Auswirkung festgestellt werden. Die Kortisonbehandlung mit Beclometason zeigte zwischen US1 und US2 bei 72% der klinischen Parameter eine signifikante Verbesserung.

Bei der Langzeitevaluierung konnte die CpGsd bei 12 von 13 Parametern (92%) einen Effekt erzielen, der als klinisch hoch relevant eingestuft werden konnte. Die CpGdd bewirkte in diesem Zeitraum bei 69% der Parameter einen großen klinischen Effekt, wohingegen bei der Kortisontherapie nur bei 31% der Parameter ein großer klinischer Effekt festgestellt wurde. Dies verdeutlicht in der Summe, wie effektiv die CpG-Therapie auf fast alle klinischen Parameter wirkte und auch im Vergleich zur bisher empfohlenen Standardtherapie mit einem inhalativen Kortikosteroid (NIEDERMAIER and GEHLEN, 2009) in der Gesamtheit deutlich bessere Ergebnisse erzielen konnte.

Durch die Reduktion der Symptomlast mithilfe der CpG-Therapie sind die Pferde möglicherweise auch wieder leistungsfähiger. RAO-Pferde könnten sogar wieder vermehrt trainiert und reiterlich genutzt werden, was vor der Therapie aufgrund der Einschränkungen durch die Erkrankung häufig nicht mehr möglich war. Eindrucksvoll konnte auch unter Beweis gestellt werden, dass die Inhalation mit

CpG-GNP vor allem hinsichtlich der anhaltenden Wirkung einen klaren Vorteil gegenüber der Kortisontherapie besitzt. Durch eine länger anhaltende Wirkung können die Intervalle, in denen die Pferde nicht behandelt werden müssen, verlängert werden, was zusätzlich einen geringeren Zeit- und Kostenaufwand bedeutet.

Die Erhöhung der CpG-Dosis auf die doppelte Menge (375µg CpG/Inhalation) kann, zusammenfassend, keine besseren Ergebnisse bewirken, als die bereits etablierte einfache Dosis von 187,5µg CpG pro Inhalation. Es zeigte sich, dass eine Steigerung der Dosis nicht zwangsläufig eine Verbesserung der Wirkung erreichen kann. In der aktuellen Studie konnten im direkten Vergleich zwischen den beiden CpG-Dosierungen zwar nie signifikante Unterschiede gemessen werden, jedoch kann im Gesamtüberblick über alle klinischen Ergebnisse festgestellt werden, dass die CpGsd bei einem breiteren Spektrum an klinischen Parametern eine signifikantere Verbesserung erzielt werden konnte, als die CpGdd.

### **7.2. Zusammenfassung der Bedeutung der immunologischen Ergebnisse**

Die Interpretation der Zytokin-Ergebnisse kann herausfordernd sein, da die Werte individuell zwischen verschiedenen Pferden sehr stark schwanken können (HANSEN et al., 2015, HOROHOV et al., 2005) Z.B. bei der IL-10-Konzentration gab es Pferde, die einen Ausgangswert von 33pg/ml aufwiesen, während ein anderes Pferd mit einem Basiswert von 694pg/ml startete. Es ist der relativ geringen Anzahl an Patienten geschuldet, dass sich solche extremen Schwankungen auch stark auf das Gesamtergebnis auswirken können und einzelne Ausreißer daher stark ins Gewicht fallen. Deshalb weisen die Resultate der Zytokin-Bestimmungen zum Teil gewisse Tendenzen auf, jedoch konnte der Effekt der Therapie nicht immer mit einem statistisch signifikanten Ergebnis belegt werden.

### **7.3. Ausblick**

Für zukünftige Studienprojekte wäre es ein großer Vorteil, wenn die zu untersuchenden Fragestellungen an größeren Patientengruppen durchgeführt werden könnten. Dadurch könnten die bereits in den vorliegenden Studien erzielten Ergebnisse (KLIER, 2011, KLIER et al., 2015b, KLIER et al., 2015a), ggfs. stärker untermauert werden, da bei einer größeren Stichprobenzahl, einzelne Ausreißer weniger stark ins Gewicht fallen. Eine kleinere Stichprobenzahl führt dazu, dass

eine Abschwächung in der Deutlichkeit der gewonnenen Resultate in Kauf genommen werden muss.

Ein weiterer interessanter Aspekt der CpG-Behandlung wäre, dass man anstatt eines zeitlich begrenzten Behandlungszeitraums, den Effekt einer Boosterung in Zukunft noch weiter untersucht. Dieser Ansatz basiert auf der Theorie, dass wiederholte Stimulationen des Immunsystems mit CpGs, die Aktivierung von Gedächtniszellen zu einem verstärkten Effekt führen könnten (BOHLE, 2002, LUNN and HOROHOV, 2010).

Es wurde beschrieben, dass bei Pferden die an RAO leiden, häufig eine genetische multiple Hypersensitivität (MHS) vorliegt (KEHRLI et al., 2015). Das bedeutet, dass bei diesen Patienten ein erhöhtes Risiko besteht, dass neben der Atemwegserkrankung weitere allergiebedingte Krankheiten, wie Sommerekzem (IBH = Insect Bite Hypersensitivity) oder Urtikaria auftreten können (CUNNINGHAM and DUNKEL, 2008). Da es sich sowohl bei RAO, als auch beim Sommerekzem um Erkrankungen allergischer Genese handelt, wäre es deshalb äußerst interessant, den Einsatz von CpGs auf die Behandlung von Pferden mit Insect Bite Hypersensitivity auszudehnen oder speziell die Wirkung bei Pferden zu untersuchen, die sowohl an RAO, als auch an IBH leiden. Auf diesem Gebiet liegt daher eine weitere Einsatzmöglichkeit von CpGs. Rein subjektiv wurde im Laufe der CpG-Behandlungen in der eigenen Studie, eine Verbesserung des „Gesamteindrucks“ (u.a. auch ein schöneres Fell) wahrgenommen. Diesen subjektiven Eindruck gilt es zu verifizieren und dabei könnten auch alternative Verabreichungsformen, z.B. in Form von CpG-Injektionen o.ä. in Erwägung gezogen werden (CUNNINGHAM and DUNKEL, 2008).

In der Humanmedizin wird aktuell der Nutzen der Bestimmung der Eosinophilenzahl im Blut, als Biomarker für die Asthma-Diagnose bzw. als Anzeichen für ein entzündliches Geschehen bei COPD diskutiert (BUHL et al., 2016, WEDZICHA, 2016). Bei COPD-Patienten mit >2% Eosinophilen konnte bei einer Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden eine bessere Exazerbationskontrolle erreicht werden (WEDZICHA, 2016). Möglicherweise könnte die Kontrolle der Blut-Eosinophilen auch beim Pferd als Marker für die Therapiekontrolle dienen und damit eine weniger invasive Alternative zur Diagnostik mittels BAL darstellen.

Der Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora und die Tendenz Allergien zu entwickeln, wird in der Humanmedizin aktuell stark untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass Darmbakterien das Gleichgewicht des Immunsystems beeinflussen können. Eine erhöhte Diversität an Mikroben im Darm sowie ein vermehrter Kontakt zu Pathogenen in der Kindheit („Hygienehypothese“) korrelierte in einigen Studien mit einem reduzierten Risiko, allergie-assoziierte Krankheiten zu entwickeln (OHNMACHT and FEDOSEEVA, 2016, KLINE, 2007a). Vor allem die ersten Monate nach der Geburt scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, da in diesem Zeitraum die mikrobielle Ansiedlung im Darm stattfindet. Bei Untersuchungen in der Humanmedizin konnte bei Kindern, die in den ersten Lebensmonaten eine Antibiotika-Therapie erhielten ein erhöhtes Risiko festgestellt werden, Allergien zu entwickeln (OHNMACHT and FEDOSEEVA, 2016). Interessant wäre hierzu auch eine Untersuchung bei Pferden, ob hier ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der juvenilen Darmflora und der Ausprägung allergischer Erkrankung, wie RAO besteht. Auch im Darm scheinen Tregs eine wichtige Rolle zu spielen, da sie für die Erkennung bzw. Toleranz gegenüber potenziellen Allergenen verantwortlich sind (OHNMACHT and FEDOSEEVA, 2016).

Da Tregs in der Entwicklung sowie der Kontrolle allergisch bedingter Erkrankungen wie RAO eine Schlüsselrolle zugesprochen wird, sollte in zukünftigen Studien eines der Ziele sein, den direkten Nachweis von Tregs (z.B. mittels FACS) zu erreichen.

Humanes Asthma und die equine RAO weisen zahlreicher Parallelen auf, u.a. hinsichtlich der Pathogenese und dem Ansprechen auf eine Therapie (LECLERE et al., 2011b). Daher wäre es wünschenswert, dass die Möglichkeit der inhalativen Therapie mit CpGs zukünftig auch bei Asthma-Patienten weiterführend untersucht wird.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Recurrent airway obstruction (RAO) ist eine chronische Erkrankung der unteren Atemwege bei Pferden mit multifaktorieller Genese. Da es sich um eine sehr weit verbreitete Erkrankung in der Pferde-Population handelt, besteht ein großes Interesse daran, neben den bisher gängigen Therapeutika, die vor allem die Symptome bekämpfen, neue Behandlungsoptionen zu finden.

Eine Therapieoption, die die Erkrankung auf immunologischer Ebene modulieren kann, bietet die Inhalation von unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN, kurz CPG). Das sind kurze DNA-Stränge, die aufgrund der Frequenz der Motive und dem Methylierungsgrad Ähnlichkeit mit der DNA von Bakterien bzw. Viren besitzen und somit vom Körper als fremd erkannt werden. Diese CpG könnten das Immunsystem weg von einer, bei Allergien dominierenden Th2-, hin zu einer spezifischen Th1-geprägten Immunantwort lenken. Um die Aufnahme der CpGs in die Zellen verbessern zu können und vor einem vorzeitigen Abbau der DNA durch Nukleasen zu schützen, werden als Trägersystem Gelatinenanopartikel (GNP) verwendet.

In der aktuellen doppelt-verblindeten Studie wurden RAO-Pferde, mittels geschichteter Zufallverteilung randomisiert, in drei unterschiedliche Behandlungsgruppen unterteilt. Dabei erhielt eine Gruppe eine einfache CpG-Dosis (CpGsd) von 187,5µg CpG/Inhalation, die zweite Gruppe die doppelte Dosis (CpGdd) mit 375µg CpG/Inhalation und die dritte Gruppe zum Vergleich eine etablierte Therapie mit Beclometason, einem inhalativen Kortikosteroid. Alle Pferde erhielten insgesamt 10 Inhalationen.

Ziel der Studie war es den Behandlungserfolg durch die inhalative CpG-Therapie unter Beweis zu stellen sowie den Dosis-Wirkungs-Effekt und die Leistungsfähigkeit der CpG-Therapie im direkten Vergleich mit einer bewährten antiinflammatorischen Inhalationstherapie mit Beclometason zu evaluieren.

In der verblindeten klinischen Feldstudie wurden insgesamt 29 RAO-Pferde in ihren Heimatställen behandelt. Bewertet wurde der Therapieeinfluss auf die klinischen Parameter Ruheatemfrequenz, Atemtyp, Nasenausfluss, Auskultation, Sauerstoffpartialdruck, Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz, Interpleuraldruck, Mukusmenge- bzw. -viskosität in der Trachea, Neutrophile in der BAL

(Bronchoalveoläre Lavage), klinisches Scoring und HOARSI (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index). Dafür wurden alle Pferde drei Mal untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte vor dem Start der Behandlung (US1), die zweite am Tage nach der letzten Behandlung (US2). Die dritte Untersuchung (US3) erfolgte acht Wochen nach der letzten Inhalation, um den Langzeiteffekt beurteilen zu können.

Direkt nach der Behandlung bei US2 konnten sowohl die CpGsd Gruppe, die bei 90% der klinischen Parameter eine signifikante Verbesserung erzielen konnte als auch die CpGdd Gruppe, die bei 81% der gemessenen Werte signifikante Verbesserungen bewirken konnte, einen Vorteil gegenüber der Kortisontherapie (72%) aufweisen. Noch eindeutiger fielen die Ergebnisse, die bezüglich der Langzeitevaluierung erhoben wurden, aus. Hier ist mit der positiven signifikanten Beeinflussung von 100% der klinischen Parameter bei der CpGsd und 67% bei der CpGdd, im Vergleich zu 54% bei der Kortisontherapie, ein klarer Vorteil in der therapeutischen Wirksamkeit aufseiten der CpG-Behandlung zu erkennen. Als wichtiger Indikator für die antiinflammatorische Wirkung ist die langfristige signifikante Reduktion der Neutrophilen in der BAL durch die beiden CpG-Gruppen hervorzuheben, wohingegen bei der Beclometason-Inhalation hier keine signifikante Reduktion festgestellt werden konnte. Von besonderer Relevanz ist außerdem die Einschätzung der Pferdebesitzer bezüglich der klinischen Symptomatik mittels standardisiertem HOARSI-Fragebogen. Hier bewerteten die Besitzer beider CpG-Dosis-Gruppen den Zustand ihrer Pferde, 8 Wochen nach der Behandlung als signifikant besser als vor der Therapie, während die Einstufung der Verbesserung nach der Beclometason-Therapie nicht signifikant ausfiel. Da sich das gesamte klinische Bild für die Besitzer merklich verbesserte, konnte somit eines der wichtigsten Ziele der Behandlung erreicht werden.

Die Erhöhung der CpG-Dosis auf die doppelte Menge konnte, auf die Gesamtzahl der klinischen Parameter gesehen, keine besseren Ergebnisse bewirken, als die ursprüngliche einfache Dosis. Die CpGsd konnte sogar bei einem breiteren Spektrum an klinischen Parametern eine signifikante Verbesserung erzielen als die CpGdd. Diese Ergebnisse sprechen daher also dafür, dass die einfache Dosierung (187,5µg CpG/Inhalation) zur Behandlung der RAO ausreicht. Hinsichtlich der Therapieverträglichkeit konnten keinerlei negative Auswirkungen auf die Patienten

beobachtet werden.

Auf immunologischer Ebene konnte nach der Behandlung mit CpGs signifikante Reduktionen des Th2-Zytokins IL-4 sowie des Th17-Zytokins IL-17 festgestellt werden. Beide Zytokine spielen eine Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Auch wenn die Ergebnisse der mRNA-Auswertungen statistisch nicht signifikant waren, deutete auch hier eine Vielzahl der Ergebnisse auf eine tendenziell antiinflammatorische Wirkung durch die CpG-Therapie hin. Hier konnte u.a. die Tendenz einer Absenkung der IL-8- sowie der GATA-3-mRNA-Expression verzeichnet werden, was sowohl auf einen antiinflammatorischen, als auch einen immunmodulatorischen Effekt, weg von einer Th2-dominierten Immunantwort, hindeutet.

In zukünftigen Studien wäre eine Untersuchung an einer größeren Patientengruppe wünschenswert, um ein noch besseres Verständnis der immunologischen Verhältnisse in den unterschiedlichen Erkrankungsphasen (Remission oder Exazerbation) bei RAO erreichen zu können und damit die Aussagekraft hinsichtlich der therapeutischen Veränderungen noch weiter stärken zu können. Außerdem könnte eine größere Patientenzahl individuelle Schwankungen, v.a. der Zytokinerggebnisse besser ausgleichen. Ein direkter Nachweis regulatorischer T-Zellen zur Evaluation des Therapieeinflusses auf die Tregs wäre in weiterführenden Studien wünschenswert. Da den Tregs in der Pathogenese des humanen Asthmas bereits eine wichtige Rolle zugesprochen wird, sollte deren Bedeutung in der RAO-Erkrankung genauer auf den Grund gegangen werden.

Da humanes Asthma und die equine RAO hinsichtlich zahlreicher Aspekte, u.a. in der Pathogenese und dem Ansprechen auf Therapie, Parallelen aufweisen, wäre es wünschenswert, dass die Möglichkeit der inhalativen Therapie mit CpGs in zukünftigen Studien über die Behandlung von RAO hinaus, auch bei Asthma-Patienten in großangelegten Studien weiterführend untersucht wird.



## VII. SUMMARY

### **An inhalative immunotherapy in RAO-affected horses: dose-response study and comparison to beclomethasone inhalation.**

Recurrent airway obstruction (RAO) is a chronic disease of the lower respiratory tract in horses with multifactorial aetiology. As RAO is a widespread disease in the horse population, there is a great interest in finding new treatment options in addition to the established therapies, which mainly aim at controlling the symptoms of the disease instead of treating the causes.

A therapy option that can modulate immunodeficiency is the inhalation of unmethylated cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN or CPG for short). These are short DNA strands which resemble the DNA of bacteria or viruses due to the frequency of the motifs and the degree of methylation and are thus recognized as foreign by the body. These CpG could redirect the immune response from an allergic dominant Th2- to a specific Th1-imprinted immune response. In order to improve the uptake of the CpGs into the cells and to protect them from premature degradation of the DNA by nucleases, gelatin nanoparticles (GNP) are used as the carrier system.

In the current double-blinded study, RAO horses were divided into three different treatment groups by a stratified random distribution. The first group was treated with a simple CpG dose (CpGsd) of 187.5 µg CpG/inhalation, the second group with the double dose (CpGdd) of 375 µg CpG/inhalation, and the third group with an established beclometason therapy which is an inhalative corticosteroid. All horses received a total of 10 inhalations.

The aim of the study was to demonstrate the efficacy of CpG therapy by inhalation, to evaluate the dose-response effect and the efficacy of CpG therapy in direct comparison with a proven anti-inflammatory inhalative therapy with beclometasone.

In this blinded field study, a total of 29 RAO horses were treated in their home stables. The therapeutic effect was measured using the clinical parameters of respiratory rate, breathing type, nasal discharge, auscultation, arterial oxygen

pressure, arterioalveolar oxygen difference, interpleural pressure, tracheal mucus, neutrophils in BAL (bronchoalveolar lavage), clinical scoring and HOARSI (Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index). For this, all horses were examined three times. The first examination was performed before the start of the treatment (US1), the second on the day after the last treatment (US2). The third examination (US3) took place eight weeks after the last inhalation in order to assess the long-term effect.

Directly after treatment (US2), the CpGsd group, which achieved a significant improvement in 90% of the clinical parameters, as well as the CpGdd group, which led to significant improvements in 81% of the measured values, had an advantage over cortisone therapy which only showed significant improvement in 72% of the parameters. The results obtained regarding the long-term evaluation are even clearer. Here, treatment led to a significant positive change of the clinical parameters in 100% and 65% of the CpGsd and the CpGdd group, respectively which contrasted to positive changes in only 54% of the parameters in the cortisone group. Accordingly, treatment with CpG shows a clear advantage over therapy with cortisone. As an important indicator for the anti-inflammatory effect, the long-term reduction of the neutrophils in the BAL by the two CpG groups was significant, whilst the beclometason inhalation did not show a significant long-term reduction of neutrophils. Of particular relevance is also the assessment of the horse owners regarding the clinical symptoms by a standardized HOARSI questionnaire. Here, the owners of both CpG dose groups rated their horses' condition, 8 weeks after treatment, as significantly better than before treatment, while improvement after beclomethasone therapy was not significant. As the overall clinical picture improved significantly for the owners, one of the main goals of the treatment was achieved.

Based on the total numbers of clinical parameters affected in a positive manner, increasing the CpG dose to twice the amount did not produce better results than the original single dose. The CpGsd treatment was able to achieve a significant improvement in an even wider range of clinical parameters than the CpGdd. These results therefore suggest that the simple dosage (187.5 µg CpG / inhalation) is sufficient to treat RAO. No adverse effects on the patients could be observed regarding the therapy tolerability.

On the immunological level, significant reductions of Th2 cytokines IL-4 and IL-17 were found after treatment with CpGs. Although the results of the mRNA analyzes were not statistically significant, a large number of the results indicated a tendency towards anti-inflammatory effects during CpG therapy. Here, the tendency to lower IL-8 as well as GATA-3 mRNA expressions was recorded, indicating both an anti-inflammatory and an immunomodulatory effect away from a Th2-dominated immune response.

In future studies, an examination of a larger group of patients would be desirable in order to achieve an even better understanding of the immunological conditions in the different phases of RAO (remission or exacerbation) and thus to further strengthen the significance of the therapeutic changes. Moreover, a larger number of patients could reduce individual fluctuations on the total cytokine results. A direct detection of regulatory T cells for the evaluation of the therapeutic effect on the Tregs would be desirable in further studies. Since Tregs already play an important role in the pathogenesis of human asthma, its importance in the RAO disease should be more precisely evaluated.

As human asthma and equine RAO are closely related regarding pathogenesis and response to therapy, it would be desirable that the possibility of inhaled therapy with CpGs would be further investigated in future large-scale studies on the treatment of RAO horses as well as asthma patients.



## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AINSWORTH, D. M. & CHEETHAM, J. 2010. Disorders of the Respiratory System. In: REED, S. M., BAYLY, W. M. & SELLON, D. S. (eds.) *Equine Internal Medicine*. 3 ed.

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

AINSWORTH, D. M., MATYCHAK, M., REYNER, C. L., ERB, H. N. & YOUNG, J. C. 2009. Effects of in vitro exposure to hay dust on the gene expression of chemokines and cell-surface receptors in primary bronchial epithelial cell cultures established from horses with chronic recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 70, 365-72.

AINSWORTH, D. M., WAGNER, B., FRANCHINI, M., GRUNIG, G., ERB, H. N. & TAN, J. Y. 2006. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 67, 669-77.

ALUVIHARE, V. R., KALLIKOURDIS, M. & BETZ, A. G. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 5, 266-71.

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, 152-7.

ASKENASY, N., KAMINITZ, A. & YARKONI, S. 2008. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev*, 7, 370-5.

BABEL, W. 1996. Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer. *Chemie in unserer Zeit*, 30, 86-95.

BARNES, K. C., GRANT, A. V. & GAO, P. 2005. A review of the genetic epidemiology of resistance to parasitic disease and atopic asthma: common variants for common phenotypes? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5, 379-85.

BEADLE, R. E., HOROHOV, D. W. & GAUNT, S. D. 2002. Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses. *Equine Vet J*, 34, 389-94.

BEHRENS, N. E. & GERSHWIN, L. J. 2015. Immune modulation of T regulatory cells and IgE responses in horses vaccinated with West Nile virus vaccine combined with a CpG ODN. *Vaccine*, 33, 5764-71.

BOHLE, B. 2002. CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*, 129, 198-203.

BOSSHARD, S. & GERBER, V. 2014. Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med*, 28, 618-23.

BOURQUIN, C., ANZ, D., ZWIOREK, K., LANZ, A. L., FUCHS, S., WEIGEL, S., WURZENBERGER, C., VON DER BORCH, P., GOLIC, M., MODER, S., WINTER, G., COESTER, C. & ENDRES, S. 2008. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol*, 181, 2990-8.

BRACHER, V., VON FELLEBERG, R., WINDER, C. N., GRUENIG, G., HERMANN, M. & KRAEHEMANN, A. 1991. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Vet J*, 23, 136-41.

- BRAMAN, S. S. 2006. The global burden of asthma. *Chest*, 130, 4s-12s.
- BRAUN-FAHRLANDER, C. & LAUENER, R. 2003. Farming and protective agents against allergy and asthma. *Clin Exp Allergy*, 33, 409-11.
- BRAZIL, T. J., DAGLEISH, M. P., MCGORUM, B. C., DIXON, P. M., HASLETT, C. & CHILVERS, E. R. 2005. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy*, 35, 854-65.
- BREUER, D. & BECKER, M. 1983. [Acetylcysteine (Fluimucil) in the treatment of COPD of the horse]. *Tierarztl Prax*, 11, 209-12.
- BROOKS, D., WILSON, L. & KELSEY, C. 1993. Accuracy and reliability of 'specialized' physical therapists in auscultating tape-recorded lung sounds. *Physiother Can*, 45, 21-4.
- BUHL, R., KORN, S., MENZIES-GOW, A., AUBIER, M., CHAPMAN, K. R., CANONICA, G. W., PICADO, C., MARTIN, N., ESCOBAR, R. A., KOROM, S. & HANANIA, N. A. 2016. Assessing biomarkers in a real-world severe asthma study (ARIETTA). *Respir Med*, 115, 7-12.
- CERASOLI, F., JR. 2006. Developing the ideal inhaled corticosteroid. *Chest*, 130, 54s-64s.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- COESTER, C. J., LANGER, K., VAN BRIESEN, H. & KREUTER, J. 2000. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul*, 17, 187-93.

COHEN, N. D., BOURQUIN, J. R., BORDIN, A. I., KUSKIE, K. R., BRAKE, C. N., WEAVER, K. B., LIU, M., FELIPPE, M. J. & KOGUT, M. H. 2014. Intramuscular administration of a synthetic CpG-oligodeoxynucleotide modulates functional responses of neutrophils of neonatal foals. *PLoS One*, 9, e109865.

CORDEAU, M. E., JOUBERT, P., DEWACHI, O., HAMID, Q. & LAVOIE, J. P. 2004. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol*, 97, 87-96.

COSTA, L. R., JOHNSON, J. R., BAUR, M. E. & BEADLE, R. E. 2006. Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *Am J Vet Res*, 67, 1635-42.

COUËTIL, H. A., HODGSON J, BUECHNER-MAXWELL V, VIEL L, WOOD JL, LAVOIE JP. 2007. Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med*.

COUËTIL, L. 2009. Multimodal Management of the Horse with Airway Disease. In: ROBINSON, N. E. & SPRAYBERRY, K. A. (eds.) *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*. 2015 ed.: Saunders Elsevier.

COUËTIL, L. L., ART, T., DE MOFFARTS, B., BECKER, M., MELOTTE, D., JASPAR, F., BUREAU, F. & LEKEUX, P. 2006. DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, 113, 11-20.

COUËTIL, L. L., CARDWELL, J. M., GERBER, V., LAVOIE, J. P., LEGUILLETTE, R. & RICHARD, E. A. 2016. Inflammatory Airway Disease of Horses-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*.

COUËTIL, L. L., CHILCOAT, C. D., DENICOLA, D. B., CLARK, S. P., GLICKMAN, N. W. & GLICKMAN, L. T. 2005. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and

environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 66, 1665-74.

COUETIL, L. L., HOFFMAN, A. M., HODGSON, J., BUECHNER-MAXWELL, V., VIEL, L., WOOD, J. L. & LAVOIE, J. P. 2007. Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med*, 21, 356-61.

COUETIL, L. L., ROSENTHAL, F. S., DENICOLA, D. B. & CHILCOAT, C. D. 2001. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am J Vet Res*, 62, 538-46.

CUNNINGHAM, F. M. & DUNKEL, B. 2008. Equine recurrent airway obstruction and insect bite hypersensitivity: understanding the diseases and uncovering possible new therapeutic approaches. *Vet J*, 177, 334-44.

DAUVILLIER, J., FELIPPE, M. J., LUNN, D. P., LAVOIE-LAMOUREUX, A., LECLÈRE, 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, 549-57.

DAVIS, E. & RUSH, B. R. 2002. Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 18, 453-67, vi.

DEBRUE, M., HAMILTON, E., JOUBERT, P., LAJOIE-KADOCH, S. & LAVOIE, J. P. 2005. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 105, 25-31.

DEEGEN, E. & KLEIN, H.-J. 1987. Interpleuraldruckmessungen und Bronchospasmolysetests mit einem transportablen Ösophagusdruckmeßgerät beim Pferd. *Pferdeheilkunde*, 3, 213-221.

DESJARDINS, I., THEORET, C., JOUBERT, P., WAGNER, B. & LAVOIE, J. P. 2004. Comparison of TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Vet Immunol Immunopathol*, 101, 133-41.

DIXON, P. M., RAILTON, D. I. & MCGORUM, B. C. 1995. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine Vet J*, 27, 422-7.

DRISCOLL, N., BAIA, P., FISCHER, A. T., BRAUER, T. & KLOHNEN, A. 2008. Large colon resection and anastomosis in horses: 52 cases (1996-2006). *Equine Vet J*, 40, 342-7.

EL ABBAS, S., FRELLSTEDT, L., ART, T., PIROTTIN, D., TOSI, I., M.C., D., P., L., BUREAU, F. & DESMET, C. 2012. Characterization of T-helper lymphocytes in peripheral blood and broncho-alveolar lavage of healthy horses and in horses with recurrent airway obstruction. *Proceedings of the 2nd Scientific Meeting of the Faculty of Veterinary Medicine*. Liege, Belgium.

FARROKHI, S., ABBASIRAD, N., MOVAHED, A., KHAZAEI, H. A., PISHJOO, M. & REZAEI, N. 2017. TLR9-based immunotherapy for the treatment of allergic diseases. *Immunotherapy*, 9, 339-346.

FEY, B., VERTER, W., DIETZ, O., HUSKAMP, B., SCHEIDERMANN, W. & THEIN, P. 2005. Krankheiten der Atmungsorgane. In: DIETZ, O. & HUSKAMP, B. (eds.) *Handbuch Pferdepraxis*. Enke Verlag.

FEY, K. & OHNESORGE, B. 2006. Alles Routine oder doch Herausforderung? Diagnostik und Therapie chronischer Atemwegserkrankungen. *Vortragsheft, Fortbildungsveranstaltung 2009, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH*.

FLAMINIO, M. J., BORGES, A. S., NYDAM, D. V., HOROHOV, D. W., HECKER, R. & MATYCHAK, M. B. 2007. The effect of CpG-ODN on antigen

presenting cells of the foal. *J Immune Based Ther Vaccines*, 5, 1.

FLEMING, K. 2008. *Analyse und Bewertung physikalisch-chemischer und stofflicher Parameter auf die Freisetzung von biogenen Gasen und luftgetragenen Partikeln aus Substraten bei der Haltung von Warmblutpferden in eingestreuten Einzelboxe*. Georg-August-Universität Göttingen

FONSECA, D. E. & KLINE, J. N. 2009. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 256-62.

FRANCHINI, M., GILL, U., VON FELLEBERG, R. & BRACHER, V. D. 2000. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res*, 61, 1369-74.

FUCHS, S., KLIER, J., MAY, A., WINTER, G., COESTER, C. & GEHLEN, H. 2012. Towards an inhalative in vivo application of immunomodulating gelatin nanoparticles in horse-related preformulation studies. *J Microencapsul*, 29, 615-25.

GASTHUYS, F. M. R. & DE MOOR, A. 2005. Anästhesiologie. In: DIETZ, O. & HUSKAMP, B. (eds.) *Handbuch Pferdepraxis*. Enke Verlag.

GEH, K. J., HUBERT, M. & WINTER, G. 2016. Optimisation of one-step desolvation and scale-up of gelatine nanoparticle production. *J Microencapsul*, 1-10.

GERBER, V., BALERI, D., KLUKOWSKA-ROTZLER, J., SWINBURNE, J. E. & DOLF, G. 2009. Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med*, 23, 626-30.

GERBER, V., KING, M., SCHNEIDER, D. A. & ROBINSON, N. E. 2000. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses

with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, 32, 411-7.

GERBER, V., ROBINSON, N. E., VENTA, R. J., RAWSON, J., JEFCOAT, A. M. & HOTCHKISS, J. A. 2003. Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, 35, 252-7.

GERBER, V., SCHOTT II, H. C. & ROBINSON, N. E. 2011. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J*, 43, 153-8.

GERBER, V., STRAUB, R., MARTI, E., HAUPTMAN, J., HERHOLZ, C., KING, M., IMHOF, A., TAHON, L. & ROBINSON, N. E. 2004. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J*, 36, 576-82.

GERBER, V., SWINBURNE, J. E., BLOTT, S. C., NUSSBAUMER, P., RAMSEYER, A., KLUKOWSKA-ROTZLER, J., DOLF, G., MARTI, E., BURGER, D. & LEEB, T. 2008. [Genetics of recurrent airway obstruction (RAO)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 115, 271-5.

GERBER, V., TESSIER, C. & MARTI, E. 2014. Genetics of upper and lower airway diseases in the horse. *Equine Vet J*.

GIGUERE, S., VIEL, L., LEE, E., MACKAY, R. J., HERNANDEZ, J. & FRANCHINI, M. 2002. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol*, 85, 147-58.

GLITZ, F. & DEEGEN, E. 2002. Allgemeine Untersuchung. In: WISSDORF, H., GERHARDS, H., HUSKAMP, B. & DEEGEN, E. (eds.) *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferde*. Hannover: Schaper.

GRABNER, A. & FEY, K. 2005. Spezielle Untersuchungen beim Pferd. In:

GRABNER, A., KRAFT, W. & DÜRR, U. (eds.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer.

HAAS, T., METZGER, J., SCHMITZ, F., HEIT, A., MULLER, T., LATZ, E. & WAGNER, H. 2008. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28, 315-23.

HAMZA, E., STEINBACH, F. & MARTI, E. 2012. CD4+CD25+ T cells expressing FoxP3 in Icelandic horses affected with insect bite hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol*, 148, 139-44.

HANSEN, S., BAPTISTE, K. E., FJELDBORG, J., BETANCOURT, A. & HOROHOV, D. W. 2014. A comparison of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in equine bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol*, 158, 238-43.

HANSEN, S., BAPTISTE, K. E., FJELDBORG, J. & HOROHOV, D. W. 2015. A review of the equine age-related changes in the immune system: comparisons between human and equine aging, with focus on lung-specific immune-aging. *Ageing Res Rev*, 20, 11-23.

HARE, J. E., VIEL, L., O'BYRNE, P. M. & CONLON, P. D. 1994. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Ther*, 17, 237-44.

HASLAM, P. L. & BAUGHMAN, R. P. 1999. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J*, 14, 245-8.

HAWRYLOWICZ, C. M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *JEM*.

HAWRYLOWICZ, C. M. & O'GARRA, A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 5, 271-83.

HENRIKSON, S. L. & RUSH, B. R. 2001. Efficacy of salmeterol xinafoate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc*, 218, 1961-5.

HENRÍQUEZ, C., PEREZ, B., MORALES, N., SARMIENTO, J., CARRASCO, C., MORÁN, G. & FOLCH, H. 2014. Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, 158, 128-34.

HERHOLZ, C., STRAUB, R., GERBER, V., WAMPFLER, B., LUTHI, S., IMHOF, A., MOENS, Y. & BUSATO, A. 2002. Relationship between clinical signs and pulmonary function estimated by the single breath diagram for CO<sub>2</sub> (SBD-CO<sub>2</sub>) in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet J*, 163, 187-95.

HOFFMAN, A. M. 1997. Inhaled medications and bronchodilator usage in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 13, 519-30.

HOROHOV, D. W. 2000. Equine T-cell cytokines. Protection and pathology. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 16, 1-14.

HOROHOV, D. W., BEADLE, R. E., MOUCH, S. & POURCIAU, S. S. 2005. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, 108, 237-45.

HOROHOV, D. W., MILLS, W. R. & GLUCK, M. 2009. Specific and innate immunity in the lung as it relates to equine RAO. . *4th world equine airways symposium (WEAS)*. Bern: Pabst Science Publishers, 106-108.

HOTCHKISS, J. W., REID, S. W. & CHRISTLEY, R. 2006. Construction and validation of a risk-screening questionnaire for the investigation of recurrent airway obstruction in epidemiological studies of horse populations in Great Britain. *Prev Vet Med*, 75, 8-21.

HOTCHKISS, J. W., REID, S. W. & 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.

HUANG, H., LAVOIE-LAMOUREUX, A., MORAN, K. & LAVOIE, J. P. 2007. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292, L1147-54.

IHMELS, S. 2012. *Vergleichende Untersuchungen der Vitalparameter bei verschiedenen Pferderassen*. Dissertation, LMU

JAMES, R., MOORE & COLYER, M. J. S. The effect of steam treatment on the total viable count, mould and yeast numbers in hay using the Haygain steamer. European Workshop for Equine Nutrition,

Sept 2010. The Impact of nutrition on the health and welfare of horses., 2010 Cirencester. 128-132.

KAISER, J. 2015. IMMUNOLOGY. How farm life prevents asthma. *Science*, 349, 1034.

KAUR, N., TOWNSEND, H., LOHMANN, K., MARQUES, F. & SINGH, B. 2013. Analyses of lipid rafts, Toll-like receptors 2 and 4, and cytokines in foals vaccinated with Virulence Associated Protein A/CpG oligonucleotide vaccine against *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 156, 182-9.

KEHRLI, D., JANDOVA, V., FEY, K., JAHN, P. & GERBER, V. 2015. Multiple

hypersensitivities including recurrent airway obstruction, insect bite hypersensitivity, and urticaria in 2 warmblood horse populations. *J Vet Intern Med*, 29, 320-6.

KELLER, H., FAULSTICH, M., ELKER, M., GRELL, M., WUSCHKO, S. & REHDERS, J. 2001. Klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von N-Acetylcystein bei der Behandlung der COB/COPD des Pferdes. *Praktischer Tierarzt*, 82, 108-117.

KIRSCHVINK, N., DI SILVESTRO, F., SBAI, I., VANDENPUT, S., ART, T., ROBERTS, C. & LEKEUX, P. 2002. The use of cardboard bedding material as part of an environmental control regime for heaves-affected horses: in vitro assessment of airborne dust and aeroallergen concentration and in vivo effects on lung function. *Vet J*, 163, 319-25.

KLEIBER, C., MCGORUM, B. C., HOROHOV, D. W., PIRIE, R. S., ZURBRIGGEN, A. & STRAUB, R. 2005. Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, 104, 91-7.

KLIER, J. 2011. *Neuer Therapieansatz zur Behandlung der COB des Pferdes durch Immunstimulation von BAL-Zellen mit verschiedenen CpG-Klassen* LMU München.

KLIER, J., FUCHS, S., MAY, A., SCHILLINGER, U., PLANK, C., WINTER, G., COESTER, C. & GEHLEN, H. 2012. A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. *Pharm Res*, 29, 1650-7.

KLIER, J., GEIS, S., STEUER, J., REESE, S., FUCHS, S., MUELLER, R. S., WINTER, G. & GEHLEN, H. 2015a. Clinical Research Abstracts of the British Equine Veterinary Association Congress 2015. *Equine Vet J*, 47 Suppl 48, 26.

KLIER, J., LEHMANN, B., FUCHS, S., REESE, S., HIRSCHMANN, A., COESTER, C., WINTER, G. & GEHLEN, H. 2015b. Nanoparticulate CpG immunotherapy in RAO-affected horses: phase I and IIa study. *J Vet Intern Med*, 29, 286-93.

KLIER, J., MAY, A., FUCHS, S., SCHILLINGER, U., PLANK, C., WINTER, G., GEHLEN, H. & COESTER, C. 2011. Immunostimulation of bronchoalveolar lavage cells from recurrent airway obstruction-affected horses by different CpG-classes bound to gelatin nanoparticles. *Vet Immunol Immunopathol*, 144, 79-87.

KLINE, J. N. 2007a. Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc Am Thorac Soc*, 4, 283-8.

KLINE, J. N. 2007b. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol Res*, 39, 279-86.

KLINE, J. N. & KRIEG, A. M. 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect*, 21, 434-9.

KLINE, J. N., WALDSCHMIDT, T. J., BUSINGA, T. R., LEMISH, J. E., WEINSTOCK, J. V., THORNE, P. S. & KRIEG, A. M. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*, 160, 2555-9.

KLINMAN, D. M. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 4, 249-58.

KNUEFERMANN, P., BAUMGARTEN, G., KOCH, A., SCHWEDERSKI, M., VELTEN, M., EHRENTAUT, H., MERSMANN, J., MEYER, R., HOEFT, A., ZACHAROWSKI, K. & GROHE, C. 2007. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir Res*, 8, 72.

KOCH, C., STRAUB, R., RAMSEYER, A., WIDMER, A., ROBINSON, N. E. & GERBER, V. 2007. Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance for the evaluation of lower airway health in horses. *Equine Vet J*, 39, 107-12.

KORN, A., MILLER, D., DONG, L., BUCKLES, E. L., WAGNER, B. & AINSWORTH, D. M. 2015. Differential Gene Expression Profiles and Selected Cytokine Protein Analysis of Mediastinal Lymph Nodes of Horses with Chronic Recurrent Airway Obstruction (RAO) Support an Interleukin-17 Immune Response. *PLoS One*, 10, e0142622.

KRIEG, A. M. 2002. From A to Z on CpG. *Trends Immunol*, 23, 64-5.

KRIEG, A. M., YI, A. K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T. J., BISHOP, G. A., TEASDALE, R., KORETZKY, G. A. & KLINMAN, D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374, 546-9.

KRUG, N., HOHLFELD, J. M., KIRSTEN, A. M., KORNMANN, O., BEEH, K. M., KAPPELER, D., KORN, S., IGNATENKO, S., TIMMER, W., ROGON, C., ZEITVOGEL, J., ZHANG, N., BILLE, J., HOMBURG, U., TUROWSKA, A., BACHERT, C., WERFEL, T., BUHL, R., RENZ, J., GARN, H. & RENZ, H. 2015. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *N Engl J Med*, 372, 1987-95.

KURT, E., DEMIR, A. U., CADIRCI, O., YILDIRIM, H. & PINAR ESER, T. 2011. Immediate-type drug hypersensitivity and associated factors in a general population. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 39, 27-31.

LATZ, E., SCHOENEMEYER, A., VISINTIN, A., FITZGERALD, K. A., MONKS, B. G., KNETTER, C. F., LIEN, E., NILSEN, N. J., ESPEVIK, T. & GOLENBOCK, D. T. 2004a. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5, 190-8.

- LATZ, E., VISINTIN, A., ESPEVIK, T. & GOLENBOCK, D. T. 2004b. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res*, 10, 406-12.
- LAUMEN, E., DOHERR, M. G. & GERBER, V. 2010. Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families. *Equine Vet J*, 42, 142-8.
- LAVOIE-LAMOUREUX, A., LECLERE, M., LEMOS, K., WAGNER, B. & LAVOIE, J. P. 2012. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med*, 26, 1419-26.
- LAVOIE-LAMOUREUX, A., MORAN, K., BEAUCHAMP, G., MAUEL, S., STEINBACH, F., LEFEBVRE-LAVOIE, J., MARTIN, J. G. & LAVOIE, J. P. 2010. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299, L472-82.
- 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, 1410-3.
- LAZAREVIC, V., GLIMCHER, L. H. & LORD, G. M. 2013. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 777-89.
- LECLERE, M., LAVOIE-LAMOUREUX, A., GÉLINAS-LYMBURNER, É., DAVID, F., MARTIN, J. G. & LAVOIE, J.-P. 2011a. Effect of Antigenic Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45, 181-187.
- LECLERE, M., LAVOIE-LAMOUREUX, A. & LAVOIE, J. P. 2011b. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, 16, 1027-46.

LÉGUILLETTE, R. & LAVOIE, J. P. 2006. Effects of the bronchoalveolar lavage procedure on lung function in horses with clinical exacerbation of recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 67, 1929-33.

LIU, T., NERREN, J., LIU, M., MARTENS, R. & COHEN, N. 2009. Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vaccine*, 27, 674-83.

LOHMANN, K. L., LOPEZ, A. M., MANNING, S. T., MARQUES, F. J., BROWNLIE, R., ALLEN, A. L., SANGSTER, A. E., MUTWIRI, G., GERDTS, V., POTTER, A. & TOWNSEND, H. G. 2013. Failure of a VapA/CpG oligodeoxynucleotide vaccine to protect foals against experimental *Rhococcus equi* pneumonia despite induction of VapA-specific antibody and interferon- $\gamma$  response. *Can J Vet Res*, 77, 161-9.

LOPEZ, A. M., HECKER, R., MUTWIRI, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L. A. & TOWNSEND, H. G. 2006. Formulation with CpG ODN enhances antibody responses to an equine influenza virus vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 114, 103-10.

LUNN, D. P. & HOROHOV, D. W. 2010. The Equine Immune System. In: REED, S. M., BAYLY, W. M. & SELLON, D. S. (eds.) *Equine Internat Medicine*. Saunders.

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, 457-60.

MATTHEWS, A. G., HACKETT, I. J. & LAWTON, W. A. 1988. The mucolytic effect of Sputolysin in horses with respiratory disease. *Vet Rec*, 122, 106-8.

MAY, A. & GEHLEN, H. 2009. Durchführung, Analyse und Aussagekraft von Tracheobronchialsekret (TBS) Und Bronchoalveolärer Lavage bei Pferden mit

Lungenerkrankungen. *Pferdeheilkunde*, 25, 310-320.

MCGORUM, B. C., ELLISON, J. & CULLEN, R. T. 1998. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J*, 30, 430-4.

MCPHERSON, E. A., LAWSON, G. H., MURPHY, J. R., NICHOLSON, J. M., BREEZE, R. G. & PIRIE, H. M. 1979a. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine Vet J*, 11, 159-66.

MCPHERSON, E. A., LAWSON, G. H., MURPHY, J. R., NICHOLSON, J. M., BREEZE, R. G. & PIRIE, H. M. 1979b. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): factors influencing the occurrence. *Equine Vet J*, 11, 167-71.

MCPHERSON, E. A. & THOMSON, J. R. 1983. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: Nature of the disease. *Equine Vet J*, 15, 203-6.

MILTENYI, S., MULLER, W., WEICHEL, W. & RADBRUCH, A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-8.

MISKOVIC, M., COUETIL, L. L. & THOMPSON, C. A. 2007. Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. *J Vet Intern Med*, 21, 1060-6.

MIYARA, M. & SAKAGUCHI, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, 13, 108-16.

MOORE, B. R., KRAKOWKA, S., CUMMINS, J. M. & ROBERTSON, J. T. 1996. Changes in airway inflammatory cell populations in standardbred racehorses after interferon-alpha administration. *Vet Immunol Immunopathol*, 49, 347-58.

MOSEMAN, E. A., LIANG, X., DAWSON, A. J., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., KRIEG, A. M., LIU, Y. J., BLAZAR, B. R. & CHEN, W. 2004. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*, 173, 4433-42.

MURPHY, J. R., MCPHERSON, E. A. & DIXON, P. M. 1980. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): effects of bronchodilator drugs on normal and affected horses. *Equine Vet J*, 12, 10-4.

MUTWIRI, G. K., NICHANI, A. K., BABIUK, S. & BABIUK, L. A. 2004. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release*, 97, 1-17.

NEUHAUS, S., BRUENDLER, P., FREY, C. F., GOTTSTEIN, B., DOHERR, M. G. & GERBER, V. 2010. Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a high-prevalence family. *J Vet Intern Med*, 24, 407-13.

NIEDERMAIER, G. & GEHLEN, H. 2009. Möglichkeiten der Inhalationstherapie zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde*, 25.

NOGRADI, N., COUETIL, L. L., MESSICK, J., STOCHELSKI, M. A. & BURGESS, J. R. 2015. Omega-3 fatty acid supplementation provides an additional benefit to a low-dust diet in the management of horses with chronic lower airway inflammatory disease. *J Vet Intern Med*, 29, 299-306.

OHNMACHT, C. & FEDOSEEVA, M. 2016. Kann die Darmflora Allergien verhindern? *Deutsches Ärzteblatt - Perspektiven der Pneumologie und Allergologie*, 2, 29-30.

OZDEMIR, C., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2009. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy*, 39, 626-39.

PEREZ, B., HENRIQUEZ, C., SARMIENTO, J., MORALES, N., FOLCH, H., GALESIO, J. S., UBERTI, B. & MORAN, G. 2015. Tamoxifen as a new therapeutic tool for neutrophilic lung inflammation. *Respirology*.

PIRIE, R. S., COLLIE, D. D., DIXON, P. M. & MCGORUM, B. C. 2003. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy*, 33, 676-83.

PONGRATZ, M., GRAUBNER, C. & WEHRLI ESER, M. 2010. Equines Cushing Syndrom – Wirkungen einer Langzeittherapie mit Pergolid. *Pferdeheilkunde* 26, 598-603.

RAMSEYER, A., GAILLARD, C., BURGER, D., STRAUB, R., JOST, U., BOOG, C., MARTI, E. & GERBER, V. 2007. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J Vet Intern Med*, 21, 149-56.

RANKIN, R., PONTAROLLO, R., IOANNOU, X., KRIEG, A. M., HECKER, R., BABIUK, L. A. & VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. 2001. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11, 333-40.

RETTMER, H., HOFFMAN, A. M., LANZ, S., OERTLY, M. & GERBER, V. 2015. Owner-reported coughing and nasal discharge are associated with clinical findings, arterial oxygen tension, mucus score and bronchoprovocation in horses with recurrent airway obstruction in a field setting. *Equine Vet J*, 47, 291-5.

ROBBIN, M. G., WAGNER, B., NORONHA, L. E., ANTCZAK, D. F. & DE MESTRE, A. M. 2011. Subpopulations of equine blood lymphocytes expressing regulatory T cell markers. *Vet Immunol Immunopathol*, 140, 90-101.

ROBINSON, D. S. 2000. Clenbuterol and the horse. *AAEP Proceedings*, 46.

ROBINSON, N. E. 2001. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J*, 33, 5-19.

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, 1247-53.

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, 550-7.

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, 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, 283-306.

ROBINSON, N. E., OLSZEWSKI, M. A., BOEHLER, D., BERNEY, C., HAKALA, J., MATSON, C. & DERKSEN, F. J. 2000. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J*, 32, 393-400.

ROWE, P. 2012. Statistik für Mediziner und Pharmazeuten. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

RUSH, B. & MAIR, T. 2004. *Equine Respiratory Diseases*, Wiley-Blackwell.

RUSH, B. R., HOSKINSON, J. J., DAVIS, E. G., MATSON, C. J. & HAKALA, J.

SCHNEBERGER, D., CALDWELL, S., SURI, S. S. & SINGH, B. 2009. E. 1999. Pulmonary distribution of aerosolized technetium Tc 99m pentetate after administration of a single dose of aerosolized albuterol sulfate in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 60, 764-9.

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, respectively. *Am J Vet Res*, 59, 1039-43.

RUSH, B. R., RAUB, E. S., THOMSEN, M. M., DAVIS, E. G., MATSON, C. J. & HAKALA, J. E. 2000. Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc*, 217, 359-64.

SAKAGUCHI, S., WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P. & YAMAGUCHI, T. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*, 21, 1105-11.

SANCHEZ, A., COUETIL, L. L., WARD, M. P. & CLARK, S. P. 2005. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. *J Vet Intern Med*, 19, 87-92.

SASSE, H. H. L. 1971. *Some Pulmonary function Tests in Horses. An Aid to an Early Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases (Heaves) in Horses.* PhD Thesis, Utrecht, Netherlands.

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, 245-56.

Expression of toll-like receptor 9 in horse lungs. *Anat Rec (Hoboken)*, 292, 1068-77.

SENTI, G., JOHANSEN, P., HAUG, S., BULL, C., GOTTSCHALLER, C., MÜLLER, P., PFISTER, T., MAURER, P., BACHMANN, M. F., GRAF, N. & KÜNDIG, T. M. 2009. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy*, 39, 562-70.

SHAMJI, M. H. & DURHAM, S. R. 2011. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy*, 41, 1235-46.

SOBOLL HUSSEY, G., HUSSEY, S. B., WAGNER, B., HOROHOV, D. W., VAN DE WALLE, G. R., OSTERRIEDER, N., GOEHRING, L. S., RAO, S. & LUNN, D. P. 2011. Evaluation of immune responses following infection of ponies with an EHV-1 ORF1/2 deletion mutant. *Vet Res*, 42, 23.

SOLBERG, O. D., JACKSON, K. A., MILLON, L. V., STOTT, J. L., VANDENPLAS, M. L., MOORE, J. N. & WATSON, J. L. 2004. Genomic characterization of equine interleukin-4 receptor alpha-chain (IL4R). *Vet Immunol Immunopathol*, 97, 187-94.

SOMA, L. R., BEECH, J. & GERBER, N. H., JR. 1987. Effects of cromolyn in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Res Commun*, 11, 339-51.

SWEENEY, C. R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E. L. & LINDBORG, S. 1992. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res*, 53, 1376-9.

TAKEYAMA, K., DABBAGH, K., JEONG SHIM, J., DAO-PICK, T., UEKI, I. F. & NADEL, J. A. 2000. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol*, 164, 1546-52.

TAYLOR, A., VERHAGEN, J., BLASER, K., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117, 433-42.

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, 35-8.

TURGUT, K. & SASSE, H. H. 1989. Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Rec*, 125, 526-30.

UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2006. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev*, 212, 238-55.

VALE-PEREIRA, S., TODO-BOM, A., GERALDES, L., SCHMIDT-WEBER, C., AKDIS, C. A. & MOTA-PINTO, A. 2011. FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma. *Clin Exp Allergy*, 41, 490-6.

VAN DER HAEGEN, A., KUNZLE, F., GERBER, V., WELLE, M., ROBINSON, N. E. & MARTI, E. 2005. Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol*, 108, 325-34.

VAN SCOTT, M. R., JUSTICE, J. P., BRADFIELD, J. F., ENRIGHT, E., SIGOUNAS, A. & SUR, S. 2000. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278, L667-74.

VANDENPUT, S., DUVIVIER, D. H., VOTION, D., ART, T. & LEKEUX, P. 1998. Environmental control to maintain stabled COPD horses in clinical remission: effects on pulmonary function. *Equine Vet J*, 30, 93-6.

VAUGHN, J. M., MCCONVILLE, J. T., BURGESS, D., PETERS, J. I., JOHNSTON, K. P., TALBERT, R. L. & WILLIAMS, R. O., 3RD 2006. Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 63, 95-102.

VCOG, V. C. O. G.-. 2011. Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet Comp Oncol*.

VECELLIO, L., KIPPAX, P., ROUQUETTE, S. & DIOT, P. 2009. Influence of realistic airflow rate on aerosol generation by nebulizers. *Int J Pharm*, 371, 99-105.

VOLLMER, J. & KRIEG, A. M. 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 195-204.

VOSKUIL, J. 2014. Commercial antibodies and their validation. *F1000Res*, 3, 232.

WAGNER, B. & FREER, H. 2009. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, 127, 242-8.

WAGNER, B., HILLEGAS, J. M., BRINKER, D. R., HOROHOV, D. W. & ANTCZAK, D. F. 2008. Characterization of monoclonal antibodies to equine interleukin-10 and detection of T regulatory 1 cells in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, 122, 57-64.

WARREN, T. L., BHATIA, S. K., ACOSTA, A. M., DAHLE, C. E., RATLIFF, T. L., KRIEG, A. M. & WEINER, G. J. 2000. APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells. *J Immunol*, 165, 6244-51.

WÄRTHNER, B. 2013. *Nicht-viraler Gentransfer mittels Magnetofektion bei*

---

*primären Zellen des Equinen Sarkoids*. Dissertation, Freie Universität Berlin.

WEDZICHA, J. A. 2016. Eosinophils as Biomarkers of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation Risk. Maybe Just for Some? *Am J Respir Crit Care Med*, 193, 937-8.

WESTERMANN, C. M., LAAN, T. T., VAN NIEUWSTADT, R. A., BULL, S. & FINK-GREMMELS, J. 2005. Effects of antitussive agents administered before bronchoalveolar lavage in horses. *Am J Vet Res*, 66, 1420-4.

WILLIAMSON, K. K. & DAVIS, M. S. 2007. Evidence-based respiratory medicine in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 23, 215-27.

WILLOUGHBY, R. A. & MCDONELL, W. N. 1979. Pulmonary function testing in horses. *Vet Clin North Am Large Anim Pract*, 1, 171-96.

WILLS-KARP, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*, 17, 255-81.

WOODS, P. S., ROBINSON, N. E., SWANSON, M. C., REED, C. E., BROADSTONE, R. V. & DERKSEN, F. J. 1993. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J*, 25, 208-13.

ZIBLER, U. & CHAKER, A. 2016. Eine immunologische Schnittstelle. *Deutsches Ärzteblatt - Perspektiven der Pneumologie und Allergologie*, 2, 31-32.

ZWIOREK, K., BOURQUIN, C., BATTIANY, J., WINTER, G., ENDRES, S., HARTMANN, G. & COESTER, C. 2008. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res*, 25, 551-62.

ZWIOREK, K., KLOECKNER, J., WAGNER, E. & COESTER, C. 2005. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J Pharm Pharm Sci*, 7, 22-8.

## IX. ANHANG

### 1. Untersuchungsprotokolle

#### 1.1. Protokoll Allgemeine Untersuchung/Aufzeichnungsplan

Die Beurteilung des Allgemeinbefindens der Tiere erfolgt nach folgendem Plan:

##### US 1

Gewicht (Maßband), Alter, Rasse:

Haltungsbedingungen:

Anamnese:

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

Blutabnahme (Differentialblutbild)

Arterielle Blutgase

Indirekte Lungendruckmessung

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Lidocain-Hydrochlorid 40ml intratracheal

##### US 1-US 2

Während der Inhalationen erfolgt eine kontinuierliche Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Körpertemperatur

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

##### US 2

Erste Kontrolluntersuchung nach Inhalationen

Allgemein-US

Gewicht (Maßband):

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

## Blutabnahme (Differentialblutbild)

Arterielle Blutgase

Indirekte Lungendruckmessung

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Lidocain-Hydrochlorid 40ml intratracheal

## US 2-US 3

Während der inhalationsfreien Zeit erfolgt eine kontinuierliche Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Körpertemperatur

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

## US 3

Allgemein-US

Gewicht (Maßband):

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

## Blutbild

Arterielle Blutgase

Indirekte Lungendruckmessung

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Lidocain-Hydrochlorid 40ml intratracheal

## 1.2. Protokoll Spezielle Lungenuntersuchung

<b>Auskultation/ Atemgeräusche</b>	<b>inspiratorisch:</b> ggr. verschärft <input type="checkbox"/> verschärft <input type="checkbox"/> Sonstiges: _____
	<b>expiratorisch:</b> ggr. verschärft <input type="checkbox"/> verschärft <input type="checkbox"/> Sonstiges: _____
<b>Lungenfeld</b>	physiologisch <input type="checkbox"/> vergrössert <input type="checkbox"/> rechts _____ fingerbreit links _____ fingerbreit
<b>Endoskopie</b>	<b>Trachelalsekret:</b> Farbe, Konsistenz, Menge
	<b>Sekretmenge:</b> kein Sekret <input type="checkbox"/> ggr. <input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr. <input type="checkbox"/>
	<b>Sekretkonsistenz:</b> flüssig <input type="checkbox"/> viskös <input type="checkbox"/> zäh <input type="checkbox"/>
<b>Bifurcatio tracheae</b>	messerrückenscharf <input type="checkbox"/> ggr. verdickt <input type="checkbox"/> mgr. verdickt <input type="checkbox"/> hgr. verdickt <input type="checkbox"/>
<b>Arterielle Blutgase</b>	<b>Datum, Uhrzeit:</b>
<b>Barometerdruck zum Entnahmezeitpunkt</b>	_____ hPa
<b>1 hPa = 0,750062 mmHg =&gt;</b>	_____ hPa * 0,750062 mmHg = _____ mmHg
<b>pO<sub>2</sub></b>	100 +/- 5 mmHg _____ 90 +/- 5 mmHg _____

	80 +/- 5 mmHg _____
pCO <sub>2</sub>	40 +/- 5 mmHg _____ 50 +/- 5 mmHg _____
Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz	< 10 mmHg _____ 10 - 15 mmHg _____ 15 - 25 mmHg _____ >25 mmHg _____
Ventigraphische Untersuchung	
Interpleurale Druckdifferenz	2,0 – 4,0 cm H <sub>2</sub> O (gesund) 4,1 – 6,0 cm H <sub>2</sub> O 6,1 – 15 cm H <sub>2</sub> O >15,1 cm H <sub>2</sub> O

### 1.3. Protokolle zytologische Untersuchungen

#### a) BAL Zytologie:

BAL Flüssigkeitsmenge	
Gesamtzellzahl	
<b>Zytologie</b>	
Neutrophile Granulozyten	
Lymphozyten	
Makrophagen	
Eosinophile Granulozyten	
Auffälligkeiten	

**b) Tracheobronchialsekret:**

Farbe, Konsistenz und Menge	
<b>Zytologische Untersuchung:</b>	
Neutrophile Granulozyten - Geringr. (<30%) - Mittelgr. (30-50%) - Hochgr. (>50%)	
Schaumige Makrophagen (reaktive Entzündungszellen) - Keine - Wenige - Viele	
Mehrkernige Riesenzellen - Keine - Wenige - Viele	
Charcot-Leyden Kristalle - Keine - Wenige - Viele	
Creola-Körperchen (entnahmebedingt)	
Eosinophile Granulozyten (allergische Bronchitis, Lungenwürmer)	
Bakterien - Intrazellulär - extrazellulär	
Epithelzellen	
Curschmannspiralen	
Hyphen und Konidien	
Mastzellen	

#### 1.4. Abbruchkriterien/Protokoll zur Kontrolle der Verträglichkeit

Zur Kontrolle der Verträglichkeit wurde das folgende Protokoll nach der „*Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0*“ modifiziert nach WÄRTHNER angewandt (2013).

**Reaktionen ab der Stufe 1 wurden als Unverträglichkeit gewertet und führten zum Abbruch des Versuchs.**

##### a) Allergische /immunologische Reaktionen

	1	2	3	4	5
<b>Allergie/ Hypersensitivität</b>	Urtikaria, vorübergehend	Hautausschlag, Urtikaria, Dyspnoe	Systemischer Blutdruckabfall +/- Urticaria, parenterale Medikation notwendig, Ödembildg.	Anaphylaxie mit notwendiger parenteraler Medikation	Tod
<b>Autoimmunreaktion</b>	Asymptomatische, serologische oder andere Hinweise auf Autoimmunreaktion, normale Organfunktion ohne Indikation f. Behandlung	Nachweis einer Autoimmunreaktion die ein nicht-essentielles Organ oder eine nicht-essentielle Funktion betrifft (Bsp. Hypothyreose)	Reversible Reaktion mit Beeinträchtigung eines essentiellen Organs oder andere Nebenwirkungen	Lebensbedrohliche Autoimmunreaktionen	Tod

<b>Vasculitis (nicht bei peri- vaskuläre Injektion)</b>	Mild, keine Indikation f. Behandlung	Sympto- matische Therapie mit nicht- steroidalen Medika- menten	Behandlung mit steroidalen Medika- menten indiziert	Ischämisch e Reaktionen, Amputation oder chir. Débride- ment indiziert	Tod
<b>Andere</b>	Mild	moderat	erheblich	lebensbedro- hlich	Tod

b) **Inhalation**

	1	2	3	4	5
<b>Rötung</b>	Lokal begrenzt	Generali- siert im Bereich der Atemwege			
<b>Blutung</b>	Lokal begrenzt	Generali- siert im Bereich der Atemwege	-	-	-
<b>Follikuläre Hyper- plasie</b>	Ggr. Ver- mehrung	Mgr. Ver- mehrung	Hgr. Ver- mehrung	-	-
<b>Hyper- sekretion</b>	Mgr. vermehrte Sekretion	Hgr. vermehrte Sekretion	-	-	-
<b>Hustenreiz</b>	Stark auftretender Hustenreiz	Atemnot	-	-	-

## c) Dermatologie

	1	2	3	4	5
<b>Hämatome (ohne Vorhanden sein von Thrombo- zytopenie)</b>	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert	-	-	-
<b>Alopezie</b>	Ggr. Ausdünnung des Haarkleids (Injektions- stelle)	Ggr. generalisierte Ausdünnung des Haarkleids	Generalisierter Haarverlust	-	-
<b>Erythem</b>	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert, aber erst bei genauer Unter- suchung sichtbar	Generalisiert,  leicht sichtbar bei Unter- suchung	-	-
<b>Hyperpig- mentation</b>	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert	-	-	-
<b>Hypopig- mentation</b>	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert	-	-	-

<b>Reaktionen an der Injektionstelle</b>	Schmerz/ Juckreiz/ Erythem	Schmerz oder Schwellung mit Entzündung oder Phlebitis	Ulzeration oder Nekrose, die chirurgische Intervention erfordert	Ulzeration/ Nekrose, die chirurgische Intervention erfordert und die täglichen Lebens- funktionen einschränkt	-
<b>Photo-sensitivität</b>	Schmerz- loses Erythem	Schmerz- haftes Erythem	Erythem mit Schuppen- bildung	Lebens- bedrohlich	Tod
<b>Juckreiz</b>	Mild oder lokalisiert	Intensiv oder großflächig auftretend	Intensiv, großflächig auftretend mit Ein- schränkung der tägl. Lebens- funktionen	-	-

<b>Ausschlag: Schuppen- bildung</b>	Papeln/ Pusteln oder Erythem ohne weiter Symptome	Papeln/ Pusteln oder Erythem mit Juckreiz oder weiteren Sympto- men, lokalisierte Schuppen- bildung oder weitere Läsionen, < 50% der Körperoberf läche betreffend	Erhebliche, generalisierte Haut- rötungen oder Papeln/ Pusteln oder vesikuläre Veränderun- gen; Schuppenbil- dung, > 50% der Körper- oberfläche betreffend	Generalisierte exfoliative, ulzerative oder bullöse Dermatitis	Tod
<b>Ausschlag: Akne</b>	Keine Behandlung angezeigt	Behandlung angezeigt	Begleitet von Schmerz, Ulzeration oder Schuppen- bildung		

<b>Ausschlag: Erythema multiforme</b>	-	Stellenweise, nicht generalisierte Erhöhungen	Erheblich, generalisierter Ausschlag o. schmerzhafte Stomatitis, i.v. Substitution, Zusatzfütterung angezeigt	Lebensbedrohlich	Tod
<b>Urtikaria</b>	-	Vorübergehend	Behandlung für < 24 h angezeigt	Behandlung für > 24 h angezeigt	-
<b>Hautablösung</b>	Dezente Hautablösung, nur bei genauer Untersuchung bemerkbar	Hautablösung leicht bemerkbar, aber keine klumpige Exfoliation ggr. Krustenbildung	Hautablösung leicht bemerkbar, mit Exfoliation bei der Untersuchung	-	-
<b>Weitere</b>	mild	moderat	erheblich	Lebensbedrohlich	Tod

## d) Konstitutionelle Auswirkungen

	1	2	3	4	5
<b>Lethargie</b>	Milde Lethargie	Gering ausgeprägte Lethargie mit leichter Einschränkung der täglichen Aktivitäten	Ausübung der täglichen Aktivitäten ernsthaft eingeschränkt	Hilfe zur Ausübung der täglichen Aktivitäten nötig, Zwangsfütterung	Tod
<b>Fieber (wenn keine Neutropenie; physiol. beim Pferd: 37,0-38,0 °C)</b>	Erhöhung der Normaltemperatur < 5 °C	Erhöhung der Normaltemperatur > 5-8 °C	Erhöhung der Normaltemperatur > 8-10 °C	Erhöhung der Normaltemperatur >10 °C	Tod
<b>Hypothermie</b>	-	36,0-33 °C	33-30 °C	< 30 °C oder lebensbedrohliche Konsequenzen	Tod
<b>Gewichtsverlust</b>	5-10% des Ausgangsgewichts, keine Intervention angezeigt	10-20% des Ausgangsgewichts, Zusatzfütterung angezeigt	>20 % des Ausgangsgewichtes	-	Tod

<b>Andere</b>	Mild	Moderat	Erheblich	Lebens- bedrohlich	Tod
---------------	------	---------	-----------	-----------------------	-----

**e) Auswirkungen auf Muskeln / Weichteilgewebe**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Arthritis (nicht- septisch)</b>	Ggr. Schmerz mit Entzündung oder Gelenk- schwellung, ohne Funktions- beein- trächtigung	Moderate Schmerzen, mit Entzündung oder Gelenk- schwellung, mit funktions- Beeinträch- tigung, aber ohne Beeinträch- tigung der tägl. Lebens- funktionen	Erhebliche Schmerzen mit Entzündung oder Gelenk- schwellung, Beeinträch- tigung der tägl. Lebens- funktionen	Lebens- bedrohliche Einschrän- kungen	-
<b>Extremi- täten (Lahmheit)</b>	Lahmheit nur dem erfahrenen Beobachter auffallend	Bewegungs- einschrän- kung d. Gliedmaße, kann sich aber über weitere Strecken fortbewegen	Erhebliche Lahmheit (4/5)	Lahmheit (5/5)	-

<b>Muskelschwäche (generalisiert - lokalisiert)</b>	Asymptomatisch, Schwäche bei klin. US auffallend	Symptomatische Muskelschwäche, ohne Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Symptomatische Muskelschwäche, Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Lebensbedrohliche Einschränkungen	Tod
<b>Myositis</b>	Ggr. Schmerz, ohne Funktionsbeeinträchtigung	Funktionsbeeinträchtigende Schmerzen, keine Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Schmerzen mit Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen		Tod
<b>Weichteilnekrose</b>	-	Lokale Wundbehandlung, medizin. Intervention angezeigt	Operatives Débridement oder weitere invasive Intervention indiziert	Lebensbedrohlich, notfallmäßige, invasive Intervention indiziert	Tod
<b>Weitere</b>	Mild	Moderat	Erheblich	Lebensbedrohlich	Tod

## 1.5. HOARSI

### Standardisierter Fragebogen -Horse Owner Assessed Signs Index (HOARSI)

Erscheinungsbild	Beurteilung	Auswahl	Punkte
Husten	kein Husten		0
	gelegentlich		1
	regelmäßig		3
	ständig		5
Muköser Nasenausfluss	fehlend		0
	vorhanden		1
Atmung in Ruhe	normal		0
	angestrengt		3
Atmung bei Belastung	normal		0
	angestrengt		2
Atemberuhigung	normal		0
	langsam		1
	sehr langsam		2
Leistung	sehr gut		0
	gut		0
	ausreichend		1
	schlecht		2
Motivation	sehr gut		0
	gut		0
	ausreichend		0
	schlecht		1

<b>Einteilung der Pferde in HOARSI Gruppen:</b>	
<b>HOARSI 1</b>	<p><b>keine Anzeichen einer chronischen Atemwegserkrankung</b> (0-2 Punkte)</p> <p>⇒ Kriterien : Husten, Nasenausfluss, angestrengte Atmung bei Belastung und angestrengte Atmung in Ruhe = 0</p> <p>⇒ insgesamt HOARSI 1 maximal 2 Punkte (Leistungsbeurteilung von den Besitzern = ausreichend und die Motivation = schlecht)</p>
<b>HOARSI 2</b>	<p><b>geringgradige respiratorische Symptomatik</b> (max. 3 Punkte)</p> <p>⇒ Nasenausfluss (mukös) vorhanden</p> <p>⇒ und/oder gelegentlicher Husten (IAD)</p>
<b>HOARSI 3</b>	<p><b>mittelgradige respiratorische Symptomatik</b> (4-7 Punkte)</p> <p>⇒ regelmäßig (1 x täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten</p> <p>⇒ keine Leistungsminderung</p> <p>⇒ und/oder angestrengte Atmung länger als zwei Monate bestehend (chronisch lungenerkrankte Pferde =&gt; RAO)</p>
<b>HOARSI 4</b>	<p><b>hochgradige respiratorische Symptomatik</b> (8-16 Punkte):</p> <p>⇒ regelmäßig (einmal täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten mit Hustenanfällen</p> <p>⇒ Leistungsminderung</p> <p>⇒ und/oder angestrengte Atmung für länger als acht Wochen (chronisch lungenerkrankte Pferde =&gt; RAO)</p>

Punktevergabe am Beispiel Husten:	<p>0 = kein Husten</p> <p>1 = gelegentlich Husten</p> <p>3 = regelmäßig (einmal täglich) Husten</p> <p>5 = ständig (mehrmals täglich) Husten mit Hustenanfällen</p>
--------------------------------------	---

## 2. Materialliste

### 2.1. Verwendete Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 65:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Accu-jet Pipettierhilfe	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Aeroneb® Go Micropump Nebulizer	INSPIRATION Medical GmbH, Bochum, Deutschland
BAL 300 Bronchoalveolar-Spülkatheter, 300 cm lang	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn, Deutschland
Blutgasgerät Irma TRUpoint	Keller Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland
EBA 20 Kleinzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Equine Haler™	Equine Healthcare ApS, Hoersholm, Dänemark
FACS-Gerät: MACSQuant® VYB,	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Färbemaschine (Slide Stainer)	Bayer, Hematek, Diagnostic Europe Limited, Dublin
Megafuge 2.0R, Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Olympus CLV-U40, Evis CV-230 Endoskopieturm	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus Evis CF Typ 230 L Videoendoskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
TBS Absaug-/Spülkatheter 230	Wieser GmbH, Egenhofen, Deutschland

cm/2,3mm	
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ventigraph	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland
Zytozentrifuge, Rotofix 32A	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 66:** Verwendete Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Alvegesic 10mg/ml (Wirkstoff: Butorphanol)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Cepesedan 10mg/ml (Wirkstoff: Detomidinhydrochlorid)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
CpGs (einzelsträngige ODNs der A-Klasse vom Typ 2216 CpG-ODN)	Biomers GmbH, Ulm, Deutschland
Equiner CD4-Antikörper (Mouse Anti Horse CD4: RPE, Monoclonal Antibody, Clone: CVS4, Isotype: IgG1)	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland
MACS-Antikörper (anti-mouse IgG1 MicroBeads)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Buffer (MACS BSA Stock Solution und autoMACS rinsing solution)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Quadro MACS™ Separator	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
RNAlater	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sanasthmax 400µg/ml Suspension (Wirkstoff: Beclometason)	Chiesi GmbH, Hamburg, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

**Tabelle 67:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Tubes	Thermo Fisher Scientific, Roskilde Site, Dänemark
Nunc cryo Tube vials	Thermo Fisher Scientific, Roskilde Site, Dänemark
Objekträger 50 Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
Sandwich-ELISA (IL-4)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Septoderm Haut	Dr. Schuhmacher GmbH, Melsungen, Deutschland
S-Monovette®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

### 3. Ergebnis-Tabellen

#### 3.1. Patientendaten

**Tabelle 68:** Zusammenfassung der teilnehmenden Patienten nach Gewicht, Größe, Rasse, Geschlecht, Alter und Haltungsbedingungen.

<b>Nr.</b>	<b>Gewicht</b> [kg]	<b>Größe</b> [cm]	<b>Rasse</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b> [Jahre]	<b>Haltung</b>
<b>1</b>	300	130	1	1	21	1
<b>2</b>	320	134	1	2	17	1
<b>3</b>	700	160	2	2	16	1
<b>4</b>	538	171	3	3	21	3
<b>5</b>	446	148	4	2	24	3
<b>6</b>	408	141	4	2	19	1

7	630	152	5	1	11	3
8	480	152	6	2	14	3
9	480	153	7	2	18	1
10	680	170	6	2	20	1
11	400	132	1	1	21	1
12	340	134	1	1	20	3
13	420	160	8	2	19	3
14	380	136	9	2	16	3
15	540	164	6	1	19	3
16	650	172	6	2	19	1
17	480	142	4	1	26	3
18	700	173	6	2	24	3
19	470	152	10	2	22	1
20	500	154	6	1	15	3
21	380	139	1	2	16	1
22	570	170	6	2	24	1
23	455	153	11	2	22	1
24	530	165	6	1	13	2
25	596	172	6	2	16	3
26	478	152	4	2	7	1
27	490	162	6	1	30	3
28	420	147	11	2	21	1
29	480	142	1	2	22	1

**Geschlecht:***1 = Stute**2 = Wallach**3 = Hengst*

**Rasse:**

1 = Isländer

2 = Tinker

3 = Friesen

4 = Haflinger

5 = Tinker-Friesen-Mix

6 = Warmblut

7 = Apaloosa-Mix

8 = Araber

9 = Dülmener

10 = Pony

11 = Quarter Horse

**Haltung:**

1 = Offenstall

2 = Innenbox

3 = Außenbox



## **X. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, zu diesem hochinteressanten Thema meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Herzlichen Dank auch für ihr entgegengebrachtes Vertrauen, so dass wir die Studie, trotz der räumlichen Distanz, in dieser Form durchführen durften. Vielen Dank für die nette Betreuung und die Endkorrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. John Klier, der mir jeder Zeit bei Fragen mit einem offenen Ohr zur Seite stand. Beginnend mit der Konzeptentwicklung der Studie, über den Tierveruchsantrag, die praktische Durchführung, bis hin zur Korrektur der Arbeit, bin ich ihm für seine hervorragende Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Vielen Dank auch für seine Anregungen, seine große Unterstützung bei der Erhebung der Daten und der Korrektur der Arbeit.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Lutz Göhring für sein konstruktives Feedback bedanken sowie dafür, dass er die praktische Umsetzung der Studie unterstützt und ermöglicht hat.

Für die Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Pferde der LMU München, Abteilung für Innere Medizin und Reproduktionsmedizin, möchte ich mich außerdem bei meinen Kolleginnen und Kollegen bedanken. Hier möchte ich ganz besonders meine Kollegen Sabine Geuder und Alfred Bauschatz erwähnen, ohne deren tatkräftige Unterstützung, die Durchführung der Studie in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Gerhard Winter sowie seinen Mitarbeiterinnen Katharina Geh und Dr. Madlen Hubert (Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics der LMU München) für ihre Unterstützung und die unkomplizierte Kooperation sowohl bei den Vorbereitungen, als auch bei der Durchführung der Studie.

Für die finanzielle Förderung der Arbeit bedanke ich mich bei der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.) (GE'2044/4-1).

Ich möchte mich außerdem für das Sponsoring der Vernebler (AeroNeb® Go™ Mikropump Nebulizer) durch die Firma INSPIRATION Medical GmbH (Bochum, Germany) sowie der Spacer (Equine Haler™®) durch die Firma Equine HealthCare Aps (Hoersholm, Denmark) bedanken.

Bei Dr. Michael Lehmann (Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München) möchte ich mich ausdrücklich für seine Hilfe bei der Durchführung der Vorversuche bedanken.

PD Dr. Sven Reese danke ich für seine große Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Studie.

In großer Dankbarkeit möchte ich mich bei meine Familie, insbesondere, meinen Eltern für die riesige Unterstützung und das große Vertrauen bedanken. Ohne sie wäre die Anfertigung der Dissertation nicht möglich gewesen. Danke für den Rückhalt in jeder Lebenslage.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund, Josef Bartl, von ganzem Herzen danken, ganz besonders für seine moralische Unterstützung und für die Inspiration, die er mir jeden Tag aufs Neue gibt.

## **XI. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

Weyarn, den 05.04.2018

Carolin Zimmermann







9 783863 878894

**mbv**berlin mensch und buch verlag

59,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-889-4