

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

**Spezifische Immuntherapie COB kranker Pferde
mittels inhalativer Verabreichung einer
nanopartikulär gebundenen CpG-ODN Sequenz in
Kombination mit definierten Allergenen**

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

vorgelegt von

Sabine Geis

Tierärztin

aus Tübingen

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3757

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, chronic obstructive pulmonary disease, nucleotides, immunomodulatory properties, nanoparticles, pleura, therapy

Tag der Promotion: 03.06.2015

Förderung: Die Durchführung dieser Dissertation wurde durch die DFG (deutsche
Forschungsgemeinschaft) unterstützt.

Felix qui potuit
rerum cognoscere causas
(*Vergil*)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
I EINLEITUNG.....	1
II LITERATURÜBERSICHT	2
1. CHRONISCH RESPIRATORISCHE ERKRANKUNGEN DES MENSCHEN	2
1.1 <i>Das humane Asthma</i>	2
1.2 <i>Die chronic obstructive pulmonary disease (COPD) des Menschen</i>	3
2. DIE CHRONISCH OBSTRUKTIVE BRONCHI(OLI)TIS (COB) DES PFERDES	3
2.1 <i>Aktuelle Terminologie</i>	3
2.1.1 Definition COPD/RAO/Heaves/COB	3
2.1.2 Definition IAD/SPAOPD	4
2.2 <i>Epidemiologie</i>	6
2.3 <i>Ätiologie</i>	7
2.4 <i>Pathogenese</i>	8
2.4.1 Bronchospasmus.....	9
2.4.2 Hyper- und Dyskrinie.....	9
2.4.3 Schleimhautschwellung.....	10
2.5 <i>Klinisches Bild</i>	10
2.6 <i>Immunologische Hintergründe</i>	11
2.6.1 Th1/Th2-Hypothese	11
2.6.2 Immunologie der COB.....	12
2.6.3 Überempfindlichkeitsreaktionen	13
2.6.3.1 Typ-I Allergie	14
2.6.3.2 Typ-III Allergie	15
2.6.3.3 Typ-IV Allergie.....	15
2.6.4 Immunmodulation.....	16
2.6.4.1 Immunsuppressiva	16
2.6.4.2 Immunstimulatoren.....	17
2.6.4.3 Antigen-spezifische Immunmodulation	17
2.7 <i>Diagnostik</i>	18
2.7.1 Anamnese	18
2.7.2 Allgemeine Untersuchung	19
2.7.3 Untersuchung von Blutproben.....	19
2.7.4 Tracheobronchoskopie mit TBS- und BAL-Analyse.....	19
2.7.5 Röntgenologische Untersuchung des Thorax	20
2.7.6 Lungenfunktionsanalyse	21
2.7.7 Allergiediagnostik	21
2.7.7.1 Diagnostische Provokationstests	21

2.7.7.2	Der funktionelle in vitro Test (FIT)	22
2.7.7.3	Der Cellular Antigen Stimulations Test (CAST).....	23
2.7.7.4	Serologischer Nachweis von IgE.....	23
2.8	<i>Therapieformen</i>	23
2.8.1	Haltungsoptimierung.....	23
2.8.2	Medikamentöse Therapie	24
2.8.2.1	Entzündungshemmende Wirkung	24
2.8.2.2	Bronchospasmolyse	25
2.8.2.3	Expektorantien.....	25
2.8.3	Inhalation von Arzneimitteln	26
3.	CYTOSIN-PHOSPHAT-GUANIN-OLIGODEOXYNUKLEOTIDE (CPG-ODN)	27
3.1	<i>Geschichtliche Entwicklung</i>	27
3.2	<i>Wirkungsmechanismen der CpG-ODN</i>	28
3.2.1	Molekulare Mechanismen	28
3.2.2	Immunologie	30
3.3	<i>Einteilung in Klassen</i>	31
3.4	<i>Therapeutischer Einsatz</i>	32
3.4.1	CpG-ODN als Vakzineadjuvans	32
3.4.2	Vorbeugung und Bekämpfung infektiöser Erkrankungen.....	33
3.4.3	Anti-Tumor-Therapie	34
3.4.4	Kombinierte spezifische Immuntherapie	34
4.	GELATINENANOPARTIKEL	35
4.1	<i>In vitro- und In vivo-Einsatz von GNP</i>	35
4.2	<i>Inhalative Anwendung von GNP</i>	36
III	MATERIAL UND METHODEN	38
1.	STUDIENDESIGN UND ZIELSETZUNG	38
2.	BEWERTUNG MITTELS PUNKTESYSTEM	38
3.	EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN.....	40
4.	BESITZERAUFKLÄRUNG	40
5.	PATIENTENGUT.....	40
6.	ANAMNESE	41
7.	KLINISCHE ERSTUNTERSUCHUNG	41
7.1	<i>Spezielle klinische Untersuchung</i>	41
7.1.1	Untersuchung des Atmungstraktes	41
7.1.1.1	Auskultation des Respirationstraktes	43
7.1.1.2	Lungenperkussion	44
7.1.2	Weiterführende Untersuchungen	44
7.1.2.1	Arterielle Blutgasanalyse	44
7.1.2.2	Venöse Blutuntersuchung	46
7.1.2.3	Indirekte interpleurale Druckmessung.....	46
7.1.2.4	Endoskopie des Respirationstrakts	47

7.1.2.5	Zytologische Untersuchung des Tracheobronchialsekrets	49
8.	THERAPIEAUFBAU	51
8.1	<i>Inhalationslösungen</i>	51
8.2	<i>Inhalationsprotokoll</i>	52
8.3	<i>Überwachung der Studienteilnehmer</i>	54
9.	KLINISCHE FOLGEUNTERSUCHUNGEN	54
10.	DER FUNKTIONELLE IN VITRO TEST (FIT)	54
11.	STATISTISCHE ANALYSEN	56
IV	ERGEBNISSE	57
1.	ALLGEMEINE DATEN ZU DEN PATIENTEN	57
1.1	<i>Patientengut und Gruppeneinteilung</i>	57
1.2	<i>Anamnestische Grunddaten</i>	60
1.2.1	Erkrankungsdauer	60
1.2.2	Jahreszeitlich variierende Symptomstärke	62
1.2.3	Management der Pferde	63
1.2.3.1	Haltungsformen	63
1.2.3.2	Einstreu	65
1.2.3.3	Raufuttergabe	65
2.	ERGEBNISSE DER ERSTUNTERSUCHUNG	66
2.1	<i>Ruheatemfrequenz</i>	66
2.2	<i>Auskultation des Respirationstrakts</i>	67
2.3	<i>Arterielle Blutgasanalyse</i>	67
2.4	<i>Venöse Blutuntersuchung</i>	67
2.5	<i>Indirekte interpleurale Druckmessung</i>	68
2.6	<i>Endoskopische Untersuchung</i>	68
2.7	<i>Zytologische Untersuchung</i>	69
2.8	<i>Gesamtscore</i>	70
3.	ERGEBNISSE DER FOLGEUNTERSUCHUNGEN NACH INHALATIONSTHERAPIE	71
3.1	<i>Ruheatemfrequenz</i>	71
3.2	<i>Auskultation des Respirationstrakts</i>	72
3.3	<i>Arterielle Blutgasanalyse</i>	73
3.4	<i>Venöse Blutuntersuchung</i>	73
3.5	<i>Indirekte interpleurale Druckmessung</i>	73
3.6	<i>Endoskopische Untersuchung</i>	74
3.7	<i>Zytologische Untersuchung</i>	76
3.8	<i>Gesamtscore</i>	77
V	DISKUSSION	79
1.	DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	79
1.1	<i>Diskussion der allgemeinen Patientendaten</i>	79

1.1.1	Patientengut	79
1.1.2	Anamnestiche Grunddaten	80
1.1.2.1	Vorberichtliche Dauer der Erkrankung	80
1.1.2.2	Jahreszeitliches Auftreten der Symptome	80
1.1.2.3	Managementbedingungen	82
1.2	<i>Diskussion der angewandten Methoden</i>	83
1.2.1	Der funktionelle in vitro Test (FIT)	83
1.2.2	Spezifische Immuntherapie (SIT)	84
1.2.3	Inhalationsprotokoll und Verträglichkeit	86
1.2.4	Score-Punktesystem	87
2.	DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	88
2.1	<i>Atemfrequenz in Ruhe</i>	88
2.2	<i>Arterielle Blutgasanalyse</i>	89
2.3	<i>Maximale interpleurale Druckdifferenz und Auskultationsbefunde</i>	90
2.4	<i>Endoskopische Untersuchung</i>	92
2.5	<i>Zytologische Auswertung des TBS</i>	93
3.	DISKUSSION DER INHALATIVEN ANWENDUNG VON CPG-ODN IM VERGLEICH ZU HERKÖMMLICHEN THERAPIEVERFAHREN	95
4.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	97
VI	ZUSAMMENFASSUNG	99
VII	SUMMARY	101
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	103
IX	ANHANG	119
1.	UNTERSUCHUNGSPLÄNE	119
1.1	<i>Signalement- und Anamnesebogen</i>	119
1.2	<i>Allgemeine Untersuchung</i>	120
1.3	<i>Spezielle Untersuchung der Atemwege</i>	124
2.	FRAGEBOGEN ZUR ANAMNESEERHEBUNG	126
3.	BEWERTUNG DER BEFUNDE (SCORINGSYSTEM)	127
4.	GERÄTSCHAFTEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND REAGENZIEN	129
5.	DANKSAGUNG	132
6.	LEBENS LAUF	133
7.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-aDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Cytidin
ca.	cirka
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule (Maß für Druck)
COB	Chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CpG-GNP/ CpG-ODN/GNP	Gelatinenpartikel-gebundene Cytosin-Phosphat-Guanin- Oligodeoxynukleotide
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide
DC	Dendritische Zellen
ΔPpl max	Maximale Interpleuraldruckdifferenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIPH	Exercise-induced pulmonary hemorrhage
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii (und andere)
G	Guanin, Guanosin
ggr.	geringgradig
GINA	Global Initiative for Asthma
GNP	Gelatinenpartikel
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
hgr.	hochgradig
HPW	Highly purified water
IAD	Inflammatory airway disease

Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulatory factor
i. v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg KM	Kilogramm Körpermasse
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
MHC	Major histocompatibility complex
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min.	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Maß für Druck)
n	Anzahl (n-fach)
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor-κB
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
ODN	Oligodeoxynukleotide
p	Signifikanzniveau
p _a CO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
p _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck
p _b	Barometerdruck
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PG	Prostaglandin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

Poly-G	Poly-Guanosin
RAO	Recurrent airway obstruction
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SIT	Spezifische Immuntherapie
sog.	sogenannt
SPAOPD	Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
Th	T-Helfer-Zelle
Th-1	Lymphozyt vom Typ Helfer-1
Th-2	Lymphozyt vom Typ Helfer-2
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	T-regulatorische Zelle

I EINLEITUNG

Heutzutage stellt die zeitweise oder komplette Boxenhaltung mit Heufütterung eine weit verbreitete und übliche Unterbringung von Pferden dar. Auffällig ist, dass in den letzten Jahrzehnten mit Zunahme dieser Haltungsform auch die Zahl der chronischen Atemwegserkrankungen bei Pferden deutlich anstieg. In unseren Breiten gilt die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes als die häufigste, nicht infektiöse Erkrankung des Respirationstrakts. Grundlage der COB stellt eine allergische Überempfindlichkeitsreaktion der Atemwege dar, von welcher mehr als 50% der adulten Pferde betroffen sind. Die genaue Ätiologie der Krankheit ist bis heute nicht vollständig geklärt, jedoch gelten als relevante Auslöser vor allem organische Stäube, Schimmelpilzsporen und bakterielle Endotoxine, wie sie meist in Heu- oder Strohstaub vorkommen. Zwar konnten in den vergangenen Jahren die Diagnostik verbessert und einige neue Erkenntnisse zur Pathogenese erlangt werden, trotzdem beschränkt sich die konventionelle Therapie der COB bis heute auf die alleinige Bekämpfung der Symptome mit Hilfe von Entzündungshemmern, Bronchodilatoren und Schleimlösern.

KLIER und Mitarbeitern war es 2011 gelungen, auf immunologischer Ebene in das Krankheitsgeschehen der COB einzugreifen. Mit der inhalativen Verabreichung von nanopartikulär gebundenen Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) konnte die Entstehung einer allergischen Überempfindlichkeitsreaktion und somit eine bestehende klinische Symptomatik reduziert werden (KLIER et al., 2011).

Ausgewählte, unmethylierte CpG-ODN, welche in der Natur hauptsächlich in prokaryotischer DNA vorkommen, stellen für das Immunsystem der Säuger potentielle Krankheitserreger dar. Somit kann mit der Verabreichung von synthetisch hergestellten, CpG-ODN eine bakterielle oder virale Infektion simuliert und eine spezifische Th1-Immunantwort provoziert werden. Gleichzeitig wird die allergisch bedingte Th2-Antwort des Immunsystems herunterreguliert und der klinischen Ausprägung einer Überempfindlichkeitsreaktion vorgebeugt.

Um die, gegenüber ubiquitären Nukleasen anfälligen CpG-ODN zu schützen, werden Gelatinenanoartikel (GNP) als molekulares Trägersystem eingesetzt. Die Partikel werden mit den DNA-Molekülen beladen und verbessern zudem deren Aufnahme in die Zielzellen des Immunsystems.

Durch die Kombination von CpG-ODN mit spezifischen Allergenen konnten SENTI und Mitarbeiter bereits 2009 vielversprechende Erfolge bei der Behandlung der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas beim Menschen verzeichnen. Der hyposensibilisierende Effekt durch die wiederholte Gabe spezifischer Allergene wird durch die gleichzeitige Verabreichung der CpG-ODN dahingehend unterstützt, dass die, für die allergenspezifische Immuntherapie wichtige Th1-Immunantwort durch die DNA-Sequenzen provoziert wird. Somit kann eine erhebliche und längerfristige Verbesserung der klinischen Symptomatik bei den Probanden erzielt werden.

Ziel dieser Studie war es den therapeutisch wirksamen Effekt von inhalativ verabreichten CpG-ODN, basierend auf den positiven Ergebnissen von KLIER und Mitarbeitern (2011), zu bestätigen. Zudem sollte untersucht werden, ob die Wirkung durch die kombinierte Inhalation von spezifischen Allergenen und CpG-ODN potenziert werden kann. Durch die Dosissteigerung der inhalierten Allergene sollte ein hyposensibilisierender Effekt erzielt werden. Die CpG-ODN sollten diesen Effekt unterstützen und somit zu einer klinischen Besserung der Symptome führen.

II LITERATURÜBERSICHT

1. Chronisch respiratorische Erkrankungen des Menschen

Ebenso wie die COB des Pferdes stellen das Asthma bronchiale und die COPD des Menschen chronische Atemwegserkrankungen dar, welche durch rezidivierende Obstruktionen, Hyperreagibilität und entzündliche Prozesse der unteren Atemwege gekennzeichnet sind (LECLERE et al., 2011). Eine weitere Übereinstimmung der Krankheiten bei Pferd und Mensch besteht im Vorhandensein von krankheitsassoziierten Genvarianten (EWART und ROBINSON, 2007). Trotz der klinischen Vergleichbarkeit der Erkrankungen lassen die jeweilige Art der Entzündung und Unterschiede bei den dabei beteiligten Zellen und Mediatoren auf unterschiedliche pathologische Mechanismen schließen.

1.1 Das humane Asthma

Laut der „Global Initiative for Asthma“ (GINA) stellt das humane Asthma bronchiale eine Atemwegshyperreagibilität auf Grund von chronisch eosinophil-entzündlichen Veränderungen der Atemwege dar, welche auch in anfallsfreien Intervallen vorhanden sind. Bei akuten Fällen besteht zusätzlich eine spontane oder unter Therapie reversible Atemwegsobstruktion. Das klinische Bild ist charakterisiert von wiederkehrenden, variablen Episoden mit Kurzatmigkeit, Brustenge, Husten und giemenden Atemgeräuschen, die meist nachts oder in den frühen Morgenstunden auftreten (GINA, 2012).

Unterteilt wird die Erkrankung nach ihrer grundsätzlichen Genese in das extrinsische, allergische Asthma oder das intrinsische, nichtallergische Asthma (KROEGEL, 2002). In der Kindheit oder der frühen Jugend ist das extrinsische Asthma deutlich häufiger. Hierbei kommt es nach Exposition des Patienten gegenüber Umweltallergenen zu einer IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion vom Typ I (GINA, 2012). Im Gegensatz dazu manifestiert sich das nichtallergische Asthma meist im höheren Alter als Folge eines respiratorischen Infekts (KROEGEL, 2002). Weitere Trigger können Schadgase, kalte und trockene Luft, körperliche Anstrengung oder psychischer Stress darstellen.

Zusätzlich werden weitere Formen, wie das anstrengungs- und analgetikaassoziierte oder das nächtliche (nocturnale) Asthma beschrieben, welche jedoch nicht die Ursache, sondern den Auslöser, bzw. den Zeitraum gehäufte klinischer Beschwerden beschreiben (KROEGEL, 2002).

Aus pathologischer Sicht ist heutzutage eine der Erkrankung zugrundeliegende primär entzündliche Veränderung der Atemwege sicher. Bei dieser komplexen inflammatorischen Reaktion sind über 100 verschiedene Entzündungsmediatoren beteiligt (GINA, 2012). Vorherrschende Zellen sind hierbei eosinophile Granulozyten, Th2-Lymphozyten und aktivierte Mastzellen (GINA, 2012). Durch die Zunahme der CD4⁺-T-Lymphozyten (Th2-Helferzellen) kommt es zur Degranulation von Mastzellen. Spezifische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) werden freigesetzt und steuern die Eosinophilie, ebenso wie die IgE-Produktion (GILLISSEN, 2006).

Letztendlich führt die Überempfindlichkeit auf inhalative Antigene oder auf unspezifische Reize über einen vagalen Reflex oder indirekt über Mediatorenfreisetzung insbesondere aus Mastzellen (Histamin, Prostaglandin D₂, Leukotriene) und eosinophilen Granulozyten (Leukotriene) zu einer Bronchokonstriktion (EMPEY et al., 1976).

Therapeutisch wird heute, auf Grund der primär entzündlichen Genese, initial mit antiinflammatorischen Mitteln und β_2 -Sympathomimetika behandelt, um eine Fibrosierung des subepithelialen Bereichs der Atemwege zu verhindern (KROEGEL, 2002).

1.2 Die chronic obstructive pulmonary disease (COPD) des Menschen

Heutzutage stellt die COPD die vierthäufigste Todesursache beim Menschen weltweit dar (GOLD, 2013). Von der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD) wurde sie als eine persistierende und progressiv verlaufende Einengung der Atemwege beschrieben, die immer mit einer gesteigerten, chronischen Entzündungsreaktion des Respirationstrakts verbunden ist. Ausgelöst wird die inflammatorische Reaktion durch schädliche Partikel oder Gase (Zigarettenrauch, Asbest, Cadmium, Getreidestaub, Staub im Kohle- und Goldbergbau, Schwefeldioxid, Stickoxid, Ozon) in der Atemluft (GILLISSEN und RICHTER, 2002). Mit dieser Definition wird eine Abgrenzung zum Asthma bronchiale deutlich.

Klinisch zeigt sich die Erkrankung in chronisch fortschreitender Dyspnoe, Husten und Schleimproduktion (WIRTZ, 2002). Außerdem kommen für COPD-Patienten ein erheblich erhöhtes Risiko eines Herzinfarktes, Angina pectoris, Osteoporose, respiratorischer Infekte, Frakturen, Depressionen, Diabetes, Schlafstörungen, einer Anämie oder eines Glaukoms hinzu (GOLD, 2013).

Durch die chronische Irritation durch Schadgase kommt es bei der COPD zu einem Umbau des respiratorischen Epithels mit Vergrößerung der submukösen Drüsen, Untergang von Clara-Zellen (Surfactant-Produktion) und Reduzierung submuköser Azini (GILLISSEN und RICHTER, 2002). Eine weitere bedeutende Veränderung ist der Aufbau von, physiologisch in den kleinen Atemwegen nicht vorhandenen Becherzellen, welche für die übermäßige Schleimproduktion verantwortlich sind.

Im Gegensatz zum humanen Asthma stehen bei der COPD neutrophile Granulozyten, $CD8^+$ -T-Helferszellen (Th1-Helferszellen) und aktivierte Alveolarmakrophagen im Vordergrund des Entzündungsgeschehens (WELTE et al., 2002). Als wichtigste zelluläre Mediatoren fungieren hier IL-8, was chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, $TNF-\alpha$, durch welchen proinflammatorische Proteine und Enzyme, inklusive IL-8, synthetisiert werden, Leukotrien B₄ und reaktive Sauerstoffmetaboliten (WELTE et al., 2002).

Der Verlust der Lungenfunktion ist bei der COPD im Vergleich zum humanen Asthma nicht reversibel. Auch resultiert die Obstruktion bei diesem Krankheitsbild in erster Linie aus der Übermäßigen Schleimproduktion (WIRTZ, 2002).

2. Die chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis (COB) des Pferdes

2.1 Aktuelle Terminologie

2.1.1 Definition COPD/RAO/Heaves/COB

Unter dem deutschen Begriff der chronisch obstruktiven Bronchitis, bzw. Bronchiolitis (COB) und den englischen Termini RAO („recurrent airway obstruction“) und „Heaves“ wird heute eine chronisch-reversible und nicht infektiöse, entzündliche Atemwegserkrankung erwachsener Pferde verstanden

(LÉGUILLETTE, 2003). Charakteristisch für die COB ist eine reversible Obstruktion der Atemwege, welche aus Schleimhautschwellung, Hyper- bzw. Dyskrie und Bronchospasmus besteht (FEY, 2006a).

Die Bezeichnung COPD („chronic obstructive pulmonary disease“) gilt heute als veraltet. Sie wurde in der Vergangenheit sowohl in der Literatur, als auch in der Praxis sehr allgemein für eine entzündliche, nicht infektiöse Erkrankung der unteren Atemwege beim Pferd verwendet (ROBINSON, 2006). Ursprünglich sollte die COPD anhand eines erhöhten intrathorakalen Drucks und gleichzeitiger Senkung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks objektiv diagnostizierbar sein (MCPHERSON und THOMSON, 1983). Allerdings rückte durch das Fehlen von internationalen Richtlinien, was Messgrößen und Grenzwerte zur Schweregradbestimmung betrifft, und durch die methodisch aufwändigeren Untersuchungen die objektive Bestimmung der Krankheit in den Hintergrund (FEY, 2006a)

Bei einem internationalen Seminar über chronische Atemwegserkrankungen des Pferdes im Jahr 2000 wurde letztlich der Begriff COPD durch die Bezeichnung RAO ersetzt. Es sollte dadurch eine Differenzierung zur humanen COPD verdeutlicht werden. Zwar dominieren sowohl bei der humanen, als auch bei der equinen COPD die neutrophilen Entzündungszellen im Tracheobronchialsekret, weshalb der Terminus aus der Humanmedizin übernommen wurde, jedoch stellten sich im Laufe der Jahre deutliche Unterschiede in der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf heraus (ROBINSON, 2006). Die COPD beim Menschen gilt als progressive Erkrankung, welche trotz Beseitigung der Ursachen (insbesondere Zigarettenrauch) stetig, wenn auch langsamer, fortschreitet (ROBINSON, 2001a). Beim Pferd dagegen gilt die Obstruktion der Atemwege als reversibel (ROBINSON, 2006). Durch konsequente, dauerhafte Staubvermeidung in der Umgebung des erkrankten Pferdes und eventuell zeitweise medikamentöse Therapie kann das Krankheitsbild deutlich und dauerhaft verbessert werden, vorausgesetzt es besteht noch kein Lungenemphysem (FEY, 2006a). Somit ähnelt die equine COPD eher dem humanen Asthma, als der humanen COPD (ROBINSON, 2001a).

Für die Diagnosestellung der RAO wurden auf dem Arbeitstreffen der Pneumologen genaue Voraussetzungen bestimmt. Somit muss ein Pferd mit RAO bei einer Provokation mit entsprechenden Umweltreizen (organische Stäube) eine deutliche Verschlechterung der Symptomatik zeigen (ROBINSON, 2001a). Diese sogenannte Exazerbation wurde anhand von Messgrößen und Grenzwerten definiert. Gleichzeitig muss nach der Provokation, unter anschließend dauerhaft staubarmer Umgebung und eventueller Verabreichung von Bronchodilatoren, das klinische Bild einer Remission zu erkennen sein (ROBINSON, 2001a).

Der deutsche Begriff der chronisch obstruktiven Bronchitis steht sinngemäß für das gleiche Krankheitsbild wie der Begriff RAO. Allerdings wird durch die deutsche Bezeichnung die Erkrankung hinsichtlich Dauer, Lokalisation und bezüglich der entzündlichen Genese präziser benannt (FEY, 2006a). Bei korrekter Bezeichnung sollte jedoch der Terminus Bronchiolitis verwendet werden, da sich die Erkrankung initial in den Bronchioli abspielt (FEY, 2006a).

2.1.2 Definition IAD/SPAOPD

Die Abgrenzung der geringgradigen, bzw. asymptomatischen COB von der Inflammatory Airway Disease (IAD) gestaltet sich häufig schwierig bis unmöglich

(ROBINSON, 2001a). Laut einem Konsensuspapier des American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) bedarf es wenigstens eines Leistungsmangels und/oder Husten mit/ohne vermehrtem Trachealsekret, einer nicht infektiösen Entzündung der Atemwege und einer verminderten Lungenleistung, um die Diagnose IAD zu stellen (COUËTIL et al., 2007). Der entscheidende Unterschied zur COB ist das Fehlen einer Atemwegsobstruktion in Ruhe (COUËTIL et al., 2007).

Obwohl die Erkrankung am häufigsten bei jungen Rennpferden nach dem Einstieg ins Training gefunden wird, ist auch eine IAD des älteren Pferdes beschrieben (ROBINSON, 2006). Eine Studie von WOOD und Mitarbeiter (2005b) zeigt, dass die Anzahl der neu an IAD erkrankten Pferde mit dem Alter sinkt.

Die genaue Entstehung der IAD ist bis heute nicht restlos geklärt, wird aber als multifaktorielles Geschehen beschrieben. Sehr wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang mit dem Alter, der Nutzung, der Fütterung, vorangegangenen Infektionen und der Umwelt des Pferdes (COUËTIL et al., 2007). Es ist möglich, dass das Krankheitsbild der IAD die Antwort auf persistierende virale oder bakterielle Infektionen, auf belastungsinduziertes Lungenbluten oder auf die Inhalation von Stall- und Umweltstäuben darstellt (WOOD et al., 2005a; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Die am häufigsten aus dem Tracheobronchialsekret isolierten Bakterienspezies sind *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Actinobacillus equuli* und *Pasteurella* spp. (ROBINSON, 2006; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Somit wäre die sinkende Inzidenz bei älteren Pferden auf eine ausgereifte Entwicklung des Immunsystems zurückzuführen. Insgesamt wurde die Pathogenese bei erwachsenen Pferden jedoch nur wenig untersucht. Es konnten bei Lungenfunktionsuntersuchungen älterer Pferde deutliche obstruktive Veränderungen des Respirationstrakts ohne klinische Anzeichen in Ruhe ermittelt werden (ROBINSON, 2006). Fraglich ist jedoch, ob diese Form der IAD eine frühe Form der COB, bzw. RAO darstellt. Der Zusammenhang zwischen beiden Krankheiten ist nicht genau geklärt, jedoch scheint es durchaus möglich, dass Pferde, die in jungem Alter an IAD erkranken später das Krankheitsbild der COB entwickeln (ROBINSON, 2011).

Klinisch können betroffene Pferde durch Leistungsminderung, intermittierenden Husten oder mukopurulenten Nasenausfluss auffallen (COUËTIL et al., 2007). Häufig ist der Krankheitsverlauf jedoch subklinisch. Bei der allgemeinen Untersuchung erweist sich die Auskultation meist als physiologisch, wobei erkrankte Pferde eine erhöhte Atemfrequenz und abdominal verstärkte Atemtätigkeit zeigen können (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Im Gegensatz dazu befindet sich die interpleurale Druckdifferenz allerdings stets im Normbereich (COUËTIL et al., 2007).

Das diagnostische Vorgehen sieht zu Anfang das Ausschließen einer bakteriellen oder viralen Entzündung vor. Im weiteren Verlauf ist die Tracheobronchoskopie mit der Gewinnung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) das Mittel der Wahl. Die zytologische Untersuchung der BAL zeigt einen Anstieg der Mastzellen (> 2%) und der eosinophilen Granulozyten (> 1%) (COUËTIL et al., 2007). Um mit Sicherheit die COB klinisch von der IAD zu unterscheiden, besteht die Möglichkeit der natürlichen Provokation. Werden Pferde mit IAD qualitativ schlechtem Heu ausgesetzt, entwickeln sie möglicherweise eine Neutophilie der Atemwege oder vermehrt Husten, jedoch keine Dyspnoe, wie es bei Pferden mit COB der Fall wäre (COUËTIL et al., 2007).

Da die genaue Pathogenese der IAD bis heute ungeklärt ist wird als Behandlung primär eine staubfreie Aufstallung empfohlen. Bakterielle Atemwegserkrankungen sollten, nach Anlegen eines Antibiogramms aus Trachealsekretproben stets mit geeigneten Antibiotika behandelt werden (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Unterstützend können auch Kortikosteroide und Bronchodilatoren wirken (ROBINSON, 2011).

Neben der IAD stellt die Summer Pasture-Associated obstructive pulmonary Disease (SPAOPD) ein weiteres, schwer von der COB abzugrenzendes Krankheitsbild dar. Die Erkrankung tritt ausschließlich bei erwachsenen Pferden auf, welche auf der Koppel gehalten werden. Die klinischen Anzeichen ähneln stark denen der COB und treten nur im späten Frühling, Sommer und frühen Herbst auf (SEAHORN und BEADLE, 1993). Im Winter zeigen diese Pferde eine vollständige Remission mit nahezu kompletter Symptomfreiheit (MCGORUM und DIXON, 1999). Werden jedoch, an SPAOPD erkrankte Pferde qualitativ schlechtem Heu oder Stroh ausgesetzt, ist die zusätzliche Entwicklung einer COB möglich (DIXON et al., 1995a).

Auf Grund der großen symptomatischen Ähnlichkeit zur COB wird bei der SPAOPD ebenfalls von einer Hyperreagibilität der Atemwege auf Pollen und/oder auf in der Natur vorkommende Schimmelpilze ausgegangen (MCGORUM und DIXON, 1999). Dagegen spricht allerdings eine Studie von SEAHORN und Mitarbeitern (1997), nach welcher kein signifikanter Anstieg von Pollen- oder Schimmelpilz-spezifischen IgG oder IgE bei Pferden mit SPAOPD festzustellen ist.

Wie auch bei der COB entwickeln Pferde mit SPAOPD eine Neutrophilie der Atemwege mit Schleimhautschwellung, vermehrte Produktion von Mukus im Atemwegslumen und eine daraus resultierende Dyspnoe (COSTA et al., 2000). Die klinischen Anzeichen entsprechen denen der COB und sind gekennzeichnet von auskultatorisch pathologischen Geräuschen wie Giemen oder Knistern, von chronischem Husten und Nasenausfluss und bei schweren Fällen von Nüsternblähen in Ruhe und verstärkt abdominaler Atmung mit Ausbildung einer Dampfrinne (MCGORUM und DIXON, 1999).

Das diagnostische Vorgehen bei der SPAOPD entspricht dem der COB. Der entscheidende Unterschied ist die bei der Anamnese zu erfragende Saisonalität der auftretenden Symptome. Die klinisch-pathologischen Veränderungen müssen nach der Aufstallung, vor allem im Winter nahezu restlos verschwinden. Die fortlaufende Diagnostik wird unterstützt durch weiterführende Untersuchungen wie der Blutgasanalyse, der Tracheobronchoskopie oder der TBS- und/oder BAL-Zytologie.

Therapeutisch steht bei dieser Erkrankung, im Gegensatz zur COB, das Verbringen des betroffenen Pferdes in einen Stall an erster Stelle. Es sollte auf Grasfütterung und staubige Einstreu verzichtet werden (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Ebenso sollte es vermieden werden, das Pferd mit trockenem Heu oder Stroh in Kontakt zu bringen. Wie auch bei der COB können Kortikosteroide und Bronchodilatoren zur Verminderung der Symptome beitragen (MCGORUM und DIXON, 1999).

2.2 Epidemiologie

Das Krankheitsbild der COB wird weltweit beschrieben. Am häufigsten tritt die Erkrankung jedoch in der nördlichen Hemisphäre auf, da hier zum einen die

Stallhaltung üblich, zum anderen die Heuqualität auf Grund von nassen Witterungsverhältnissen oft mangelhaft ist (MAIR und DERKSEN, 2000). In zwei Schweizer Studien an unterschiedlichen Pferdepopulationen wurde eine Prävalenz von 54% ermittelt (BRACHER et al., 1991; FEIGE et al., 2002). Somit stellt die COB in unseren Breiten mit Sicherheit die häufigste nicht infektiöse Erkrankung des Respirationstrakts dar.

Überwiegend betroffen sind Pferde mittleren Alters (7-15 Jahre) oder älter (AVIZA et al., 2001; AINSWORTH, 2010). Zudem kann eine deutliche Zunahme der Krankheitszeichen mit steigendem Alter beobachtet werden (LÉGUILLETTE, 2003).

Auffällig ist das familiär gehäufte Auftreten der wiederkehrenden Atemwegsbeschwerden, was in zahlreichen Studien bewiesen wurde (GERBER et al., 2008). Diese Tatsache lässt auf eine genetische Prädisposition schließen. Bei Nachkommen eines an COB erkrankten Elterntiers, ist die Wahrscheinlichkeit ebenfalls zu erkranken 3-fach erhöht, bei zwei betroffenen Elternteilen steigt diese sogar auf das 5-fache an (GERBER et al., 2008). Es ist Forschern gelungen, Mikrosatelliten in der Nähe des IL-4-Rezeptor-Gens auf Chromosom 13 zu identifizieren, welche mit COB-Symptomen der Nachkommen des betroffenen Pferdes in Zusammenhang stehen (JOST et al., 2007; GERBER et al., 2008). Unterstützt wird dieses Erkenntnis durch die gleichermaßen vorhandene Kopplung des IL-4-Rezeptor-Gens des Menschen mit dem Auftreten des humanen Asthmas (EWART und ROBINSON, 2007).

2.3 Ätiologie

Bis heute ist die genaue Ätiologie der COB nicht restlos geklärt. Sicher ist allerdings, dass nicht nur ein einzelnes Agens, sondern eine Vielzahl von Faktoren die Genese der Erkrankung beeinflusst. Als ätiologisch relevant gilt eine spezifische Hyperreagibilität auf organische Stäube, Schimmelpilzsporen und bakterielle Endotoxine, was somit eine allergische Reaktion auf definierbare Antigene darstellt (KLEIN und DEEGEN, 1986b; LECLERE et al., 2011). Im weiteren Verlauf der Erkrankung besteht zusätzlich eine relativ unspezifische Überempfindlichkeit der Atemwege auf irritierende Reize (ROBINSON et al., 1996). In diesem Stadium wird die Krankheit schon durch alltägliche Gase (z.B. Ammoniak, Kohlendioxid) oder Stäube (z.B. in der Reithalle, Futter) aufrechterhalten. Diese auslösenden Faktoren lassen sich durch die zumindest zeitweise übliche Stallhaltung und Heufütterung in unseren Breiten kaum vermeiden (FEY, 2006b). Als Ursache für solch eine erhöhte spezifische und unspezifische Reaktionsbereitschaft der Atemwege auf für den Körper an sich ungefährliche Bestandteile der Atemluft, werden virale, bakterielle oder parasitäre Infektionen im Initialstadium der COB diskutiert (SASSE, 1995). Dadurch kann durch mangelnde Regeneration des Flimmerepithels und des Epithels der Bronchi und Bronchioli neben einer Hyperreagibilität auch ein verminderter Selbstreinigungsmechanismus (Clearance) des Atemwegepithels zurückbleiben (FEY, 2006b).

Der Staub in Pferdeställen setzt sich aus über 50 verschiedenen Arten von Schimmelpilzen, einer großen Anzahl an Futtermilben, Endotoxinen und anorganischen Bestandteilen zusammen (CLARKE, 1993; WOODS et al., 1993). Folglich besteht dieser Staub aus einer Vielzahl von Antigenen, von denen unter Umständen jedes einzelne eine Atemwegsentszündung bei empfänglichen Pferden auslösen oder verschlimmern kann (HALLIWELL et al., 1979; MCGORUM et al., 1998). Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass eine

Kombination aus Endotoxinen und Schimmelpilzbestandteilen die pathologische Reaktion der Atemwege potenziert (PIRIE et al., 2003b).

Die wichtigste Rolle für die Hyperreagibilität der Atemwege scheinen sowohl der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* als auch die thermophilen Aktinomyceten *Thermoactinomyces vulgaris* und *Faenia rectivirgula* (früher: *Mikropolyspora faeni*) zu spielen (MCPHERSON und THOMSON, 1983; DERKSEN et al., 1988; MCGORUM et al., 1993c, SCHMALLENBACH et al., 1998). Studien haben gezeigt, dass die alleinige Inhalation einer wässrigen Lösung aus Schimmelpilz- und Aktinomyceten-Antigenen zwar zu einem Anstieg an Neutrophilen Granulozyten im Bronchoalveolarekret führt, jedoch nicht das volle Krankheitsbild einer COB auslöst (DERKSEN et al., 1988; MCGORUM und DIXON, 1993). Ebenso konnte auch bei der einzelnen Inhalation von Endotoxinen keine signifikante Reaktion der Atemwege im Vergleich zur Inhalation einer salinen Lösung beobachtet werden (PIRIE et al., 2001, 2003a). Die volle Ausprägung des Krankheitsbilds einer COB erfordert zumindest die Inhalation eines Staubgemisches, wie es bei Heu oder Stroh vorkommt (MCGORUM et al., 1993c; PIRIE et al., 2002a; KLEIBER et al., 2005). Dies kann sowohl durch eine natürliche Exposition, als auch durch Verneblung erreicht werden.

2.4 Pathogenese

Die entscheidende Rolle bei der Pathogenese der COB spielen obstruktive Veränderungen der Atemwege. Zu Grunde liegen diesen Veränderungen drei grundsätzlich voneinander zu trennende Pathomechanismen, welche beim einzelnen Patienten meist gleichzeitig, jedoch in unterschiedlichem Grad auftreten und therapeutisch differenziert zu betrachten sind (FEY, 2006b). Zum einen wird die Verengung der Bronchien durch Bronchospasmen und der Ansammlung von übermäßig, unphysiologisch zusammengesetztem Sekret verursacht (ROBINSON et al., 1996). Zum anderen trägt die Schleimhautschwellung, sei es durch ein entzündliches Ödem oder durch zelluläre Infiltrate hervorgerufen, erheblich zur Einengung der Atemwege bei (DERKSEN, 1993). Ebenfalls zu einer, über das Maß verdickten Schleimhaut führt eine Hyper- und Metaplasie des Epithels (SCHOON und DEEGEN, 1983; KAUP et al., 1990; LECLERE et al., 2011).

Im Falle eines fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs mit zunehmender Atemwegsobstruktion kann es zu einer Art Ventilfunktion der Bronchioli kommen. Während der Inspiration wird der Thorax und mit ihm auch die Bronchioli aktiv geweitet, um den Strömungswiderstand der Atemluft zu überwinden (FEY, 2006b). Die Luft gelangt inspiratorisch noch relativ leicht bis an die Alveolen, wird aber expiratorisch, durch das abschnittsweise Verschießen der zuführenden Atemwege, eingeschlossen. Dieses Kollabieren und anschließend mögliche Verkleben der kleinsten Atemwege mit kaudalem Einschluss der Luft, führt zum Phänomen des „air trapping“ (DEEGEN und MÜLLER, 1983). Die Alveolen werden übermäßig gebläht (alveoläres Emphysem) und es kann durch Zerreißen der Alveolarsepten und elastischen Fasern der Lunge zum irreversiblen Lungenemphysem kommen (SCHOON und DEEGEN, 1983; LECLERE et al., 2011).

2.4.1 Bronchospasmus

Als Hauptursache für die Atemwegsobstruktion wird von einer Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur ausgegangen, da die Gabe von Bronchodilatoren zu einer deutlichen Besserung der obstruktiven Anzeichen führt (ROBINSON et al., 1996). Diese übermäßig starke und/oder anhaltende Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur besitzt den größten Effekt im Bereich der nicht mehr rundum knorpelgestützten kleinen Atemwege (FEY, 2006b). Die Bronchokonstriktion stellt eigentlich einen physiologischen Abwehrmechanismus des Körpers dar, durch welchen verhindert werden soll, dass potentiell pathogene Partikel bis in den Alveolarbereich eingeatmet werden (DERKSEN und ROBINSON, 2002). Als zentraler Auslöser des Bronchospasmus kommt nach ROBINSON und Mitarbeitern (1996) eine Hyperreagibilität der Atemwege in Betracht (ROBINSON et al., 1996). Eine Hyperreagibilität bedeutet die vermehrte Bereitschaft der Atemwege, auf für den Körper an sich ungefährliche Noxen, mit einer starken Verengung des Bronchialdurchmessers zu reagieren (DERKSEN und ROBINSON, 2002).

Die Erregung sogenannter „irritant receptors“ (schnell adaptierende Reizrezeptoren), einer von drei Rezeptortypen in der Schleimhaut die für den Hustenreflex verantwortlich sind, führt zu einer Aktivierung des N. vagus mit folgender Acetylcholinfreisetzung (ROBINSON, 2011). Die Folge ist eine Stimulation der muskarinergen Rezeptoren der glatten Muskulatur und somit eine Bronchokonstriktion (DERKSEN und ROBINSON, 2002). Aktiviert wird dieses System zum einen durch inhalede Noxen wie Staub und Schadgase (z.B. Ammoniak), zum anderen durch Entzündungsmediatoren, Histamin und andere biogene Amine (KLEIN und DEEGEN, 1986b; DERKSEN und ROBINSON, 2002). Entzündungen im Bereich der luftleitenden Wege legen diese „irritant receptors“ frei und machen diese angreifbarer für Entzündungsmediatoren (DEEGEN et al., 1987).

Diese chronische Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege führt sowohl zur Hyperplasie als auch zur vermehrten Proliferation der Myozyten und somit zu einer irreversiblen Einengung des Atemwegslumens (FEY, 2006b).

2.4.2 Hyper- und Dyskrinie

Im Zuge des entzündungsbedingten Umbaus des Bronchialepithels kommt es zu einer Größenzunahme und Vermehrung der Becherzellen bis in die Bronchioli und einer Abnahme der Clara-Zellen (ROBINSON et al., 1996). Die Folge ist eine vermehrte Produktion von unphysiologisch zusammengesetztem Sekret (FEY, 2006b). Physiologischerweise besteht die Schleimschicht der Atemwege aus zwei Phasen. Direkt dem Epithel aufgelegt befindet sich die seröse Solschicht, in welcher die Zilien reibungslos vor und zurück gleiten können. Dieser aufgelagert befindet sich die muköse, klebrige Gelschicht, in welcher inhalede Partikel und Zelldetritus festgehalten werden (FEY, 2006b). Bei jeder oral gerichteten Bewegung tauchen die Spitzen der gestreckten Zilien in die Gelphase ein und transportieren diese zusammen mit den anhaftenden Partikeln nach kranial (FEY, 2006b). Beim Zurückgleiten ziehen sich die Zilien in die Solschicht zurück und gelangen ohne großen Widerstand in ihre Ausgangsposition.

Durch die Hyper- und Dyskrinie kann es sowohl zu einem Ungleichgewicht zwischen Sol- und Gelphase, zugunsten der Gelphase, als auch zu einer mechanischen Schädigung des überlasteten Flimmerepithels kommen

(ROBINSON et al., 1996). Die Folge ist eine erhebliche Einschränkung der mukoziliären Clearance mit Sekretansammlungen in Trachea und Bronchien.

2.4.3 Schleimhautschwellung

Die unphysiologische Dicke der Schleimhaut in den Atemwegen, wie sie bei der COB vorkommt, bedingt eine zusätzliche, oft erhebliche Einengung des Atemvolumens (FEY, 2006b). Verursacht wird diese Schwellung zum großen Teil durch ein entzündliches Ödem. Ebenso führt die Infiltration der Submukosa durch Lymphozyten, Mastzellen und Plasmazellen zu einer Weitung der Interzellulargaps und Verdickung der Schleimhaut (ROBINSON, 2001a). Histologisch zeigen sich bei fortgeschrittenen Erkrankungsfällen meist lymphozytäre peribronchioläre Infiltrate, die in einer Fibrose enden können (ROBINSON et al., 1996).

Da es momentan pathogenetisch nicht zu entscheiden ist, ob die COB regelmäßig durch eine übermäßige spezifische Reaktion des Immunsystems ausgelöst wird oder allein durch unspezifisch wirksame Abwehrmechanismen aufrechterhalten wird, geht die chronisch obstruktive Bronchitis nicht über eine symptomatische Diagnose hinaus (FEY, 2006b).

2.5 Klinisches Bild

Die Symptome der equinen COB sind je nach Haltungs- und Umweltbedingungen sehr variabel. Meist entwickelt sich das Krankheitsbild schleichend und mit progressivem Charakter. Allerdings sind auch akute Erkrankungsfälle beschrieben (MCPHERSON und THOMSON, 1983). Bei einem milden Verlauf der Krankheit sind für den Besitzer oftmals keine oder sehr unspezifische Anzeichen, wie Leistungsmangel oder einzelne Hustenstöße zu Beginn der Arbeit (sog. „Abhusten“) zu bemerken (MAIR und DERKSEN, 2000). Dabei scheint die Atmung kaum verändert und die Lungenauskultation kann physiologisch sein (FEY, 2006b).

Eine schlechte Staubqualität und-quantität in der Umgebung kann innerhalb weniger Stunden eine drastische Verschlechterung der Symptome hervorrufen (LECLERE et al., 2011). Kennzeichnend für solch eine Exazerbation ist die Obstruktion der Atemwege, welche hauptsächlich durch Bronchospasmus verursacht wird (ROBINSON, 2001a). Folge dieser Bronchialobstruktion ist eine deutliche, initial expiratorische, später gemischte Dyspnoe mit doppelschlägiger Ausatmung (MAIR und DERKSEN, 2000). Da im Bereich der kleinen Atemwege zu große Einengungen bestehen, muss die Ausatemluft endexpiratorisch mit Hilfe der Bauchdecke aktiv aus der Lunge gepresst werden, was sich dann als biphasische Expiration darstellt. (FEY, 2006b). Bei längerem Bestehen der expiratorischen Atembeschwerden kommt es zur Hypertrophie des Musculus obliquus externus abdominis und des Musculus rectus abdominis und somit zur Ausbildung einer „Dampfrinne“ (AINSWORTH, 2010). Ebenfalls zu beobachten ist ein atemsynchrones Hervortreten des Afters (sog. „Afteratmung“), was bei der Ausatmung durch das aktive Auspressen der Luft aus der Lunge verursacht wird (MAIR und DERKSEN, 2000). Während eines fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs kommt es schon bei der Inspiration, durch die hochgradige Verengung der Luftwege zu einem erheblichen, von der Atemluft zu überwindenden, Widerstand. Um diesem entgegen zu wirken muss der Unterdruck im Thorax verstärkt werden, was sich klinisch in geweiteten Nüstern

und inspiratorisch hervortretenden Rippen äußert (sog. „Zwischenrippenatmung“) (AINSWORTH, 2010). Begleitet werden diese klinischen Anzeichen meist von regelmäßigen, vereinzelt oder anfallsartigen Hustenstößen (LECLERE et al., 2011). Bei der klinischen Untersuchung können neben einer erhöhten Atemfrequenz auskultatorisch oft pathologische Geräusche wie Hiemen, Giemen, Rasseln oder Knistern auffallen (LÉGUILLETTE, 2003). Nasenausfluss wird meist intermittierend in seröser bis mukopurulenter Qualität beobachtet (MAIR und DERKSEN, 2000). Besteht eine hochgradige Dyspnoe über längere Zeit ist ebenfalls eine starke Abmagerung möglich (MAIR und DERKSEN, 2000).

In sehr seltenen und schweren Fällen treten bei betroffenen Pferden ein Cor pulmonale mit Pulsation der Jugularvene und ventralen Ödemen auf (DIXON, 1978; SAGE et al., 2006).

2.6 Immunologische Hintergründe

2.6.1 Th1/Th2-Hypothese

T-Helferzellen der spezifischen Immunantwort, auch adaptive oder erworbene Immunantwort genannt, sind in der Lage zwei unterschiedliche Zytokinmuster zu produzieren. MOSMANN und Mitarbeiter (1986) unterschieden anhand der Expression dieser gegenläufigen Zytokinprofile am murinen Modell erstmals Th1- und Th2-Lymphozyten, welche sich wie alle T-Helferzellen durch ein CD4-Antigen (CD4+) auf ihrer Zelloberfläche auszeichnen. Eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der jeweiligen Immunantwort stellt die Stimulierung naiver T-Helferzellen (Th0-Zellen) in Zusammenhang mit dem vorherrschenden Zytokinmilieu dar (LUNN und HOROHOV, 2010). So differenzieren sich Th0-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 und IFN- γ zu Th1-Lymphozyten, wohingegen IL-4 und IL-10 die Produktion von Th2-Lymphozyten fördern (LUNN und HOROHOV, 2010). Die Immunantwort der Th1-Zellen ist gekennzeichnet durch die Produktion von IFN- γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) und der daraus resultierenden Aktivierung von Makrophagen und Stimulierung der B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG2a (LUNN und HOROHOV, 2010). Die zellvermittelte Th1-Immunantwort stellt die Bekämpfungsreaktion auf intrazelluläre Infektionen (Bakterien, Viren) dar und steht gleichzeitig mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten in Zusammenhang (LUNN und HOROHOV, 2010). Im Gegensatz zur Th1-Immunantwort produzieren Th2-Zellen vor allem die Mediatoren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (LUNN und HOROHOV, 2010). Zur Folge hat dieses Zytokinmuster die Aktivierung der humoralen Immunität mit Antikörperproduktion vom Subtyp IgA, IgE und IgG1 (LUNN und HOROHOV, 2010). Neben der Beteiligung bei der Entstehung von Hypersensitivitätsreaktionen wird der Th2-Immunantwort auch eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegen extrazelluläre Parasiten, wie beispielsweise die intestinalen Helminthen, zugeschrieben (LUNN und HOROHOV, 2010). Da IgE-Antikörper in erster Linie zur Bekämpfung parasitärer Infektionen produziert werden, wird die Schiene der Th2-Immunantwort insbesondere an der Schleimhaut des Respirations- und Gastrointestinaltrakts eingeschlagen, da diese Gewebe durch den Kontakt zur Außenwelt besonders empfänglich für Parasiteninvasionen sind (LUNN und HOROHOV, 2010).

Zusätzlich zur Stimulierung der entsprechenden Immunreaktion besitzen die Th1- und Th2-Zytokine eine gegenseitige regulatorische Wirkung. Im Besonderen IFN- γ und IL-10 supprimieren die Ausbildung des jeweils anderen Zytokinprofils (LUNN und HOROHOV, 2010). Um die Immunantworten im Gleichgewicht zu halten und insbesondere autoimmunen und allergischen Reaktionen

entgegenzuwirken, besitzen regulatorische-T-Zellen (Treg), welche eine zusätzliche Population von CD4⁺-T-Zellen darstellen, ebenfalls eine supprimierende Wirkung (LUNN und HOROHOV, 2010). Dieser Mechanismus beruht gleichermaßen auf der Ausschüttung spezifischer immunregulatorischer Zytokine wie dem IL-10 und dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) (LUNN und HOROHOV, 2010).

Insgesamt ist eine Th1/Th2-Balance von entscheidender Bedeutung um das immunologische Gleichgewicht zu bewahren und immunologischen Krankheiten, wie Allergien und Autoimmunreaktionen, vorzubeugen (KLINE, 2007).

2.6.2 Immunologie der COB

Bis heute werden die immunpathologischen Vorgänge der COB kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien beweisen, dass die Inhalation von organischen Stäuben bei betroffenen Pferden zu einer Th2-Immunantwort mit IgE-vermittelter Degranulation von Mastzellen führt (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Gestützt wird diese Hypothese sowohl von dem Nachweis einer erhöhten Transkription von mRNA für IL-4 und IL-5 und Reduktion der mRNA für IFN- γ in BAL-Zellen, als auch von dem Anstieg Antigen-spezifischer IgA-, IgE- und Histamin-Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit und dem vermehrte Auftreten von Antigen-spezifischen IgE-Antikörpern im Serum von COB-Pferden (HALLIWELL et al., 1993; MCGORUM et al., 1993b; LAVOIE et al., 2001; CORDEAU et al., 2004; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Im Gegensatz dazu konnten AINSWORTH und Mitarbeiter (2003) keinen Unterschied in der Zytokinexpression bei Pferden in Exazerbation im Vergleich zu Kontrollpferden nachweisen. Stattdessen stellte diese Arbeitsgruppe eine erhöhte mRNA-Expression für IFN- γ und IL-8 bei erkrankten Pferden während einer chronischen Phase fest, was gegen eine alleinige Th2-Überreaktion spricht (AINSWORTH et al., 2003). Genauso konnte gezeigt werden, dass in der BAL-Flüssigkeit erkrankter Pferde ebenfalls Antigen-spezifische Antikörper vom Isotyp IgGa und IgGb vermehrt vorkommen, welche nicht mit einer Th2-Immunantwort kompatibel sind (HALLIWELL et al., 1993).

KLEIBER und Mitarbeiter (2005) konnten nach der Provokation von Krankheitsschüben kein bestimmtes Zytokinmuster bei betroffenen Pferden erkennen. Stattdessen war die Expression aller untersuchten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ), sowohl in Blut-, als auch in BALF-Lymphozyten, herunterreguliert (KLEIBER et al., 2005). Auch HOROHOV und Mitarbeiter (2005) stellten ein gemischtes Zytokinprofil, abhängig von der Phase der COB, fest. Zu Beginn der Erkrankung bilden COB-Pferde eine typische Th2-Immunantwort auf vorhandene Allergene aus, wohingegen mit zunehmender Dauer und Chronizität vermehrt IL-8 und IFN- γ produziert werden (HOROHOV et al., 2005).

Für das proinflammatorische und chemotaktisch wirkende IL-17 konnte ebenfalls eine entscheidende Beteiligung am Pathomechanismus der COB nachgewiesen werden (DEBRUE et al., 2005). Das von Th17-Zellen, welche erst in jüngster Zeit als dritte Subklasse der T-Helferzellen entdeckt wurden, produzierte Zytokin wirkt sowohl auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Atemwegslumen, als auch auf die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine stimulierend (z.B. IL-6 und IL-8) (DEBRUE et al., 2005; SCHMIDT-WEBER, 2008).

Vergleicht man die COB mit dem allergischen Asthma des Menschen, fällt die gemeinsame chronische Atemwegsentszündung mit Atemwegshyperreagibilität und Atemwegsobstruktion auf. Beide Phänotypen lassen sich durch

Allergenkontakt provozieren und zeigen eine Reversibilität nach Meidung der auslösenden Noxe (HOROHOV et al., 2009).

Neben diesen Übereinstimmungen bestehen bei der COB des Pferdes einige Merkmale, welche einer Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion wie sie beim humanen Asthma auftritt, widersprechen. So tritt beim Asthma nach Allergenexposition der IgE-vermittelte Bronchospasmus innerhalb weniger Minuten auf, wohingegen bei der COB eine Verzögerung der klinischen Symptomatik von Stunden bis Tagen besteht (ROBINSON, 2011). Da zusätzlich nur eine geringe Korrelation zwischen dem Nachweis von Allergie-vermittelndem IgE und der klinischen Ausbildung einer COB besteht und die Typ-I-Effektorzellen, die Mastzellen, eine nur untergeordnete Rolle in der Pathogenese besitzen, ist eine alleinige Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion unwahrscheinlich (LÉGUILLETTE, 2003; HOROHOV et al., 2009; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Ebenso spricht gegen diesen Überempfindlichkeitstyp die Tatsache, dass die vorherrschenden Entzündungszellen im Atmungstrakt bei der COB, nicht wie beim humanen Asthma die eosinophilen Granulozyten, sondern die neutrophilen Granulozyten sind, welche durch das IL-8 angelockt werden (LÉGUILLETTE, 2003; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Allerdings können auch bei schweren und chronischen Asthmafällen erhöhte Neutrophilenzahlen auftreten (HOROHOV et al., 2009). Zudem wird eine weitere Form des Asthmas beschrieben, welche durch eine akute Entzündung und dem Vorherrschen von neutrophilen Granulozyten und proinflammatorischen Zytokinen, wie dem IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α , gekennzeichnet ist (HOROHOV et al., 2009).

Grundsätzlich wird heutzutage bei dem immunologischen Geschehen der COB von einer gestörten Th1/Th2-Balance mit einer Verschiebung zur übermäßigen Th2-Antwort und einer verzögerten, IgE-unabhängigen Typ-IV-Immunreaktion ausgegangen (HOROHOV et al., 2009).

2.6.3 Überempfindlichkeitsreaktionen

Als Allergien werden Immunmechanismen bezeichnet, welche sich entgegen ihrer eigentlichen Bestimmung und meist in überschießendem Maße gegen spezifische, exogene Antigene, sogenannte Allergene, richten und so zur klinischen Erkrankung führen (LUNN und HOROHOV, 2010). Richtet sich diese Hypersensitivitätsreaktion des Immunsystems gegen körpereigene (endogene) Antigene, so wird dies als Autoimmunkrankheit bezeichnet und von der Allergie abgegrenzt (LUNN und HOROHOV, 2010).

Auch in der Veterinärmedizin wurde im Laufe der Zeit die humanmedizinische Einteilung der Allergien in vier Typen übernommen. GELL und COOMBS (1963) (GELL und COOMBS, 1963) unterschieden dabei Antikörper-vermittelte Immunreaktionen (Typ I-III) von Antikörper-unabhängigen, Zell-vermittelten Reaktionen (Typ IV).

Im Falle der allergischen Komponente der COB konnten einige Autoren bei Pferden in Exazerbation eine erhöhte mRNA-Transkription für spezifische Zytokine (IL-4, IL-5) in BAL-Zellen, einen Anstieg Antigen-spezifischer IgA-, IgE- und Histamin-Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit und erhöhte IgE-Titer im Serum nachweisen, was alles für eine Typ-I Überempfindlichkeitsreaktion spricht (HALLIWELL et al., 1993; MCGORUM et al., 1993b; LAVOIE et al., 2001; CORDEAU et al., 2004; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Dem gegenüber

stehen Studien, bei welchen kein spezifisches Zytokinmuster, jedoch Antigen-spezifische Antikörper vom Isotyp IgG_a und IgG_b in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen wurden (HALLIWELL et al., 1993; KLEIBER et al., 2005). Diese Erkenntnisse sprechen für eine Allergie des Typ-III. HOROHOV und Mitarbeiter (2009) beschreiben das allergische Geschehen der COB als eine Mischung aus einer verspäteten Typ-I Reaktion und einer IgE-unabhängigen Typ-IV Reaktion.

2.6.3.1 Typ-I Allergie

Die Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ-I gilt als eine Reaktion vom Soforttyp und wird auch als „Klassische“ Allergie bezeichnet (LUNN und HOROHOV, 2010). Hierbei treten die klinischen Symptome sehr schnell, innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Allergenkontakt auf (LUNN und HOROHOV, 2010).

Im Rahmen der immunologischen Antwort werden bei diesem Allergietyp B-Lymphozyten über das IL-4 aus Th2-Zellen zur Produktion von IgE angeregt, welches spezifisch für ein, an sich ungefährliches Allergen ist (BROIDE, 2001). Die antigenspezifischen IgE binden über den hoch affinen Fcε-Rezeptor I (FcεRI) an Mastzellen und führen nach Kreuzvernetzung durch ein passendes Antigen zur Degranulation und Mediatorenfreisetzung (u.a. Histamin, Heparin, Tryptasen) (BROIDE, 2001). Zusätzlich führt dieser Mechanismus zur Synthese von Arachidonsäuremetaboliten, wie bestimmten Leukotrienen und Prostaglandinen, aber auch zur Transkription spezieller Zytokine (u.a. IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α) (BROIDE, 2001). Diese Entzündungsmediatoren sind für die allergische Sofortreaktion verantwortlich, stellen jedoch gleichfalls die Basis für die verzögerte Form der Typ-I Allergie, die sogenannte Spätreaktion (ca. 8-12 Stunden später) dar (BROIDE, 2001; LUNN und HOROHOV, 2010). So steigert Histamin die lokale Durchblutung und führt durch Exsudation von Plasma zu Ödemen (LUNN und HOROHOV, 2010). Aktivierte Matrixmetalloproteinasen bewirken eine lokale Gewebsdestruktion, wohingegen Leukozyten durch TNF-α chemotaktisch angelockt werden (LUNN und HOROHOV, 2010).

Wie die Mastzellen besitzen auch aktivierte eosinophile und basophile Granulozyten den FcεRI und sind so in gleichem Maße an der Reaktion beteiligt (LUNN und HOROHOV, 2010). Deren Produktion wird über das IL-5 aus Th2-Zellen stimuliert und die Expression der Rezeptoren durch die Aktivierung über Chemokine und Zytokine angeregt (LUNN und HOROHOV, 2010).

Neben dem Fcε-Rezeptor I existiert ein weiterer, zu IgE niedrig affiner Rezeptor, genannt CD23 (oder FcεRII), welcher auf B-Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, Thrombozyten und follikulär dendritischen Zellen lokalisiert ist (LUNN und HOROHOV, 2010). Durch die Interaktion von IgE und dem Rezeptor CD23 kommt es zu einer Steigerung der zellulären und humoralen Immunantwort auf spezifische, an IgE gebundene Antigene (LUNN und HOROHOV, 2010). Beim Pferd konnte eine stimulierende Wirkung des IL-4 auf die Expression des CD23 nachgewiesen werden (LUNN und HOROHOV, 2010).

Insgesamt steigert eine erhöhte Menge an IgE die Ausprägung IgE-spezifischer Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten (BROIDE, 2001). Mehrere Studien lieferten den Nachweis dafür, dass IgE-knock-out Mäuse vier- bis fünfmal weniger FcεRI auf Mastzellen und bis zu dreimal weniger CD23 Rezeptoren auf B-Lymphozyten ausbilden (BROIDE, 2001).

Die klinische Ausprägung der Überempfindlichkeitsreaktion hängt von der Menge der vorhandenen IgE, der Menge des Allergens und der Art des

Allergenkontaktes ab (LUNN und HOROHOV, 2010). Gelangt ein Allergen direkt in den Blutkreislauf (Bsp. iatrogen verursacht) oder wird sehr schnell enteral resorbiert, so kann es zu einer systemischen Anaphylaxie mit folgendem anaphylaktischem Schock kommen (LUNN und HOROHOV, 2010). Im Gegensatz dazu führt die Inhalation eines Allergens oder der Kontakt mit der Haut nur zu einer lokalen Entzündung mit Quaddelbildung, Rötung, Ausbildung eines Ekzems oder Urtikaria bei systemischer Reaktion (LUNN und HOROHOV, 2010). Typische Beispiele für eine Typ-I Allergie beim Menschen sind die allergische Rhinitis oder das allergische Asthma, beim Pferd die saisonal rekurrende atopische Dermatitis (Culicoides Hypersensitivität oder Sommereczem).

2.6.3.2 Typ-III Allergie

Diese Überempfindlichkeitsreaktion resultiert aus der Entstehung von Antigen-Antikörper-, bzw. Immunkomplexen (LUNN und HOROHOV, 2010). Die Antigene liegen im Blutkreislauf gelöst und, im Verhältnis zu Antikörpern, im Überschuss vor (LUNN und HOROHOV, 2010) Somit können nur kleine Immunkomplexe gebildet werden, welche sich in Blutgefäßwänden und Geweben ablagern (LUNN und HOROHOV, 2010).

Die Bildung von Immunkomplexen stellt eine physiologische Reaktion des Immunsystems auf Antigene dar. Ist das Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper ausgeglichen oder zu Gunsten der Antikörper verschoben, bilden sich große Immunkomplexe, welche leicht durch die Aktivierung des Komplementsystems über das retikulo-endotheliale System neutralisiert werden können (LUNN und HOROHOV, 2010).

Abgelagerte Immunkomplexe aktivieren sowohl das Komplementsystem, als auch Fc-Rezeptor tragende Zellen, was zu einer Entzündungsreaktion führt, die je nach Entstehungsort lokal (Arthusreaktion: beispielsweise nach subkutaner Injektion) oder systemisch (z.B. „Serumkrankheit“) verläuft (LUNN und HOROHOV, 2010).

Das klassische Beispiel der Typ-III Hypersensibilität stellt die sogenannte „Serumkrankheit“ dar, welche bei der Behandlung von Schlangenbissen beim Menschen auftritt. Serum von Pferden, welche zuvor mit Schlangengift immunisiert wurden, wird Menschen injiziert und löst in diesem Organismus eine adaptive Immunantwort aus (LUNN und HOROHOV, 2010). Verantwortlich für die Bildung anti-equiner-IgG sind verschiedene Bestandteile des Serums, insbesondere die equinen Antikörper (LUNN und HOROHOV, 2010). Bei wiederholter Gabe eines solchen Pferdeserums bilden sich Immunkomplexe, welche sich in Gefäßen, Gelenken und Nieren ablagern können und so zu Fieber, Urtikaria, Vasculitis, Arthritis und Glomerulonephritis führen können (LUNN und HOROHOV, 2010).

2.6.3.3 Typ-IV Allergie

Die Typ-IV Allergie stellt eine verzögerte Immunreaktion dar, welche Antikörperunabhängig und allein von Zellen, insbesondere T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, vermittelt ist (LUNN und HOROHOV, 2010). Wird ein Antigen über ein MHC-Klasse I präsentiert, so reagieren CD8⁺-T-Lymphozyten und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (JANEWAY und

MURPHY, 2009). Durch diese Zellen werden sowohl die antigenpräsentierenden Zellen direkt abgetötet, als auch spezifische Zytokine (IFN- γ , TNF- α , TNF- β) sezerniert, welche phagozytierende Zellen anlocken und aktivieren (JANEWAY und MURPHY, 2009).

Zu dieser Gruppe der Überempfindlichkeitsreaktion zählen beispielsweise die Kontaktallergien oder der diagnostische Tuberkulintest, bei welchem unter dem regulierenden Einfluss einer Th1-Immunantwort antigenspezifische T-Gedächtniszellen gebildet werden (LUNN und HOROHOV, 2010).

2.6.4 Immunmodulation

Die Modulation des Immunsystems stellt eine bedeutende therapeutische Möglichkeit dar, um sowohl physiologische Immunantworten zu steigern, als auch ein geschwächtes Immunsystem zu unterstützen oder überschießende Immunreaktionen herunter zu regulieren (LUNN und HOROHOV, 2010). Somit zählen in diese Gruppe gleichermaßen stimulatorisch, wie auch suppressiv auf das Immunsystem wirkende Stoffe (LUNN und HOROHOV, 2010).

2.6.4.1 Immunsuppressiva

Die wohl geläufigste Gruppe der immunsuppressiv wirkenden Stoffe stellen die Kortikosteroide dar. Als Steroidhormone der Nebennierenrinde besitzen sie weitreichende Effekte sowohl auf die angeborene, als auch auf die adaptive Immunabwehr (LUNN und HOROHOV, 2010). Lipidlösliche Kortikoid-Moleküle diffundieren durch die Plasmamembran ihrer Zielzellen ins Zytosol und binden dort an spezifische Steroid-Rezeptoren (LUNN und HOROHOV, 2010). Über diesen Hormon-Rezeptor-Komplex wird ein Hitzeschockprotein (Hsp90) vom Rezeptor losgelöst und gibt eine DNA-bindende Region frei mit welcher der Komplex im Zellkern an seine Promotorregion binden kann (LUNN und HOROHOV, 2010). Durch diese Hormonsteuerung wird die Transkription des spezifischen Gens und somit die Produktion von pro- oder antiinflammatorischen Enzymen, Zytokinen und Proteinen aktiviert oder inhibiert (LUNN und HOROHOV, 2010).

Neben den Kortikosteroiden werden ebenfalls zytotoxische Arzneistoffe, wie das Azathioprin oder das Cyclophosphamid, zur Immunsuppression eingesetzt, welche über die Blockierung der DNA- und RNA-Synthese die Vermehrung der T- und B-Lymphozyten hemmen (LUNN und HOROHOV, 2010). HUMBER und Mitarbeiter (1991) und MESSER und ARNOLD (1991) beschreiben den Einsatz dieser Arzneimittel bei Pferden mit immunvermittelter hämolytischer Anämie und Thrombozytopenie.

Als nicht-toxische, immunsuppressive Alternative können Derivate aus Bakterien oder Pilzen, wie das Cyclosporin, verwendet werden (LUNN und HOROHOV, 2010). Cyclosporin bindet intrazellulär an spezifische Proteine (Immunophiline) und hemmt somit über blockierte Signalwege die Ausschüttung immunstimulierender Lymphokine und somit die Aktivierung und Vermehrung von Lymphozyten (LUNN und HOROHOV, 2010). Beim Pferd wird dieses Arzneimittel nur zur topischen Anwendung bei okulär-entzündlichen Erkrankungen, wie der Keratitis oder Uveitis, verwendet (GRATZEK et al., 1995; GILGER et al., 2001).

2.6.4.2 Immunstimulatoren

Immunstimulantien werden durch die Fähigkeit definiert, antigenunspezifische humorale und zellvermittelte Abwehrmechanismen zu fördern (TIZARD, 1993). Laut TIZARD (1993) wird dieser Mechanismus durch Makrophagen angeregt, welche über die Phagozytose der Stimulansantigene aktiviert werden, somit spezifische Zytokine freisetzen (Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktor) und dadurch zu einer Steigerung der Phagozytoseaktivität, Antikörperproduktion und Zytotoxizität führen.

Körpereigene Produkte, welche zur unspezifischen Stimulierung des Immunsystems eingesetzt werden können sind zum einen Immunglobuline, welche in Form eines polyklonales Serums intravenös verabreicht werden (LUNN und HOROHOV, 2010). Deren Verwendung zur Therapie von Autoimmunerkrankungen zeigte Erfolge, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht geklärt ist (LUNN und HOROHOV, 2010). Zum anderen konnten positive therapeutische Ergebnisse durch den Einsatz von Zytokinen beim Pferd verzeichnet werden. Neben antiviralen und immunstimulierenden Eigenschaften konnte dem Interferon- α (IFN- α) eine Verbesserung der klinischen Parameter bei Rennpferden, welche an „Inflammatory airway disease“ (IAD) litten, zugeschrieben werden (MOORE et al., 1997). Die Verabreichung von „Granulocyte-colony Stimulating Factor“ (G-CSF) an neugeborene Fohlen, führt zu einer kontinuierlichen, dosisabhängigen Steigerung der Neutrophilen-Anzahl mit Linksverschiebung, was bei der Behandlung einer Sepsis oder Endotoxämie hilfreich sein kann (LUNN und HOROHOV, 2010).

Zur Behandlung von respiratorischen Erkrankungen und equinen Sarkoiden beim Pferd kommen heutzutage unter anderem verschiedene bakterielle, virale oder pflanzliche Produkte zum Einsatz (LUNN und HOROHOV, 2010). So zeigen kleinste Bestandteile (muramyl dipeptide) von Mykobakterien immunologische und als Adjuvanz geeignete Aktivität (AUDIBERT und LISE, 1993). Abgetötete und aufbereitete Propionibacterium acnes-Präparate tragen zur klinischen Besserung bei chronisch-infektiösen Respirationserkrankungen bei und können ebenso prophylaktisch bei Stress (beispielsweise vor dem Absetzen oder einem Transport) verabreicht werden (LUNN und HOROHOV, 2010). Weit verbreitet ist ebenfalls die prophylaktische und/oder therapeutische Gabe von inaktivierten Parapox ovis Viren bei bakteriellen oder viralen Infektionen (RUSH und FLAMINIO, 2000). Die Wirkung beruht auf einer spezifischen Hüllproteinstruktur, welche die Aktivität von NK-Zellen steigert und Makrophagen aktiviert (RUSH und FLAMINIO, 2000).

Seit einigen Jahren wird der Einsatz spezifischer bakterieller DNA-Motive und deren immunmodulatorischen Effekten mit großem Interesse erforscht (s. II Literaturübersicht, Kap. 3.).

Pflanzliche Extrakte wie Echinacea (aus Echinacea angustifolia) oder Acemannan (aus Aloe Vera) gelten ebenfalls als Immunstimulantien, wobei letztere überwiegend zur Behandlung von Fibrosarkomen bei Katzen und Hunden eingesetzt wird (RUSH und FLAMINIO, 2000).

2.6.4.3 Antigen-spezifische Immunmodulation

Die wichtigste antigen-spezifische Modulation des Immunsystems stellt mit Sicherheit die aktive und passive Immunisierung dar. Durch die aktive Impfung, also die Verabreichung toter oder lebender Antigene oder DNA, wird eine

Antigen-spezifische Immunantwort provoziert (LUNN und HOROHOV, 2010). Dagegen werden bei der passiven Immunisierung lediglich spezifische Antikörper verabreicht (LUNN und HOROHOV, 2010).

Eine weit verbreitete, vor allem in der Human- und Kleintiermedizin angewandte Therapie zur Antigen-spezifischen Immunsuppression stellt die spezifische Immuntherapie (SIT) oder auch Hyposensibilisierung dar. Ziel ist es die überschießende Immunantwort auf ein spezifisches Antigen herunter zu regulieren und eine angemessene Reaktion des Immunsystems zu erreichen (LUNN und HOROHOV, 2010). Dies bedeutet beispielsweise bei einer Allergie des Typ-I, welche durch eine Th2-Immunantwort vermittelt ist, den Shift zur Th1-Anwort und somit einen Isotypen-Switch von IgE zu IgG zu erzielen (JANEWAY und MURPHY, 2009). Der genaue immunologische Mechanismus, durch welchen bei der SIT eine klinische Besserung erreicht wird, ist bis heute unklar (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Bewiesen ist allerdings eine veränderte Reaktion der APCs, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Bei Hunden mit atopischer Dermatitis konnte nach abgeschlossener spezifischer Immuntherapie in den mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) ein Anstieg der IFN- γ mRNA ohne Veränderung der IL-4 mRNA verzeichnet werden, was auf einen Th1-Shift der Immunantwort schließen lässt (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009).

Beim Pferd treten Überempfindlichkeitsreaktionen, wie die Culicoides Hypersensitivität oder die COB vermehrt auf, weshalb die Verabreichung spezifischer Allergene in steigenden Dosen eine vielversprechende Möglichkeit zur Minderung der klinischen Symptomatik darstellt (LUNN und HOROHOV, 2010). Voraussetzung hierfür ist die genaue Identifikation des Allergens, gegen welches die Hypersensibilität gerichtet ist (LUNN und HOROHOV, 2010). Die variierende Sensitivität und Spezifität der verfügbaren Testmethoden beim Pferd erschweren die Bestimmung der richtigen Allergene und somit auch den Therapieerfolg (LUNN und HOROHOV, 2010).

Eine vielversprechende Entwicklung stellt die kombinierte Anwendung mit CpG-Motiven dar, welche die Th1-Immunantwort fördert (SENTI et al., 2009). SENTI (2009) konnte beweisen, dass die kombinierte Therapie beim Menschen zu einem vielfach schnelleren Behandlungserfolg führte, als die alleinige Verabreichung spezifischer Allergene.

2.7 Diagnostik

2.7.1 Anamnese

Als wichtigster Teil der Diagnostik ist die Anamnese zu nennen. Neben dem Alter, der Art der Aufstallung, Fütterung, Nutzung und Leistungsbereitschaft des Pferdes, können so einige Hinweise auf die Art, Dauer und den Sitz der Erkrankung erlangt werden. Weiterhin sind das Auftreten von Husten oder Atemproblemen ebenso wie vorangegangene Infektionen genau zu erfassen. Voraussetzung für die Diagnose einer COB ist auf jeden Fall der Nachweis über den chronischen Verlauf der Erkrankung. Die Symptome müssen seit mindesten 6 Wochen bestehen (FEY, 2006b). Typischerweise erkranken Pferde mittleren Alters, mit einer Aufstallung auf Stroh und Fütterung mit Heu (AINSWORTH, 2010). Die Haltungform (Box, Paddock, Weide, etc.) gibt zwar keine Hinweise auf das Bestehen der Erkrankung, kann jedoch die Symptome deutlich beeinflussen und somit die Beurteilung der aktuellen klinischen Anzeichen konkretisieren.

2.7.2 Allgemeine Untersuchung

Bei mittel- und hochgradig betroffenen Pferden ist schon bei der allgemeinen Untersuchung eine stark ausgeprägt Dyspnoe auffällig. Die Atemfrequenz ist dann erhöht und auch auskultatorisch sind meist inspiratorisch und/oder expiratorisch pathologische Geräusche zu hören (MAIR und DERKSEN, 2000). Ebenso zeigt sich meist bei einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf bei der Lungenperkussion ein eventuelle erweitertes Lungenfeld nach caudo-ventral.

Schwieriger zu diagnostizieren ist die COB bei geringgradig erkrankten Patienten, die oftmals nur wegen einer unspezifischen Leistungsminderung vorgestellt werden. Das Allgemeinbefinden erscheint völlig ungestört und die Atemfrequenz bewegt sich meist im oberen Referenzbereich (MAIR und DERKSEN, 2000). Hinweise auf einen chronischen Nasenausfluss geben Depigmentierungen im Bereich der ventralen pigmentierten Nasenschleimhaut (sog. „Sekretrinnen“) (AINSWORTH, 2010). Da die meist unauffällige allgemeine Untersuchung bei geringgradig betroffenen Pferden leicht zur Unterschätzung einer pathologisch veränderten Lungenfunktion führt, sollten schon bei der Veränderung von nur einem Parameter weiterführende Untersuchungen eingeleitet werden. (ROBINSON et al., 2000).

2.7.3 Untersuchung von Blutproben

Grundsätzlich sollte eine venöse Blutprobe entnommen und auf erhöhte Entzündungsparameter untersucht werden. Somit können infektiöse Ursachen für die Atemwegproblematik ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann arterielles Blut entnommen und der arterielle Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2), der arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck (p_aCO_2) und die alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($A-aDO_2$) bestimmt werden. Hierdurch erhält man Auskunft über eine eventuelle partielle oder globale respiratorische Insuffizienz (KLEIN und DEEGEN, 1986a). Da die Diffusionsgeschwindigkeit von CO_2 um ein vielfaches höher ist als die des O_2 , fällt zu Beginn einer Störung im Ventilations-Perfusions-Verhältnis zunächst eine Erniedrigung des p_aO_2 auf (Partialinsuffizienz) (KLEIN und DEEGEN, 1986a). Bleibt die Gasaustauschstörung weiter bestehen, kommt es schließlich zum Anstieg des p_aCO_2 und somit zur Ausprägung einer Hyperkapnie (Globalinsuffizienz). Um dies zu kompensieren und vermehrt CO_2 abzugeben reagiert der Körper mit Hyperventilation.

2.7.4 Tracheobronchoskopie mit TBS- und BAL-Analyse

In der Diagnostik kommt der Tracheobronchoskopie eine entscheidende Rolle zu. In der Trachea werden Farbe und Feuchtigkeit der Schleimhaut, eventuell vorhandenes Sekret nach Menge, Viskosität und Verteilung, ebenso wie die Dicke der Bifurcatio tracheae beurteilt (GERBER et al., 2004). Außerdem werden sonstige Auffälligkeiten genau notiert.

Das Sekret eines lungengesunden Pferdes ist insgesamt zell- und schleimarm, sowie von klarer, wässriger Konsistenz (DIECKMANN und DEEGEN, 1990). Vereinzelt finden sich Alveolarmakrophagen und selten Neutrophile und Lymphozyten (MAY und GEHLEN, 2009). Die zytologischen Untersuchungen von TBS- oder BAL-Proben COB kranker Pferde ergeben meist einen typischen Anstieg der neutrophilen Granulozytenzahl (TBS >30%, BAL >25%)

(ROBINSON, 2001b; MAY und GEHLEN, 2009). Bei hochgradig erkrankten Tieren können diese auch das komplette Zellbild der Proben dominieren. Physiologisch häufig in den Proben zu sehen sind pulmonale Alveolarmakrophagen. Steigt ihre Phagozytoseaktivität an, bekommen sie durch die Füllung des Zytoplasmas mit lichtbrechenden Vakuolen ein schaumiges Aussehen (Schaumzellen oder schaumige Makrophagen) (MAY und GEHLEN, 2009). Ihr relativ vermehrtes Auftreten im Verhältnis zur Gesamtmakrophagenzahl, wird als Anzeichen für einen verlangsamten Sekrettransport aus den terminalen Lungeneinheiten interpretiert (DIECKMANN und DEEGEN, 1990). Steigt die Anzahl der schaumigen Makrophagen jedoch absolut an, so kann von einer verbesserten mukoziliären Clearance, nach vorangegangener Obstruktion und Bronchospasmus ausgegangen werden (MAY und GEHLEN, 2009). Riesenzellen (Epitheloidzellen) stellen ebenfalls eine Art Makrophagen dar, die auf erhöhte Phagozytoseaufgaben spezialisiert sind (KRAUS, 1982). Meist treten sie bei gering- und mittelgradigen Erkrankungen der Lunge im TBS auf (DIECKMANN und DEEGEN, 1990). Ebenfalls regelmäßig im TBS eines an COB erkrankten Pferdes vorkommend sind eingedickte Sekretaussgüsse der terminalen Bronchioli, sog. Curschmann-Spiralen. Sie weisen zum einen auf die Beteiligung der kleinen Atemwege, zum anderen auf die verminderte mukoziliäre Clearance und Bronchialobstruktion hin (DECONTO, 1983). In einer Probe vermehrt auftretende, spontan abgeschilferte Becherzellen stellen ein morphologisches Korrelat zur Dyskrie dar (BRUNNER und DIX, 1988). Das Auftreten von vermehrt eosinophilen Granulozyten im TBS und/oder der BAL lässt auf eine parasitäre Infektion schließen, kann aber auch bei der Hypersensitivitätsreaktion im Zuge einer allergischen Bronchitis auftreten (HARE und VIEL, 1998). In Zusammenhang mit diesen Zellen stehen die Charcot-Leyden-Kristalle, die Zerfallsprodukte der eosinophilen Entzündungszellen darstellen.

Insgesamt beschreiben viele Autoren, die für die COB typische erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten sowohl im TBS, als auch in der BAL (DERKSEN et al., 1985; DIXON et al., 1995a; DEBRUE et al., 2005). Im Vergleich zu Proben aus proximalen Anteilen des Atmungstraktes enthält die BAL-Flüssigkeit weniger Epithelzellen, jedoch mehr Makrophagen und Lymphozyten, was laut NAYLOR und Mitarbeiter (1992) die Entzündungsprozesse besser widerspiegelt.

2.7.5 Röntgenologische Untersuchung des Thorax

Die Röntgenuntersuchung des Thorax kann bei der Diagnostik der COB zusätzliche Informationen über Art und Schweregrad der Erkrankung liefern. Zudem ist sie ein unersetzliches Hilfsmittel, um andere Erkrankungen, wie Tumore oder Abszesse auszuschließen (GEHLEN et al., 2009). Um den kompletten Thorax röntgenologisch zu erfassen muss eine caudo-dorsale, eine caudo-ventrale, eine cranio-dorsale und eine cranio-ventrale Aufnahme angefertigt werden (GEHLEN et al., 2009). Bei der Beurteilung der Lunge werden die Lungenstrukturen und die durch die Lunge überlagerten Strukturen zunächst getrennt betrachtet (KÄNGSTRÖM, 1968). Röntgenologisch sind bei der chronisch obstruktiven Bronchitis eine Bronchienwandverdickung und - im Falle eines Emphysems - weniger röntgendichte Areale mit „honigwabenartigem“ Interstitium auffällig (KLEIN und OFFENEY, 1990; GEHLEN et al., 2009). Verursacht werden die typischen Röntgenbefunde zum einen durch peribronchiale Infiltrate an den Bronchien, zum anderen durch die pathologischen Luftansammlungen des Emphysems.

2.7.6 Lungenfunktionsanalyse

Unter den Begriff der Lungenfunktionsanalyse fallen verschiedene, zum Teil technisch sehr aufwändige Methoden, um die funktionelle Beeinträchtigung der Lunge objektiv beurteilbar zu machen. Am häufigsten werden die Techniken der Spirometrie und Interpleuraldruckmessung verwendet.

In der Vergangenheit wurden diverse Methoden entwickelt, um das Atemzugvolumen und den Atemfluss bei Pferden zu messen. In der Regel werden diese Parameter mittels Atemmaske bestimmt. Die älteste Messeinheit stellt das Staudruckrohr nach FLEISCH (1925) dar, welches die Druckdifferenzen in Abhängigkeit vom Strömungsverlauf misst. Ohne Maske kommt die neuere indirekte Impedanz-Spirometrie aus. Hierbei wird die elektrische Impedanz des Thorax dem Atemvolumen zugeordnet (REINHARD et al., 1972). In neuester Zeit werden Messgeräte auf der Basis der Ultraschalltechnologie eingesetzt (BUESS et al., 1993). Die Messung der Strömungsgeschwindigkeit basiert bei diesem System auf der absoluten Laufzeitmessung von Ultraschallimpulsen, welche mit bzw. gegen die Strömung wandern (BUESS et al., 1993).

Um eine noch bessere Aussage über die Lungenfunktion eines Pferdes treffen zu können wird die Spirometrie meist durch die Interpleuraldruckmessung ergänzt. Diese gilt als der diagnostisch bedeutsamste Parameter und bezeichnet die Druckdifferenz zwischen maximaler Inspiration (niedrigster Druck) und maximaler Expiration (höchster Druck) (DEEGEN und KLEIN, 1987). Die früher verwendete sehr invasive, direkte Messmethode wird heute von der indirekten Ösophagusdruckmessung abgelöst. An COB erkrankte Pferde zeigen im Vergleich zu lungengesunden Pferden einen deutlich veränderten Verlauf des Interpleuraldrucks, weshalb mit der Ösophagusdruckmessung eine Erweiterung der Diagnostik relativ leicht erreicht werden kann (KLEIN und DEEGEN, 1987, DEEGEN und KLEIN, 1987). Wie bereits BOERMA und Mitarbeiter (1986) beschrieben haben, entspricht der Druck im thorakalen Abschnitt des Ösophagus mit nur minimalen Abweichungen dem direkt durch Thoraxpunktion gemessenen interpleuralen Druck, womit die Messung über eine Ösophagussonde durchaus aussagekräftig ist und eine anerkannte Methode zur Bestimmung der Druckschwankungen im Thorax darstellt (KLEIN und DEEGEN, 1987).

2.7.7 Allergiediagnostik

2.7.7.1 Diagnostische Provokationstests

Um die bronchiale Hyperreagibilität eines erkrankten Pferdes zu diagnostizieren, können verschiedene Provokationstests zum Einsatz kommen. Der einfachste qualitative Nachweis beruht auf der natürlichen Exposition. Hierbei wird eine klinische Reaktion des Organismus durch den Kontakt mit qualitativ schlechtem Heu oder Stroh provoziert (MCGORUM et al., 1993c).

Soll jedoch eine quantitative Messung der Atemwegsreagibilität erfolgen, so wird zwischen Provokationstest, welche die spezifische und solchen welche die unspezifisch Reaktionsbereitschaft der Atemwege messen unterschieden. Durch die Inhalation von ultraschallvernebelten Schimmelpilz- oder Milbenextrakten, bakteriellen Lipopolysacchariden oder Suspensionen aus fraktioniertem Heustaub oder Futterpellets wird die spezifische Reaktion auf ausgewählte Antigene provoziert (MCPHERSON et al., 1979; MCGORUM et al., 1993c; FINK, 1998; PIRIE et al., 2001; PIRIE et al., 2002b; PIRIE et al., 2003b). Diese

Methoden werden heutzutage meist zur Erforschung der COB-Ätiologie angewandt.

Zur Ermittlung der unspezifischen Reaktionsbereitschaft des betroffenen Organismus werden Substanzen wie Histamin, Ipratropiumbromid, Metacholin oder Zitronensäure inhaliert (ARMSTRONG et al., 1986; KLEIN und DEEGEN, 1986b; ROBINSON et al., 1993).

Sowohl quantitative, als auch qualitative Inhalations-Provokationstestmethoden werden heute meist nur noch in Forschungseinrichtungen eingesetzt.

Einen weiteren in vivo Provokationstest stellt der Intrakutantest dar. Die Untersuchungen mit diesem diagnostischen Verfahren führten in der Vergangenheit zu kontroversen Ergebnissen. EVANS und Mitarbeiter (1992) zeigten, dass durch einen Intrakutantest klinisch gesunde Pferde nicht zuverlässig von COB kranken unterschieden werden können. Trotz der Verwendung verschiedener Konzentrationen von speziellen Allergenextrakten konnten sie ein positives Ergebnis nicht mit der klinischen Apparenz gleichsetzen. Somit bestimmen zum einen die Konzentration des verwendeten Antigens und zum anderen die klinische Bedeutung des Antigens, ob die Injektion eine falsch oder richtig positive Hautreaktion provoziert (EVANS et al. 1992). Ebenso konnten MCGORUM und Mitarbeiter (1993a) bei der Anwendung des Tests keinen Unterschied zwischen klinisch gesunden und COB kranken Pferden erkennen. Hierfür titrierten sie in einem Vorversuch die anzuwendende Konzentration einer Schimmelpilz-Präparation an je acht klinisch gesunden und COB kranken Pferden aus.

Gegen diese Erkenntnisse spricht eine Studie von HALLIWELL und Mitarbeiter (1979), welche bei der Untersuchung zahlreicher Schimmelpilz-, Actinomyceten-, und Staubpräparationen hoch signifikante Unterschiede zwischen gesunden und an COB erkrankten Pferden nachwies. Neben diesen kontroversen Untersuchungsergebnissen stellt die fehlende Standardisierung zur Herstellung der Allergenpräparationen ein weiteres Problem dar (MORRIS und LINDBORG, 2003).

Insgesamt dient der Intrakutantest heutzutage, trotz variierender Methodik bei Durchführung und Beurteilung, teilweise der Auswahl spezifischer Antigene für eine Hyposensibilisierung (WONG et al. 2005b).

2.7.7.2 Der funktionelle in vitro Test (FIT)

Mit dem FIT war es KAUL (1989) gelungen einen in vitro Allergietest zu entwickeln, welcher die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten zuverlässig misst und quantifiziert. Zudem arbeitet der Test mit „gewaschenem“ Vollblut und detektiert somit nur die zum Zeitpunkt der Untersuchung auf den Effektorzellen lokalisierten Antikörper.

Der Test beruht auf dem Prinzip der Messung des freigesetzten Histamins aus Typ-I Effektorzellen im Blut, im Verhältnis zur maximal möglichen Histaminfreisetzung dieser Zellen. Hierfür werden die basophilen Granulozyten in vitro mit dem zu testenden Allergen in unterschiedlichen Konzentrationen in Kontakt gebracht. Wurden die basophilen Granulozyten in vivo sensibilisiert, d.h. sind ausreichend spezifische Antikörper (hauptsächlich vom Isotyp IgE) auf deren Oberfläche gebunden, reagieren sie mit einer Histaminfreisetzung (ROHWER et al., 2008).

Die Menge des freigesetzten Histamins wird mittels Radioimmunoassay quantifiziert und mit der Menge ins Verhältnis gesetzt, welche durch physikalische Freisetzung (Kochen der Zellen) oder durch Bindung eines spezifischen Antikörpers maximal erreicht werden kann. Die Höhe des Verhältnisses gibt das Maß der Sensibilisierung der basophilen Granulozyten an und entscheidet, ob ein Pferd in Bezug auf das getestete Allergen insgesamt als sensibilisiert anzusehen ist.

Im Vergleich zu verschiedenen in vivo Provokationstests (Intrakutantest, Inhalationstest), wie von MCGORUM und Mitarbeitern (1993a, 1993b) oder KLEIN und DEEGEN (1986b) praktiziert, stellt der FIT eine sichere und quantitativ genau beurteilbare Methode mit einem hohen Maß an Spezifität und Sensitivität dar. Den Pferden wird lediglich das Probenmaterial, im Normalfall Blut, entnommen und so der belastende Kontakt mit eventuellen Allergenen erspart.

2.7.7.3 Der Cellular Antigen Stimulations Test (CAST)

Bei diesem Test werden nach Stimulation der Leukozyten mittels Antigen die neusynthetisierten Sulfido-Leukotriene quantitativ mit einem Immunoassay auf ELISA-Basis bestimmt (RENZ et al. 2002). Ähnlich dem FIT kommt auch bei diesem Test gewaschenes Vollblut als Probenmaterial zum Einsatz. Nachteilig stellt sich hierbei die Tatsache dar, dass bei der 40-minütigen Inkubationszeit der Zellen mit Antigen auch andere Zellen in gewissem Maß die zu untersuchenden Mediatoren freisetzen können. Aus diesem Grund konnten BASELGA und Mitarbeiter (2006) in ihrer Studie nur einen Wert von 61% für die richtig positiven Testergebnissen ermitteln.

2.7.7.4 Serologischer Nachweis von IgE

Um spezifisches IgE aus dem Serum nachzuweisen stehen heutzutage diverse kommerzielle, allerdings nicht spezifisch für das Pferd entwickelte Tests zur Verfügung. Die meisten dieser Verfahren arbeiten überwiegend mit humanen polyklonalen Antikörpern und stützen ihre Aussagekraft auf die Kreuzreaktivität zwischen humanen und equinen Antikörpern (WONG et al. 2005a). LORCH und Mitarbeiter (2001) konnten in einer Studie beweisen, dass der FcεR1alpha-ELISA gegenüber zwei anderen untersuchten ELISAs im Vergleich zum Intrakutantest am besten abschneidet. Insgesamt zeichnen sich jedoch alle drei Methoden durch eine niedrige Sensitivität aus und liefern keine verlässlichen Informationen (LORCH et al. 2001).

2.8 Therapieformen

Das grundsätzliche Ziel der Behandlungsmaßnahmen besteht zum einen in der Vermeidung von Exazerbationen und zum anderen in der Verbesserung der klinischen Symptome mit Stabilisierung des COB-Patienten auf einem zufriedenstellenden Niveau (FEY, 2006b).

2.8.1 Haltungsoptimierung

Die optimale Anpassung von Management und Fütterung der Pferde stellt mit Sicherheit den bedeutendsten Teil der Therapie bei der COB dar

(LÉGUILLETTE, 2003; AINSWORTH, 2010). Grundvoraussetzung ist die Vermeidung jeglicher Stäube, besonders Heu- und Strohstaub und stets ausreichend frische Luft, sei es durch das andauernde Halten des Pferdes in einem Offenstall oder auf der Weide oder aber durch Boxenhaltung in einem sehr gut belüfteten Stall. Bei letzterem sollte bei der Art der Einstreu komplett auf Stroh, ebenso wie auf Sägemehl verzichtet werden (alternativ: Papier- oder Holzspäne, Gummimatten, feuchter Torf) (ROBINSON et al., 2001). Es ist darauf zu achten, dass die Einstreu so häufig gewechselt wird, dass kein Ammoniakgeruch wahrnehmbar ist (FEY, 2006b). Neben der Stroheinstreu stellt die Fütterung von Heu ein großes Problem dar. Bestenfalls wird die Raufütterung auf Silage umgestellt oder komplett durch gepresste Futtermittel ersetzt (Heucobs, Pellets) (LÉGUILLETTE, 2003). Oftmals ist jedoch die Akzeptanz der Pferde gegenüber diesen Futtermitteln nicht zufriedenstellend oder deren Beschaffung für den Besitzer nicht realisierbar. Auch können Obstipationskoliken oder Verhaltensprobleme entstehen, weshalb sich die meisten Besitzer für das Einweichen von Heu in Wasser entscheiden (FEY, 2006b). Wichtig ist dabei, das zu verfütternde Heu nicht nur mit Wasser zu benetzt oder zu übergießen, sondern für mehrere Stunden in einem geeigneten Gefäß komplett einzuweichen (ROBINSON et al., 2001). Ebenso sollte eventuell nicht staubfreies Kraffutter feucht verfüttert werden (FEY, 2006b).

Im Gegensatz zu akuten Bronchitiden ist bei der COB eine der individuellen Leistungsfähigkeit angepasste Bewegung des Pferdes hilfreich, da hierdurch die Clearancefunktion der Lunge und der Atemwege gesteigert wird (FEY, 2006b).

Zwar stellt die Haltungsoptimierung den wichtigsten Teil der COB-Therapie dar, jedoch auch gleichzeitig den aufwändigsten. Bei einer kompletten oder teilweisen Boxenhaltung ist es oftmals für die Besitzer schwierig die optimalen Bedingungen für ihr Pferd zu schaffen, da die Fütterung und Haltung der benachbarten Pferde ebenfalls angepasst werden müsste, um einen andauernden und ausreichenden Effekt auf das erkrankte Pferd zu erzielen (LÉGUILLETTE, 2003). Zudem stellt die Beschaffung und Vorbereitung der Futtermittel einen erhöhten Kosten- und Zeitaufwand dar. Frustrierend können auch akute Krankheitsschübe sein, die durch einen ungewollten, oft nur wenige Minuten andauernden Kontakt zu Heu- oder Strohstaub ausgelöst werden können (ROBINSON et al., 2001).

2.8.2 Medikamentöse Therapie

Wo bei geringgradigen Krankheitsfällen schon eine Haltungsoptimierung zur Symptombefreiheit führen kann, ist bei mittel- oder hochgradig erkrankten Pferden meist eine symptomatische Therapie durch ausgewählte Medikamente indiziert.

2.8.2.1 Entzündungshemmende Wirkung

Die Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) zur Behandlung der entzündlichen Schiene der COB gilt als nicht wirksam oder sogar kontraindiziert, da sie die Produktion des Prostaglandin E₂ (PGE₂) hemmen. PGE₂ wirkt Entzündungsreaktionen im Atmungstrakt entgegen und verhindert Bronchospasmen (ROBINSON et al., 2001).

Die Wirkstoffgruppe der Wahl stellen die Glukokortikoide dar. Sie hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Eikosanoiden und verhindern die „Downregulation“ von β_2 – Adrenozeptoren (ROBINSON et al.,

2001). Dadurch wird ein schnell eintretender schleimhautabschwellender Effekt mit einer antiödematöse Wirkung und einer Verringerung der zellulären Infiltrate erreicht (FEY, 2006b). Bei der Anwendung sollte stets auf kurzwirksame Vertreter zurückgegriffen werden, um die Gefahr einer Hufrehe zu minimieren (LÉGUILLETTE, 2003). In der deutschsprachigen Literatur wird der orale Einsatz von Prednisolon (0,5 bis 1,0 mg/kg KM 2 x tägl.) oder Dexamethason (0,04 mg/kg KM 1 x tägl.) empfohlen (FEY, 2006b). Nach 3- bis 5-tägiger Gabe sollte die Dosis um etwa 1/10 der Initialdosis reduziert und ausgeschlichen werden (FEY, 2006b). Auch die Hyperreagibilität der Atemwege kann durch Glukokortikoide herabgesetzt werden (FEY, 2006b).

2.8.2.2 Bronchospasmolyse

Zur Behandlung des Bronchospasmus stehen grundsätzlich die Gruppen der Sympathomimetika, der Parasympatholytika und der Phosphodiesterasehemmer zur Verfügung. Letztere und von diesen am bekanntesten die Xanthine wirken über die Aktivierung der Kalziumpumpen entspannend auf die glatte Muskulatur der Bronchien, haben jedoch eine sehr geringe therapeutische Breite (FEY, 2006b). Unerwünschte Effekte sind Tachykardie, Unruhe und Hypertonie. Auf Grund der hohen Nebenwirkungen und fehlender, zugelassener Medikamente spielen die Phosphodiesterasehemmer bei der Behandlung von Atemwegserkrankungen beim Pferd keine Rolle.

Die bekanntesten Vertreter der Parasympatholytika sind Atropin, Butylscopolamin und in der Humanmedizin Ipratropiumbromid. Besonders die intravenöse Gabe von Atropin gilt als äußerst effektiv bei der Behandlung akuter Dyspnoe (ROBINSON et al., 2001). Da diese Substanzen jedoch nicht spezifisch an der Bronchialmuskulatur wirken und somit auch andere anticholinerge Effekte zu erwarten sind, sollte die Anwendung auf eine einmalige Gabe limitiert werden (ROBINSON et al., 2001). Auftretende Nebenwirkungen sind Tachykardie, Erschlaffung der Magen-Darm-Muskulatur und Verminderung der Sekretionstätigkeit (LÉGUILLETTE, 2003).

Die in der Pferdemedizin am weitesten verbreiteten Vertreter der Sympathomimetika sind die β_2 -Agonisten und unter diesen im Besonderen das Clenbuterol (ROBINSON, 2001b). Die Substanz greift spezifisch an β_2 -Rezeptoren an, wie sie an den glatten Muskelzellen der Atemwege, im Uterus oder an Gefäßen vorkommen (MAIR und DERKSEN, 2000). In der deutschsprachigen Literatur gilt die orale Gabe von 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM 2 x tägl. als therapeutische Dosis (FEY, 2006b). Im englischsprachigen Raum werden Dosen bis zu 3,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM 2 x tägl. empfohlen (ROBINSON, 2001b). Neben dem spasmolytischen Effekt steigern β_2 -Agonisten zusätzlich die mukoziliäre Clearance und wirken antiinflammatorisch (LECLERE et al., 2011). Auf Grund der Herunterregulation der β_2 -Rezeptoren bei längerer Anwendung der Agonisten, sollte die Therapie nur zeitweise erfolgen.

2.8.2.3 Expektorantien

Um der Dys- und Hyperkrinie entgegen zu wirken können Sekretolytika, Mukolytika und Sekretomotorika zum Einsatz kommen.

Als Sekretolytika gelten Substanzen, welche die wässrige Sekretion des Bronchialepithels steigern und somit den Abtransport der angesammelten

Mukusmassen durch eine gesteigerte Zilienaktivität erleichtern (FEY, 2006b). Als beim Pferd wirksame Substanzen gelten Dembrexin (0,3 mg/kg KM 2 x tägl. p.o.), Bromhexin (0,1 - 0,2 mg/kg KM) und Ambroxol (0,6 mg/kg KM 2 x tägl. p.o.) (MAIR und DERKSEN, 2000; FEY, 2006b). Bei ungenügender Wirkung der Sekretolytika auf die klinische Symptomatik wird der Einsatz der Hyperinfusionstherapie als sekretolytisch wirksame Maßnahme beschrieben (FEY, 2006b). Hierbei wird intragastral (über eine Nasenschlundsonde) oder intravenös eine große Menge 0,9%-iger NaCl-Lösung (67 ml/kg KM) an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (FEY, 2006b). Folge ist ein geringgradiges, iatrogenes, intraalveoläres Lungenödem, was dazu führen soll, dass die nach kranial abzutransportierende Flüssigkeit die in den Atemwegen haftenden Schleimb Bestandteile löst. In der englischsprachigen Literatur gilt die Methode der Hyperinfusionstherapie als umstritten und weniger wirksam (LÉGUILLLETTE, 2003; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Bei Mukolytika wird die Viskosität des Sekrets durch Spaltung der oftmals stark untereinander vernetzten Mukopolysaccharide und Mukoproteine herabgesetzt (FEY, 2006b). Der einzige zugelassene Wirkstoff für dieses Anwendungsgebiet beim Pferd ist momentan das Acetylcystein (10 mg/kg KM 2 x tägl. p.o.) (MAIR und DERKSEN, 2000; FEY, 2006b). Es spaltet Disulfidbrücken und erreicht so ein wasserlöslicheres Sekret.

Unter Sekretomotorika werden Wirkstoffe verstanden, die die Aktivität des Flimmerepithels der Bronchialschleimhaut steigern (FEY, 2006b). Neben dem β_2 -Sympathomimetikum Clenbuterol besitzt auch das Dembrexin eine starke sekretomotorische Wirkung (FEY, 2006b; LECLERE et al., 2011).

2.8.3 Inhalation von Arzneimitteln

Die inhalative Verabreichung von Wirkstoffen besitzt im Gegensatz zur systemischen Applikation die Vorteile der möglichen Dosisreduktion und der lokalen Anwendung und somit der Wirkung der Medikamente am Bestimmungsort (FEY, 2006b). Beide Vorteile verringern das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwirkungen.

Um einen ausreichenden Effekt der Wirkstoffe zu erreichen müssen die Tröpfchen des Aerosols bis in die kleinen Atemwege und Alveolen gelangen. Dies wird nur mit einer Partikelgröße von 1-5 μm erreicht (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Größere Partikel setzen sich bereits in den oberen Atemwegen ab und werden abgeschluckt, was unter Umständen zu systemischen Nebenwirkungen führen kann (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Bei zu kleinen Partikeln (< 0,5 μm) besteht die Möglichkeit, dass sie ohne Wirkung wieder ausgeatmet werden.

Da zur inhalativen Therapie keine Tierarzneimittel zur Verfügung stehen, muss über die Umwidnungskaskade auf humanmedizinische Präparate zurückgegriffen werden. Hier haben sich das Glukokortikoid Beclometason (500-3750 μg 2 x tägl.) und der β_2 -Agonist Salbutamol (360-1000 μg) als äußerst wirksam erwiesen (ROBINSON et al., 2001; NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Ebenso gelten Anticholinergika, wie das Ipratropiumbromid, als sehr effektiv (MAIR und DERKSEN, 2000). Grundsätzlich sollten Bronchodilatoren bei Anwendung über einen längeren Zeitraum nicht ohne Glukokortikoide eingesetzt werden, da sonst zwar die klinische Symptomatik (Bronchospasmus), jedoch nicht die Ursache (Entzündung) therapiert wird (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

Durch die präventive Anwendung von Cromoglycinsäure als Mastzellstabilisator wird von einem mehrwöchigen (bis zu 24 Tage) Schutz vor der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren bei Allergenexposition ausgegangen (MAIR und DERKSEN, 2000).

Ergänzend zu allen Therapieverfahren, kann die inhalative Verabreichung von isotonischer Kochsalzlösung sehr hilfreich sein. Sie bewirkt einen osmotischen Effekt auf der Bronchialschleimhaut, reduziert so die Viskosität des Sekrets und verbessert die mukoziliäre Clearance (FEY, 2006b).

3. Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN)

3.1 Geschichtliche Entwicklung

Bereits vor über 100 Jahre wurden bei ersten klinischen Versuchen am Menschen lebende Bakterien zur immunstimulatorischen Anti-Tumortherapie eingesetzt (WEINER, 2000). Allerdings konnte erst in den 1980er Jahren die bakterielle DNA als die immunstimulatorische Komponente identifiziert werden (TOKUNAGA et al., 1984; TOKUNAGA et al., 1988; YAMAMOTO et al., 1988). TOKUNAGA und Mitarbeiter (1988) und YAMAMOTO und Mitarbeiter (1988, 1992) zeigten, dass bakterielle DNA zu einer gesteigerten Aktivität der natürlichen Killerzellen und einer vermehrten Sekretion von IFN- γ führt.

Welche Abschnitte der DNA für die beobachtete immunstimulatorische Wirkung im Säugerorganismus verantwortlich waren untersuchten KRIEG und Mitarbeiter (1995) in den 1990er Jahren. Sie konnten beweisen, dass B-Lymphozyten durch Oligonukleotide, welche ein CpG-Motiv enthalten, am stärksten aktiviert werden (KRIEG et al., 1995). Das zentrale Cytosin-Guanin-Dinukleotid wird hierbei von zwei Purin- und zwei Pyrimidinbasen eingeschlossen (5´ - P₁P₂ CpG Py₁Py₂ - 3´) (KRIEG et al., 1995). Die besten Ergebnisse erzielten KRIEG und Mitarbeiter (1995) mit einem Motiv, bei welchem für P₁ ein Guanin, für P₂ ein Adenin, für Py₁ ein Thymin und für Py₂ ein Thymin oder Cytosin steht.

Weitere Studien zeigten Unterschiede in der immunstimulatorischen Wirkung bestimmter CpG-Sequenzen auf verschiedene Spezies (HARTMANN et al., 2000; BAUER et al., 2001; MUTWIRI et al., 2003). Diese sequenzabhängige Speziespezifität wird hauptsächlich von den, das zentrale CpG-Motiv flankierenden Basen, beeinflusst (HARTMANN et al., 2000). Im Jahre 1998 konnte diese spezifische Sequenz für die Maus bestimmt werden (5´-GACGTT-3´) (YI et al., 1998). Zwei Jahre später gelang dies auch für den Menschen (5´-GTCGTT-3´) (HARTMANN et al., 2000). RANKIN und Mitarbeiter (2001) konnten anhand von umfangreichen Studien an verschiedenen Tierarten diese humane Sequenz als die effektivste bei fast allen untersuchten Spezies (Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein, Hund, Katze, Huhn) benennen (RANKIN et al., 2001).

Eine ideale CpG-Sequenz für das Pferd wurde 2004 von ÓLAFSDÓTTIR und TORSTEINSDÓTTIR das erste Mal beschrieben (5´-CTGTT-3´). Allerdings ist diese Sequenz in keiner anderen Publikation zu finden. Im Jahr 2011 untersuchten KLIER und Mitarbeiter in einer in vitro Studie die immunstimulatorische Wirkung unterschiedlicher CpG-Motive auf equine BAL-Zellen (KLIER et al., 2011). Anders als von RANKIN und Mitarbeitern (2001) beschrieben, zeigte die humane Sequenz in dieser Studie keine effektive Stimulation der BAL-Zellen (KLIER et al., 2011). Dies lässt sich auf die Unterschiede in den vorherrschenden Zellpopulationen der mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und der BAL-Zellen zurückführen (KLIER et

al., 2011). Als effektivste Sequenz wurde die CpG-ODN Klasse A 2216 ermittelt: 5'-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G-3' (*Phosphothioester) (KLIER et al., 2011). Diese Klasse besitzt ein gemischtes Zuckerrückgrat aus Phosphodiester und Phosphothioester, was sie sehr anfällig für Nukleasen macht (VOLLMER und KRIEG, 2009). Somit ist ein in vivo Einsatz dieser CpG-ODN nicht ohne weiteres möglich.

3.2 Wirkungsmechanismen der CpG-ODN

Laut der „Hygiene Hypothese“ wird das juvenile Immunsystem durch die Exposition gegenüber Bakterien, Viren oder deren Produkte zur Ausbildung einer stabilen, zellvermittelten, proinflammatorischen Th1-Immunität stimuliert und gleichzeitig die Allergie-vermittelte, humorale Th2-Antwort unterdrückt (KLINKE, 2007). Erfolgte dieser mikrobielle Kontakt in der Jugend nicht oder nicht ausreichend, ist eine lebenslange Tendenz des Organismus zur Th2-Immunantwort möglich, was sich in Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber ungefährlichen Antigenen äußern kann (KLINKE, 2007).

Für den immunstimulatorischen Effekt von mikrobieller DNA im Säugerorganismus sind Cytosin-Phosphat-Guanin-reiche Sequenzen verantwortlich (WEINER, 2000). Diese Motive kommen in bakterieller DNA durchschnittlich alle 16 Dinukleotide vor, wohingegen im Säuger genom nur etwa ein Viertel so viel CG-Dinukleotide vertreten sind (WEINER, 2000). Dieses Phänomen bezeichnen KRIEG und Mitarbeiter (1995) als „CpG-Suppression“.

Ein Grund für das verminderte Auftreten von Cytosin-Phosphat-Guanin-Sequenzen im eukaryontischen Genom besteht in deren Methylierungsgrad. Immunstimulatorische CpG-Motive liegen immer unmethyliert vor, wohingegen sie im Säuger genom zu 70% methyliert sind (BOHLE, 2002). Da diese methylierten Sequenzen „hotspots“ für Mutationen zu Thymin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide darstellen, ist das Vorliegen von CpG-Motiven im Säuger genom deutlich reduziert (BOHLE, 2002). Somit dient der Nachweis von unmethylierten CpG-Motiven im Körper dem Immunsystem als Früherkennung einer möglichen mikrobiellen Infektion und führt zur Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen (BOHLE, 2002).

3.2.1 Molekulare Mechanismen

Nach dem Kontakt der CpG-ODN mit der Zielzelle, binden diese an spezielle sequenzunabhängige DNA-Oberflächenproteine und werden über Endozytose ins Zellinnere aufgenommen (FONSECA und KLINKE, 2009). Die ODN-Aufnahmekapazität der unterschiedlichen Zellen ist sehr variable. So besitzen beispielsweise B-Lymphozyten und Makrophagen eine weitaus höhere endosomale Aufnahmefähigkeit als T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (KRIEG, 2002a). In den säurehaltigen endosomalen Kompartimenten wird über die Bindung der DNA-Sequenzen an den toll-like receptor-9 (TLR-9) die Zelle aktiviert (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Neben dem TLR-9 existieren noch weitere Rezeptorklassen, welche alle jedoch eine individuelle Ligandenspezifität aufweisen. So detektieren TLR-4 nur Lipopolysaccharide (LPS) aus Bakterien, TLR-3, TLR-7 und TLR-8 nur RNA und TLR-9 nur DNA (VOLLMER und KRIEG, 2009). Wohingegen die meisten TLRs (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10, -11) auf der Zelloberfläche ausgebildet werden, ist der

TLR-9 ausschließlich im Zellinneren, in Endosomen lokalisiert (FONSECA und KLINE, 2009). Die bisher einzigen Immunzellen beim Menschen, von welchen die Expression des TLR-9 bewiesen ist, sind B-Lymphozyten und plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Allerdings konnte dieser auch in nicht-Immunzellen wie Lungenepithelien, Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen und nach Zellaktivierung in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und CD4⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (VOLLMER und KRIEG, 2009). Beim Pferd konnten SCHNEBERGER und Mitarbeiter (2009) die Expression von TLR-9 in pulmonalen Zellen wie intravaskuläre Makrophagen, Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen und Typ-II-Alveolarepithelzellen beweisen.

Der toll-like-Rezeptor 9 stellt den Schlüsselmechanismus zwischen CpG-ODN und Immunantwort dar, was durch TLR-9-knock-out Mäuse, welche keine ODN-induzierte Aktivierung von B-Lymphozyten, DC oder NK zeigen, bewiesen werden konnte (KRIEG, 2002a). Eine Studie mit TLR-9 unterschiedlicher Spezies (Mensch, Maus) in Kombination mit spezifischen CpG-ODN hat gezeigt, dass dieser Rezeptor für die variierende Wirkungsweise, also die Speziespezifität der unterschiedlichen CpG-Klassen verantwortlich ist (KRIEG, 2002a).

Über die Dimerisierung der Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Moleküle (TIR), welche eine zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne des TLR-9 darstellen, kommt es zur allosterischen Konformationsänderung der TIR-Domäne und zur Rekrutierung von Signaladaptormolekülen (MyD88) (VOLLMER und KRIEG, 2009). MyD88 bindet nun an den zytoplasmatischen Abschnitt des TLR-9 und initiiert so über die Phosphorylierung von Signaltransduktionsmoleküle, wie „IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase“ (IRAK), „mitogenaktivierte Proteinkinase“ (MAPK) oder „IFN regulatory factors“, die CpG-ODN vermittelten Effekte (VOLLMER und KRIEG, 2009). Ein weiterer Abschnitt der Signalkaskade besteht in der Aktivierung des I κ B α -Kinase-Komplex (IKK), welcher die auf den NF- κ B inhibitorisch-wirkenden Proteine abbaut und somit zytoplasmatisch gelegene NF- κ B-Moleküle für den Weg in den Zellkern freisetzt (KRIEG, 2002a). Das Resultat dieses Stufenprozesses ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor- κ B“ (NF- κ B), mit anschließender Produktion von Zytokinen und Expression kostimulatorischer Moleküle in den Zielzellen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Neben der Aktivierung des NF- κ B besteht ein zweiter MyD88-abhängiger Weg, welcher ebenfalls aus einem Komplex mit IRAK-1, IRAK-4, „TNF receptor-associated factor 6“ (TRAF 6) und zusätzlich „interferon-regulatory factor 7“ (IRF-7) besteht (VOLLMER und KRIEG, 2009). Über die Phosphorylierung des IRF-7 wird die Genexpression von Typ-1 Interferonen stimuliert und die NF- κ B-Aktivierung unterbleibt (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Um die TLR-9-spezifischen Immunreaktionen zu regulieren, bestehen verschiedene Kontrollmechanismen. Prozesse und Produkte wie die Cyclooxygenase-2 (COX-2), „die NO Synthase 2“ (NOS 2), die Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostaglandin E2 (PGE 2) und dem regulatorischen Zytokin IL-10 werden durch CpG-ODN stimuliert, wobei sie gleichzeitig über ein negatives Feedback die Effekte der DNA-Sequenzen herunterregulieren (VOLLMER und KRIEG, 2009). Weitere negative Regulatoren des TLR-9-Signalwegs sind IRAK-M, „suppressors of cytokine signaling“ (SOCS), „MAPK-Phosphatase“ (MKP)-1 und „single immunoglobulin IL-1R-related molecule“ (SIGIRR) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Diese Kontrolleinheiten unterstützen die Bildung von Treg-Zellen und unterdrücken sowohl die T-Lymphozyten-Expansion, als auch die zytotoxische T-Zell-Aktivität (VOLLMER und KRIEG, 2009). Nach VOLLMER und KRIEG (2009) können diese Mechanismen möglicherweise die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindern.

3.2.2 Immunologie

Nach der Aufnahme der CpG-ODN in den Zellkern kommt es über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Ausschüttung verschiedener Zytokine- und Chemokine (FONSECA und KLINE, 2009). Eine zentrale Rolle spielt hier das IL-12, da es durch die Schaffung eines Th1-Zytokin-Milieus die Th1-Zell-Differenzierung (Th1-Shift) aus naiven CD4⁺-T-Helfer-Zellen induziert und indirekt über IFN- γ Th2-spezifische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) unterdrückt (FONSECA und KLINE, 2009). Hierfür spricht auch die Tatsache, dass CpG-ODN ihre immunmodulatorischen Effekte bei Mäusen, welche mit anti-IL-12-Antikörper behandelt wurden, verloren haben (BOHLE, 2002). Durch die Th2-Interleukine 4, 5 und 13 werden eosinophile Granulozyten und Mastzellen angelockt und zur Degranulation stimuliert, zudem induzieren sie die IgE-Produktion durch B-Lymphozyten (FONSECA und KLINE, 2009).

Die bedeutendsten Zellen zur Freisetzung von IL-12 sind die APCs (Antigen-präsentierende Zellen), im Speziellen aktivierte Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (DC) (WEINER, 2000). Natürliche Killerzellen und T-Helfer-Zellen, hauptsächlich aktiviert durch IL-12 und IL-18 aus APCs und nur in geringem Maß durch CpG-ODN direkt, produzieren das Zytokin IFN- γ , welches wiederum stimulatorisch auf APCs und inhibitorisch auf Th2-Zytokine wirkt (WEINER, 2000). Zusätzlich besitzt dieses Interferon auch eine steigernde Wirkung auf die IL-6 und IL-10 Produktion von B-Lymphozyten (KRIEG, 2002a).

Einen weiteren wichtigen Mediator, um ein Th1-Shift zu erreichen stellt das IFN- α dar, welches ebenfalls in APCs gebildet wird (BOHLE, 2002). Es stellt eine bedeutende Komponente der Immunantwort auf virale Infektionen dar (KRIEG, 2002a). Als die bedeutendste Quelle der IFN- α -Produktion werden die plasmazytoiden dendritischen Zellen angesehen (BOHLE, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit allergischem Asthma reduzierte IFN- α -Level im Blut vorliegen (BOHLE, 2002).

Neben den Th1-Lymphozyten werden, durch die Aktivierung mit IL-10 aus DC, auch allergenspezifische regulatorische Zellen (Treg) produziert (FONSECA und KLINE, 2009). Diese T-Lymphozyten besitzen durch ihre Produktion von IL-10 sowohl auf Th1-, als auch auf Th2-Immunantworten eine regulatorische Wirkung (BOHLE, 2002; FONSECA und KLINE, 2009). Ebenso verhindern sie eine immunologische Antwort auf körpereigene Antigene (BOHLE, 2002). Trotz der inhibitorischen Wirkung der Treg auf naive und aktivierte Th1-Lymphozyten ist die spezifische Immuntherapie bei einer Überempfindlichkeit gegen Insektengift nur mit dem Einfluss von Treg erfolgreich (BOHLE, 2002).

Entscheidend für die T-Lymphozyten-Differenzierung sind spezielle Transkriptionsfaktoren. Diese sind für die Th1-Immunantwort der Faktor T-bet und für die Th2-Immunantwort die Faktoren GATA3 und STAT6 (FONSECA und KLINE, 2009). Da bekannt ist, dass T-bet einen durch IFN- γ vermittelten Immunglobulin-Isotypenswitch induziert, wurden die Effekte von CpG-ODN auf T-bet in B-Lymphozyten untersucht (FONSECA und KLINE, 2009). Neben einer erhöhten Expression von T-bet in behandelten B-Zellen konnte auch eine vermehrte Induktion von IgG2a und eine Suppression von IgG1 und IgE festgestellt werden (Isotypenswitch) (FONSECA und KLINE, 2009). Zusätzlich kommt es zu einer Konkurrenz der verbleibenden, Allergie-vermittelten IgE und der IgG2 um die gemeinsame Bindungsstelle an den Mastzellen (FONSECA und KLINE, 2009). Durch die Verdrängung der IgE-Subtypen bleibt eine Mastzelldegranulation aus und somit auch die allergischen Symptome (FONSECA und KLINE, 2009).

Neben dem Einfluss durch IFN- γ auf die Immunglobulinproduktion besitzen die CpG-ODN, speziell die der B-Klasse, über den TLR-9 einen direkten Effekt auf B-Lymphozyten (KRIEG, 2002a). Sie induzieren die IL-6 und IL-10 Synthese, was zur Produktion von IgM und Reduktion von IL-12-Sekretion führt (KRIEG, 2002a). Zusätzlich kommt es, wie auch bei anderen APCs, zur vermehrten Ausbildung von „major histocompatibility complex I und II“ (MHC-I und -II) und anderen costimulatorischen Molekülen (KRIEG, 2002a)

3.3 Einteilung in Klassen

Ein zentrales Cytosin-Guanin-Dinukleotid bildet zusammen mit seinen vier flankierenden Basen ein spezifisches CpG-Motiv. Die variable Struktur dieses sogenannten Hexamers ist verantwortlich für die Wirkung auf spezielle Zellen des Immunsystems (VOLLMER und KRIEG, 2009). Zusätzliche Abweichungen bezüglich der immunstimulatorischen Wirkung sind durch variierende Primär- oder Sekundärstrukturen des Motivs gegeben (VOLLMER und KRIEG, 2009). Hierbei sind die Menge der enthaltenen CpG-Dinukleotide, ihr Abstand und ihre Anordnung zueinander, das Vorhandensein von Poly-Guanin-Sequenzen und das Zuckerrückgrat von Bedeutung (KRIEG, 2006). Insgesamt werden drei Hauptklassen unterschieden (A-, B-, C-Klasse) (VOLLMER et al., 2004).

Die Struktur der A-Klasse ist gekennzeichnet durch eine zentrale Phosphodiesterregion, bestehend aus mehreren Cytosin-Guanin-Motiven in palindromischer Anordnung (KRIEG, 2006). Flankiert werden die Sequenzen von Poly-Guanin-Schwänzen mit einem Phosphothioesterrückgrat am 5'- und 3'-Ende (KRIEG, 2006). Von anderen Autoren wird diese Klasse auch als D-Typ bezeichnet (KRIEG, 2002b).

Das gemischte Zuckerrückgrat, oder auch Rückgratchimäre genannt, im speziellen die Phosphodiesterregion, der A-Klasse ist besonders anfällig für DNAsen, was einen in vivo Einsatz dieser CpG-ODN nicht ohne weiteres möglich macht (SENTI et al., 2009). Dahingegen sorgen die Poly-G-Sequenzen an den Flanken für eine verbesserte Stabilität, eine gesteigerte endosomale Aufnahme und somit eine erhöhte intrazelluläre Konzentration um die Rezeptoren (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Die CpG-A ODN besitzen neben einer aktivierenden Wirkung auf NK-Zellen eine starke stimulatorische Wirkung auf die Reifung von antigenpräsentierenden Zellen (APC), was zu einer großen Produktion von IFN- α und IFN- β durch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) führt (SENTI et al., 2009). Auf andere TLR9 abhängigen Effekte, wie die Reifung der pDC oder Vermehrung der B-Lymphozyten, besitzt die A-Klasse einen nur schwachen Einfluss (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Die B-Klasse, auch bekannt als K-Typ, besitzt eine lineare Struktur mit einem kompletten Phosphothioesterrückgrat, was sie somit deutlich stabiler gegenüber ubiquitären Nukleasen macht (KRIEG, 2006). Zu dieser Klasse gehören die CpG-Motive, welche als optimal für Mensch und Maus ermittelt wurden (s. II Literaturübersicht, Kap. 4.1) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Die Wirkung beruht auf einer starken Stimulierung von B-Lymphozyten und einer Reifeinduktion von pDC und Monozyten (VOLLMER und KRIEG, 2009). Die Produktion von IFN- α und IFN- β wird nur in geringem Maß gefördert (SENTI et al., 2009).

Als dritte Untereinheit wird die C-Klasse beschrieben, welche die positiven Eigenschaften der A- und B-Klasse kombiniert und somit sowohl B-Lymphozyten

als auch pDC stimuliert (VOLLMER und KRIEG, 2009). Folge ist eine vermehrte Sekretion von IL-6, Immunglobulin Typ-M (IgM) und IFN- α (SENTI et al., 2009). Verantwortlich wird dafür die einzigartige Struktur der ODN gemacht, welche aus mindestens einem CpG-Motiv in der Nähe des 5'-Ende und einer, durch Thymin verbundenen, palindromischen Sequenz am 3'-Ende besteht (KRIEG, 2006; VOLLMER und KRIEG, 2009). Dieses Palindrom ermöglicht eine Doppelformation von zwei aneinander gelagerten Motiven innerhalb eines Endosoms (KRIEG, 2006). Durch ihre hohe Stabilität besitzen sowohl die C-Klasse, als auch die B-Klasse eine Halbwertszeit von zwei Tagen im Gewebe (SENTI et al., 2009).

VOLLMER und KRIEG (2009) beschreiben außerdem noch eine sogenannte P-Klasse, welche ein Cytosin-Guanin-reiches Palindrom am 3'-Ende und ein C-G-armes am 5'-Ende enthält. Diese doppelpalindromische Struktur scheint für die bisher stärkste Typ I IFN-Induktion durch CpG-ODN verantwortlich zu sein (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Eine letzte Gruppe stellen die suppressiven Oligodeoxynukleotide dar (S-Klasse), welche die immunstimulatorischen Effekte der CpG-ODN blockieren (VOLLMER und KRIEG, 2009). Zudem sind S-Klasse ODN in der Lage die TLR-7 und TLR-8 vermittelten Immunantworten zu hemmen und somit einen therapeutischen Effekt bei rheumatischer Arthritis und systemischen Lupus erythematosus zu erzielen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

3.4 Therapeutischer Einsatz

Der Effekt von CpG-ODN auf periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) verschiedener Tierarten wurde bereits in einigen in vitro Studien untersucht (RANKIN et al., 2001; LIU et al., 2008; ZWIOREK et al., 2008). Der Schwerpunkt lag darauf, die Hochregulation von Th1-Zytokinen in Bezug auf variierende CpG-Motive zu beurteilen und somit sequenzabhängige speziesspezifische Unterschiede zu ermitteln.

Ebenso zeigten sich bei der in vivo Anwendung von CpG-ODN vielversprechende Erfolge.

3.4.1 CpG-ODN als Vakzineadjuvans

Die meisten der heutzutage eingesetzten Adjuvanzien nehmen nur einen positiven Einfluss auf die Th2-Antwort, steigern allerdings nicht die zelluläre Immunreaktion (WEINER, 2000). Der meistverbreitete Vertreter bei kommerziellen Impfstoffen ist das Aluminiumhydroxid, welches jedoch die Aktivierung von CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten blockiert (WEINER, 2000). Im Gegensatz dazu steigern CpG-ODN, als TLR9-Agonisten, sowohl die antigen-spezifische humorale, als auch die zelluläre Immunantwort (KRIEG, 2006). VOLLMER und KRIEG (2009) machen für diesen starken Effekt auf die humorale Immunantwort ein Zusammenspiel von TLR9 und antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptoren, eine Hemmung der B-Lymphozyten-Apoptose und eine Stimulation der Immunglobulin Typ-G (IgG) Produktion verantwortlich. Zusätzlich zeigen CpG-ODN, im Vergleich zu anderen Wirkverstärkern wie dem Freund-Adjuvans, keine lokale Entzündungsreaktion am Applikationsort (WEINER, 2000). Die Verabreichung der Oligodeoxynukleotide kann laut KRIEG (2006) oral, vaginal, rektal, konjunktival, inhalativ oder transdermal erfolgen, ohne deren

Adjuvansaktivität zu verlieren, wobei die Wirkung über die Schleimhaut neben der systemischen Reaktion auch eine lokale Immunität induziert.

In einer Studie am Menschen wurden ODN der Klasse B als Adjuvans in Kombination mit einer Hepatitis B Impfung eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Hepatitis B-spezifischen Antikörper bei Probanden, die mit der CpG-ODN-Vakzine geimpft wurden, früher und in Verbindung mit einem höheren Titer auftraten als bei der Kontrollgruppe (VOLLMER und KRIEG, 2009). Die meisten Probanden der Versuchsgruppe (92%) erreichten bereits 2 Wochen nach der ersten Impfung protektive Antikörperlevel, während bei der Kontrollgruppe eine solche Beobachtung nicht gemacht werden konnte (0%) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Zudem zeigten die Probanden nach der zweiten Dosis CpG-ODN und Vakzine einen 30mal höheren Antikörpertiter als die Kontrollgruppe (WEINER, 2000).

Eine Anthrax-Impfstudie bewies eine deutlich schnellere Serokonversion durch den kombinierten Einsatz mit CpG-ODN B (KRIEG, 2006). Während die Kontrollgruppe ihren Maximalwert an Toxin-neutralisierenden Antikörpern am Tag 46 erreichte, erzeugte die Versuchsgruppe denselben Wert bereits nach 22 Tagen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Durch den kombinierten Einsatz von CpG-ODN und Vakzine kann die Dosis des Impfantigens verringert, somit gesundheitliche Risiken minimiert und eine ausreichende Produktion des Impfstoffes gewährleistet werden, was gerade bei der Herstellung von Influenzavakzinen entscheidend ist (VOLLMER und KRIEG, 2009). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch das Einbauen von CpG-Sequenzen die Impfdosis um 99% verringert werden kann (VOLLMER und KRIEG, 2009). So wird mit nur einem Zehntel der normalen Impfdosis in Kombination mit CpG-ODN das gleiche IFN- γ -Level erreicht, wie mit der vollen Dosis (KRIEG, 2006).

3.4.2 Vorbeugung und Bekämpfung infektiöser Erkrankungen

Da der Einsatz von CpG-ODN einen Wechsel zur Th1-Immunantwort stimuliert liegt die Vermutung nahe, dass dies, durch die Verbesserung der angeborenen Immunität, von Nutzen bei der Vorbeugung und Behandlung infektiöser Krankheiten sein kann (WEINER, 2000). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der prophylaktische Einsatz von TLR-9-Agonisten bei Mäusen einen vorübergehenden Schutz gegen ein weites Feld von viralen, bakteriellen und einigen parasitären Krankheitserregern bietet (VOLLMER und KRIEG, 2009). Der Schutz vor, unter anderem tödlichen Erregern wie *Bacillus anthracis*, Ebola, Vakziniavirus oder auch *Listeria monocytogenes* und *Francisella tularensis* reichte je nach Modell und Applikationsart der CpG-ODN von einem Tag bis zu zwei Wochen (VOLLMER und KRIEG, 2009). Auch die Verabreichung post infectionem verbessert die Überlebenschancen und führt zu einem therapeutischen Nutzen bei chronischen Erkrankungen (VOLLMER und KRIEG, 2009). Erste Erfolge konnten bereits durch den Einsatz von C-Klasse CpG-ODN bei chronisch an Hepatitis C erkrankten Patienten erzielt werden. In einer Phase 1b Studie führte die ODN-Monotherapie zu einem Absinken der Virus-RNA Level im Blut (VOLLMER und KRIEG, 2009). Auf Grund der hohen Rezidivrate nach Abschluss der Therapie bedarf es in dieser Hinsicht jedoch weiterer Untersuchungen.

3.4.3 Anti-Tumor-Therapie

Schon in den 1890er Jahren erreichte Dr. William Coley durch die, direkt in die Tumormasse verabreichte Injektion von zu Anfang lebenden Streptokokken und später durch Hitze abgetötete gram-positive und gram-negative Bakterien (Coley's Toxin) eine Tumorregression (WEINER, 2000). Zu späterer Zeit wurde erkannt, dass für diesen therapeutischen Effekt des Coley's Toxins mit hoher Wahrscheinlichkeit die bakterielle DNA und deren Einfluss auf das Immunsystem verantwortlich war (WEINER, 2000). Heutzutage ist bekannt, dass CpG-ODN neben einem direkten Effekt auf Immunzellpopulationen wie natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen, welche alle eine wichtige Rolle in der anti-Tumor-Immunität spielen, auch einen steigernden Effekt auf die Produktion von einigen anti-Tumor wirksamen Zytokinen besitzen (TNF- α , IL-12, IFN- γ) (WEINER, 2000).

In verschiedenen Mausmodellen konnte ein synergistischer Effekt bei der kombinierten Anwendung von CpG-ODN und anderen Tumortherapieverfahren, wie die Behandlung mit monoklonalen anti-Tumor-Antikörpern, Radiotherapie, Chemotherapie und chirurgische Verfahren, gezeigt werden (VOLLMER und KRIEG, 2009). WEINER (2000) applizierte Mäusen, welche am murinen B-Zell-Lymphom 38C13 litten, zum einen CpG-ODN als Monotherapie und zum anderen als Kombination mit anti-Tumor-Antikörpern. Die Monotherapie führte zu keiner erkennbaren Steigerung der Überlebensrate, wohingegen die Kombinationstherapie, im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit Antikörpern, die Chancen auf Eliminierung der Tumorlast auf das 30fache erhöhte (WEINER, 2000).

Ebenso konnten VOLLMER und KRIEG (2009) in einer Phase II Studie am Menschen eine Wirksamkeit von B-Klasse CpG-ODN in Kombination mit einer Standard-Taxan/Platin Chemotherapie bei Lungenkrebs nachweisen. Wo in der Kontrollgruppe (alleinige Chemotherapie) nur 19% auf die Therapie ansprachen, zeigten in der Gruppe mit der kombinierten Therapie 38% einen positiven Effekt (VOLLMER und KRIEG, 2009). Die mittlere Überlebenszeit belief sich bei der Monotherapie auf 6,8 Monate, bei der Kombinationstherapie auf 12,3 Monate (VOLLMER und KRIEG, 2009). Phase III Studien an Menschen mit inoperablen Tumorstadien konnten keine Verbesserung der allgemeinen oder progressionsfreien Überlebenszeit zeigen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

3.4.4 Kombinierte spezifische Immuntherapie

Bei Allergien oder allergisch bedingten Erkrankungen reagiert das Immunsystem auf spezielle Antigene mit einer starken Th2-Antwort. Die Behandlung dieser Überempfindlichkeitsreaktionen mit Hilfe der spezifischen Immuntherapie, also der Verabreichung steigender Mengen an Antigenextrakten, ist bereits seit mehr als 80 Jahren bekannt (BOHLE, 2002). An sensibilisierten Mäusen konnte bewiesen werden, dass inhalativ verabreichte CpG-ODN die Th1/Th2-Balance zu Gunsten der Th1-Antwort verschieben, somit eine Eosinophilie der Atemwege verhindern und einer bronchialen Hyperreagibilität vorbeugen (WEINER, 2000). Mit diesen Erkenntnissen stellte sich die Frage, ob beide Therapien kombiniert werden können. TIGHE und Mitarbeiter (2000) koppelten immunstimulatorische DNA an spezifische Antigene und erzielten somit durch eine antigenspezifische Th1-Immunantwort einen optimalen Therapieerfolg. Zusätzlich führt dieses Verfahren zu einer verstärkten Antigenaufnahme und reduziert die benötigte Antigenmenge (TIGHE et al., 2000).

Auch in der Humanmedizin konnten bereits mehrere Studien erfolgreich abgeschlossen werden (MARSHALL et al., 2001; SPIEGELBERG und RAZ, 2002; SENTI et al., 2009). Die kombinierte Therapie führte bei Probanden zu einem deutlichen Anstieg allergenspezifischer IgG-Antikörper und bereits nach 10-wöchiger Behandlung praktisch zur Symptombefreiheit (SENTI et al., 2009). Eine solche klinische Verbesserung ist bei der konventionellen Immuntherapie mit der alleinigen Applikation von spezifischen Allergenen erst nach ca. zwei Jahren zu erwarten (SENTI et al., 2009).

4. Gelatinenanoartikel

Im Gegensatz zu den CpG-ODN Klassen B und C besitzt die A-Klasse, auf Grund des fehlenden Phosphothioesterrückgrats, eine sehr kurze Halbwertszeit im Gewebe und wird durch ubiquitäre DNAsen schnell abgebaut (ZWIOREK et al., 2008). Allgemein besteht bei ungebundenen CpG-ODN eine erschwerte Aufnahme in die Zellen und eine verminderte zelluläre Spezifität (ZWIOREK et al., 2008). Neben diesen zellulären Nachteilen der unverpackten CpG-ODN kann es zusätzlich zu einer Verteilung im Organismus kommen, was sich in einer Splenomegalie oder toxischen Schockreaktionen äußern kann (STORNI et al., 2004).

Um diese Probleme zu lösen wurden verschiedene Transportsysteme entwickelt, an welche die DNA-Moleküle gekoppelt wurden. So können CpG-ODN in ihre Zielzellen befördert und ihre immunstimulatorische Wirkung sogar verstärkt werden (ZWIOREK et al., 2008; WILSON et al., 2009). Ein entscheidender Vorteil der Kombination von Oligodeoxynukleotide und nanopartikelärem Trägersystem ist die Aufnahme der DNA-Moleküle in regionäre Lymphknoten und somit eine unterbleibende systemische Ausbreitung (STORNI et al., 2004; BOURQUIN et al., 2008). Zusätzlich steigern die Nanopartikel die lokale Phagozytose, wodurch die CpG-ODN direkt an die Toll-like-Rezeptoren-9 (TLR-9) innerhalb der Endosomen gelangen (STORNI et al., 2004).

Als äußerst vielversprechendes Transportsystem erwiesen sich Gelatinenanoartikel (GNP). ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) verknüpften die kationisierten GNP mit negativ geladenen CpG-ODN über elektrostatische Anziehung. Die Kationisierung wurde durch die Kopplung mit Cholamin und über dessen quaternäre Aminogruppe erreicht (ZWIOREK et al., 2008). Bei dieser Methode sitzen die DNA-Moleküle auf der Oberfläche des Transportsystems und sind so in der Lage das Immunsystem schneller zu aktivieren (ZWIOREK et al., 2008). Hergestellt werden die Gelatinenanoartikel aus Gelatine Typ A, welche aus Schweinehaut (175 Bloom) extrahiert wird (ZWIOREK et al., 2008).

Gegenüber anderen Transportsystemen besitzen die GNP den Vorteil immunologisch inert zu sein (ZWIOREK et al., 2008). Somit wird auch bei wiederholtem Einsatz der Nanopartikel keine immunologische Reaktion provoziert. Zudem erwiesen sich GNP als biologisch sehr gut verträglich und abbaubar (BOURQUIN et al., 2008; TSENG et al., 2009; KLIER et al., 2011).

4.1 In vitro- und In vivo-Einsatz von GNP

In ihrer Studie bezeichneten ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) bei der Beladung der GNP ein Verhältnis von 1:20 (5 %) als optimal. Bei einer höheren Beladung können vermehrt Aggregationen der GNP beobachtet werden, die aus der

neutralen Oberfläche der Partikel und der somit fehlenden elektrostatischen Wechselwirkungen resultieren (ZWIOREK et al., 2008).

In einem *in vitro* Versuch konnte nachgewiesen werden, dass nach zwölf stündiger Inkubation von CpG-ODN/GNP mit murinen myeloiden dendritischen Zellen (DC) 68% der Zellen die nanopartikulär gebundenen DNA-Moleküle aufgenommen hatten, wohingegen unbeladene, nichtkationisierte GNP nur von 33% der Zellen aufgenommen wurden (ZWIOREK et al., 2008). Zudem konnte bewiesen werden, dass der Hauptaufnahmemechanismus der Zellen, im Besonderen der Abwehrzellen, die Phagozytose ist, was vermutlich auf die Größe der Formulierungen zurückzuschließen ist, die den Größenverhältnissen von Mikroorganismen ähnelt (ZWIOREK et al., 2008).

Nach einer Inkubation der murinen myeloiden DC von 24 Stunden wurden von ZWIOREK und Mitarbeitern (2008) mittels quantitativem ELISA spezifische Th1-Zytokine bestimmt (IL-12 p70, IL-6, TNF- α). Mit diesem Verfahren konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN gebunden an GNP einen zwei- bis dreifach stärkeren Anstieg des IL-12 p70 und einen sieben- bis neunfach stärkeren Anstieg des TNF- α auslösen, im Vergleich zu ungebundene CpG-ODN (ZWIOREK et al., 2008). Zudem wird durch die nanopartikulär gebundenen CpG-ODN die Expression der Oberflächenmoleküle MHC-II und CD86 durch die dendritischen Zellen hochreguliert, wodurch diese in ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu prägen und zu aktivieren verbessert werden (ZWIOREK et al., 2008).

Um zu beweisen, dass CpG-ODN durch die Bindung an GNP auch *in vivo* immunstimulatorisch wirksam sind, wurden zwei GNP unterschiedlicher Größe mit jeweils der gleichen CpG-Klasse beladen und Mäusen intravenös verabreicht (ZWIOREK et al., 2008). Als positiver Kontrollwert wurden ungebundene CpG-ODN eingesetzt. Während unbeladene GNP zu keiner Zytokinproduktion führten, konnte 18 Stunden nach der Injektion bei den größeren Partikeln (300 nm) eine dreifach höhere IL-12-Produktion und eine leichte Erhöhung der IL-6 Werte, im Vergleich zu denen der ungebundenen CpG-ODN festgestellt werden (ZWIOREK et al., 2008). Die kleineren Nanopartikel (150 nm) erlangten einen Zytokinanstieg, der dem der ungebundenen DNA-Moleküle entsprach.

Eine immunologische Reaktion auf die GNP selbst wurde durch eine dreiwöchige Versuchsreihe ausgeschlossen. Den Mäusen wurde zweimal im Abstand von 14 Tagen CpG-ODN/GNP subkutan verabreicht und nach weiteren sieben Tagen deren Antikörperlevel mittel ELISA ermittelt (ZWIOREK et al., 2008). Keine der behandelten Mäuse zeigte einen Anstieg der spezifischen Antikörper. Als positiv Kontrolle wurden GNP zusammen mit Freund-Adjuvans appliziert, was zu einem deutlichen IgG-Anstieg führte (ZWIOREK et al., 2008). Somit konnte eine direkte Immunantwort auf die Proteinmatrix des Trägersystems ausgeschlossen werden (ZWIOREK et al., 2008).

ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) konnten weder *in vitro* noch *in vivo* toxische Effekte durch die Anwendung von GNP nachweisen.

4.2 Inhalative Anwendung von GNP

Gelatinen nanopartikel sind als Trägersysteme dafür verantwortlich gebundene Substanzen an deren Bestimmungsort zu transportieren. Sollen Zellen des Respirationstrakts Ziel der Formulierungen sein, so stellt die Inhalation ein bewährtes Transportsystem dar. Die Stabilität der GNP nach Vernebelung konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (TSENG et al., 2009; KLIER et al.,

2012). Klier und Mitarbeiter (2012) konnten eine immunologische Reaktion durch inhalativ verabreichte CpG-ODN gebunden an GNP beweisen. In der Studie wurde ein Effekt von CpG-ODN/GNP auf Bronchoalveolarzellen *in vitro* nachgewiesen (KLIER et al., 2012). Dieser Effekt konnte durch Vernebelung und Inhalation am Pferd ebenso *in vivo* gezeigt werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Inhalation von GNP ein stabiles Transportsystem darstellt.

Voraussetzung für eine Inhalation bis in die Alveolen ist eine Partikelgröße des Aerosols von 1-5 μm , was nur durch einen leistungsstarken, geeigneten Vernebler zu erreichen ist (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

III MATERIAL UND METHODEN

1. Studiendesign und Zielsetzung

In dieser Studie sollte die therapeutische Wirkung von inhalativ verabreichten nanopartikulär gebundenen CpG-ODN in Zusammenhang mit spezifischen Allergenen untersucht werden.

Der spezifisch immunmodulatorische Effekt der CpG-ODN wurde in Bezug auf das Verhältnis von Therapiedauer und Länge des Effekts genauer untersucht. Im Besonderen sollte die Frage beantwortet werden, ob die Inhalation von spezifischen Allergenen in Kombination mit der Inhalation von A-Typ CpG-ODN einen hyposensibilisierenden Effekt bewirkt.

Hierfür wurden die Studienteilnehmer (n = 21) nach einer Eingangsuntersuchung in geringgradig, mittelgradig und hochgradig an COB erkrankt eingestuft. Die Zuordnung zur jeweiligen Erkrankungsgruppe erfolgte anhand eines standardisierten Untersuchungsplans (s. IX Anhang, Kap. 2. und 4.).

11 Pferde wurden mit entsprechend ausgewählten Allergenen und nanopartikulär gebundenen CpG-ODN inhaliert, zehn Pferde erhielten die alleinige Inhalation der nanopartikulär gebundenen CpG-ODN. Die Zuteilung zur jeweiligen Gruppe erfolgte per Losverfahren, wobei aus den drei Erkrankungsstufen getrennt gelost wurde. So konnte gewährleistet werden, dass bezüglich des Erkrankungsgrades die Gruppen homogen verteilt waren. Zwei Probanden schieden während der Versuchsdauer auf Grund von Kortisongabe oder Euthanasie aus. Die Gründe hierfür standen nicht mit der Studie in Zusammenhang.

Die Studie sah insgesamt bei jedem Pferd sieben Inhalationen (s. III Material und Methoden, Kap. 8.2) mit zwei anschließenden Folgeuntersuchungen (s. III Material und Methoden, Kap. 9.) vor.

Die Behandlung der Pferde erfolgte jeweils im Heimatstall unter gewohnter Umgebung. Somit konnte eine Veränderung der Symptomatik auf Grund eines Ortswechsels, bzw. einer Haltungsänderung ausgeschlossen werden.

Die Studie wurde als Tierversuch von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 55.2-1-54-2531-31-10).

2. Bewertung mittels Punktesystem

Alle Pferde wurden am Ende der Erstuntersuchung anhand eines standardisierten Punktesystems in lungengesund, geringgradig, mittelgradig oder hochgradig an COB erkrankt eingestuft (s. IX Anhang, Kap. 3.). Das Scoring-System berücksichtigte die Befunde der Anamnese und der allgemeinen und speziellen Untersuchung, ebenso wie die weiterführenden Untersuchungen (arterielle Blutgase, Interpleuraldruckmessung, Tracheobronchoskopie mit zytologischer Untersuchung des TBS). Die Befunde jeder Untersuchung wurden nach ihrem Schweregrad mit einer Punktzahl bewertet und daraus die Summe gebildet. Somit konnten auch, die zum Teil nicht direkt messbaren Parameter semiquantitativ in die Bewertung mit einfließen.

Direkt messbare Parameter (Atemfrequenz, Ergebnisse der Blutgasanalyse und Interpleuraldruckmessung, Scoring-Punkte der endoskopischen Untersuchung

nach GERBER et al. (2004), Menge der neutrophilen Granulozyten) wurden festgelegten Wertebereichen zugeordnet und diese mit Punkten bewertet.

Bei subjektiv zu beurteilenden Parametern wurden nach standardisierten Definitionen Punkte verteilt und so möglichst objektiv bewertet.

Die maximal zu erreichenden Punkte der einzelnen Untersuchungen sind in Tab. 1 zu sehen.

Tab. 1: Maximal zu erreichende Punktzahlen der einzelnen Untersuchungen.

Untersuchung	maximale Punktzahl
Anamnese, klinische Allgemeinuntersuchung (Husten auslösbar, Husten, Nasenausfluss, Atemfrequenz, Atemtyp, Dampfrinne/Zwischenrippenatmung, Lungenauskultation, Lungenfeld)	23
Blutgasanalyse (p_aO_2 , p_aCO_2 , A-aDO ₂)	9
indirekte interpleurale Druckmessung	3
endoskopische Untersuchung (Trachealsekretmenge, Trachealsekretkonsistenz, Schleimhautschwellung)	9
TBS-Zytologie (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Curschmann-Spiralen)	10
Summe	54

Der Grad der Erkrankung wurde anhand der errechneten Summe aller erzielten Punkte ermittelt (s. Tab. 2). Somit war es möglich Pferde aus unterschiedlichen Krankheitsstadien für die Studie zu evaluieren, wodurch eine Einschätzung des Therapieerfolgs auf den gesamten Krankheitsverlauf getroffen werden konnte.

Tab. 2: Einteilung des Erkrankungsgrads mit Hilfe der Summe aller erzielten Punkte.

gesund	0 – 4 Punkte
geringgradige COB	5 – 21 Punkte
mittelgradige COB	22 – 38 Punkte
hochgradige COB	39 - 54 Punkte

In die vorliegende Studie wurden nur Pferde eingeschlossen, welche zweifelsfrei an COB erkrankt waren.

3. Ein- und Ausschlusskriterien

Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war es, dass der Besitzer oder Halter des Pferdes das Tier zumindest ein Jahr lang kannte, um die Zuverlässigkeit der vorberichtlichen Aussagen zu erhöhen. Das Mindestalter der Teilnehmer wurde auf sieben Jahre festgelegt. Die Dauer der respiratorischen Symptomatik musste bei jedem Pferd mindestens 12 Monate betragen. Somit konnte eine gewisse Chronizität in Zusammenhang mit einer eventuellen Saisonalität erkannt werden.

Die letzte medikamentöse Behandlung, im Besonderen mit lungenfunktionsbeeinflussenden Medikamenten, durfte nicht kürzer als zwei Monate her sein.

Ausschlusskriterien waren Befunde der allgemeinen oder speziellen Untersuchung, die auf anderweitige organische Erkrankungen hindeuteten oder ein Punkteergebnis im Lungenscoring von weniger als vier Punkten. Zudem wurden Pferde, die während der Studie, das heißt vor der letzten Untersuchung nach sechs Wochen, medikamentös behandelt werden mussten, komplett von der Studie ausgeschlossen.

4. Besitzeraufklärung

Die Besitzer der Pferde, welche sich auf Grund der Befunde der Erstuntersuchung und der Ein- und Ausschlusskriterien als für die Studie geeignet erwiesen, wurden über den genauen Ablauf der Studie informiert. Die Einverständniserklärung der Patientenbesitzer zur Teilnahme an der Studie und die Aufklärung wurden schriftlich festgehalten.

5. Patientengut

Die eigenen Untersuchungen fanden an insgesamt 21 Pferden mit einem mittleren Alter von $17,43 \pm 5,14$ Jahren zwischen Juni 2012 und November 2012 statt (s. IX Anhang, Kap. 1.). Die Studienteilnehmer entstammten zum einen dem Patientengut der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München, zum anderen wurde die Gruppe durch Vermittlungen von Haustierärzten/Haustierärztinnen und direkte Anfragen an Pferdebesitzer ergänzt. Alle Pferde fielen anamnestisch durch chronischen Husten, Leistungsabfall oder Atemnot auf.

Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war für alle Tiere das Erfüllen definierter Einschlusskriterien (s. III Material und Methoden, Kap. 3.). Ebenso musste bei jedem Pferd ein Zeitraum von mindestens zwei Monaten ohne medikamentöse Behandlung gewährleistet sein.

6. Anamnese

Vor der Erstuntersuchung wurde ein ausführlicher Vorbericht erhoben, welcher die gängigen Daten zu Besitzer und Pferd beinhaltet. Ebenso wurden die Nutzung, etwaige Vorerkrankungen, der genaue Impf- und Entwurmungsstatus und eventuelle Vorbehandlungen erfragt. Auch Angaben zu aktuellen Symptomen wie Nasenausfluss (Menge, Farbe, Konsistenz), Leistungsabfall, Husten (Charakter, Häufigkeit, Zeitpunkt) und Dyspnoe wurden aufgenommen. Die Antworten auf Fragen zum vermuteten Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns, bzw. Beginn einer Verschlechterung der Symptomatik und zum Auftreten sowie Ausprägung der Symptome wurden genau erfasst.

Besondere Beachtung galt der Haltung und Aufstallung, inklusive der Art der Einstreu und des Fütterungsmanagement. Hierfür wurde ein kurzer Fragebogen konzipiert, welcher von allen Pferdebesitzern auszufüllen war. Bei der Aufstallung wurde zwischen Box, Paddock, Offenstall und Weide unterschieden. Im Falle einer Box oder Unterstands war anzugeben, welche Einstreu (Stroh, Sägemehl, Sägespäne, Torf, Sonstige) dort verwendet wurde und aus welchem Material die Wände (Holz, Fliesen, Sonstige) waren. Ebenso wurde erfragt, ob ein eventueller Boxennachbar anders aufgestallt oder gefüttert wurde, als das eigene Pferd. Das Fütterungsmanagement wurde möglichst genau erfasst (Heu nass/trocken, Müsli nass/trocken, Silage, Gras, Heucobs, Pellets, Sonstige). Bei einer eventuell wiederkehrenden Verschlechterung der Symptomatik wurde der Zeitpunkt in Bezug auf die Jahreszeit, den Aufenthaltsort (Box, Weide) und den Zusammenhang zur körperlichen Belastung (vor, während nach Belastung) erfragt. Eine vermehrte Staubexposition durch vorwiegende Bewegung in der Reithalle oder dem Reitplatz wurde in Verbindung mit einer eventuellen Bewässerung der Trainingsfläche ermittelt. Zuletzt wurde das Wachsen ausgewählter Bäume und Sträucher in unmittelbarer Umgebung zum Stall abgefragt. Außerdem hatten die Pferdebesitzer die Möglichkeit am Ende des Fragebogens eigene Beobachtungen im Zusammenhang mit auftretenden Symptomen zu notieren.

7. Klinische Erstuntersuchung

Zu Beginn wurden alle Pferde einer klinischen Allgemeinuntersuchung (1. US) in Ruhe unterzogen. Hier wurden neben der Körperhaltung, dem Verhalten und Habitus, auch der Ernährungs- und Pflegezustand des Pferdes festgehalten. Weiter wurden die rektale Körpertemperatur, die Herz- und Atemfrequenz und die kapilläre Füllungszeit gemessen. Außerdem wurden die Farbe der Schleimhäute, die Herzauskultation und die Lnn. mandibulares beurteilt.

Anschließend erfolgte die spezielle Untersuchung des Atmungstraktes, wobei auf eine Belastungsuntersuchung auf Grund der unterschiedlichen konditionellen Verfassung der Pferde verzichtet wurde.

7.1 Spezielle klinische Untersuchung

7.1.1 Untersuchung des Atmungstraktes

Waren vorberichtlich Hinweise auf eine Erkrankung im Bereich der Atemwege oder der Lunge gegeben, lag das Hauptaugenmerk der speziellen klinischen Untersuchung auf dem Respirationstrakt.

Die Untersuchung beinhaltete unter anderem die Beurteilung der Qualität der Atemtätigkeit, bzw. die Differenzierung einer evtl. Dyspnoe nach inspiratorisch (verlängerte Einatmung, Einsinken der Intercostalmuskulatur, Nüsternblähen) oder expiratorisch (verlängerte Ausatmung, biphasische Expiration, Dampf Rinne, Afteratmung, Nüsternblähen) und die Bestimmung des Atemtyps. Zudem wurde adspektorisch etwaiger Nasenausfluss erfasst und nach Qualität und Quantität beurteilt.

Es wurde während der gesamten Untersuchung auf spontanen Husten geachtet und zuletzt versucht durch manuellen Druck auf die ersten Trachealspangen Hustenstöße auszulösen. Neben der Anzahl wurde auch die Qualität solcher aufgezeichnet.

Abschließend erfolgten eine sorgfältige Auskultation von Kehlkopf, Trachea und Lunge und eine Perkussion der caudo-ventralen Lungengrenzen.

Um die nicht direkt messbaren vorberichtlich und klinisch erfassten Parameter auswerten zu können, wurden sie mittels eines Punkte-Systems semiquantitativ bewertet. Ebenfalls mit in die Punktebewertung floss die ermittelte Ruhe-Atemfrequenz ein. Die Einteilung erfolgte in Anlehnung an das von OHNESORGE und Mitarbeiter (1998) entwickelte Scoring-System (s. Tab. 3).

Somit wurde ein auslösbarer Husten mit 1 bewertet. War dies nicht möglich wurde die Punktezahl 0 vergeben.

Ein anamnestischer Husten wurde in 0 = „kein Husten“ bis 3 = „spontan, bzw. vorberichtlich anfallsweise“ unterteilt.

Für den gezeigten Nasenausfluss wurden Punkte von 0 bis 3 verwendet, wobei 0 = „kein Nasenausfluss“ und 3 = „hochgradig muköser Nasenausfluss“ bezeichnete.

Die Bewertung des Atemtyps erfolgte von 0 Punkten = „costoabdominal“ bis 4 Punkte = „Nüsternblähen in Ruhe“. Einzeln bewertet wurde hierbei eine Dampf Rinne oder Zwischenrippenatmung einmalig mit 3 Punkten.

Tab. 3: Bewertung der anamnestischen und klinischen Befunde.

Parameter		Punkte
Husten auslösbar	nein	0
	ja	1
Husten	keiner	0
	vorberichtlich selten	1
	vorberichtlich mehrmals täglich	2
	spontan, bzw. vorberichtlich anfallsweise	3
Nasenausfluss	keiner	0
	ggr. serös	1
	ggr.-mgr. sero-mukös	2
	hgr. mukös	3
Atemfrequenz in Ruhe	≤ 16 / min.	0
	17 – 22 / min.	2
	≥ 23 / min.	3
Atemtyp	costoabdominal	0
	ggr. abdominal verstärkt	2
	deutlich abdominal verstärkt	3
	Nüsternblähen in Ruhe	4
Dampfrinne, Zwischenrippenatmung	nein	0
	ja	3
Lungenauskultation	physiologisch	0
	ggr. inspiratorisch verschärft	1
	inspiratorisch verschärft und ggr. expiratorische Atemgeräusche	2
	mgr. in- und expiratorische Atemgeräusche und/oder tracheale Rasselgeräusche	3
	hgr. expiratorische Atemgeräusche und/oder Hiemen, Giemen	4
Lungenfeld	physiologisch	0
	ggr. vergrößert	1
	deutlich vergrößert	2

7.1.1.1 Auskultation des Respirationstraktes

Im Zuge der speziellen Untersuchung des Respirationstraktes wurden der Kehlkopf, die Trachea und die Lunge schematisch auskultiert. Begonnen wurde im Bereich des Larynx und der Apertura thoracis um die Atemgeräusche der oberen luftleitenden Wege beurteilen und eventuelle Sekretansammlungen in der Trachea erfassen zu können. Anschließend wurde die rechte und linke Lunge vergleichend beurteilt. Die Auskultationspunkte befanden sich an der Bifurcatio tracheae, den Lobi caudales und den Spitzenlappen (OTTO et al., 2002).

Insgesamt wurde sowohl auf abnorme Atemgeräusche wie Giemen, Rasseln oder Knistern als auch auf eine veränderte in- oder expiratorische Atemtätigkeit geachtet.

Die Bewertungsskala für die Lungenauskultation reichte von 0 = „physiologisch“ bis 4 = „hgr. expiratorische Atemgeräusche und/oder Hiemen, Giemen“.

7.1.1.2 Lungenperkussion

Zur Bestimmung der Lungengrenzen wurden bei allen Pferden beide Thoraxseiten mit Hilfe eines Perkussionshammers und eines Plessimeters interkostal perkutiert. Die physiologischen Grenzen des Lungenperkussionsfeldes wurden durch eine Verbindungslinie ermittelt, die den 16. IKR auf Höhe des unteren Randes des Tuber coxae, den 14. IKR auf Höhe des unteren Randes des Tuber ischiadicum und den 10. IKR auf Höhe des Tuberculum majus des Humerus verbindet (DEEGEN und GLITZ, 2002).

Der Lungenschall wurde qualitativ bewertet und es wurde auf Abweichungen, wie tympanischer oder gedämpfter Schall, geachtet. Weiterhin wurden eventuell vergrößerte Lungengrenzen ausgemessen, notiert und mit Score-Punkten bewertet. Hierbei entsprachen 0 Punkte = „Physiologisch“ und 2 Punkte = „deutlich vergrößert“ (s. Tab. 3).

7.1.2 Weiterführende Untersuchungen

Im Folgenden werden die weiterführenden Untersuchungen beschrieben, welche jeweils vor der ersten Inhalation, 2 Tage nach der letzten Inhalation und 6 Wochen nach der letzten Inhalation durchgeführt wurden. Sie galten zur Sicherung der Diagnose (Voruntersuchung) und zur Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung. Zudem sollte so ein möglicher therapeutischer Erfolg überprüft werden.

7.1.2.1 Arterielle Blutgasanalyse

Zu Beginn der weiterführenden Untersuchungen wurde arterielles Blut aus der rechten Arteria carotis communis entnommen. Die Punktion erfolgte nach Desinfektion in der rechten Drosselrinne etwa handbreit proximal der Apertura thoracis mit einer Kanüle 22G (BD Microlance™, 0,7 mm x 30 mm, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) (KLEIN und DEEGEN, 1986a). Das aus dem Kanülenkonus austretende Blut wurde luftblasenfrei in eine heparinisierte Monovette (Sarstedt Monovette®, 2ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) aufgezogen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nach der Aspiration die im Konus der Monovette verbleibende Luftblase sofort ausgedrückt wird. Die Analyse der Partialdrücke von Sauerstoff (p_aO_2) und Kohlenstoffdioxid (p_aCO_2) erfolgte umgehend mit Hilfe eines automatischen Blutgasanalysegerätes (IRMA TruPoint® Blood Analysis System, ITC, Edison, NJ). Unmittelbar vor der Probengewinnung wurde die rektale Körpertemperatur ermittelt und in das Gerät eingegeben.

Um einen, vom aktuellen Luftdruck und der Körpertemperatur unabhängigen und somit vergleichbareren Wert zu erlangen, wurde bei jeder Messung die alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($A-aDO_2$) bestimmt. Bei diesem Parameter wird neben den gemessenen Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrücken auch der aktuelle Luftdruck berücksichtigt.

Zur Berechnung diente folgende Formel (GRABNER, 2005a):

$$p_aO_2 = (p_B [\text{mmHg}] - 47 [\text{mmHg}]) \times 0,2095 - p_aCO_2 [\text{mmHg}]$$

$$A-aDO_2 = p_aO_2 - p_aO_2$$

Referenzwerte bei NN (GRABNER, 2005a):

p_aO_2 :	95-105 mmHg
p_aCO_2 :	35-45 mmHg
A-aDO ₂ :	5,4 ± 5,1 mmHg

Dabei steht p_B für den aktuellen Luftdruck während der Blutentnahme. Die Wasserdampfdruck-Konstante 47 spiegelt den Wasserdampfdruck der Ausatemluft von 47 mmHg bei 37 °C Körpertemperatur wieder, während der Faktor 0,2095 den prozentualen Sauerstoffgehalt (20,95 Vol.-%) der Atemluft angibt.

Wie von GRABNER (2005a) beschrieben, kann durch die gemessenen Werte der Schweregrad der Erkrankung wie folgt abgeschätzt werden:

latent	p_aO_2 90-95 mmHg	A-aDO₂ < 10 mmHg
geringgradig	80-90 mmHg	10-15 mmHg
mittelgradig	65-80 mmHg	15-25 mmHg
hochgradig	< 65 mmHg	> 25 mmHg

Die Punktevergabe zur endgültigen Ermittlung des Schweregrads der COB im Scoring-System richtete sich nach der Einteilung von GRABNER (2005a) (s. Tab. 4).

Tab. 4: Bewertung der Blutgasanalyse.

		Punkte
p_aCO_2 in mmHg	≤ 45	0
	> 45	2
p_aO_2 in mmHg	> 95	0
	90 – 95	1
	80 – 90	2
	65 – 80	3
	< 65	4
A-aDO ₂ in mmHg	< 10	0
	10 – 15	1
	15 – 25	2
	> 25	3

7.1.2.2 Venöse Blutuntersuchung

Neben der arteriellen Blutgasanalyse wurde jedem Pferd bei allen drei Untersuchungen auch venöses Blut entnommen. Hierfür wurde die V. jugularis externa nach Desinfektion, am Übergang vom oberen in das mittlere Halsdrittel mit einer 18G Kanüle punktiert (BD Microlance™, 1,2 x 50mm, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) (WISSDORF et al., 2002). Das so gewonnene Blut wurde in EDTA-, Natriumcitrat- und Serumröhrchen (S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgefüllt. Von den Proben wurde im klinikeigenen Labor ein Differenzialzellbild erstellt. Zudem wurden die absolute Leukozytenzahl und die Gesamteiweißkonzentration bestimmt. Routinemäßig wurde auch das rote Blutbild analysiert (Hämatokrit, Erythrozytenanzahl, Hämoglobingehalt). Primär sollten mit den Ergebnissen akute Entzündungs- oder Infektionsgeschehen ausgeschlossen werden. Auch konnten so eventuelle systemische Reaktionen auf die Behandlung frühzeitig erkannt werden.

Am Tag der ersten Untersuchung wurde zusätzlich eine Blutprobe für den funktionellen in vitro Test (FIT) entnommen.

In die Studie aufgenommen wurden ausschließlich Pferde, deren klinische Untersuchung und venöse Blutuntersuchung keine systemische Entzündungsreaktion oder Erkrankung anderer Organe vermuten ließ.

7.1.2.3 Indirekte interpleurale Druckmessung

Um objektive Daten einer Lungenfunktionsveränderung zu erhalten wurde bei allen Pferden eine indirekte Interpleuraldruckmessung über eine Ösophagussonde durchgeführt. Diese registriert vorhandene Luftdruckdifferenzen und leitet sie an einen Druckwandler, den Venti-Graph weiter. Das Meßgerät formt die gemessenen Luftdruckdifferenzen in elektrische Impulse um und zeichnet diese auf ein Thermoregistrierpapier in Form von Ausschlägen auf.

Zu Beginn der Untersuchung wurde die Sonde von außen am Pferd angelegt und in ihrem späteren Verlauf entlang des ventralen Nasengangs und des Ösophagus so abgemessen, dass ihre Spitze auf Höhe der Herzbasis lag. Anschließend wurde sie gleitfähig gemacht und über den ventralen Nasengang an die abgemessene Position in den Ösophagus vorgeschoben. Bei einigen der Pferde war es erforderlich eine Oberlippenbremse anzulegen, welche auch im weiteren Verlauf der Untersuchung meist nicht abgenommen wurde, da eine maßgebliche Beeinflussung der Messergebnisse durch die Oberlippenbremse nicht zu erwarten war (DEEGEN und KLEIN, 1987). Lediglich zwei der Probanden zeigten sich so unkooperativ, dass eine Sedierung mit 0,01 mg/kg KM Detomidin (Domidine®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) und 0,01 mg/kg KM Butorphanol (Dolorex®, MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz) unumgänglich war.

Nach einer kurzen Beruhigungsphase wurde die Sonde an das Messgerät (Venti-Graph, Modell PG100/REC, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) angeschlossen und die Messung gestartet (s. Abb. 1). Die Aufzeichnung der Kurven erfolgte über eine Zeitspanne von ca. fünf Minuten oder solange bis mindestens 5-10 gleichmäßige, zusammenhängende Atemzüge zu sehen waren.



Abb. 1: Venti-Graph mit Ösophagussonde zur Interpleuralen Druckmessung.

Die Auswertung der aufgezeichneten Kurven erfolgte mit einer eigens für das Messgerät konzipierten Schablone (Venti-Graph Auswertungsschablone, Boeringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland). Durch anlegen des Registrierpapiers auf die Auswertungsschablone konnte die maximale interpleurale Druckdifferenz ($\Delta P_{pl} \max$) ermittelt werden. Die Einteilung der ermittelten $\Delta P_{pl} \max$ -Werte in die jeweilige Gruppe (lungengesund, geringgradig, mittelgradig, hochgradig erkrankt) und die Bewertung mit Punkten erfolgte anhand der Untersuchungsergebnisse von THOMSON und MCPHERSON (1984), sowie nach DEEGEN und KLEIN (1987) (s. Tab. 5).

Tab. 5: Bewertung der maximalen interpleuralen Druckdifferenz.

$\Delta P_{pl} \max$ in cmH_2O	Punkte
< 4,6	0
4,6 – 12,5	1
12,5 - 20,3	2
> 20,3	3

7.1.2.4 Endoskopie des Respirationstrakts

Für die endoskopische Untersuchung wurden alle Pferde mit 0,01 mg/kg KM Detomidin (Domidine®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) und 0,01 mg/kg KM Butorphanol (Dolorex®, MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz) durch eine intravenöse Injektion in die V. jugularis externa sediert. Das flexible Endoskop (ETM VET 175, Endoskopische Technik GmbH, München, Deutschland) wurde über den ventralen Nasengang bis zum Rachen- und Kehlkopfbereich vorgeschoben. Hier wurde auf eventuelle Veränderungen, wie

eine Dorsalverlagerung des weichen Gaumens, Hemiplegia laryngis, oder entzündlich veränderte lymphoide Follikel am Rachendach geachtet. Beim weiteren Vorschieben des Endoskops in die Luftröhre wurde vorhandenes Sekret nach Menge, Viskosität und Verteilung beurteilt. Zudem wurde eine eventuelle Mukosaschwellung an der Aufzweigung der Trachea in die beiden Hauptbronchien bewertet (s. Abb. 2).

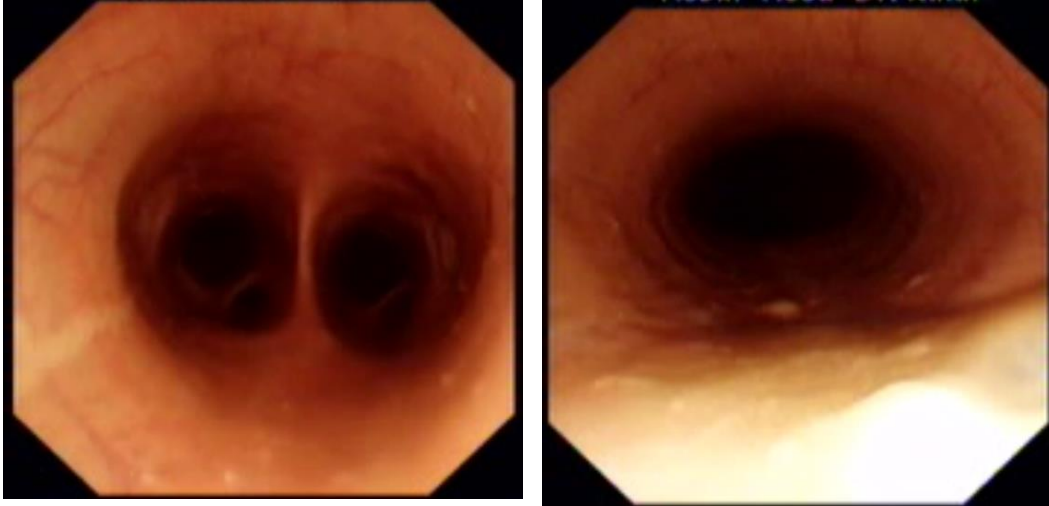


Abb. 2: Endoskopische Darstellung einer geringgradig verbreiterten Bifurcatio Tracheae (links) und eines intratrachealen Sekretsees mit Sekretflocken (rechts). TBS-Scoring nach GERBER et al. (2004) Grad 3-4.

Die Bewertung der tracheobronchoskopischen Befunde erfolgte in Anlehnung an das TBS-Scoring von GERBER und Mitarbeitern (2004) anhand eines Punktesystems (s. Tab. 6). Bei der Beurteilung der Schleimhautschwellung an der Bifurcatio tracheae wurde einem physiologischen Aussehen 0 Punkte und einer hochgradigen Schwellung 2 Punkte zugeordnet.

Tab. 6: Bewertung der endoskopischen Befunde.

Parameter		Punkte	
Trachealsekretmenge	Scoring nach GERBER et al. (2004)		
	< 1	kein Sekret erkennbar	0
	1 < 2	kleine, vereinzelte Sekretflocken	1
	2 < 3	größere Sekretflocken, schmale unterbrochene Sekretstraße	2
	3 ≤ 4	durchgehende Sekretstraße	3
	> 4 - 5	Sekretsee, extreme Menge an Sekret	4
Trachealsekretkonsistenz	≤ 2	serös, flüssig, fließend	1
	> 2 - 4	serös bis viskös, nicht fließend	2
	≥ 4 - 5	hochviskös, zäh	3
Schleimhautschwellung	keine Schleimhautschwellung	0	
	ggr. bis mgr. Schwellung der Bifurcatio tracheae	1	
	hgr. Schwellung der Bifurcatio tracheae, kaum zu erkennende Trachealspangen	2	

War bei der endoskopischen Untersuchung ausreichend Sekret in der Trachea zu finden, wurde eine Probe zur zytologischen Untersuchung des TBS entnommen. Hierfür wurde ein Polyvinylkatheter über den Arbeitskanal des Endoskops bis zu dessen Spitze vorgeschoben und mit Hilfe einer, am Ende des Katheters aufgesetzten 20 ml Spritze (BD Discardit™II, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eine kleine Menge des TBS aspiriert. Die Probe wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet.

Nach Abschluss der endoskopischen Untersuchung wurde der sedierte Patient für zwei Stunden ohne Futtermöglichkeit aufgestallt.

7.1.2.5 Zytologische Untersuchung des Tracheobronchialsekrets

Die bei der Tracheobronchoskopie gewonnenen, auf Objektträger ausgestrichenen und luftgetrockneten TBS-Proben wurden mit Hilfe eines Diff-Quick®-Sets (Diff-Quick staining set, Medion diagnostics, Düdingen, Schweiz) gefärbt. Die Auswertung unter dem Lichtmikroskop erfolgte zunächst bei 200-

facher Vergrößerung. Hier wurde nach mäanderförmiger Durchmusterung die Zelldichte, sowie die Menge und Struktur der mukösen Grundmasse semiquantitativ bewertet (GRABNER, 2005b). Danach erfolgte die quantitative Bewertung einzelner Zellpopulationen bei 500-facher Vergrößerung (Ölimmersion) (s. Abb. 3). Hierfür wurde das Präparat mäanderförmig durchgemustert und 200 Zellen ausgezählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die auszuzählenden Gesichtsfelder gleichmäßig über das Präparat verteilt lagen.

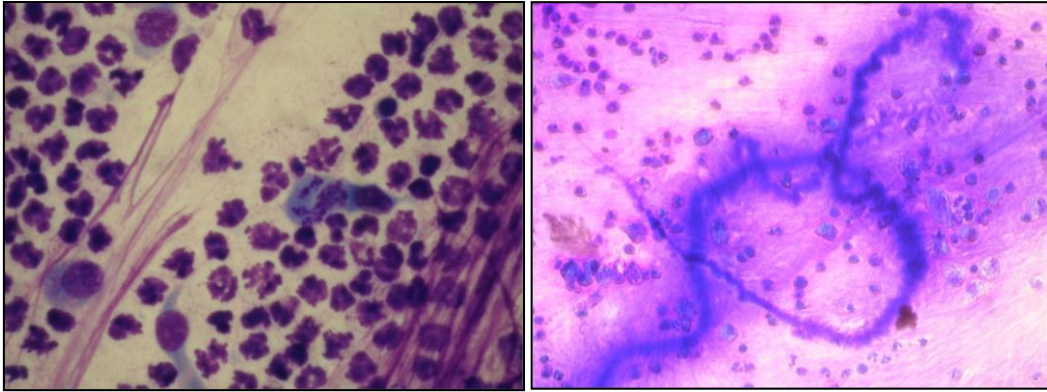


Abb. 3: TBS-Präparat eines mittelgradig COB-kranken Pferdes, mittels Diff-Quick®-Set angefärbt. Zu sehen sind überwiegend polymorphkernige neutrophile Granulozyten (links) und Curschmann-Spiralen (rechts).

Als physiologische, prozentuale Anteile von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten galten folgende Werte (MAY und GEHLEN, 2009):

Makrophagen	30-35%
Lymphozyten	25-30%
neutrophile Granulozyten	10-30%

Auf Grund der mikroskopischen semiquantitativen und quantitativen Befunde erfolgte die Punkteverteilung und Einordnung in das Scoring-System (s. Tab. 7). So wurde bei vereinzelt vorkommenden Makrophagen 0 Punkte und bei vielen 2 Punkte vergeben. Bei den Curschmann-Spiralen wurde von 0 – 4 unterschieden, wobei 0 = „keine“ und 4 = „viele“ bedeutete.

Tab. 7: TBS-Scoring.

Parameter		Punkte
neutrophile Granulozyten	< 30%	0
	30-50%	3
	> 50%	4
Makrophagen	vereinzelt	0
	vermehrt	1
	viele	2
Curschmann-Spiralen	keine	0
	wenige	3
	viele	4

Zellarmes Sekret oder Sekret mit einer Endoskopie-Bewertung von 0-1 Punkte wurde immer mit einem TBS-Score von 0 Punkten bewertet.

8. Therapieaufbau

8.1 Inhalationslösungen

Auf Grund der Studienergebnisse von KLIER und Mitarbeiter (2011) kam für die Inhalationsreihe die einzelsträngige A Klasse 2216 CpG-ODN zum Einsatz. Kennzeichnend für diese Sequenz sind 20 Basen, Poly-Guanin-Motive an den Flanken und ein gemischtes Zuckerrückgrat aus Phosphodiester und Phosphothioester (= *): 5`-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G-3` (KLIER et al., 2012). Die Oligodeoxynukleotide wurden von der Firma Biomers GmbH (Ulm, Deutschland) in lyophilisierter Form bezogen.

Die GNP wurden nach dem Standardprotokoll von COESTER und Mitarbeitern (2000) im Institut für Pharmazie und pharmazeutische Technologie der LMU München hergestellt.

Um das ODN-Lyophilisat zu lösen wurde „highly purified water“ (HPW) verwendet. Nach der Verdünnung auf eine Arbeitskonzentration von 1 mg/ml, wurde die Lösung aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

Pro Inhalation wurden 3,75 mg GNP aus der hergestellten Dispersion entnommen und in 2,5 ml sterilem highly purified water (HPW) gelöst. Anschließend wurden 187,5 µg CpG-ODN zugefügt und die Lösung bei 22 °C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten inkubiert. Diese Inhalationskonzentration entspricht einer Menge von 1,5 mg/ml GNP und 0,075 mg/ml CpG-ODN. Diese 5% Beladung war für die kolloidale Stabilität der Dispersion erforderlich.

Die Allergene (Artuvetrin, Artu Biologicals Europe BV, Lelystad, Netherlands) wurden aus der Medizinischen Kleintierklinik, Abteilung Dermatologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bezogen. Alle verwendeten Allergene wurden auf eine Arbeitskonzentration von 1 µl/ml (1:1000) in PBS verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde die der Inhalation entsprechende Menge entnommen (s. Tab. 8 und 9).

Tab. 8: Menge der inhalierten Allergene.

	Menge der Allergenstammlösung
Inhalation Nr. 1	0,6 ml
Inhalation Nr. 2	0,6 ml
Inhalation Nr. 3	0,8 ml
Inhalation Nr. 4	0,8 ml
Inhalation Nr. 5	1,0 ml
Inhalation Nr. 6	1,0 ml
Inhalation Nr. 7	1,2 ml

8.2 Inhalationsprotokoll

Zur Inhalation der GNP-gebundenen CpG-ODN (CpG-GNP) und der Allergene wurde ein geeigneter Inhalator (Equine Haler, Equine HealthCare Aps, Hoersholm, Dänemark) in Kombination mit einem leistungsstarken Vernebler (Aeroneb® Go Micropump Nebulizer, Aerogen, Galway, Irland) verwendet (s. Abb. 4). Die beiden Geräte wurden über ein Verbindungsstück zu einem geschlossenen System zusammengefügt und über ein, mit einem Kabel verbundenes Steuergerät, geregelt.



Abb. 4: Inhalationssystem aus „Equine Haler“ und „Aeroneb® Go Micropump Nebulizer“.

Während der Behandlung der Pferde bedurfte es keiner weiteren Fixationsmaßnahmen. Der „Equine Haler“ wurde mit seiner Vorrichtung über die eine Nüster gelegt und die andere mit der Hand bestmöglich abgedeckt, was von den Pferden gut toleriert wurde (s. Abb. 5). So war eine maximale Inhalation der vernebelten Flüssigkeit gewährleistet.

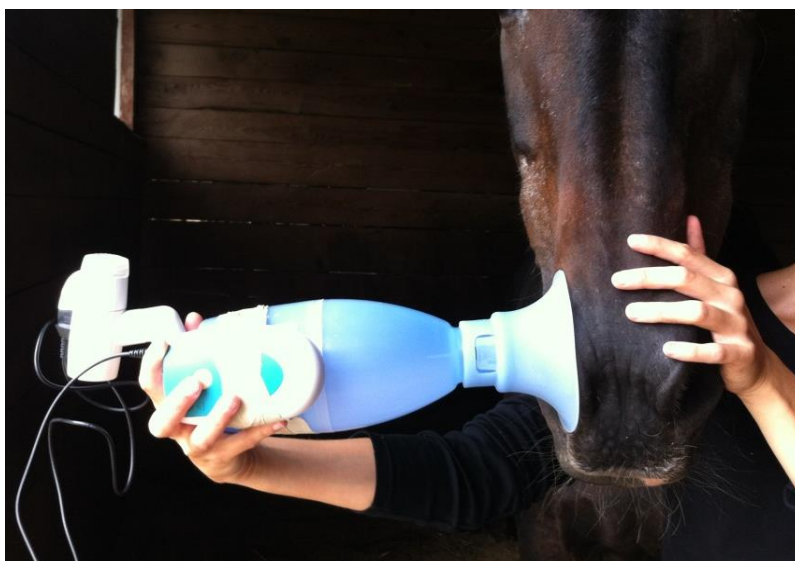


Abb. 5: Inhalation mit dem „Equine Haler“ in Kombination mit dem „Aeroneb® Go Micropump Nebulizer“.

Ein Teil der Pferde wurde mit spezifischen Allergenen und nanopartikulär gebundenen CpG-ODN inhaliert, der andere Teil erhielt die alleinige Inhalation der nanopartikulär gebundenen CpG-ODN. Die Zuteilung zur jeweiligen Gruppe erfolgte per Losverfahren, wobei aus den drei Erkrankungsstufen getrennt gelost wurde. Die verwendeten Allergene wurden nach vorherigem FIT-Test und entsprechend nachgewiesener Sensibilisierung ausgewählt.

Das Protokoll sah insgesamt sieben Inhalationen im Abstand von jeweils zwei Tagen vor (s. Abb. 6). Die Dosierung der verwendeten CpG-ODN betrug 0,18 mg pro Inhalation, gebunden an 3,75 mg GNP und gelöst in 2,5 ml HPW. Die Menge der verdünnten Allergene (1:1000) steigerte sich mit jeder Inhalation von 0,6 ml der verdünnten Lösung zu Beginn bis 1,2 ml bei der letzten Inhalation. Die Inhalationszeit betrug bei den in HPW dispergierten CpG-GNP etwa 10 Minuten und bei den verdünnten Allergenen je nach Menge zwischen 2 und 5 Minuten.

Vor der ersten Inhalation, zwei Tage nach der letzten und 6 Wochen nach der letzten Inhalation erfolgte jeweils eine ausführliche allgemeine und spezielle klinische Untersuchung mit Blutprobennahme, Interpleuraldruckmessung und Endoskopie der Atemwege, inklusive TBS-Zytologie (1. US, 2. US, 3. US) (s. Abb. 6).

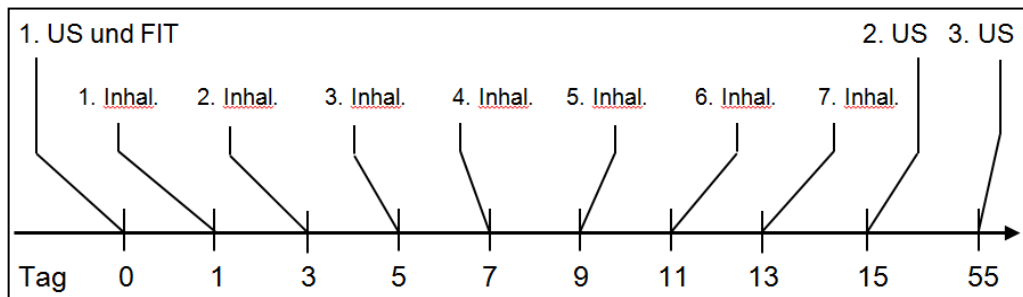


Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen und Inhalationen.

Alle verwendeten Allergene wurden in einem Verhältnis 1:1000 in PBS (PBS Dulbecco, Biochrom AG Berlin, Deutschland) verdünnt. Um eine Adaptation des Immunsystems an die spezifischen Allergene zu stimulieren, wurde die zu inhalierende Menge der Lösung bei jeder Behandlung gesteigert (s. Tab. 9).

Tab. 9: Darstellung der Konzentrationen der inhalierten Substanzen.

	Menge CpG-ODN	Menge GNP	Menge Allergen-Reinsubstanz
Inhalation Nr. 1	187,5 µg	3,75 mg	0,6 µl
Inhalation Nr. 2	187,5 µg	3,75 mg	0,6 µl
Inhalation Nr. 3	187,5 µg	3,75 mg	0,8 µl
Inhalation Nr. 4	187,5 µg	3,75 mg	0,8 µl
Inhalation Nr. 5	187,5 µg	3,75 mg	1,0 µl
Inhalation Nr. 6	187,5 µg	3,75 mg	1,0 µl
Inhalation Nr. 7	187,5 µg	3,75 mg	1,2 µl

8.3 Überwachung der Studienteilnehmer

Vor jeder Inhalation wurden die Pferde klinisch allgemein untersucht und während der Behandlung das Allgemeinbefinden kontinuierlich überwacht. Dabei wurde die Körpertemperatur kontrolliert und im Falle eines Anstiegs über den Normwert der Versuch abgebrochen und das Pferd von den weiteren Behandlungen ausgeschlossen.

Bei allen Studienteilnehmern wurden die Leukozytenzahlen im Rahmen der Eingangsuntersuchung und bei beiden Nachuntersuchungen bestimmt. Die Untersuchungen dienten dazu akute Entzündungs- oder Infektionsgeschehen auszuschließen und, im Besonderen während der Inhalationsperiode, systemische Reaktionen zeitnah zu erkennen. Zudem sollte durch die Probenahme bei der zweiten Nachuntersuchung ein eventuell negativer Einfluss der CpG-ODN/GNP auf das Immunsystem in Bezug auf die Langzeitwirkung des Präparats ausgeschlossen werden.

Ein Anstieg der Körpertemperatur, Normabweichungen im Blutbild, eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und lokale Reaktionen wurden als Hauptabbruchskriterien festgelegt. Dabei wurden beobachtete unerwünschte Reaktionen anhand eines modifizierten Schemas (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) eingeteilt (s. IX Anhang, Kap. 2.2).

9. Klinische Folgeuntersuchungen

Die beiden Folgeuntersuchungen gestalteten sich in gleichem Maße wie die Eingangsuntersuchung. Es wurde zu Beginn eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt mit folgender spezieller Untersuchung des Atmungstrakts inklusive aller beschriebenen weiterführenden Untersuchungen. Die erste Nachuntersuchung (2. US) erfolgte zwei Tage nach, die zweite Nachuntersuchung (3. US) 42 Tage nach der letzten Inhalationsbehandlung (s. Abb. 6).

10. Der funktionelle in vitro Test (FIT)

Für den Allergietest wurde jedem Pferd im Zuge der Erstuntersuchung 20 ml Blut aus der desinfizierten V. jugularis externa, am Übergang vom oberen in das mittlere Halsdrittel mit einer 18G Kanüle entnommen (BD Microlance™, 1,2 x 50mm, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verbracht und umgehend per Express-Bote versandt. Durchgeführt wurde der FIT-Test im Institut für Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Im FIT-Test wird nach Provokationen der in gewaschenem Vollblut vorhandenen basophilen Granulozyten die, aus diesen Zellen freigesetzte Histaminmenge quantifiziert. Als Formen der „Provokation“ kommen die physikalische (thermische) Behandlung (zehn-minütiges Kochen), zur Ermittlung des maximal vorhandenen Histamins in den Zellen, und die Behandlung mit Antigenpräparationen, zur Prüfung der spezifischen Sensibilisierung, zum Einsatz. Zudem werden die Proben mit Anti-Isotop-Antikörper (Anti-IgG, Anti-IgE) auf eine generelle Sensibilisierung der basophilen Granulozyten überprüft. Die

Quantifizierung des Histamins erfolgt mittels kompetitivem Radioimmunoassay (RIA). Ob ein Pferd für ein bestimmtes Allergen als sensibilisiert anzusehen ist entscheidet bei der Auswertung der Testergebnisse die freigesetzte Histaminmenge bei einer definierten Allergenkonzentration im Verhältnis zur physikalisch freigesetzten Histaminmenge. Das Maß der Sensibilisierung wird unterteilt in 0=negativ, 1=schwach positiv, 2=positiv, 3=stark positiv, 4=hochgradig positiv.

Die für die Studie eingesetzten Allergengemische und Einzelallergene zur Überprüfung der spezifischen Sensibilisierung sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Im FIT eingesetzte Allergengemische und Einzelallergene.

<p>LPx Spätblüher-Mischung</p> <p>Amaranthus hybridus (Fuchsschwanz) Xanthium commune (Spitzklette) Iva ciliata (Weidenröschen) Chenopodium ambrosianum (Mex. Teekraut) Artemisia vulgaris (Gem. Beifuß)</p>	<p>GMx Gräser-Mix (Pollen)</p> <p>Festuca elatior (Rohrschwengel) Poa pratensis (Wiesenrispengras) Dactylis glomerata (Gem. Knäuelgras) Agrostis alba (Straussgras) Phleum pratense (Wiesenlieschgras) Lolium perenne (Dt. Weidegras) Anthoxantum odoratum (Gew. Ruchgras)</p>
<p>TMx - early</p> <p>Fagus grandifolia (Amer. Buche) Ulmus americanus (Amer. Weißulme) Acer saccharum (Zuckerahorn) Salix nigra (Schwarzweide) Alnus glutinosa (Schwarzerle) Populus deltoides (Schwarzpappel)</p>	<p>GMx Gräser-Mix (Korn)</p> <p>Wiesenlieschgras Wiesenschwengelgras Wiesenrispengras Rotschwengel Rohrschwengel Wiesenfuchsschwanz Deutsches Weidelgras</p>
<p>TMx - late</p> <p>Quercus rubra (Roteiche) Platanus occidentalis (Am. Platane) Juglans nigra (Schwarze Walnuss) Carya ovata (Hickorynuss) Fraxinus americana (Esche weiß)</p>	<p>MMx Schimmelpilz-Mix</p> <p>Alternaria tenuis Aspergillus niger Helminthosporium sativum Hormodendrum hordei Penicillium notatum</p>
<p>Birken – Mix</p> <p>Betula pendula Betula nigra</p>	<p>Einzelallergene</p> <p>Corylus avellana (Haselnuss) Brassica apus (Raps) Lepidoglyphus destructor (Pflaumenmilbe) Dermatophagoides pteronyssinus (Hausstaubmilbe) Acarus siro (Mehlmilbe)</p>

Da für die Typ-I-Reaktion der COB nachgewiesenermaßen hauptsächlich Schimmelpilzsporen, Milben und Pollen verantwortlich sind, wurde auf die Untersuchung weiterer Allergengruppen (Insekten, Futtermittel) verzichtet.

Anhand der Ergebnisse des FIT-Test wurden die spezifischen Allergene zur Inhalationsbehandlung ausgewählt.

11. Statistische Analysen

Die statistische Bearbeitung der Daten erfolgte mit Microoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und IBM® SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, Armonk, USA).

Alle erhobenen Daten wurden zu Beginn auf Normalverteilung untersucht. Um auf Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu prüfen erfolgte bei normalverteilten Datensätzen der t-Test, bei den nicht-normalverteilten Werten und bei Scoreparametern der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney. Erfolgte eine Unterteilung in mehr als zwei Gruppen, so wurde zur Überprüfung von statistischen Unterschieden zwischen den Gruppen der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern zu ermitteln erfolgte bei schief verteilten Werten die Berechnung des Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s), bei annähernd normalverteilten Werten die Berechnung des Korrelationskoeffizient nach Pearson (r).

Für alle statistischen Verfahren wurde die statistische Signifikanzgrenze in Abhängigkeit der Irrtumswahrscheinlichkeit p auf $\leq 0,05$ festgelegt. Wurde nicht der jeweils berechnete p -Wert angegeben, so wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

- n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)
- * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$)
- ** = signifikant ($p \leq 0,01$)
- *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

Die einzelnen Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in der Form $\bar{x} \pm s$ angegeben.

Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft® PowerPoint 2010 und Microoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

IV ERGEBNISSE

1. Allgemeine Daten zu den Patienten

1.1 Patientengut und Gruppeneinteilung

Alle in diese Studie aufgenommenen 21 Pferde wiesen vorberichtlich seit mindestens einem Jahr eine chronische Lungenerkrankung auf, welche bei allen Pferden mit den Ergebnissen der klinischen Allgemeinuntersuchung und der speziellen Lungenuntersuchung als chronisch obstruktive Bronchitis diagnostiziert wurde. Der Schweregrad der COB wurde anhand eines standardisierten Untersuchungsbogens mittels Score-Punkten bewertet (s. IX Anhang, Kap. 4.). Somit stellten sich 4 Pferde (19 %) als geringgradig, 11 Pferde (52 %) als mittelgradig und 6 Pferde (29 %) als hochgradig erkrankt dar. Die Aufteilung in die jeweilige Behandlungsgruppe erfolgte wie in Tab. 11 beschrieben.

Tab. 11: Darstellung des Erkrankungsgrads und Anzahl der Patienten mit Score-Punkten in den jeweiligen Gruppen.

	Gruppe I (Inhalation mit Allergenen)		Gruppe II (Inhalation ohne Allergene)	
	n	Score-Punkte Mittelwert ± SD	n	Score-Punkte Mittelwert ± SD
geringgradig	2	42,5 ± 3,7	2	42,0 ± 2,8
mittelgradig	5	25,4 ± 4,6	6	26,0 ± 3,3
hochgradig	4	17,8 ± 3,2	2	21,0 ± 0,0

Somit bestand kein signifikanter Unterschied der beiden Therapiegruppen in Bezug auf den Erkrankungsgrad zu Beginn der Studie ($p=0,843$).

Das Alter der Patienten variierte zwischen 8 und 27 Jahren, wobei der Mittelwert ± Standardabweichung $17,43 \pm 5,14$ betrug. Am häufigsten trat die Altersspanne zwischen 17-18 Jahre auf (s. Abb. 7)

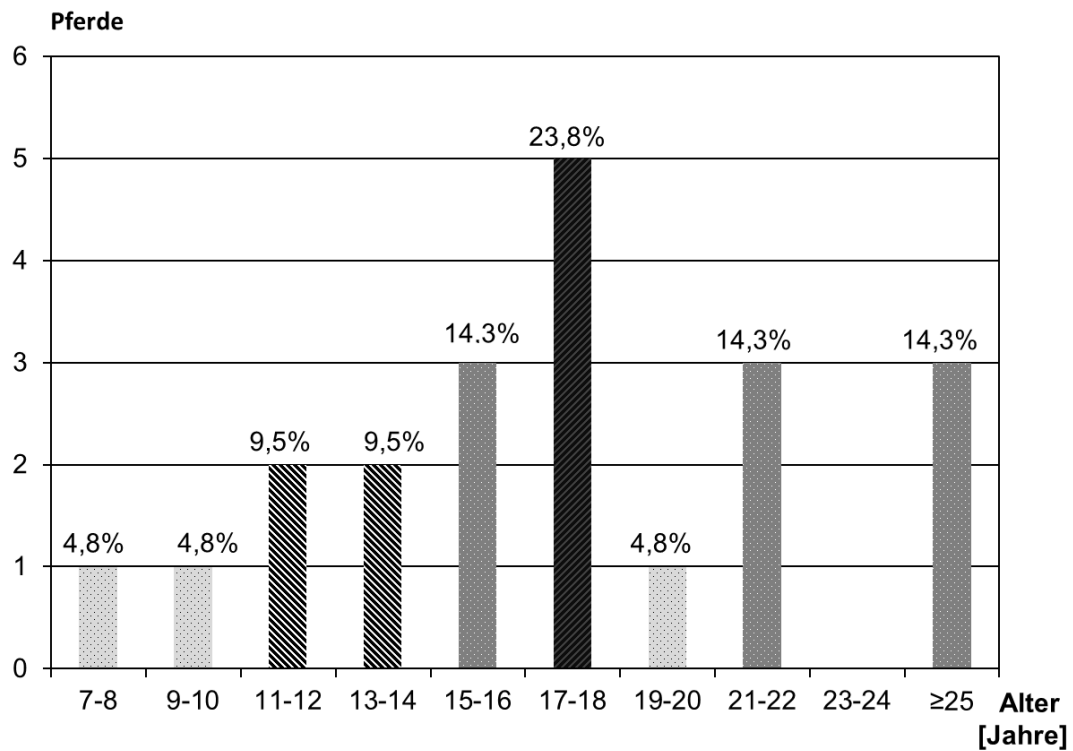


Abb. 7: Altersverteilung der Patienten.

Eine Übersicht über die Gruppenverteilung bezüglich des Alters, des Geschlechts, der Rasse und der Größe gibt Tabelle 12 wieder. Die Nutzungsart betreffend kamen ausschließlich freizeitleich gerittene Pferde zum Einsatz.

Tab. 12: Patientengut der Studie nach Gruppen aufgelistet.

	Pferd Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse	Größe (cm)
Gruppe I (mit Allergenen)	1	27	Stute	Hannoveraner	160
	2	25	Wallach	Leutstettner	160
	3	21	Wallach	Hannoveraner	172
	4	25	Hengst	Pura Raza Espanol	158
	5	21	Wallach	Haflinger	145
	6	14	Wallach	Österreicher	165
	7	18	Wallach	Isländer	141
	8	18	Hengst	Friese	168
	9	14	Wallach	Tinker	153
	10	22	Wallach	Trakehner	164
	11	12	Wallach	Dt. Reitpony	148
Gruppe II (ohne Allergene)	12	16,5	Wallach	Trakehner	175
	13	20	Wallach	Mecklenburger	173
	14	18	Stute	Isländer	130
	15	17	Wallach	Sachsen-Anhaltiner	172
	16	16	Stute	Isländer	128
	17	8	Stute	Isländer	143
	18	8,5	Wallach	Connemara Pony	144
	19	16	Wallach	Isländer	130
	20	11	Wallach	Isländer	138
	21	18	Wallach	Quarter Horse	145

Die Verteilung der männlichen und weiblichen Tiere war nahezu homogen und unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,311$). Bei der Überprüfung der Altersverteilung der zwei Gruppen fiel auf, dass das Durchschnittsalter in der Gruppe mit Allergenen signifikant höher war, als in der Gruppe ohne Allergene ($p = 0,036$). Der mittlere Wert belief sich in Gruppe I auf $19,73 \pm 4,98$ und in Gruppe II auf $14,9 \pm 4,2$ Jahre.

Für die statistische Berechnung bezüglich des Einflusses der Rasse erfolgte eine Einteilung in Großpferde und Kleinpferde/Ponys. Hier war zu erkennen, dass sich in Gruppe I deutlich mehr Großpferde und in Gruppe II mehr Kleinpferde befanden. Allerdings erwies sich dieses Verhältnis als statistisch nicht signifikant ($p = 0,198$).

1.2 Anamnestische Grunddaten

1.2.1 Erkrankungsdauer

Vorberichtlich wurden alle Besitzer genauestens nach dem ersten zeitlichen Auftreten typischer Symptome wie Husten, Leistungsmangel oder Nasenausfluss befragt. Demnach zeigten 66,7% (n = 12) der Pferde seit weniger als 10 Jahren und von diesen 75% (n = 9) seit weniger als 5 Jahre für die Besitzer deutliche Symptome. Im Mittel belief sich die Erkrankungsdauer auf $6,69 \pm 5,39$ Jahre. Die statistische Untersuchung ergab in diesem Punkt keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,489$) (s. Abb. 8).

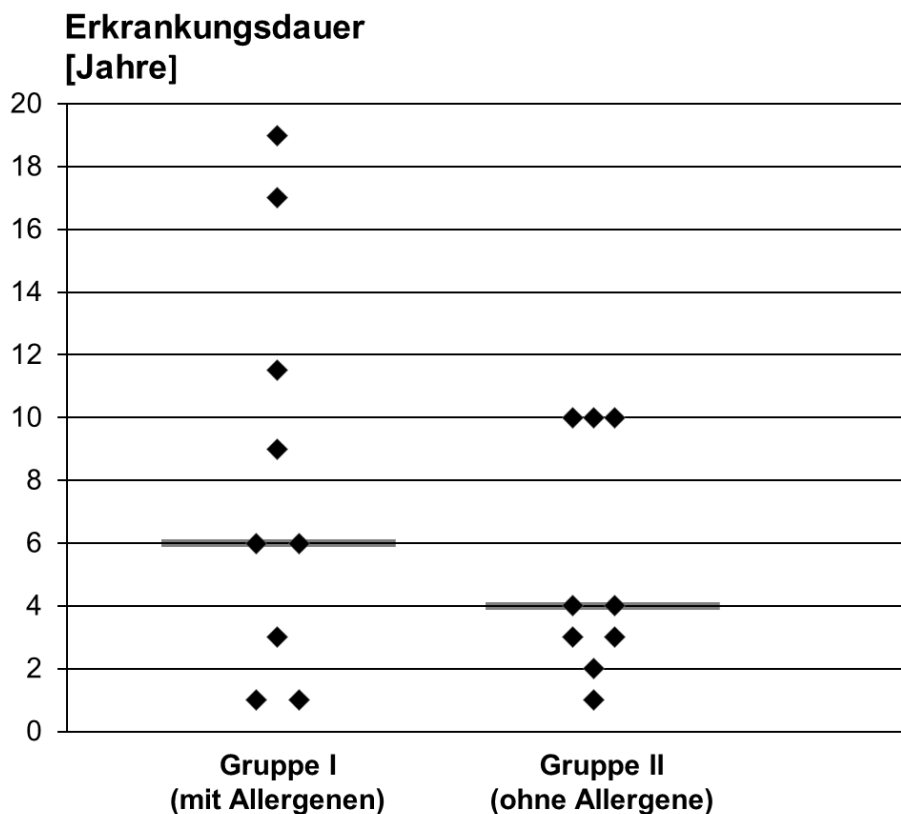


Abb. 8: Erkrankungsdauer (in Jahren) der Pferde in der jeweiligen Gruppe. Medianwert als horizontale Linie gekennzeichnet.

Ebenso ergab die Untersuchung des Alters beim Auftreten der ersten Symptome keine statistisch signifikante Inhomogenität der Gruppen ($p = 0,546$) (s. Abb. 9). Es konnte ein mittleres Alter zu Krankheitsbeginn von $10,33 \pm 4,04$ Jahren ermittelt werden.

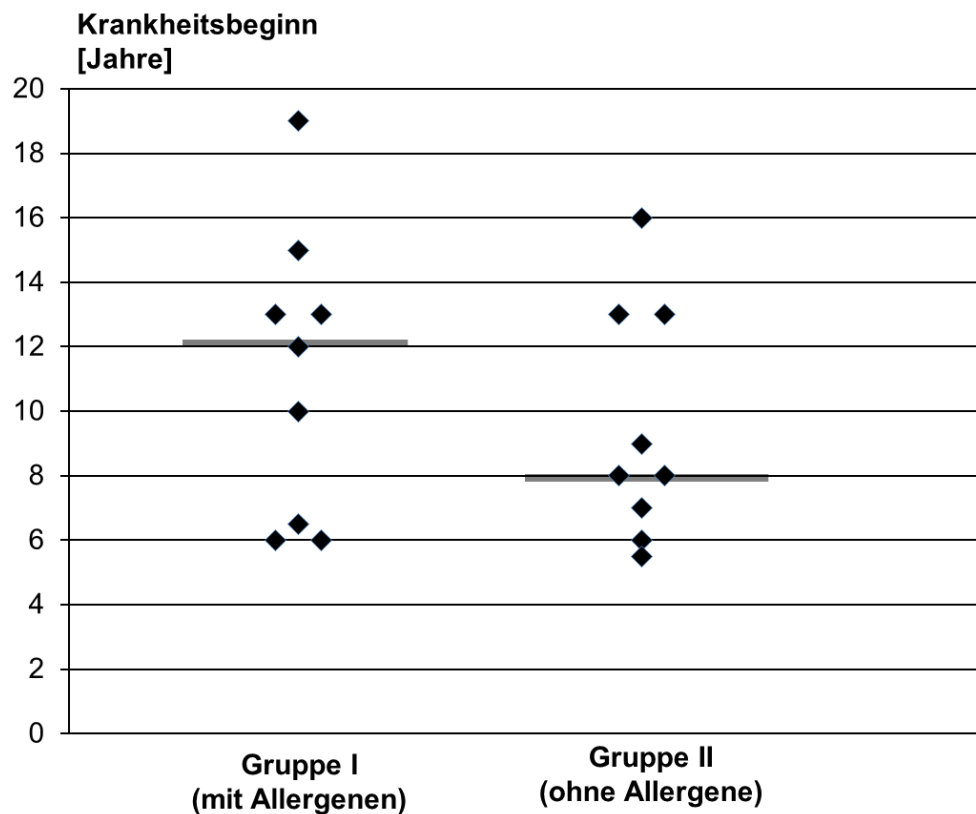


Abb. 9: Krankheitsbeginn (in Jahren) der Pferde in der jeweiligen Gruppe. Medianwert als horizontale Linie gekennzeichnet.

Bei der Überprüfung von möglichen Zusammenhängen zwischen der Erkrankungsdauer und anamnestischen oder klinischen Parametern fiel ein signifikanter ($p = 0,001$) Korrelationskoeffizient von $r = 0,705$ zwischen der Erkrankungsdauer und dem Alter der Patienten auf (s. Abb. 10). Ebenso konnte eine signifikante ($p = 0,014$) Korrelation ($r = 0,567$) zwischen der Erkrankungsdauer und dem Gesamtscore ermittelt werden.

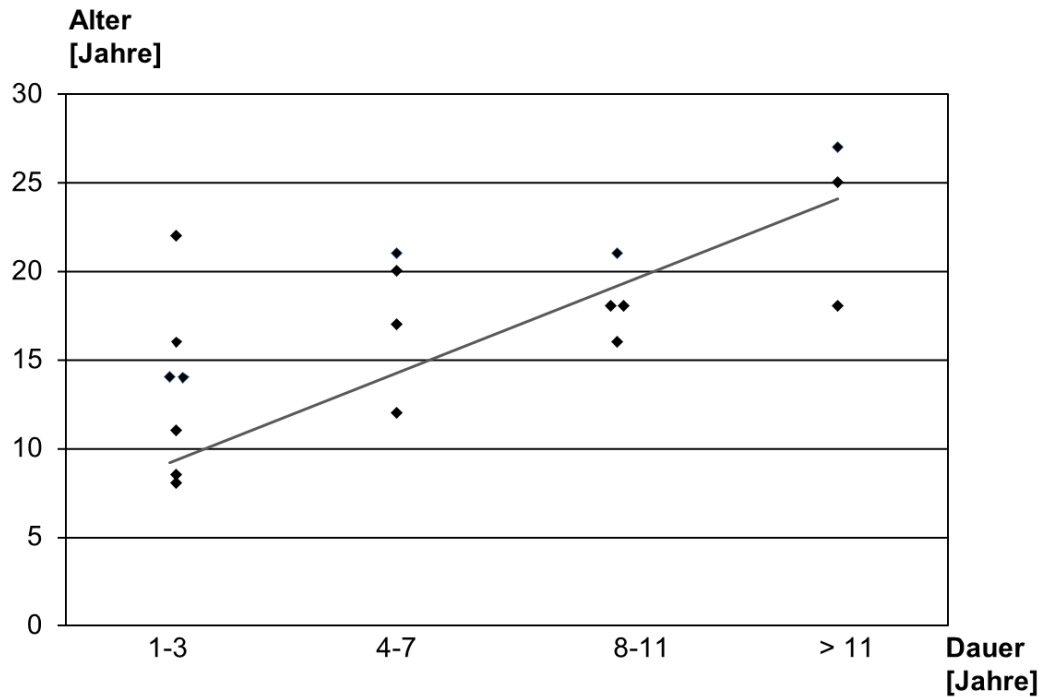


Abb. 10: Zusammenhang zwischen Alter der Pferde und anamnestischer Erkrankungsdauer.

1.2.2 Jahreszeitlich variierende Symptomstärke

In der anamnestischen Erfassung der jahreszeitlichen Änderung der Symptome zeigten sieben Pferde keine dem Besitzer über das Jahr hinweg auffälligen Veränderungen (k. V.). Bei allen weiteren Pferden konnten die Besitzer von einer deutlichen Verbesserung oder Verschlechterung der Symptome zu einer bestimmten Jahreszeit berichten. Somit war es möglich die verbleibenden Pferde bezüglich der Verschlechterung der Symptomstärke in Frühling/Sommer und Herbst/Winter zu unterteilen. Die entsprechende Häufigkeitsverteilung ist in Abb. 11 dargestellt.

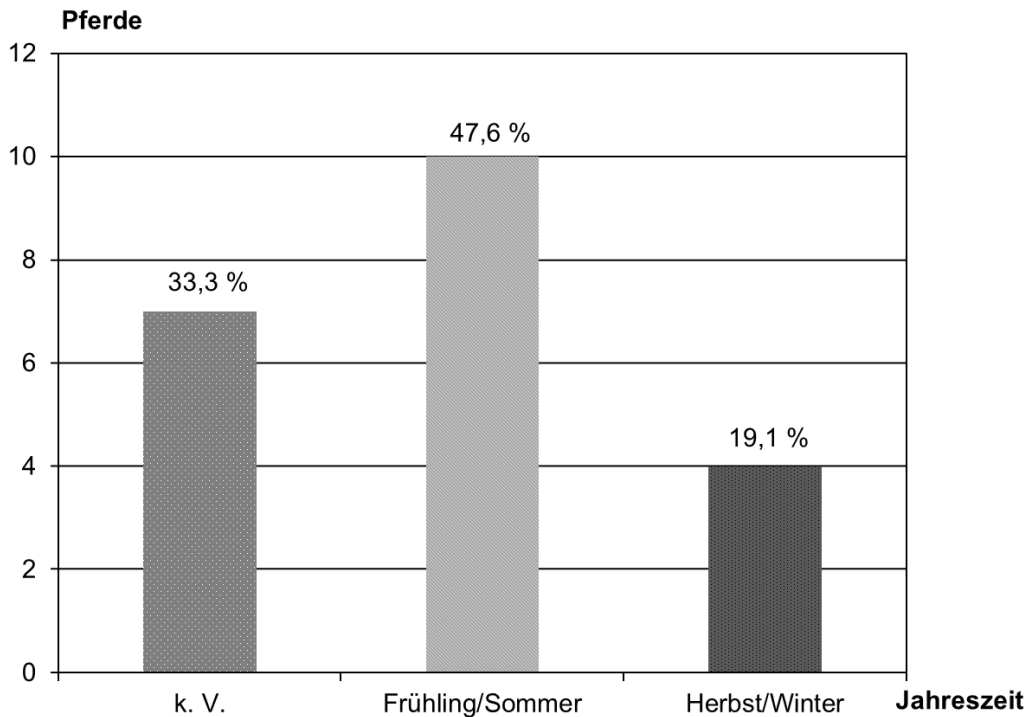


Abb. 11: Jahreszeitliche Verschlechterung der Symptome aller Pferde (k. V. = keine Veränderung).

Die statistische Untersuchung der zwei Gruppen (mit und ohne Allergene) erbrachte eine nahezu homogene Verteilung ohne signifikante Varianz ($p = 1,0$).

1.2.3 Management der Pferde

In Bezug auf das Management wurden die Haltungsbedingungen und somit die Staubbelastung für die Pferde, sowie der Kontakt der Tiere zu Stroh und trockenem Heu genau vom Besitzer erfragt (s. IX Anhang, Kap. 3).

1.2.3.1 Haltungsformen

Der überwiegende Anteil der Pferde ($n = 12$, entspricht 57,1 %) wurde in Offenstall- oder Weide-Haltung untergebracht. 9 Tiere (42,9 %) kamen aus Boxenhaltung mit zumindest stundenweisem Koppelgang oder Auslauf auf einem Paddock.

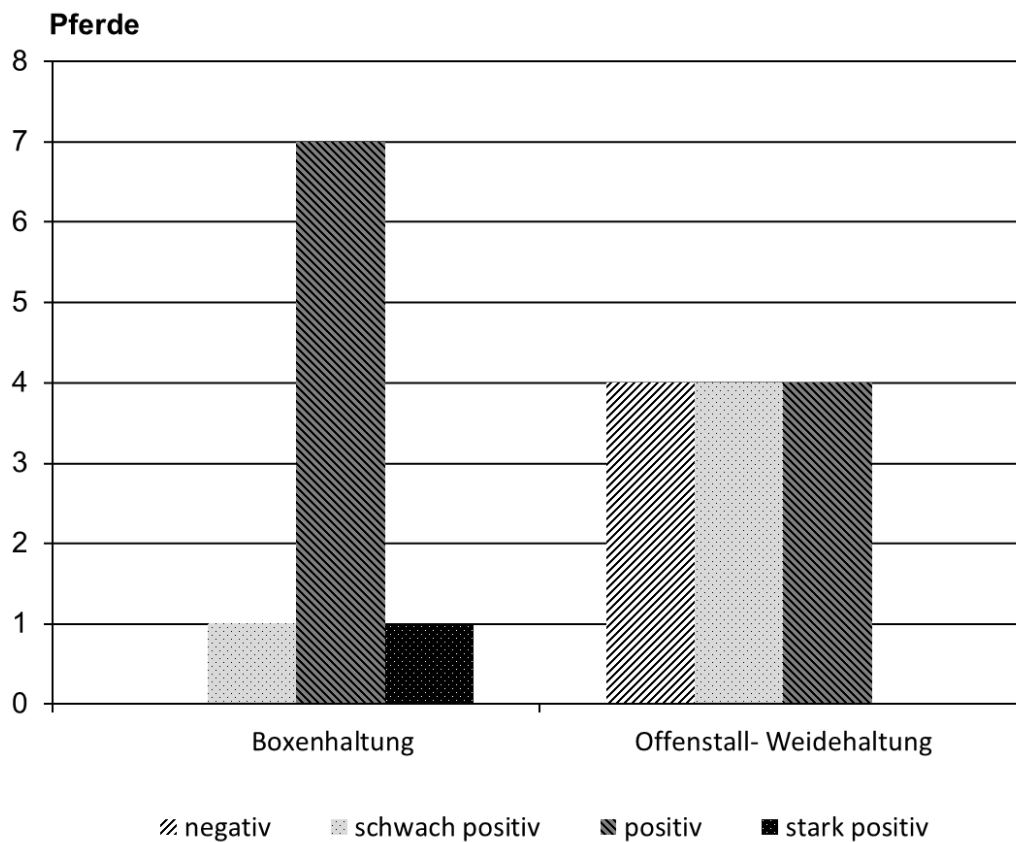
Die Betrachtung der Gruppenaufteilung zeigt, dass die Gruppe I (mit Allergenen) deutlich, jedoch nicht signifikant mehr Pferde aus Boxenhaltung beinhaltete ($p = 0,8$).

In Bezug auf die Gesamtscore-Punktzahl, die Ruheatemfrequenz, den Auskultations-Score und die endoskopische Untersuchung ergaben sich des Öfteren unterschiedliche Werte zwischen diesen zwei Haltungsformen, allerdings ohne jegliche statistische Signifikanz. Die aufgeschlüsselten Daten mit der statistischen Signifikanz p bezüglich der Gruppenunterscheidung zeigt Tabelle 13.

Tab. 13: Klinische Ergebnisse ($\bar{x} \pm s$), nach Haltungsform eingeteilt.

	Boxenhaltung	Offenstall-Weidehaltung	Signifikanz p
Gesamtscore-Punkte	31 ± 11,8	28,2 ± 7,4	0,917
Ruheatemfrequenz (Züge/min)	24,2 ± 6,7	28,3 ± 10,9	0,508
Auskultationscore-Punkte	2,4 ± 1,3	2,1 ± 1,1	0,602
Sekretmenge (Score-Punkte)	2,9 ± 1,2	3,2 ± 0,9	0,917
Sekretviskosität (Score-Punkte)	3,0 ± 1,0	3,2 ± 1,1	0,702

Alle Pferde wurden bezüglich ihrer Gesamtreaktion auf die untersuchten Allergene anhand des FIT-Ergebnisses in negativ, schwach positiv, positiv und stark positiv eingeteilt und auf statistische Unterschiede der Gruppen untersucht. Demnach reagierten im FIT-Test aus der Gruppe mit Boxenhaltung insgesamt signifikant mehr Tiere stärker positiv auf eines der untersuchten Allergene, als aus der Gruppe ohne Boxenhaltung ($p = 0,048$) (s. Abb. 12).

**Abb. 12:** Nach der Haltungsform eingeteiltes Ergebnis des FIT-Tests. Bei mehrfach positiven Reaktionen auf unterschiedliche Allergene wurde die stärkste in die Bewertung aufgenommen.

Wurden die Reaktionen der beiden Gruppen auf die einzelnen, im Test untersuchten Allergene aufgeschlüsselt, so ergab sich eine deutliche, wenn auch nicht signifikant häufigere und stärkere Reaktion der Pferde aus Boxenhaltung auf Schimmelpilze ($p = 0,299$), Gräser-Mix (Korn) ($p = 0,21$), Baum-Mix (spät) ($p = 0,244$), Raps ($p = 0,111$), Dermatophagoides pteronyssinus ($p = 0,114$) und Acarus siro ($p = 0,099$). Bei den übrigen verwendeten Allergenen konnten keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Gruppen erkannt werden.

Beide Haltungsformen wurden anhand der Gesamtscoredifferenz zwischen Eingangsuntersuchung und erster Nachuntersuchung auf einen Therapieerfolg hin überprüft. Es konnte kein bedeutender Unterschied zwischen den Haltungsformen in Bezug auf den Therapieerfolg ausgemacht werden ($p = 0,67$).

1.2.3.2 Einstreu

Neben der Haltungsform ist in großem Maße die Einstreu der Boxen, Ausläufe und Unterstände ausschlaggebend für die Staubbelastung der Pferde. Als relevante Materialien wurden hier Stroh und Sägemehl angenommen, um die Tiere zu unterteilen. Insgesamt hatten nur sechs Pferde (28,6 %) überhaupt keinen Kontakt zu diesen Einstreumaterialien. Jeweils sechs Pferde (28,6 %) wurden auf Stroh oder Sägemehl gehalten und drei Tiere (14,3 %) hatten Kontakt zu beiden Materialien.

Betrachtete man die beiden Hauptgruppen der Studie, so befanden sich in Gruppe I (mit Allergenen) signifikant mehr Pferde, welche regelmäßig Kontakt zu Stroh, Sägemehl oder zu beiden Materialien hatten ($p = 0,04$). Zudem konnten signifikant unterschiedliche Werte in Bezug auf die Einstreu der Boxen für die Parameter p_aO_2 ($p = 0,018$), Trachealsekretmenge ($p = 0,038$) und Gesamtscore-Punkte ($p = 0,027$) ermittelt werden. Somit wiesen die Pferde, welche weder Kontakt zu Stroh noch zu Sägemehl hatten, einen signifikant höheren p_aO_2 auf, als diejenigen, von welchen die Boxen nur mit Stroh ($p = 0,017$) oder mit Stroh und Sägemehl ($p = 0,036$) eingestreut wurden. In Bezug auf die Sekretmenge in der Trachea erreichten die Pferde mit Stroheinstreu signifikant mehr Score-Punkte ($p = 0,041$) als die Pferde mit Sägemehleinstreu. Ebenso erreichten die Pferde mit Stroh und Sägemehl einen signifikant höheren Gesamtscore als diejenigen ohne ($p = 0,024$).

1.2.3.3 Raufuttergabe

Alle Pferde wurden bezüglich ihres Raufutters in zwei Gruppen unterteilt. Insgesamt neun Tieren (42,9 %) wurde als Raufutterkomponente trockenes Heu verfüttert. Diesen gegenüber standen 12 Tiere (57,1 %), welche ausschließlich nasses Raufutter bekamen, was neben eingeweichtem Heu auch Silage, Heulage oder Gras beinhaltete.

Verglich man die Gruppe I (mit Allergenen) mit der Gruppe II (ohne Allergene), konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ausgemacht werden ($p = 0,198$).

2. Ergebnisse der Erstuntersuchung

Bei der Untersuchung aller Pferde wurde nach dem im Anhang aufgeführten, standardisierten Untersuchungsbogen vorgegangen (s. IX Anhang, Kap. 2.).

Ausnahmslos allen Besitzern fiel anamnestisch ein zumindest sporadisch auftretender Husten ihrer Pferde auf. Bei 28,6 % (n = 6) trat dies sogar mehrmals täglich auf und bei 9,5 % (n = 3) der Pferde berichteten die Besitzer von anfallsartigen Hustenepisoden. Bei der klinischen Allgemeinuntersuchung konnte bei nur einem Pferd ein physiologisch costo-abdominaler Atmungstyp diagnostiziert werden. Bei mehr als der Hälfte der Tiere (52,4 %) war eine geringgradig abdominal verstärkte Atmung zu erkennen, bei 9,5 % (n = 2) war diese sogar deutlich abdominal verstärkt. Als Anzeichen einer Dyspnoe zeigten 33,3 % (n = 7) der Pferde in Ruhe geweitete Nüstern und 14,3 % (n = 3) die sogenannte Zwischenrippenatmung und/oder eine Dampfbinne (s. Abb. 13).



Abb. 13: Inspiratorische Dyspnoe: Hervortreten der Rippen (li.: Pferd Nr. 22) und in Ruhe geblähte Nüstern (re.: Pferd Nr. 1).

2.1 Ruheatemfrequenz

In der allgemeinen klinischen Untersuchung konnte bei 14,3 % (n = 3) der Pferde eine physiologische Ruheatemfrequenz von ≤ 16 Atemzügen/min ermittelt werden. Die restlichen 18 Pferde zeigten zu gleichen Teilen (je 42,9 %) gering bis mittelgradig erhöhte Atemfrequenzen von über 16 bis 26/min und hochgradig erhöhte Frequenzen von > 26 /min.

Bei der Erstuntersuchung konnte in der statistischen Untersuchung kein signifikanter Unterschied ($p = 0,85$) zwischen Gruppe I und Gruppe II in Bezug auf die Ruheatemfrequenz festgestellt werden.

In der statistischen Überprüfung von Zusammenhängen zwischen der Atemfrequenz und anderen klinischen und anamnestischen Parametern konnte eine signifikante ($p = 0,028$) Korrelation ($r = 0,478$) zwischen der Ruheatemfrequenz und der Rasse ermittelt werden. Somit zeigten die Probanden aus der Gruppe Kleinpferde/Ponys eine deutlich höhere Ruheatemfrequenz als die Pferde der Gruppe Großpferde.

2.2 Auskultation des Respirationstrakts

Bei der Lungenauskultation der Erstuntersuchung stellten sich die Durchschnittswerte mit Standardabweichung für die Gruppe I mit $2,09 \pm 1,3$ und für Gruppe II mit $2,4 \pm 1,07$ Score-Punkten dar. Die statistische Überprüfung ergab keinen signifikanten Unterschied der Gruppen ($p = 0,309$). 23,8% ($n = 5$) der Pferde zeigten einen hochgradig veränderten Auskultationsbefund mit expiratorischen Atemgeräuschen und/oder Giemen. Bei 42,9 % ($n = 9$) der Patienten waren gering- bis mittelgrad in- und expiratorische Atemgeräusche, teilweise mit trachealen Rasselgeräuschen auszukultieren. Demnach zeigten nur 1/3 der Pferde (33,3 %, $n = 7$) ein geringgradig inspiratorisches Atemgeräusch. Die Score-Punktzahl 0 für einen physiologischen Befund wurde vor Behandlungsbeginn bei keinem Proband vergeben.

2.3 Arterielle Blutgasanalyse

Die mittleren Werte der gesamten Studienteilnehmer vor Inhalationsbeginn beliefen sich für p_aO_2 auf $82,98 \pm 12,3$ mmHg, für p_aCO_2 auf $45,63 \pm 4,67$ mmHg und für A-aDO₂ auf $21,06 \pm 9,23$ mmHg.

Vor Behandlungsbeginn konnte bei der statistischen Untersuchung kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen festgestellt werden (s. Tab. 14).

Tab. 14: Blutgasergebnisse ($\bar{x} \pm s$ in mmHg) und ihre Signifikanzen zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Gruppen vor Inhalationsbehandlung.

		Gruppe I (mit Allergenen)	Gruppe II (ohne Allergene)	Signifikanz p
1. Untersuchung	p_aO_2	$80,24 \pm 11,79$	$86,32 \pm 12,74$	0,261
	p_aCO_2	$46,29 \pm 4,03$	$44,91 \pm 5,51$	0,603
	A-aDO ₂	$23,05 \pm 9,36$	$18,62 \pm 8,97$	0,295

Zudem konnten statistisch signifikante Korrelationen zwischen spezifischen Blutgasparametern und der, in der endoskopischen Untersuchung ermittelten Sekretmenge erkannt werden (p_aO_2 : $p = 0,046$, $r = -0,450$; p_aCO_2 : $p = 0,029$, $r = 0,489$). Ebenso zeigten alle Blutgasparameter eine teils hoch signifikante Beziehung zu den Ergebnissen der indirekten interpleuralen Druckmessung (p_aO_2 : $p = <0,001$, $r = -0,856$; p_aCO_2 : $p = 0,026$, $r = 0,497$; A-aDO₂: $p = <0,001$, $r = 0,888$).

2.4 Venöse Blutuntersuchung

Bei der Eingangsuntersuchung zeigten die Differenzialzellbilder, die absoluten Leukozytenzahlen, die Gesamteiweißkonzentration und die roten Blutbilder aller Pferde ausnahmslos physiologische Werte. Somit bestand bei keinem Pferd der Verdacht einer systemischen Entzündungsreaktion oder einer Erkrankung anderer Organe.

2.5 Indirekte interpleurale Druckmessung

Zur Einschätzung der Lungendynamik wurde mittels einer Ösophagussonde die maximale interpleurale Druckdifferenz ($\Delta P_{pl} \max$) ermittelt. Es konnten von allen 21 Pferden auswertbare Lungenfunktionsprotokolle gewonnen werden. Die Werte variierten vor der Behandlung in Gruppe I von 7 bis 68 cmH₂O und in Gruppe II von 6 bis 68 cmH₂O (s. Abb. 14). Eine statistisch signifikante Varianz der Gruppen war nicht vorhanden ($p = 0,557$).

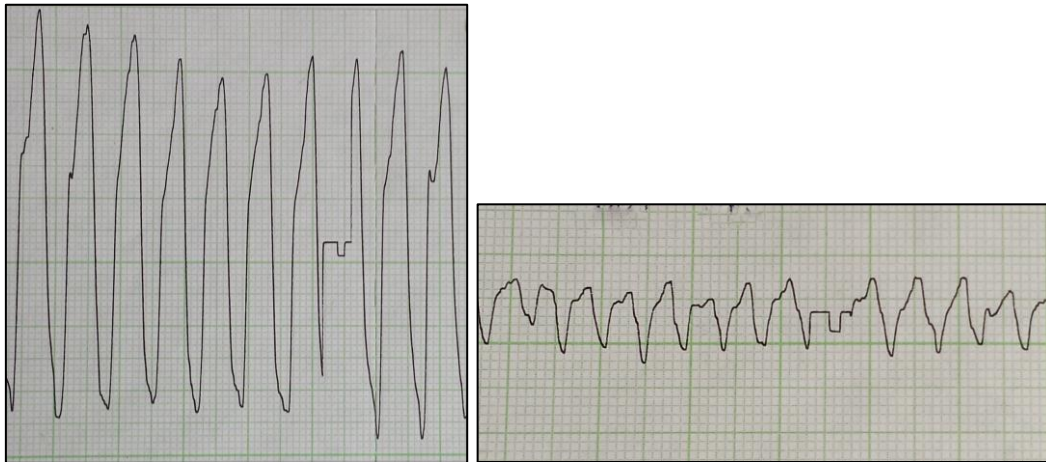


Abb. 14: Vergleichende Darstellung zweier Interpleuraldruckmessungen mit deutlicher biphasischer Expiration. Links hochgradige (Pferd Nr. 2), rechts geringgradige (Pferde Nr. 18) Erhöhung des indirekten Interpleuraldrucks.

Die Korrelationen zwischen Lungenmechanik und Gasaustausch in den Alveolen zeigte sich deutlich in den statistischen Berechnungen (s. Tab. 15). Zudem konnte ein hoch signifikanter ($p = <0,001$) Zusammenhang zum Auskultationsscore nachgewiesen werden ($r = 0,795$).

Tab. 15: Rangkorrelationskoeffizienten (r) mit Signifikanz (p) zwischen $\Delta P_{pl} \max$ und den Blutgasparametern.

Parameter	$\Delta P_{pl} \max$	
	r	p
p_{aO_2} :	-0,856	<0,001
p_{aCO_2}	0,497	0,026
A-aDO ₂	0,888	<0,001

2.6 Endoskopische Untersuchung

Die mittleren Punktwerte aller Pferde beliefen sich bei der Sekretmenge auf $3,05 \pm 1,04$ und bei der Sekretviskosität auf $3,14 \pm 1,02$. Eine statistisch signifikante Gruppenvarianz war weder für die Sekretmenge ($p = 0,654$), noch für die Sekretkonsistenz ($p = 0,314$) vorhanden.

Bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Sekretmenge und dem p_aO_2 ($p = 0,046$, $r = -0,450$) zum einen und eine positive Korrelation zwischen Sekretmenge und p_aCO_2 ($p = 0,029$, $r = 0,489$) zum anderen. Die Blutgasparameter waren umso besser, je weniger Sekret in der Trachea vorhanden war.

Zusätzlich konnten Beziehungen zwischen den Ergebnissen der endoskopischen und der zytologischen Untersuchung ermittelt werden (s. Tab. 16). Die Korrelationen zwischen Sekretmenge des TBS auf der einen Seite und Neutrophilen mit $r = 0,702$ ($p = 0,001$) und Makrophagen mit $r = -0,675$ ($p = 0,002$) auf der anderen Seite zeigten sich als signifikant. Ebenso konnte eine Korrelation zwischen Sekretkonsistenz und Neutrophilen ($r = 0,598$, $p = 0,007$) und Sekretkonsistenz und Makrophagen ($r = -0,760$, $p = <0,001$) errechnet werden. Je höher der Sekretmenge- und Sekretkonsistenzscore, desto mehr neutrophile Granulozyten und desto weniger Makrophagen traten im TBS auf.

Tab. 16: Korrelationskoeffizienten (r) mit ihren Signifikanzen (p) zwischen endoskopischen und zytologischen Parametern.

Parameter	Sekretmenge		Sekretkonsistenz	
	r	p	r	p
Neutrophile Granulozyten (%)	0,702	0,001	0,598	0,007
Makrophagen (%)	-0,675	0,002	-0,760	<0,001

2.7 Zytologische Untersuchung

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen wurden in jeder TBS-Probe nachgewiesen, wobei drei der einundzwanzig Proben auf Grund von Speichelkontamination nicht auswertbar waren. Im Mittel belief sich die Zahl der Neutrophilen auf $65,64 \pm 34,6$ % und die der Makrophagen auf $28,38 \pm 33,37$ %. Die Verteilung der Zellen vor der Behandlung auf die beiden Gruppen zeigt Abbildung 15. Hier ist zu erkennen, dass die geringgradig erkrankten Pferde ($n = 4$) deutlich weniger Neutrophile im TBS aufwiesen.

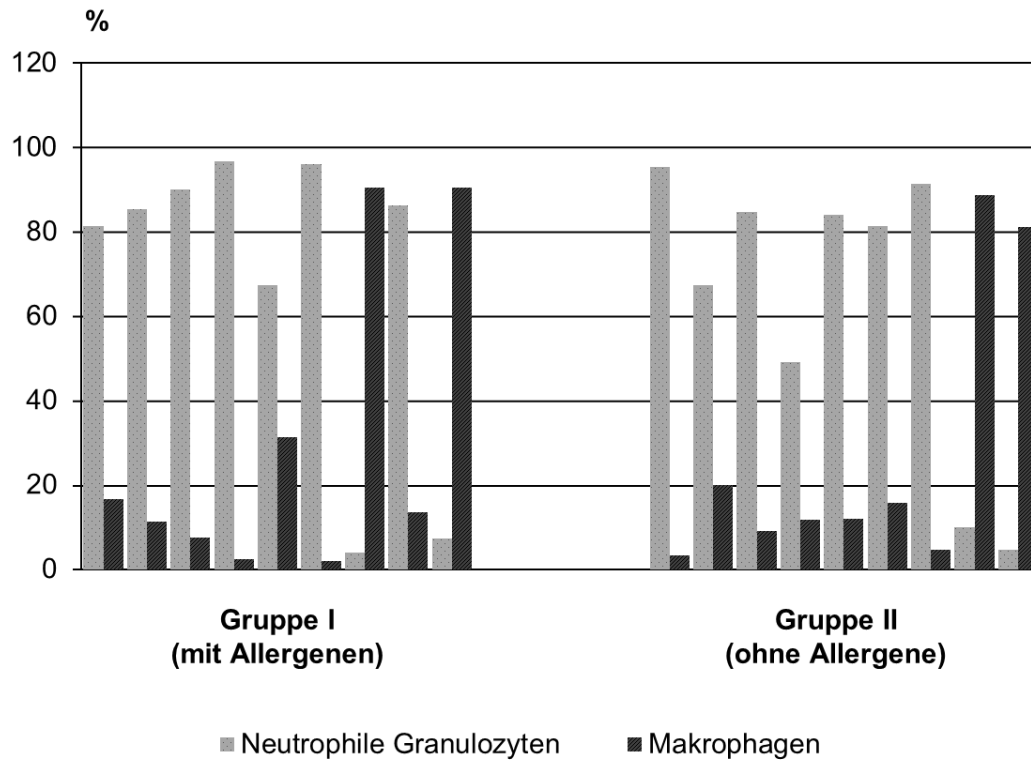


Abb. 15: Prozentuale Anteile der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an den TBS-Gesamtzellbildern vor der Behandlung. Jedes Balkenpaar symbolisiert ein Pferd.

Ein statistisch signifikanter Unterschied vor der Behandlung fand sich weder bei den neutrophilen Granulozyten ($p = 0,431$), noch bei den Makrophagen ($p = 0,835$).

In den Korrelationsuntersuchungen zeigten sich, wie bereits beschrieben, teils signifikante Beziehungen zwischen den endoskopischen und zytologischen Untersuchungen des Tracheobronchialsekrets (s. IV Ergebnisse, Kap. 2.6).

Die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen korrelierten negativ miteinander ($r = -0,965$, $p = <0,001$).

2.8 Gesamtscore

Der Mittelwert mit Standardabweichung der Gesamtscore-Punkte aller Pferde belief sich auf $29,24 \pm 9,41$, wobei sich in Gruppe I eine Punktzahl ($\bar{x} \pm s$) von $30,32 \pm 10,8$ und in Gruppe II von $28,15 \pm 8,05$ errechnen ließ. Die Verteilung der nach der Erstuntersuchung erreichten Score-Punkte auf die zwei Gruppen ist in Abbildung 16 zu sehen.

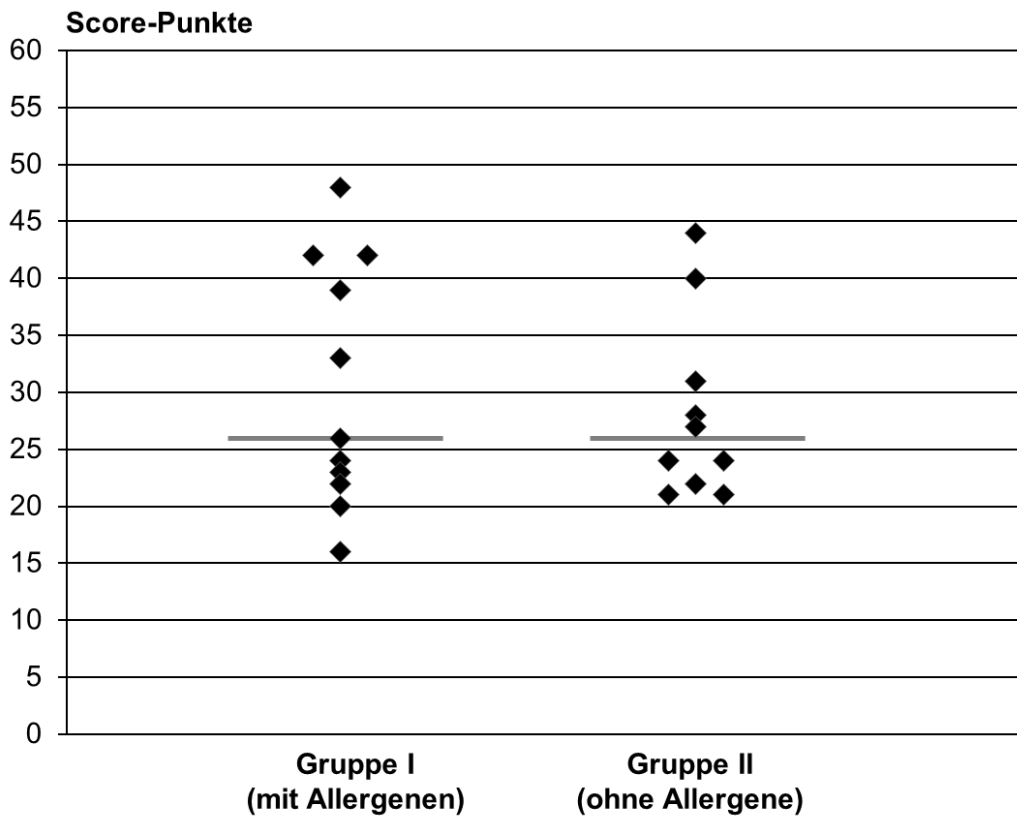


Abb. 16: Errechnete Score-Punktzahl der einzelnen Pferde, aufgeteilt auf die zwei Gruppen. Medianwert als horizontale Linie gekennzeichnet.

Die statistische Untersuchung ergab, dass in Bezug auf die Gesamtscore-Punkte eine nahezu homogene Verteilung und somit kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bestand ($p = 0,809$).

3. Ergebnisse der Folgeuntersuchungen nach Inhalationstherapie

3.1 Ruheatemfrequenz

In der statistischen Untersuchung war zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied der Gruppe I und Gruppe II in Bezug auf die Ruheatemfrequenz zu sehen. Die bei den drei Untersuchungen ermittelten mittleren Werte, sowie die jeweiligen Signifikanzwerte p sind in Tabelle 17 zu sehen.

Tab. 17: Mittlere Ruheatemfrequenzwerte ($\bar{x} \pm s$ Züge/min) der 3 Untersuchungen mit den dazugehörigen Signifikanzwerten zur Analyse der Gruppenvarianz.

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung
Gruppe I (mit Allergenen)	22,91 ± 7,12	21,09 ± 7,87	16,4 ± 8,04
Gruppe II (ohne Allergene)	30,6 ± 10,16	25,33 ± 8,49	19,56 ± 11,26
Signifikanz p	0,85	0,370	0,4

Die Verbesserung der Ruheatemfrequenzwerte zwischen 1. (vor Behandlung) und 2. (direkt nach Behandlung) Untersuchung war in Gruppe I nicht signifikant ($p = 0,41$) und in Gruppe II nur knapp nicht signifikant ($p = 0,058$). Die Verbesserung zur 3. Untersuchung erwies sich in Gruppe I ebenfalls als knapp nicht signifikant ($p = 0,057$), wohingegen die Gruppe II eine signifikante Verbesserung zeigte ($p = 0,018$).

3.2 Auskultation des Respirationstrakts

Es konnten deutliche Besserungen in den Auskultationsbefunden nach der Behandlung verzeichnet werden, welche in Gruppe I signifikant waren (2. Untersuchung $p = 0,006$, 3. Untersuchung $p = 0,004$). In Gruppe II stellte sich die Verbesserung der Befunde zwischen erster und dritter Untersuchung als signifikant heraus ($p = 0,028$) (s. Abb. 17).

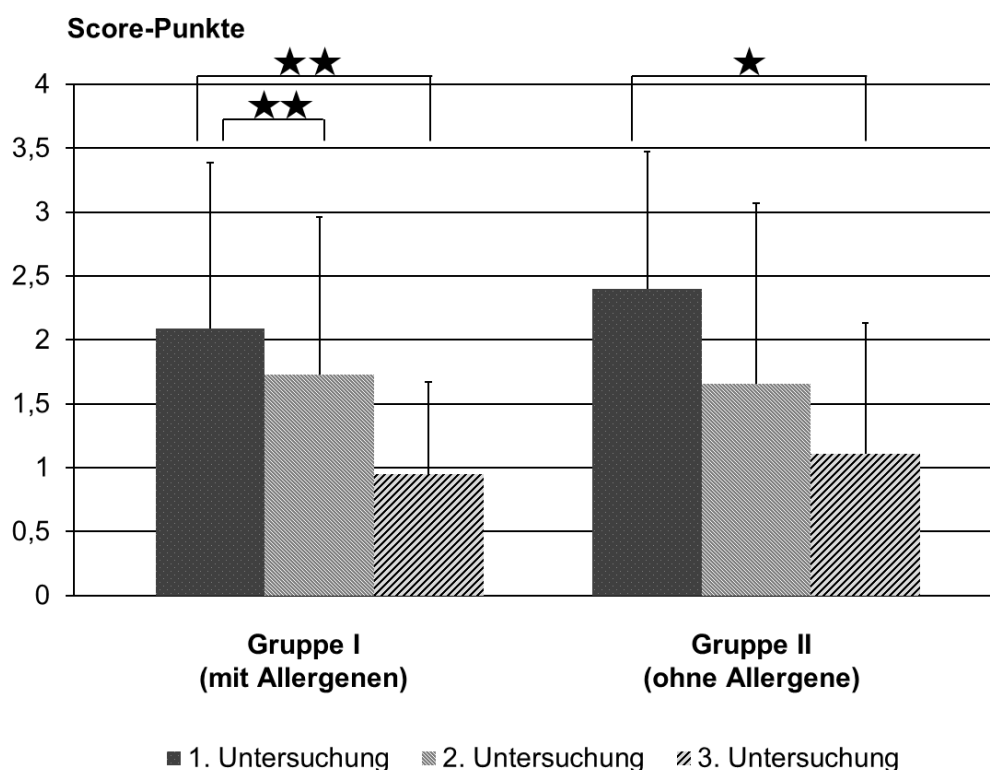


Abb. 17: Mittlere Score-Punkte der Lungenauskultation mit Standardabweichung vor, direkt nach und sechs Wochen nach letzter Inhalation.

Dennoch bestand zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe II (s. Tab. 18).

Tab. 18: Mittlere Punktzahlen ($\bar{x} \pm s$) des Auskultationscores mit der jeweiligen Signifikanz p zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Gruppen.

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung
Gruppe I (mit Allergenen)	2,09 ± 1,3	1,73 ± 1,23	0,95 ± 0,72
Gruppe II (ohne Allergene)	2,4 ± 1,07	1,66 ± 1,41	1,11 ± 1,02
Signifikanz p	0,309	0,163	0,853

3.3 Arterielle Blutgasanalyse

Mit der statistischen Auswertung der Blutgasanalysedaten konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Verbesserung der Werte, basierend auf der Inhalationsbehandlung, weder bei der 2. Untersuchung, noch bei der 3. Untersuchung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe II bestand (s. Tab. 19). Obwohl statistisch nicht signifikant konnten im Gruppenvergleich durchschnittlich etwas bessere Werte bei Gruppe II erkannt werden.

Tab. 19: Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse ($\bar{x} \pm s$ in mmHg) und Unterschiede zwischen den Gruppen nach Inhalationsbehandlung.

		Gruppe I (mit Allergenen)	Gruppe II (ohne Allergene)	Signifikanz p
1. Untersuchung	p _a O ₂	80,24 ± 11,79	86,32 ± 12,74	0,261
	p _a CO ₂	46,29 ± 4,03	44,91 ± 5,51	0,603
	A-aDO ₂	23,05 ± 9,36	18,62 ± 8,97	0,295
2. Untersuchung	p _a O ₂	85,33 ± 15,25	89,08 ± 13,11	0,603
	p _a CO ₂	44,25 ± 4,92	42,42 ± 1,73	0,412
	A-aDO ₂	20,61 ± 15,29	18,57 ± 13,72	0,766
3. Untersuchung	p _a O ₂	91,07 ± 15,57	95,37 ± 11,94	0,604
	p _a CO ₂	45,69 ± 2,98	42,19 ± 3,01	0,035
	A-aDO ₂	13,01 ± 13,97	12,26 ± 12,25	0,905

Die Verbesserung der Werte zwischen 2. und 3. Untersuchung in Gruppe I konnten bei den Parametern p_aO₂ (p = 0,013) und A-aDO₂ (p = 0,027) als signifikant ermittelt werden.

3.4 Venöse Blutuntersuchung

Bei keinem der Pferde konnte zu irgendeinem Zeitpunkt der Therapie eine Abweichung von den Normwerten des Differenzialzellbilds, im Speziellen weder eine Leukopenie noch eine Leukozytose festgestellt werden. Auch die roten Blutbilder (Hämatokrit, Erythrozytenanzahl, Hämoglobingehalt) aller Pferde wiesen bei keinem der Untersuchungstermine unphysiologische Werte auf.

3.5 Indirekte interpleurale Druckmessung

Im Laufe der Behandlung verringerten sich die Werte im Mittel ($\bar{x} \pm s$) in Gruppe I von 28,45 ± 25,07 auf 26 ± 24,16 cmH₂O und zuletzt auf 22,78 ± 22,39 cmH₂O, in Gruppe II von 23,8 ± 22,89 auf 21 ± 21,85 cmH₂O und am Ende auf 16,88 ± 16,77 cmH₂O. In der statistischen Überprüfung erwiesen sich die Verbesserungen der ΔPpl max im Laufe der Inhalationstherapie als nicht signifikant (s. Abb. 18).

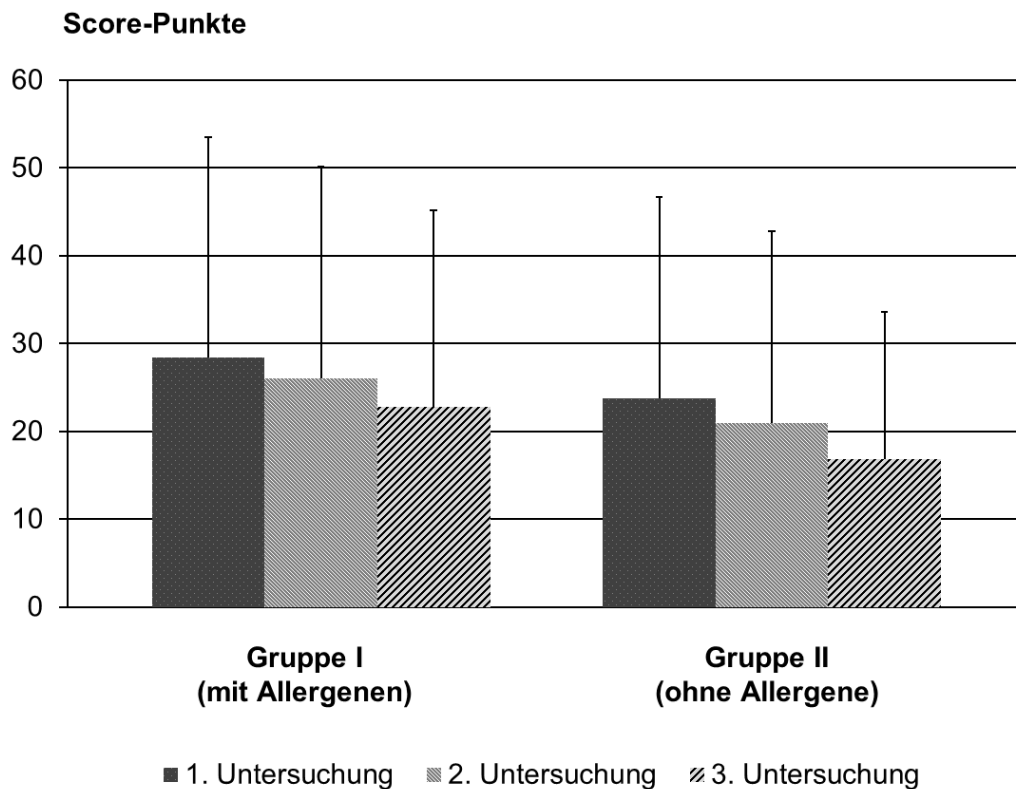


Abb. 18: Mittlere ΔP_{pl} max-Werte ($\bar{x} \pm s$) vor, direkt nach und 6 Wochen nach letzter Inhalation.

Die Werte der Gruppe II schienen sowohl zu Beginn, als auch bei den weiteren 2 Untersuchungen deutlich geringer als in Gruppe I. Dies bestätigte sich in den Signifikanzberechnungen nicht ($p_1 = 0,557$, $p_2 = 0,412$, $p_3 = 0,541$).

3.6 Endoskopische Untersuchung

Bei keiner der zwei Folgeuntersuchungen konnte in der endoskopischen Untersuchung ein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen (I + II) erkannt werden (für TBS-Menge: 2.US: $p = 0,552$, 3. US: $p = 0,400$; für TBS-Konsistenz: 2. US: $p = 0,603$ 3. US: $p = 0,356$). Trotz der fehlenden Signifikanz im Gruppenvergleich schien der Abfall der TBS-Scoring-Punkte der Sekretmenge in der Gruppe I deutlicher zu sein. In dieser Gruppe fällt die Score-Punktzahl von 1. auf 2. Untersuchung mit einer Signifikanz von $p = 0,005$ und von 1. auf 3. Untersuchung mit einer Signifikanz von $p = 0,003$. Bei Gruppe II lässt sich lediglich zwischen 1. und 3. Untersuchung ein statistisch signifikanter Abfall der Scoring-Punkte mit $p = 0,002$ verzeichnen (s. Abb. 19).

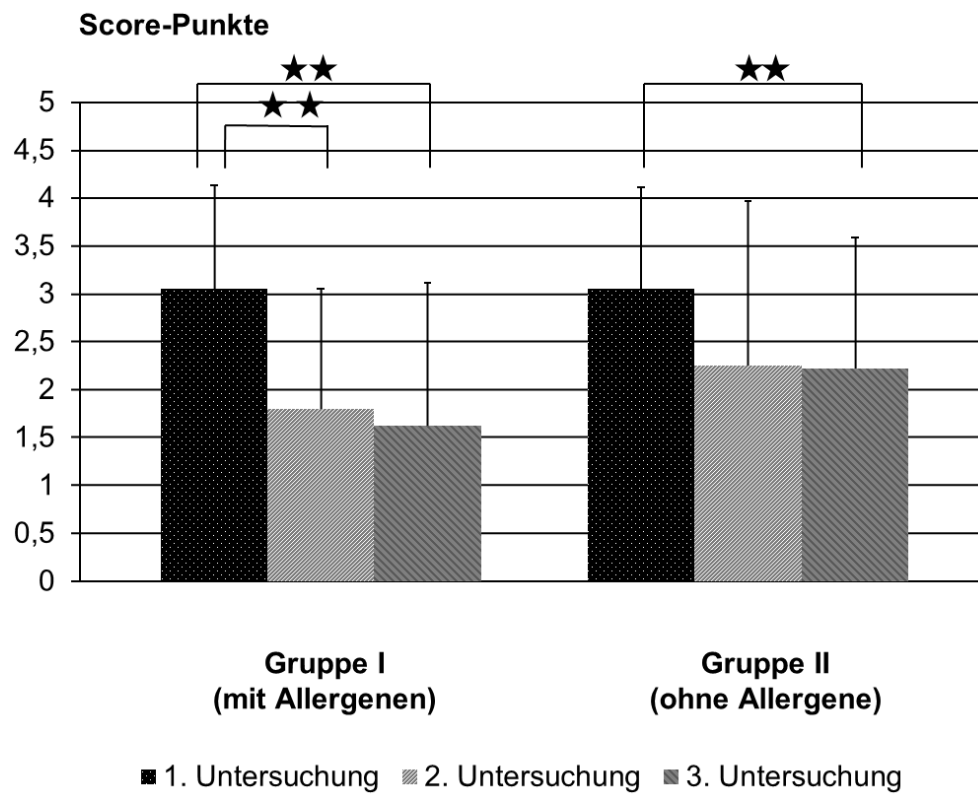


Abb. 19: Mittlere Score-Punkte der Sekretmenge mit Standardabweichung vor, direkt nach und 6 Wochen nach letzter Inhalation.

Bezüglich der Sekretkonsistenz der Gruppe I zeigte sich sowohl bei der 2. Untersuchung ($p = 0,003$), als auch bei der 3. Untersuchung ($p = 0,002$) eine statistisch signifikante Verbesserungen im Vergleich zur Eingangsuntersuchung (s. Abb. 20).

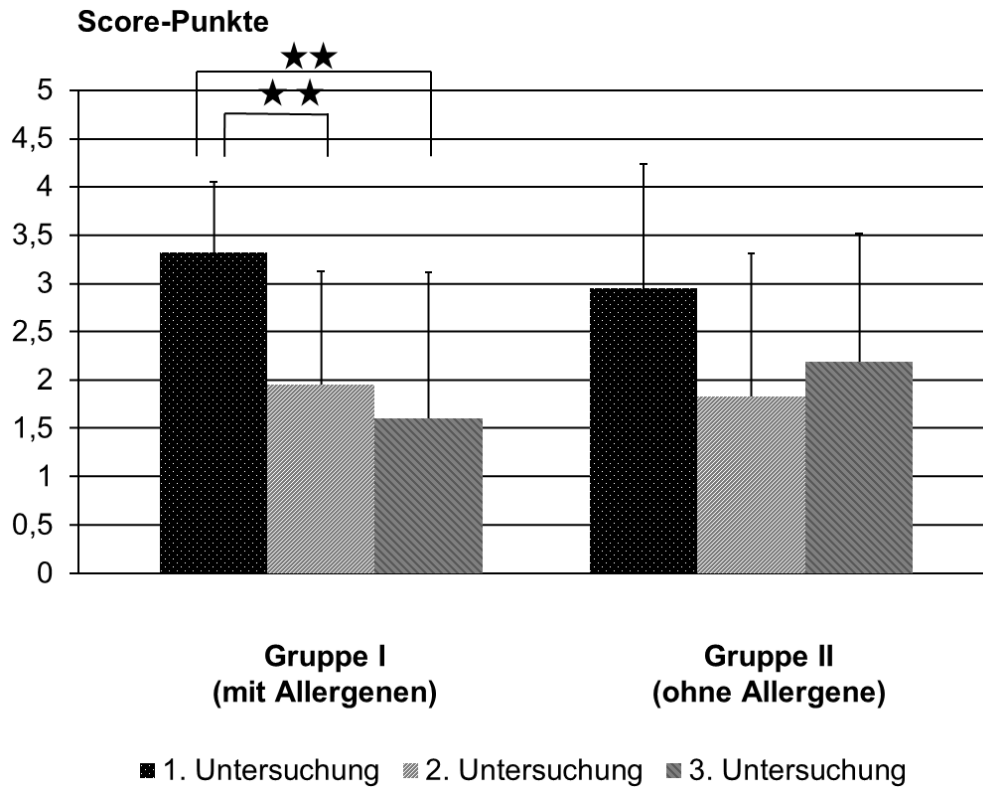


Abb. 20: Mittlere Score-Punkte der Sekretkonsistenz mit Standardabweichung vor, direkt nach und 6 Wochen nach letzter Inhalation.

In Gruppe II waren die Veränderungen der Untersuchungsergebnisse dagegen statistisch nicht signifikant.

3.7 Zytologische Untersuchung

Die statistische Überprüfung wies eine Senkung der Neutrophilen Granulozyten im Laufe der Behandlung in Gruppe I auf, welche im Gruppenvergleich keinen statistisch signifikanten Unterschied darstellte. Der prozentuale Anteil in Gruppe II blieb nahezu unverändert. Genau umgekehrt stellte sich die Situation bezüglich der Anteile an Makrophagen dar (s. Tab. 20).

Tab. 20: Mittlere prozentuale Anteile ($\bar{x} \pm s$) der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an den TBS-Gesamtzellbildern mit der Signifikanz p zur Erkennung von Gruppenvarianzen.

	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung
Neutrophile Graulozyten (%)			
Gruppe I (mit Allergenen)	68,22 ± 36,53	57,9 ± 34,33	51,77 ± 39,13
Gruppe II (ohne Allergene)	63,06 ± 34,56	63,83 ± 31,99	67,52 ± 39,0
Signifikanz p	0,431	0,873	0,525
Makrophagen (%)			
Gruppe I (mit Allergenen)	29,46 ± 35,67	27,01 ± 28,47	15,52 ± 19,13
Gruppe II (ohne Allergene)	27,31 ± 33,05	15,02 ± 16,09	8,2 ± 8,28
Signifikanz p	0,835	0,291	0,341

3.8 Gesamtscore

Zwar konnte sowohl in Gruppe I, als auch in Gruppe II eine deutliche Besserung der Symptome, also eine Verringerung der Score-Punktzahl im Verlauf der 3 Untersuchungen verzeichnet werden, jedoch reagierten beide Gruppen mit einer Signifikanz von $p = 0,882$ bei der 2. Untersuchung und von $p = 0,842$ bei der 3. Untersuchung statistisch gleich (s. Abb. 21).

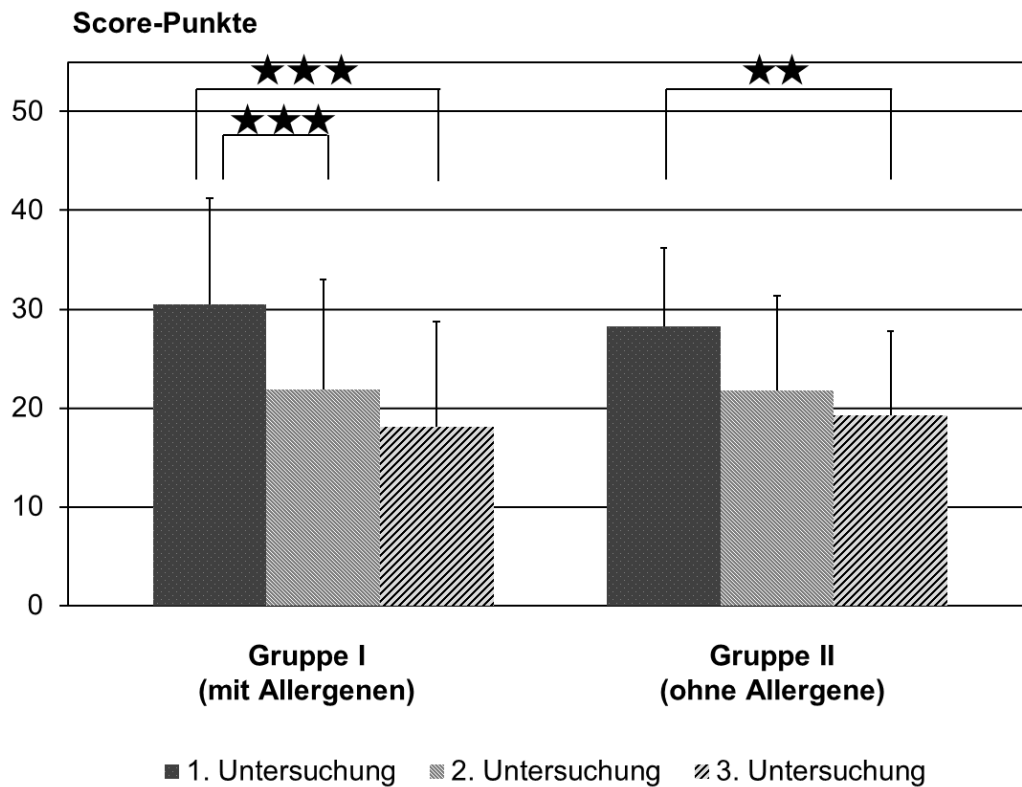


Abb. 21: Mittlere Score-Punktezahl ($\bar{x} \pm s$) vor, direkt nach und 6 Wochen nach letzter Inhalation.

Die Punkte verringerten sich in Gruppe I von durchschnittlich $30,23 \pm 10,8$ auf $21,68 \pm 11,1$ ($p = < 0,001$) und nach 6 Wochen auf $16,32 \pm 11,41$ ($p = < 0,001$). In Gruppe II fielen sie von durchschnittlich $28,15 \pm 8,05$ auf $19,55 \pm 11,4$ ($p = 0,149$) und zuletzt auf $17,2 \pm 10,08$ ($p = 0,010$).

Weiterhin wurde anhand des Gesamtscores rechnerisch der erreichte Therapieerfolg ermittelt. Verringerte sich die Score-Punktzahl um mindestens 8 Punkte oder mehr zwischen der 1. und 2. Untersuchung, so wurde der Therapieerfolg mit gut bewertet. War dies nicht der Fall, so ging man von einem schlechten Therapieerfolg aus. In der statistischen Überprüfung der Gruppen war kein signifikant unterschiedlicher Therapieerfolg zu verzeichnen ($p = 0,714$).

V DISKUSSION

1. Diskussion von Material und Methoden

1.1 Diskussion der allgemeinen Patientendaten

1.1.1 Patientengut

Das Patientengut wies mit einem Mittelwert von $17,43 \pm 5,14$ Jahren bei einer Spanne von acht bis 27 Jahren eine breite Streuung der Altersverteilung auf. Nach LÉGUILLETTE (2003) sind die meisten an COB erkrankten Pferde älter als fünf Jahre, nach AINSWORTH (2010) sogar älter als sieben Jahre. Auch in einer Studie von MCPHERSON und Mitarbeiter (1979) wiesen 21 der 38 Pferde mit diagnostizierter COB, ein Alter von sechs bis 10 Jahren auf. Die Autoren betonen, dass die Prävalenz der Erkrankung mit dem Alter deutlich zunimmt, was mit den eigenen Ergebnissen bestätigt werden kann. 90,5 % ($n = 19$) der Studienteilnehmer wiesen ein Alter von über 11 Jahren auf. Allerdings ist hierbei fraglich, ob Besitzer eventuell jüngerer Pferde, welche erst seit kurzem und/oder geringgradig erkrankt waren, einer Teilnahme bei dieser Studie zugestimmt hätten. Um die Wahrscheinlichkeit einer COB als Ursache der chronisch respiratorischen Erkrankung der Probanden zu erhöhen und das Risiko anderer Ursachen (beispielsweise bakteriellen oder parasitären Ursprungs) zu verringern, wurde für die Teilnahme an der Studie ein Mindestalter von sieben Jahren gefordert. Im Gruppenvergleich fiel ein statistisch signifikant höherer Altersdurchschnitt in Gruppe I auf, was durch das erfolgte Losverfahren bei der Zuteilung der Gruppen zufällig zu Stande kam. Diese Tatsache ist bei der statistischen Auswertung einer möglichen Korrelation von Alter und Erkrankungsdauer zu berücksichtigen.

Die eigenen COB Patienten gehörten überwiegend und zu gleichen Teilen (38,1 %) der Gruppe der Warmblutpferde und der Ponys an. Lediglich vier Pferde (23,8%) konnten auf die Gruppe der Barock- und Kleinpferde aufgeteilt werden. Diese Daten decken sich mit der Schweizer Studie von BRACHER und Mitarbeiter (1991), welche zur Ermittlung der Inzidenz bei COPD hauptsächlich Warmblutpferde einbezogen. Ebenso konnte unter gleichen Haltungsbedingungen eine familiäre Häufung der Erkrankung bei Warmblütern gegenüber Lipizzanern nachgewiesen werden (MARTI et al., 1991). Das vermehrte Auftreten der Erkrankung bei Ponys gegenüber Vollblütern beschrieben MCPHERSON und Mitarbeiter (1979) in ihrer Studie. Diese Daten, ebenso wie die eigenen Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den von DIXON und Mitarbeitern (1995a, 1995b) beschriebenen. Deren Patientengut bestand zum größten Teil aus englischen Vollblütern (40,6 %). Ponys zusammen mit Pferden anderer Rassen machten in dieser Studie nur 21,7 % der Gesamtteilnehmerzahl aus, wovon lediglich 2,7 % Warmblüter waren. Erklärend für die hohe Anzahl der Vollblutpferde war die Hauptnutzungsart (Galopprennen) der Probanden (DIXON et al., 1995a, 1995b). Vor allem für Warmblutpferde scheint eine echte Rasseprädisposition möglich, konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (BRACHER et al., 1991, DIXON et al., 1995b).

In die Studie einbezogen wurden Stuten ebenso wie Wallache und Hengste, wobei die männlichen Tiere, davon zwei Hengste, mit 81 % ($n = 17$) deutlich überwogen. Diese Datenlage widerspricht einer Studie von LÉGUILLETTE (2003), in welcher keine Hinweise auf eine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden konnten. Auch weitere Studien zur COPD konnten keine Prädisposition in Bezug auf die Geschlechterverteilung erkennen (MCPHERSON et al., 1979; MARTI et al., 1991; DIXON et al., 1995b).

1.1.2 Anamnestische Grunddaten

1.1.2.1 Vorberichtliche Dauer der Erkrankung

Die anamnestische Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Eingangsuntersuchung belief sich im Mittel auf $6,69 \pm 5,39$ Jahre, wobei 33,3% ($n = 9$) der Pferde seit mehr als 10 Jahren deutliche Symptome zeigten. Zwar ohne statistische Relevanz, jedoch klar im Vergleich zusehen, waren deutlich längere Erkrankungszeiten in Gruppe I. Dieses Ergebnis dürfte auf das signifikant höhere Alter in dieser Gruppe, in Zusammenhang mit der nachgewiesenen signifikanten Korrelation von Alter und Erkrankungsdauer zurückzuführen sein. Da eine Spontanheilung bei der COB des Pferdes nicht beschrieben ist, lässt sich die Aussagekraft dieser statistischen Untersuchungen als durchaus hoch einstufen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Patientendaten von DIXON et al. (1995b), bei welchen die jüngeren Pferde ebenfalls deutlich kürzere Erkrankungszeiten aufwiesen. Zu berücksichtigen ist bei den eigenen Ergebnissen das für die Studienteilnahme geforderte Mindestalter von sieben Jahren.

Die Untersuchung der eigenen Patienten bezüglich des Alters beim Auftreten der ersten Symptome ergab einen Mittelwert von $10,33 \pm 4,04$ Jahren. Somit erwiesen sich die eigenen Patienten als etwas älter als die von DIXON und Mitarbeitern (1995a) untersuchten Pferde, welche einen Medianwert von neun Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose aufwiesen. Angemerkt werden muss an dieser Stelle die Tatsache, dass die Werte dieses anamnestischen Parameters in der vorliegenden Studie allein von der Einschätzung der Besitzer abhängen. Naturgemäß besteht bei den verschiedenen Besitzern eine variierende Sensibilität bezüglich der Interpretation typischer Symptome (Husten, Leistungsmangel, pumpende Atmung). Ein meist schleichender Krankheitsbeginn erschwert die Einschätzungen. Somit wird die Dauer der Symptome möglicherweise durch die Besitzer eher unterschätzt, was bei der Interpretation dieser Angaben berücksichtigt werden muss. Insgesamt konnte in mehreren Studien eine mit steigendem Alter erhöhte Inzidenzrate bezüglich der COB-Erkrankungen bei Pferden gezeigt werden (COUËTIL und WARD, 2003; RAMSEYER et al., 2007).

Kontrovers diskutiert wird bis heute ein möglicher progressiver Verlauf der Erkrankung. Einige Autoren halten das Krankheitsbild der COB nicht zwangsläufig für progressiv (DIXON et al., 1995b, SASSE, 1995). Erklärend für das weniger dramatische Krankheitsgeschehen heute im Vergleich zu früher verweist GERBER (1997) auf die heutzutage besseren Haltungsbedingungen und den rücksichtsvolleren Einsatz der Pferde. Andere Studien kommen zu dem Schluss, dass sich der Krankheitsverlauf der COB stets fortschreitend darstellt (MCPHERSON et al., 1979; RAMSEYER et al., 2007). Die eigenen Untersuchungen ergaben eine signifikante ($p = 0,014$) Korrelation ($r = 0,567$) zwischen der Erkrankungsdauer und dem Gesamtscore. Demzufolge zeigten länger erkrankte Pferde stärker pathologische Atemwegssymptome, als kürzer erkrankte, was einen progressiven Krankheitsverlauf vermuten lässt. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass allein durch das Alter des Pferdes eine Verschlechterung der Lungenfunktion auftreten kann (HERHOLZ et al., 2002).

1.1.2.2 Jahreszeitliches Auftreten der Symptome

Über die Hälfte der Besitzer (67,7%) konnten von einer erkennbaren Symptomverschlechterung zu einer bestimmten Jahreszeit berichten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen von MCPHERSON und

Mitarbeitern (1979), welche bei 79 Pferden keinerlei jahreszeitlich gehäufte Hustensymptomatik feststellen konnten. In den eigenen Untersuchungen konnten lediglich sieben der 21 Pferdebesitzer keine Schwankungen der Symptomstärke beschreiben.

Bei 33,3% (n = 7) der Pferde erfolgte die Symptomverschlechterung im Frühling, wobei drei dieser Pferde eine schleichende Verschlechterung bis in den Übergang zum Sommer zeigten und bei einem Pferd zusätzlich eine Verschlechterung im Herbst deutlich war. Einfache Erklärungen für das vermehrte Auftreten respiratorischer Symptome im Frühling könnten in den steigenden Temperaturen, dem Fellwechsel der Pferde oder der nach dem Winter intensiveren reiterlichen Nutzung der Pferde liegen. Symptome wie Leistungsminderung und Husten zu Beginn der Belastung könnten dem Besitzer erst dann auffallen. Mit einer Studie aus den USA, in welche 2469 Pferde einbezogen wurden, konnten KANEENE und Mitarbeiter (1997) einen Anstieg der respiratorischen Neuerkrankungen im Monat Mai um das etwa sechsfache der Werte bezüglich der restlichen Monaten des Jahres verzeichnen. Verantwortlich hierfür machen die Autoren den erhöhten Infektionsdruck, bedingt durch den zu dieser Jahreszeit vermehrten Kontakt zu fremden Pferden auf sportlichen Veranstaltungen oder Zuchtschauen (KANEENE et al., 1997). Da beim Mensch und Kalb eine nach klinisch apparenten Infektionen des Respirationstrakts auftretende, unspezifische Hyperreagibilität der Atemwege nachgewiesen ist, liegt die Vermutung eines ähnlichen Geschehens beim Pferd nahe (EMPEY et al., 1976; REINHOLD et al., 2000). Auch FEY (2006b) beschreibt bei COB kranken Pferden einen möglichen Anstieg der unspezifischen, bronchialen Überempfindlichkeit nach akuten Atemwegsinfektionen. Weiterhin könnte für die Zunahme der Krankheitssymptome zu dieser Jahreszeit eine über den Winter suboptimale Heulagerung mit vermehrter Schimmelpilzbildung im Frühjahr verantwortlich sein (FEY, 2006b). Ebenso besteht die Vermutung, dass manche Pferde erst nach einigen Monaten auf die langanhaltende Staubbelastung durch die vermehrte Aufstallung im Winter reagieren (FEY, 2006b).

Ausschließlich in den Sommermonaten zeigten lediglich vier Pferde eine Symptomverschlechterung. Unter diesem Aspekt könnte zunächst an die Diagnose der SPAOPD (Summer Pasture-Associated obstructive pulmonary Disease) gedacht werden. Jedoch wurde in mehreren Studien aus Großbritannien die Möglichkeit eines kombinierten Auftretens von COPD und SPAOPD bestätigt (DIXON et al., 1995a; MAIR, 1996). Bei dem Großteil der Pferde dieser Studien zeigte eine Aufstallung mit Fütterung von Heu anstelle von Gras keine entsprechende Linderung der Symptome, was gegen eine reine SPAOPD spricht. Bei den vier Pferden der eigenen Studie konnten alle Besitzer eine deutliche Verschlechterung der Symptome bei (Heu-) Staubbelastung und/oder schlecht belüfteter Aufstallung beschreiben. Somit besteht höchstens die Vermutung einer kombinierten Erkrankung. Eine gesicherte Diagnose wäre letztlich nur durch eine dauerhafte Aufstallung im Sommer mit folgender Besserung der Symptomatik zu erzielen gewesen.

Im Herbst und Winter fiel vorberichtlich bei vier Pferden eine Verschlechterung der Symptomatik auf, wobei eines dieser Pferde ebenfalls im Frühling eine Symptomverstärkung zeigte. Die Veränderungen der klinischen Anzeichen zu dieser Jahreszeit lassen sich auf die längere Aufenthaltsdauer in schlecht belüfteten Ställen oder Unterständen mit vermehrter Stroheinstreu in Kombination mit mangelnder Bewegung oder Bewegung in staubigen Reithallen zurückführen (GERBER, 1997).

1.1.2.3 Managementbedingungen

Als wichtigster Teil der COB-Therapie wird heutzutage in der Literatur übereinstimmend die staubarme Haltungsoptimierung genannt (ROBINSON, 2001a; LÉGUILLETTE, 2003; FEY, 2006b; AINSWORTH, 2010). Während zu anfangs allein die Sporen thermophiler Schimmelpilze, gleichermaßen in adspektorisch einwandfreiem, wie auch in offensichtlich verschimmeltem Heu vorkommend, für die unspezifische Hyperreagibilität der Atemwege und somit die chronischen Atemwegssymptome verantwortlich gemacht wurden, konnten MCGORUM und Mitarbeiter (1993d) später beweisen, dass mit verschimmeltem Heu bei anfälligen Pferden eine deutlich stärkere Reaktion der Atemwege zu provozieren ist als mit einzelnen Schimmelpilz-Antigenen (MCPHERSON und THOMSON, 1983). Somit gingen die Autoren bezüglich des Auslösers der bronchialen Überempfindlichkeit von kombinierten organischen Stäuben (Milben, Schimmelpilzsporen, Pollen, etc.) aus.

Bei der Reduzierung der krankheitsauslösenden organischen Stäube kommt, neben der Gewährleistung von ausreichend frischer Luft, der durchgängigen Fütterung von eingeweichtem Heu oder Silage, bestenfalls der kompletten Futterumstellung auf gepresste Futtermittel die größte Bedeutung zu (ROBINSON, 2001b; LÉGUILLETTE, 2003). Nach THOMSON und MCPHERSON (1983) ist das alleinige Anfeuchten oder Einweichen des Heus nicht immer ausreichend, um aktuellen Symptomen entgegenzuwirken. Ebenso sollte bei Boxenhaltung komplett auf Stroh- und Sägemehlstreu verzichtet werden (ROBINSON, 2001a). In der Studie von DIXON und Mitarbeitern (1995c) konnte bei 51,1 % von 148 an COPD erkrankten Pferden, nach mindestens sechswöchiger Haltungsoptimierung eine komplette Symptommfreiheit („complete improvement“) erreicht werden. 36,5 % der Pferde zeigten eine nur teilweise Verbesserung, was eventuell auf das nicht ausreichend konsequente Vorgehen der Besitzer oder den nicht eindringlich genug gestalteten Rat des Tierarztes bezüglich der vorzunehmenden Managementveränderungen zurückzuführen ist. Bei 12,8 % der Studienteilnehmer konnten keine Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf eingeholt werden (DIXON et al., 1995c).

In der vorliegenden Studie hatten vorberichtlich alle Besitzer in irgendeiner Form bereits Managementveränderungen durchgeführt, wobei zwei der Besitzer die Maßnahmen auf Grund mangelnden Erfolgs und erhöhten Aufwands wieder aufgegeben hatten. Somit wurden 57,1% (n = 12) der Pferde komplett in einem Offenstall oder auf der Weide gehalten. Die restlichen Tiere (n = 9) hielten sich mindestens stundenweise in einer Box auf. Zudem wurden alle Boxen mit Sägemehl und vier zusätzlich mit Stroh eingestreut. Die erhöhten Werte der ΔP_{pl} max der Pferde aus Boxenhaltung können mit der stärkeren Staubbelastung und schlechteren Belüftungssituation bei dieser Unterbringungsart erklärt werden. Drei der Tiere aus Boxenhaltung (33,3%) erhielten als Raufutterkomponente ausschließlich trockenes Heu zu fressen. Bei den Probanden in Offenstallhaltung hatten lediglich sechs Tiere (50%) überhaupt keinen Kontakt zu Stroh und Sägemehl und von diesen nur drei, welche mit eingeweichtem Heu gefüttert wurden. Insgesamt verzichteten somit 57,1 % der gesamten Besitzer komplett auf die Verfütterung von trockenem Heu. Die Arbeitsgruppe von DIXON und Mitarbeitern (1995a) konnte in ihrer Studie bezüglich dieses Verfahrens zur Haltungsoptimierung nur einen Prozentsatz von etwa 40 % verzeichnen. Ebenso entfernte der gleiche Anteil der Besitzer (57,1 %) in der eigenen Studie das Stroh aus der Umgebung der betroffenen Pferde, wohingegen in der schottischen Studie nur 14,4 % der Pferdebesitzer zu dieser Maßnahme griffen (DIXON et al., 1995a).

Durch die Einteilung der Probanden in unterschiedliche Gruppen bezüglich der Haltungform wurde in der vorliegenden Studie, nach Kenntnisstand der Autorin, zum ersten Mal ein möglicher Zusammenhang zwischen Allergenexposition des Pferdes und einer nachgewiesenen Reaktion auf spezifische Allergene untersucht. Demnach konnte durch den FIT-Test in der Gruppe mit Boxenhaltung bei signifikant mehr Tieren stärker positive Reaktionen auf eines der untersuchten Allergene ermittelt werden, als in der Gruppe ohne Boxenhaltung. Zudem reagierten die Pferde aus Boxenhaltung deutlich, wenn auch nicht signifikant häufiger und stärker auf Schimmelpilze, Gräser-Mix (Korn), Baum-Mix (spät), Raps, *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Acarus siro*. Diese Erkenntnisse unterstützen die Theorie vieler Autoren, nach welcher wenigstens im Anfangsstadium der Erkrankung ein allergisches Geschehen für die auftretenden Symptome verantwortlich ist (MCPHERSON und THOMSON, 1983; KLEIN und DEEGEN, 1986b; DERKSEN et al., 1988; MCGORUM et al., 1993c; LECLERE et al., 2011). Da auch Pferde mit einer längeren Krankheitsdauer stark positive Ergebnisse im FIT erzielten, lässt sich durch Einbeziehung der Haltungform eine nicht nur zu anfangs relevante, sondern auch im fortgeschrittenen Krankheitsgeschehen stärkere immunologische Reaktion im Sinne einer Überempfindlichkeitsreaktion auf spezifische Allergene bei stärker staubbelasteten Pferden vermuten.

Zusammenfassend wurden zwar über die Hälfte der Pferde der vorliegenden Studie in einer staubärmeren Haltungform (Offenstall, Weide) untergebracht, waren jedoch trotzdem zum Großteil regelmäßiger Staubexposition durch trockene Heufütterung oder Stroh- und Sägemehleinstreu im Unterstand ausgesetzt. Diese Tatsache kann die, trotz besserer Haltungform, höheren Anteile der neutrophilen Granulozyten im TBS der Pferde aus Offenstallhaltung im Vergleich zur Boxenhaltung erklären.

Auffällig waren allerdings die signifikant besseren Werte der Pferde, welche weder Kontakt zu Stroh noch zu Sägemehl hatten, bezüglich Sekretmenge, p_aO_2 und Gesamtscore. Dieses Ergebnis unterstützt die Empfehlung vieler Autoren, als wichtigste Therapiemaßnahme eine staubarme Unterbringung der Pferde vorzunehmen (DIXON et al., 1995c; ROBINSON, 2001a; LÉGUILLETTE, 2003; FEY, 2006b; AINSWORTH, 2010)

1.2 Diskussion der angewandten Methoden

1.2.1 Der funktionelle in vitro Test (FIT)

Verschiedene Studien kamen zu dem Schluss, dass der funktionelle in vitro Test ein äußerst empfindliches Untersuchungsverfahren darstellt, um eine Sensibilisierung der basophilen Granulozyten auf entsprechende Allergene nachzuweisen (KAUL, 1998; GEIBEN, 2003; ROHWER et al., 2008). GEIBEN konnte 2003 bestätigen, dass selbst bei komponentenreichen Präparationen aus Insekten, die spezifischen Allergieauslöser mit dem FIT zuverlässig erkannt werden.

Die gleiche Studie zeigt beim Sommerekzem des Islandpferdes die Möglichkeit einer nachweisbaren Sensibilisierung gegen Insektenantigene im FIT ohne gleichzeitiges Auftreten von klinischen Symptomen (GEIBEN, 2003). Ein Grund dafür könnte in der Präparation der Allergene in vitro liegen, welche sich von den Antigenen in vivo unterscheiden. Zudem könnte eine in vivo nicht ausreichend vorkommende Menge der spezifischen Antigene an den sensibilisierten Zellen eine ausbleibende Typ-I Reaktion erklären. Ebenso sind immunologische

Regulationsmechanismen des Organismus, welche klinische Symptome unterdrücken, durchaus denkbar.

Diese fehlende Korrelation zwischen FIT-Ergebnis und klinischer Symptomatik, sowohl in Bezug auf das Sommerkezem, als auch auf die COB, erkannten nicht nur GEIBEN (2003) und TRAUB (2005), sondern stimmen auch mit den eigenen Ergebnissen überein. In der eigenen Studie konnte kein Zusammenhang zwischen einem positiv ausfallenden FIT-Ergebnis und der Stärke der auftretenden respiratorischen Symptome festgestellt werden. Einige Probanden zeigten deutlich positive Reaktionen im FIT-Test, wurden im verwendeten Scoring-System jedoch lediglich als mittel- oder geringgradig erkrankt eingestuft. Ebenso zeigten sich umgekehrte Fälle, mit nur schwach-positivem oder negativem FIT-Test und gleichzeitiger Scoring-Einstufung in die Gruppe der hochgradig erkrankten Pferde.

Dem gegenüber steht eine Untersuchung von BRUENNLEIN (2001), in welcher ein Zusammenhang zwischen einer COB-Erkrankung und einer nachgewiesenen Sensibilisierung auf Hausstaubmilben, bzw. Hausstaub im FIT nachgewiesen werden konnte.

Als immunologischer Auslöser einer COB werden nicht nur eine Typ-I Reaktion, sondern auch eine Typ-III und Typ-IV Allergie diskutiert, welche jedoch nicht mit einem funktionellen Test der basophilen Granulozyten im Blut erfasst werden können (HALLIWELL et al., 1993; KLEIBER et al., 2005; HOROHOV et al., 2009). Somit bleibt zu hinterfragen, ob die im FIT ermittelten spezifischen Allergene tatsächlich für die auftretenden, klinischen Symptome, im Sinne einer Typ-I Überempfindlichkeitsreaktion verantwortlich sind. Auch die eigenen Ergebnisse sprechen dagegen, dass die mit dem FIT-Test analysierten Allergene alleine für das Aufrechterhalten der klinischen Symptomatik einer COB verantwortlich sind.

1.2.2 Spezifische Immuntherapie (SIT)

In der Humanmedizin bestätigen zahlreiche Studien die gute Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis und allergischem Asthma (BOUSQUET et al., 1988; ORTOLANI et al., 1994; ABRAMSON et al., 1999; LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Auch bei der Behandlung der humanen atopischen Dermatitis konnten große Erfolge verzeichnet werden (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Diese positiven Erfahrungen ließen sich auf die Tiermedizin übertragen. In der Literatur finden sich bei der Therapie der caninen atopischen Dermatitis mittels SIT Erfolgsraten zwischen 50 % und 100 % (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Deutlich wurde hierbei, dass die Erfolgsrate maßgeblich von verschiedensten Faktoren, wie dem gewählten Allergietest, der Art der verwendeten Allergene oder dem Verabreichungsprotokoll, inklusive der Dosis und der Konzentration der Allergene abhängig war (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). In der eigenen Studie stellen diese Erkenntnisse mögliche Erklärungen für die statistisch nicht besseren Ergebnisse der kombinierten Therapie mit spezifischen Allergenen, im Vergleich zur alleinigen Anwendung der CpG-ODN dar.

STEPNIK und Mitarbeiter (2011) berichten in ihrer retrospektiven Studie über die spezifische Immuntherapie bei Pferden mit atopischer Dermatitis von einer Verbesserung der klinischen Symptome bei 84 % der Studienteilnehmer. In die Untersuchungen aufgenommen wurden insgesamt 54 Pferde, welche die klinischen Symptome Urtikaria und/oder Juckreiz zeigten. Basis für die SIT waren Intrakutantest und/oder serologische Allergietest, wobei in der statistischen

Überprüfung kein signifikanter Unterschied der Allergietests in Bezug auf den Behandlungserfolg festgestellt werden konnte (STEPNIK et al., 2011). Bei 59 % der Pferde konnte durch die alleinige SIT eine Beherrschung der klinischen Symptome erreicht werden, 9 % der Teilnehmer wurden zusätzlich mit Doxepin und Kortikosteroiden behandelt (STEPNIK et al., 2011).

Im Jahr 2003 untersuchte HUNSINGER den Erfolg der SIT bei Pferden mit allergisch bedingten respiratorischen Symptomen und Pferden mit Sommerekzem. In die Studie aufgenommen wurden 63 Patienten mit der gesicherten Diagnose einer allergisch bedingten respiratorischen Erkrankung, bei denen andere Erkrankungen differentialdiagnostisch berücksichtigt und ausgeschlossen wurden, ein serologischer Allergietest mit positivem Ergebnis vorlag, Haltungsänderungen ohne Einfluss auf das Krankheitsgeschehen blieben und eine mindesten sechsmonatige Therapiedauer mit spezifischen Allergenen gewährleistet war (HUNSINGER, 2003). Entsprechend erfolgte die Auswahl der 71 Pferde mit Sommerekzem. Bei den Pferden mit respiratorischer Symptomatik konnte bei 74,6% der Patienten durch Einsatz der SIT ein Therapieerfolg, also entweder eine komplette Symptombefreiung oder eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome erreicht werden (HUNSINGER, 2003). Weitere 7,9% zeigten eine leichte Verbesserung der klinischen Symptomatik, welche mit einer Begleittherapie gut beherrschbar war. In 17,5% der Fälle konnte durch die SIT keine Verbesserung der Symptome verzeichnet werden, wobei eine Verschlechterung der Klinik bei keinem der Patienten auftrat. Bei den Pferden mit Sommerekzem konnte bei 54,9 % von einem guten Therapieerfolg gesprochen werden (HUNSINGER, 2003). Andere Studien geben an dieser Stelle Erfolgsraten zwischen 16 % und 64 % an (WAGNER und HUNSINGER, 2005). Betrachtet man die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen konnte bei 100 % der Probanden, welche das kombinierte Inhalat mit spezifischen Allergenen verabreicht bekamen, eine deutliche Verbesserung in der Gesamtpunktzahl erreicht werden. Die Teilnehmer, welche nur die CpG-ODN inhalierten, erzielten nahezu das gleiche Ergebnis. Ein Vorteil bezüglich der Kombination von CpG-ODN und spezifischen Allergenen im Vergleich zur alleinigen Anwendung von CpG-ODN zeigt sich in diesem Falle nicht.

HUNSINGER (2003) fand heraus, dass der Erfolg der SIT maßgeblich von der Krankheitsdauer abhängt. Bei über 80 % der Patienten mit respiratorischer Symptomatik und bei 75 % derer mit Sommerekzem konnte eine Symptomverbesserung oder eine teilweise Symptombefreiung nach Behandlung erreicht werden, wenn in den ersten zwei Jahren seit Beginn der Erkrankung die spezifische Immuntherapie begonnen wurde (HUNSINGER, 2003). Die Erfolgsaussichten sanken auf 44,4 %, sobald die Patienten bei Behandlungsbeginn mehr als sechs Jahre unter respiratorischen Symptomen litten. Noch deutlicher war diese Tendenz bei Patienten mit Sommerekzem zu erkennen. Lagen hier drei statt zwei Jahre zwischen Krankheits- und Therapiebeginn, so verringerte sich der Therapieerfolg bereits von 75 % auf etwa 48 % (HUNSINGER, 2003). Wurde die Therapie erst etwa sechs Jahre nach Krankheitsausbruch begonnen, so konnte nur noch bei etwa 1/3 der Patienten ein Therapieerfolg verzeichnet werden (HUNSINGER, 2003). Diese Erkenntnis scheint in der eigenen Studie ebenso von großer Bedeutung zu sein. Da bei den Studienteilnehmern, welche zu den CpG-ODN zusätzlich spezifische Allergene inhaliert bekamen, die durchschnittliche Krankheitsdauer bei $8,2 \pm 6,6$ Jahren lag, ist es, nach den Ergebnissen von HUNSINGER (2003), nicht verwunderlich, dass sich die Erfolgsrate im Vergleich zur alleinigen CpG-ODN Behandlung statistisch nicht unterscheidet.

Insgesamt erscheint in den wenigen Literaturangaben die SIT bei Pferden als durchaus wirksam und erfolgsversprechend, wobei eine Potenzierung der

positiven Wirkung durch die Kombination mit CpG-ODN eine nachvollziehbare Überlegung darstellt. Die eigenen Ergebnisse deuten jedoch nicht auf eine solche verstärkte Wirkung durch die kombinierte Therapie hin. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings die unterschiedliche Applikationsart der Allergene. Wo bei allen genannten Literaturangaben die spezifische Immuntherapie über subkutane Injektionen erfolgte, wurde in der eigenen Studie die Inhalationsbehandlung gewählt. Diese Tatsache könnte für die nicht signifikant bessere Erfolgsrate der kombinierten Therapie im Vergleich zur alleinigen Anwendung der CpG-ODN verantwortlich sein. Dennoch lassen sie eine gezielte Modulation des pulmonalen Immunsystems durch die inhalative spezifische Immuntherapie erahnen, wenn auch nicht statistisch beweisen. Hier sollten weitere Dosis-Wirkungsstudien mit abweichendem Inhalationsprotokoll die These unterstützen.

1.2.3 Inhalationsprotokoll und Verträglichkeit

Die Form der inhalativen Verabreichung des Medikaments wurde gewählt, um mit einer möglichst niedrigen Dosis das Risiko des Auftretens unerwünschter Nebenwirkungen zu minimieren (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Zudem war so, gegenüber einer oralen oder intravenösen Applikation, die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein ausreichender Wirkspiegel in den Zielzellen des Lungengewebes erreicht wird.

Die Inhalationen mit dem „Aeroneb® Go Micropump Nebulizer“ zusammen mit dem „Equine Haler“ erwiesen sich als äußerst praktisch und benutzerfreundlich. Bereits in vorangegangenen Studien hatten sich diese Geräte bei dem Einsatz am Pferd bewährt (BERTIN et al., 2011; KLIER et al., 2011; FUNCH-NIELSEN et al., 2001). Keines der Pferde zeigte sich im Laufe der Behandlungen widersetzlich gegen das Inhalationssystem, wozu auch die kurzen Inhalationszeiten von ca. zehn Minuten beitrugen.

Das Inhalationsregime sah eine siebenmalige Verabreichung der Lösung vor, um, basierend auf den positiven Ergebnissen von KLIER et al. (2011), einen eventuell noch besseren und längeren Effekt der CpG-ODN zu erkennen. Ein Abstand von zwei Tagen zwischen den Inhalationen wurde als ausreichend angesehen, da der vollständige Abbau der CpG-ODN im Körper nach maximal 48 Stunden bei Mäusen und Affen nachgewiesen wurde (MUTWIRI et al., 2004).

Die Auswahl der spezifischen CpG-ODN-Sequenz erfolgte auf Grund der Studie von KLIER und Mitarbeitern (2011). Es konnte in einem umfangreichen in vitro Versuch die A Klasse 2216 als die stimulatorisch effektivste CpG-ODN-Sequenz hinsichtlich eines Th2/Th1-Shifts bei equinen BAL-Zellen ermittelt werden (KLIER et al., 2011).

Die Wahl der Allergene wurde anhand der Ergebnisse des FIT-Tests getroffen. Mit diesem Test wurde zwar, im Vergleich zu einem in vivo Provokationstest, ein quantitativ beurteilbares und tierfreundliches Verfahren angewandt, jedoch bleibt fraglich, ob die im Test als positiv ermittelten Allergene tatsächlich für das Aufrechterhalten der Erkrankung verantwortlich sind, da als möglicher immunologische Auslöser der COB nicht nur eine, mit dem FIT messbare Typ-I Reaktion, sondern auch eine Typ-III und Typ-IV Allergie diskutiert werden (HALLIWELL et al., 1993; KLEIBER et al., 2005; HOROHOV et al., 2009). Ebenso können bei fortgeschrittenem Erkrankungsverlauf die Symptome allein durch irritierende Reize wie Gase (z.B. Ammoniak, Kohlendioxid) oder Stäube (z.B. in der Reithalle, Futter) hervorgerufen werden (ROBINSON et al., 1996).

Unerwünschte Reaktionen auf die Inhalationen konnten zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Lokale Entzündungsreaktionen, wie Rötungen, Schwellungen oder Neutrophilie der Atemwege, wurden durch die klinischen, endoskopischen und zytologischen Untersuchungen ausgeschlossen. Zur Feststellung von systemischen Reaktionen wurden vor und nach der Inhalationsserie Blutproben genommen. Auch bei den Untersuchungen des Differentialzellbilds waren keine Auffälligkeiten zu erkennen, was für eine gute Verträglichkeit der angewandten Substanzen in Kombination mit dem festgelegten Inhalationsregime spricht. Ebenso wurde bei der Nachuntersuchung nach sechs Wochen bei keinem Patient eine Abweichung der Normwerte festgestellt, womit eine verspätete negative Wirkung der Therapie ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie, bei welcher im Zuge der inhalativen Anwendung der beschriebenen CpG-ODN/GNP-Lösung beim Pferd ebenfalls keinerlei lokale oder systemische Nebenwirkungen aufgetreten waren (KLIER et al., 2012).

Schon in älteren Studien am Menschen und Mausmodell wurden bei dem Einsatz der CpG-ODN als Vakzineadjuvans oder zur Anti-Tumor-Therapie in keiner Weise negative immunologische oder lokale Reaktionen auf die Verabreichung der Formulierungen erkannt (VOLLMER und KRIEG, 2009; KRIEG, 2006; WEINER, 2000). Auch bei der Anwendung von CpG-ODN in Kombination mit spezifischen Allergenen konnten beim Menschen bereits große Erfolge, ohne jegliche Nebenwirkungen verzeichnet werden (MARSHALL et al., 2001; SPIEGELBERG und RAZ, 2002; SENTI et al., 2009).

Die systemische Anwendung von GNP alleine hielt bereits mehreren Studien am Mausmodell stand, womit eine gute Verträglichkeit des Trägersystems bewiesen werden konnte (BOURQUIN et al., 2008; TSENG et al., 2009; ZWIOREK et al., 2008).

1.2.4 Score-Punktesystem

Zur semiquantitativen und quantitativen Beurteilung der Besitzerangaben und der eigenen Untersuchungsbefunde wurde ein Score-Punktesystem entwickelt, welches sich an dem von OHNESORGE und Mitarbeiter (1998) orientierte. Durch Addition aller Punkte konnte eine Einteilung der Pferde in den entsprechenden Krankheitsgrad erfolgen.

Als anamnestischer Parameter flossen in die Punktebewertung allein das Vorhandensein und die Ausprägung einer Hustensymptomatik mit ein. Für die Besitzer stellt das Symptom „Husten“ ein leicht und sicher zu erkennendes Krankheitszeichen für eine Atemwegserkrankung dar. Somit konnte bei der vorberichtlichen Befragung allein durch die Beschreibung der Hustensymptomatik durch die Pferdebesitzer diese gut erfasst und beurteilt werden. Besonderer Beachtung galt hier dem Auftreten von einzelnen Hustenstößen zu Beginn der Arbeit, was oft von Besitzern als normales „Abhusten“ akzeptiert wird, allerdings bereits als pathologische Veränderung der Atemwege zu beurteilen ist (MAIR und DERKSEN, 2000). Weitere vorberichtliche Besitzerangaben, wie der Leistungsmangel oder eine verlangsamte Wiederberuhigung nach Belastung wurden nicht in das Punktesystem eingeschlossen. Speziell diese Parameter sind zu stark von der Sensibilität der Besitzer, der Nutzungsart und dem Leistungsstand des Pferdes abhängig. Ebenso wird eine geringgradig abdominal verstärkte Atmung von den Besitzern nur selten wahrgenommen, obgleich dieses Symptom charakteristisch für eine COB ist (ROBINSON, 2001a). Aus diesen

Gründen wurden alle weiteren Parameter, welche in das Scoring-System einbezogen wurden, allein von Tierärzten erhoben.

Bei der Beurteilung der Dyspnoe und der Lungenauskultation bestand insgesamt die Möglichkeit die erhobenen Befunde höher zu bewerten, da bei pathologischen Ergebnissen beider Parameter auf jeden Fall von einer Erkrankung des Atmungsapparates ausgegangen werden kann. Zudem wurden gesondert Punkte für das Vorhandensein einer Dampf Rinne oder Zwischenrippenatmung vergeben, was auf eine hochgradige und chronische expiratorische und/oder inspiratorische Dyspnoe, im Sinne einer COB hinweist (FEY, 2006b).

Schwächer bewertet wurde hingegen die Lungenperkussion, da bei dieser Untersuchung eine geringgradige COB keine Veränderung zeigt, somit also nur fortgeschrittene Krankheitsgeschehen erkannt werden können (FEY, 2006b).

Die Beurteilung der endoskopischen Befunde während der Untersuchung erfolgte nach der Punkteinteilung von GERBER und Mitarbeitern (2004) und wurde später in das eigene Scoring übertragen. Im eigenen Punktesystem wurden die Ergebnisse nochmals extra mit Punkten bewertet, da die Untersuchungsbefunde teils zwischen zwei Bewertungspunkten von GERBER und Mitarbeitern (2004) lagen und somit mit dem eigenen System besser eingestuft werden konnten. Da über die Score-Punktzahlen eine Aussage über den Grad der pathologischen Veränderungen gemacht werden sollte, wurde die Breite der Bifurcatio tracheae lediglich mit maximal zwei Punkten bewertet. Ausschlaggebend hierfür war eine Studie von KOCH und Mitarbeitern (2007), welche keine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Erkrankung und der Breite der Trachealaufzweigung feststellen konnten.

Nach abschließender Betrachtung und in Bezug auf die eigenen Ergebnisse kann das angewandte Score-Punktesystem als durchaus aussagekräftig und in der Praxis als gut anwendbar bezeichnet werden. Trotzdem wäre ein international übereinstimmendes Beurteilungssystem, wie es von ROBINSON (2001a) gefordert wurde durchaus sinnvoll, um zukünftig die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen vergleichbarer zu machen.

2. Diskussion der Untersuchungsergebnisse

2.1 Atemfrequenz in Ruhe

Obwohl DIXON et al. (1995a) der Auszählung der Ruheatemfrequenz eine geringe Spezifität und Sensitivität zuschreiben, konnten in den eigenen Untersuchungen, in Kombination mit weiteren erhobenen Daten, aussagekräftige Ergebnisse bezüglich des klinischen Krankheitsverlaufs der Patienten erlangt werden.

Im Gruppenvergleich der eigenen Studie fiel ein zu Beginn etwas höherer Durchschnittswert der Ruheatemfrequenz in Gruppe II ($30,6 \pm 10,16$ Züge/min) gegenüber Gruppe I ($22,91 \pm 7,12$ Züge/min) auf. Beide mittleren Werte überstiegen deutlich die Ergebnisse von DIXON und Mitarbeiter (1995a), welche eine mittlere Atemfrequenz von 16/min, mit einer Spanne von 8 – 50 Atemzüge pro Minute bei ihren COPD Patienten verzeichnen konnten.

Da ein statistisch signifikanter ($p = 0,028$) Korrelationskoeffizient ($r = 0,478$) zwischen der Ruheatemfrequenz und der Rasse nachgewiesen werden konnte, ist diese Gruppenvarianz der eigenen Untersuchungen mit dem höheren Anteil

an Kleinpferden und Ponys in Gruppe II zu erklären. Ebenso stellt die höhere Anzahl an Isländern in Gruppe II, welche physiologisch eine höhere Ruheatemfrequenz aufweisen, eine Erklärung für dieses Ergebnis dar (IHMELS, 2012).

Nach der 3. Untersuchung konnte eine deutliche Verbesserung der Ruheatemfrequenz in beiden Gruppen erfasst werden, wobei sich die Verbesserung in Gruppe II als signifikant ($p = 0,018$) erwies. Gruppe I erreichte mit einem Durchschnittswert von $16,4 \pm 8,04$ Zügen/min nahezu eine physiologische Atemfrequenz (8 – 16 Atemzüge pro Minute). Da bei hochgradig erkrankten COB Pferden Gewebeproliferationen im Bereich des Atemwegsepithels zu erwarten sind, ist bei fortschreitendem Krankheitsverlauf von einer irreversiblen Lumeneinengung der Bronchioli auszugehen (FEY, 2006b). Diese Umbauvorgänge des Lungengewebes führen somit zu einer permanenten Störung des Gasaustausches, woraus zwangsläufig eine andauernde Hypoxie resultiert (ROBINSON et al., 2000). In diesen Fällen erscheint ein vollkommenes Absinken der Atemfrequenz auf physiologische Werte eher unwahrscheinlich.

Nach ROBINSON und Mitarbeiter (2001) kann anhand der vorherrschenden Hypoxämie, welche zu einer Zunahme der Atemfrequenz führt, auf das Ausmaß der Störung des pulmonalen Gasaustauschs geschlossen werden. In den eigenen Untersuchungen kann diese Aussage durch das gleichzeitige Absinken der Atemfrequenzen und Ansteigen der Sauerstoffpartialdrücke, wie es in beiden Gruppen zu verzeichnen war, bestätigt werden.

2.2 Arterielle Blutgasanalyse

Die arterielle Blutgasanalyse gilt als einfach durchzuführende Methode und ermöglicht durch die enge Korrelation des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks mit dem Grad der Dyspnoe eine verlässliche Beurteilung der Lungenfunktion (GERBER, 1997). Schon früh wurde in spezifischen Untersuchungen erkannt, dass beim Pferd ein p_aO_2 von ≤ 82 mmHg auf eine deutliche Atemwegsobstruktion hinweist (MCPHERSON et al, 1978). DAVIS und RUSH (2002) erklärten dazu, dass speziell Pferde mit mittelgradiger chronischer Bronchitis („heaves“) p_aO_2 Werte von unter 80 mmHg aufweisen können, wohingegen bei Pferden mit deutlicher Dyspnoe sogar Werte unter 50 mmHg gemessen wurden.

In der Literatur variieren die Angaben zur physiologischen p_aO_2 teils extrem (von $77,1 \pm 0,9$ mmHg bis 108,8 mmHg) (KLEIN und DEEGEN, 1986a). Verantwortlich hierfür sind hauptsächlich wechselnde Barometerdrücke, welche von der geografischen Höhe des Untersuchungsortes und den aktuellen Wetterverhältnissen beeinflusst werden (KLEIN und DEEGEN, 1986a). In der vorliegenden Studie herrschten Luftdrücke zwischen 752,01 und 769,26 mmHg.

Die Partialdrücke des Sauerstoffs zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Zu Beginn lag der mittlere Wert der Gruppe I bei $80,24 \pm 11,79$ mmHg und der Gruppe II bei $86,32 \pm 12,74$ mmHg. Wie von HERHOLZ und Mitarbeitern (2002) beschrieben, korrelieren die Lungenfunktionsparametern selbst bei gesunden Probanden deutlich mit dem Alter. Mit dieser Aussage kann der etwas schlechtere Durchschnittswert der Gruppe I, welche signifikant ältere Tiere beinhaltete, erklärt werden.

Sowohl in Gruppe I ($91,07 \pm 15,57$ mmHg) als auch in Gruppe II ($95,37 \pm 11,94$ mmHg) konnte in der 3. Untersuchung ein deutlicher Anstieg des p_aO_2 verzeichnet werden. Der Mittelwert in Gruppe II lag somit nach GRABNER (2005a) am Ende bereits im physiologischen Bereich.

Da CO_2 im Vergleich zu O_2 eine ca. 20mal so hohe Diffusionskapazität besitzt, kommt es erst bei fortgeschrittenen pathologischen Veränderungen des pulmonalen Gasaustausches zu einem Anstieg des p_aCO_2 (KLEIN und DEEGEN, 1986a). Der mittlere Wert der Gruppe I befand sich zu Beginn der Studie somit mit $46,22 \pm 4,03$ mmHg nur knapp über der Referenz, der Mittelwert der Gruppe II ($44,91 \pm 5,51$) lag im Referenzbereich (GRABNER, 2005a).

Einen weiteren wichtigen Parameter der arteriellen Blutgasanalyse stellt die alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($A-aDO_2$) dar, da diese den bei der Messung aktuellen Luftdruck berücksichtigt und somit einen geografisch- und wetterunabhängigen Wert liefert. Bei den eigenen Untersuchungen konnte bei sechs der 21 Pferde ein negativer und damit absurder $A-aDO_2$ Wert errechnet werden. Tatsächlich ist es nicht vorstellbar in den Arterien eine höhere Sauerstoffspannung als in den Alveolen zu erreichen. Stellenweise lassen sich in der Literatur solch negative $A-aDO_2$ Werte finden, allerdings ohne weitere Erläuterung (NYMAN et al., 1999). In der vorliegenden Studie kamen diese negativen Werte meist bei einem $p_aO_2 > 100$ mmHg in Kombination mit einem p_aCO_2 am oberen Referenzbereich zu Stande. Erklärend hierfür wären falsch hohe Sauerstoffpartialdrücke durch Lufteingüsse bei der Blutabnahme oder eine fehlerhafte Messung des Geräts. Zu überlegen bleibt auch, in wie weit eine starre Rechenformel individuelle Unterschiede verschiedener Tiere in Bezug auf ihre Lungentätigkeit berücksichtigen kann.

Die Werte der arteriellen Blutgasanalyse verbesserten sich nach der Inhalationsbehandlung im Laufe der 2. und 3. Untersuchung in beiden Gruppen deutlich, in Gruppe I signifikant für p_aO_2 ($p = 0,013$) und $A-aDO_2$ ($p = 0,027$). Somit konnte nicht nur eine kurzfristig zu erreichende positive Wirkung der Inhalationsbehandlung gezeigt, sondern ebenso ein Langzeiteffekt über sechs Wochen dokumentiert werden.

2.3 Maximale interpleurale Druckdifferenz und Auskultationsbefunde

Im Vergleich zu früheren Zeiten, als die Interpleuraldruckmessung direkt über das Einführen einer Kanüle in den Interpleuralspalt erfolgte, wird heutzutage die Messung stets indirekt über eine Ösophagusballonsonde ausgeführt, (MCPHERSON et al., 1978; BOERMA et al., 1986; ROBINSON et al., 1999).

Nach ROBINSON und Mitarbeitern (1999) stellt die Bestimmung der ΔPpl max eine geeignete Untersuchungsmethode dar, um den Schweregrad einer obstruktiven Lungenerkrankung abzuschätzen, da dieser Parameter sowohl den Atemwegswiderstand, als auch eine erhöhte Flussrate widerspiegelt. Bestätigt wird diese Aussage in den eigenen Untersuchungen durch die hoch signifikante Korrelation ($p = <0,001$, $r = 0,795$) der Untersuchungsergebnisse mit den Gesamtscore-Punkten, nach welchen die Pferde in den entsprechenden Erkrankungsgrad eingeteilt wurden. Ebenso erklärt die Aussage der Autoren die hohe Streuung der Ausgangswerte der interpleuralen Druckdifferenz beider Gruppen, da Erkrankungsgrade von gering- bis hochgradig vertreten waren.

Zu Beginn konnten bei allen Pferden auswertbare Lungenfunktionsprotokolle gewonnen werden, wobei in der letzten Untersuchung zwei Druckmessungen auf

Grund einer fehlerhaften Funktion des Gerätes nicht durchgeführt werden konnten. Zwei Pferde zeigten sich so unkooperativ, dass eine Messung nur im sedierten Zustand (0,01 mg/kg KM Detomidin, Domidine®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland und 0,01 mg/kg KM Butorphanol, Dolorex®, MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz) möglich war. Hier ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass eine vorherige Sedierung möglicherweise signifikant niedrigere Atemwegswiderstände verursachen kann (REITEMEYER et al., 1986). In dieser Studie setzten die Autoren allerdings die hohe Detomidin-Gesamtdosis von 40 µg/kg KM ein. Diesen Ergebnissen steht die allgemeine Entwicklung gegenüber, nach welcher die leichte Sedation der Pferde bei Lungenfunktionsmessung international zum Standard geworden ist (HOFFMAN, 2002).

Beide Gruppen wiesen zu keinem Zeitpunkt der Studie einen signifikanten Unterschied auf. Die einzelne Betrachtung der Ergebnisse zeigte einen durchweg etwas besseren Mittelwert der Gruppe II, was mit dem signifikant höheren Alter der Pferde in Gruppe I zu erklären ist. HERHOLZ und Mitarbeiter (2002) fanden Anzeichen für eine mit dem Lebensalter der Pferde abnehmende Lungenfunktion, was unter anderem mit einer erhöhten $\Delta P_{pl} \max$ einherzugehen scheint.

Nach ROBINSON (2001a) bedarf es unter anderem einer $\Delta P_{pl} \max$ von mindestens 15 cmH₂O um eine RAO Exazerbation zu definieren. Dieses Kriterium erfüllten zu Beginn der Studie 11 der 21 Pferde. Eines dieser Tiere schied im Laufe der Behandlung aus (nicht im Zusammenhang mit der Studie), bei drei der Pferde konnte infolge der Inhalationstherapie ein Wert unter 15 cm H₂O erreicht werden. Andere Autoren beschreiben als Grenze zur Diagnosestellung der COPD einen Wert von ≥ 6 mmHg (entspricht 8,0 cmH₂O), wohingegen ein internationales Komitee der neueren Zeit Pferde mit einem Wert bis zu 10 cmH₂O als Kontrolltiere zulässt. (MCPHERSON et al., 1978; ROBINSON, 2001a). Wie unterschiedlich die Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich der interpleuralen Druckdifferenz lungengesunder Pferde ausfallen zeigt eine Aufstellung von WILLOUGHBY und MCDONNELL (1979), in welcher Mittelwerte zwischen 3,6 und 10,3 cmH₂O als physiologisch angegeben werden.

Insgesamt konnte bei 15 (71,4 %) Pferden mit einer nur siebenmaligen Anwendung der CpG-ODN/GNP-Inhalationslösung ein deutliches Absinken der $\Delta P_{pl} \max$ verzeichnet werden, wobei 26,7% (n = 4) dieser Pferde sechs Wochen nach der letzten Inhalation einen erneuten Anstieg der interpleuralen Druckdifferenz zeigten. Hier bleibt zu diskutieren, ob bei diesen Tieren die positive Wirkung der CpG-GNP nach sechs Wochen bereits nachließ oder ob sie zu diesem Zeitpunkt einer übermäßigen Staubexposition ausgesetzt waren, welche zu einer Verschlechterung des Krankheitsgeschehens führte.

Noch deutlicher wird der Therapieerfolg bei zusätzlicher Betrachtung der Lungenauskultationsbefunde. Die Statistik ergab in Gruppe I sowohl bei der ersten (p = 0,006), als auch bei der zweiten Nachuntersuchung nach sechs Wochen (p = 0,004) eine signifikant niedrigere Score-Punktzahl im Vergleich zur Eingangsuntersuchung. In Gruppe II erwies sich die Punktzahl in der zweiten Nachuntersuchung als signifikant (p = 0,028). Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr gute kurzfristige und langfristige Wirksamkeit der angewandten CpG-ODN-Formulierung hin und lassen einen besseren Effekt der kombinierten Therapie mit Allergenen vermuten.

Allerdings sollten die bei der Auskultation erhobenen Befunde immer in Kombination mit den Befunden anderer diagnostischer Untersuchungsverfahren beurteilt werden, da Auskultationsbefunde, vor allem bei hochgradiger

Erkrankung, nicht mit dem Schweregrad korrelieren und sich in klinischer Remission meist unverändert darstellen (NAYLOR et al., 1992).

Insgesamt konnte in beiden Gruppen eine Abnahme des Grades der vorliegenden Bronchokonstriktion erreicht werden. Insbesondere die sehr signifikante Verbesserung der Befunde in Gruppe I, die zusätzlich spezifische Allergene inhaliert bekam, stellt nach nur sieben Inhalationen (15 Tage) einen außerordentlich guten Therapieerfolg dar. Vergleichend hierzu beschreiben verschiedene Studien die maximal bronchospasmolytische Wirkung bei der Therapie mit Kortikosteroiden erst nach mindestens einer Woche oder länger, während hierbei eine tägliche Medikamentengabe das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen steigert (LAVOIE, et al., 2002; LECLERE et al., 2010).

In der vorliegenden Studie konnte zusätzlich ein statistisch signifikanter Langzeiteffekt von mindestens sechs Wochen sowohl in Bezug auf die Auskultationsbefunde, als auch auf die interpleuralen Druckdifferenzen in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Dies ist insoweit erstaunlich, da während der Studie keinerlei Haltungs- oder Fütterungsveränderungen vorgenommen wurden und sich die Pferde weiterhin in gewohnter Umgebung aufhielten.

2.4 Endoskopische Untersuchung

Die Endoskopie des Respirationstrakts stellt heutzutage ein weit verbreitetes diagnostisches Verfahren dar, wobei die Beurteilung der Breite der Bifurcatio tracheae nicht zu hoch bewertet werden sollte. KOCH und Mitarbeiter (2007) konnten keine Korrelation zwischen der Beschaffenheit des Trachealseptums und anderen klinischen, endoskopischen und zytologischen Untersuchungsmethoden bei der Diagnostik einer RAO erkennen. Gesunde Pferde des gleichen Alters wiesen, gegenüber RAO-Patienten in Exazerbation oder Remission keine signifikant schmalere Bifurcatio tracheae auf (KOCH et al., 2007). Zudem kann von einer altersbedingten Breitenzunahme der Bifurcatio tracheae bei Pferden ≥ 10 Jahren ausgegangen werden (KOCH et al., 2007). In den eigenen Eingangsuntersuchungen konnte bei 19 der 21 Pferde, unabhängig vom Grad der Erkrankung, eine nur geringgradige oder gering- bis mittelgradige Schleimhautschwellung im Bereich der Bifurcatio trachea festgestellt werden, was die Ergebnisse von KOCH und Mitarbeitern (2007) bestätigt.

Bei der Beurteilung der tracheobronchialen Sekretmenge sollte berücksichtigt werden, dass auch vorberichtlich und klinisch unauffällige Pferde in Stallhaltung eine gewisse Menge an trachealem Sekret aufweisen können (GERBER et al., 2003). Somit muss nicht jede Sekretansammlung in der Trachea pathologisch sein. GERBER und Mitarbeiter (2003) untersuchten in ihrer Studie je 13 Pferde jünger als acht Jahre und älter als 12 Jahre, wobei sich alle Tiere leistungsbereit und klinisch unauffällig zeigten. Die Bewertung der Befunde erfolgte sowohl für die Sekretmenge, als auch für die Sekretkonsistenz anhand von Punkten zwischen 1 und 5. Sie konnten bei den jüngeren Pferden einen Mittelwert der TBS-Sekretmenge von $2,2 \pm 1,5$ und der TBS- Sekretkonsistenz von $2,6 \pm 0,9$, bei den älteren von $1,8 \pm 1$ und $2,6 \pm 0,7$ nachweisen.

In Bezug auf die eigenen Untersuchungen ist hier anzumerken, dass es sich in der vorliegenden Studie um Verlaufsuntersuchungen handelte, wobei der individuelle Krankheitsverlauf der Studienteilnehmer hinsichtlich Sekretmenge und Sekretkonsistenz dokumentiert werden sollte. Die Ergebnisbewertung erfolgte sowohl für die Sekretmenge, als auch für die Sekretkonsistenz nach dem Punktesystem von GERBER und Mitarbeiter (2004). Um subjektive

Messunterschiede weitestgehend zu vermeiden wurden die Bewertungen immer von demselben Untersucher vorgenommen. Nach GERBER et al. (2004) besteht für die Sekretmenge sowohl bei dem gleichen, als auch bei unterschiedlichen Untersuchern eine äußerst geringe Varianz der Bewertungsergebnisse. Für die Sekretviskosität hingegen wird eine eher hohe Bewertungsvarianz angenommen (GERBER et al., 2004). KELLER und Mitarbeiter (2001) konnten jedoch in ihrer Studie beweisen, dass durch die Beurteilung der Sekretviskosität die Studienteilnehmer genau einer Placebo- bzw. Verumgruppe (Acetylcystein) zugeordnet werden konnte. Zudem zeigte sich sowohl in den eigenen Untersuchungen, als auch in weiteren Studien eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der endoskopisch ermittelten Sekretviskosität und den Ergebnissen von Lungenfunktionsmessungen (HERHOLZ et al., 2002). Diese Forschungsergebnisse rechtfertigen die Verwendung der ermittelten Viskosität des Tracheobronchialsekrets in Ergänzung zu anderen Untersuchungsparametern.

In der eigenen Studie konnten im Laufe der Behandlung die Werte der Gruppe I bezüglich der Sekretmenge auf durchschnittlich $1,63 \pm 1,49$ Punkte, bezüglich der Sekretviskosität auf $1,58 \pm 1,51$ Punkte und die der Gruppe II auf durchschnittlich $2,22 \pm 1,37$ und $1,83 \pm 1,48$ Punkte gesenkt werden. Somit wurden in beiden Gruppen die, an klinisch unauffälligen Pferden beschriebenen Werte von GERBER und Mitarbeiter (2003) erreicht. Bei der statistischen Auswertung erwies sich die kurzfristige, wie auch langfristige (6 Wochen) Verbesserung der endoskopisch ermittelten Sekretmenge sowohl in Gruppe I, als auch in Gruppe II als signifikant. Bezüglich der Abnahme der Sekretviskosität konnte in Gruppe I eine statistische Signifikanz sowohl bei der 1., als auch bei der 2. Nachuntersuchung berechnet werden. Für Gruppe II konnte in diesem Parameter keine statistisch signifikante Verbesserung nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen nicht nur auf einen kurzfristigen, positiven Effekt durch die siebenmalige Inhalation von CpG-ODN/GNP in Kombination mit spezifischen Allergenen schließen, sondern beweisen einen Langzeiteffekt von mindestens sechs Wochen. Im Vergleich dazu bedarf es bei der oralen Gabe von Acetylcystein einer Therapiedauer von mindestens 14 Tagen um die Sekretviskosität zu reduzieren (KELLER et al., 2001). Nach GERBER und Mitarbeitern (2003) resultiert eine erhöhte tracheale Sekretmenge aus der gesteigerten Produktion von Mucinen in den Atemwegen, welche durch die, bei COB-kranken Pferden vorliegende, neutrophile Entzündungsreaktion in den Bronchien vorangetrieben wird. Bestätigt wird dies in der eigenen Studie durch die nachgewiesene signifikante und zum Teil hoch signifikante Korrelation der endoskopischen Parameter mit den zytologischen Bestandteilen des Tracheobronchialsekrets. Unter diesen Gesichtspunkten und mit Berücksichtigung der statistisch signifikanten Abnahme der Sekretmenge nach Inhalation erscheint eine, bis zu sechs Wochen anhaltende, antiinflammatorische Wirkung der CpG-ODN/GNP-Allergen-Lösung durchaus möglich.

2.5 Zytologische Auswertung des TBS

Bei lungengesunden Pferden stellt sich das TBS-Sekret insgesamt zellarm und von klarer, wässriger Konsistenz dar, wobei vereinzelt Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten auftreten können (DIECKMANN und DEEGEN, 1990; MAY und GEHLEN, 2009). Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass auch bei klinisch gesunden Pferden in Boxenhaltung erhöhte Gehalte an neutrophilen Granulozyten in der BALF gefunden werden können (GERBER et al., 2003). PIRIE und Mitarbeiter (2001, 2002a) erreichten bei lungengesunden

Pferden durch die Inhalation von Heustaub- bzw. Endotoxin-Suspensionen eine dosisabhängige Zunahme der Neutrophilen in den Atemwegen.

Trotz Allem gilt ein regelmäßiges Ansteigen der neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen über den Normwert hinaus als typisch für die COB und spiegelt den Schweregrad der Erkrankung wieder (LAVOIE et al., 2001; ROBINSON, 2001a; MAY und GEHLEN, 2009). Diese These erklärt die niedrigen Neutrophilenzahlen von insgesamt vier Pferden, welche alle nur geringgradig erkrankt waren. Es wurde international festgelegt, dass RAO Pferde in klinischer Remission weniger als 10% und in Exazerbation mindestens 25% neutrophile Granulozyten in ihrer BALF aufweisen sollten (ROBINSON, 2001a). Gegenüber der BALF werden bei Remission im TBS höhere Konzentrationen der Neutrophilen erwartet, da Proben aus proximalen Anteilen des Atmungstraktes im Vergleich zur BAL-Flüssigkeit mehr Epithelzellen, jedoch weniger Makrophagen und Lymphozyten und somit prozentual mehr neutrophile Granulozyten enthalten (NAYLOR et al., 1992).

In den eigenen Untersuchungen konnte ein signifikanter Korrelationskoeffizienten zwischen den Neutrophilen und der Sekretmenge ($r = 0,702$, $p = 0,001$) und den Neutrophilen und der Sekretkonsistenz ($r = 0,598$, $p = 0,007$) errechnet werden. Dies stimmt mit der Studie von ROBINSON et al. (2002) überein, welche eine Zunahme der trachealen Sekretmenge in Zusammenhang mit einer Zunahme der neutrophilen Granulozyten in ihren Untersuchungen beschreiben. Eine Korrelation der Neutrophilen mit weiteren Untersuchungsparametern, im speziellen mit der $\Delta P_{pl\ max}$, konnte bei den eigenen Berechnungen nicht gefunden werden. Auch DERKSEN (1993) bestreitet eine Beziehung zwischen dem Grad der vorliegenden Bronchokonstriktion und dem Grad der vorliegenden Neutrophilie der Atemwege.

In den eigenen Untersuchungen konnte zu Beginn für die neutrophilen Granulozyten ein Durchschnittswert aller Pferde von $65,64 \pm 34,60\%$ nachgewiesen werden. Bei der dritten Untersuchung erzielte die Gruppe I einen Wert von $51,77 \pm 39,13\%$, wohingegen die Gruppe II kaum eine Veränderung aufwies. Diese Tatsache bestärkt die Vermutung, dass durch die zusätzliche Inhalation von spezifischen Allergenen zu den CpG-ODN eine gezielte Modulation des pulmonalen Immunsystems erreicht werden kann. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass während der Behandlung weder Managementveränderung vorgenommen noch andere Medikamente eingesetzt wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die deutliche Reduzierung der Neutrophilenzahlen allein durch die Inhalation erreicht wurde.

Die Korrelationsanalysen zeigten zwischen den prozentualen Anteilen der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten eine hoch signifikante ($p = <0,001$) und stark negative ($r = -0,965$) Beziehung. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von TREMBLAY und Mitarbeitern (1993) überein, nach welchen die Neutrophilen im Atmungstrakt bei einer RAO Exazerbation zu Ungunsten der Makrophagen ansteigen. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei Pferden mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen unter Staubbelastung vermehrt IL-8 und „Macrophage Inflammatory Protein (MIP)“ aus den Alveolarmakrophagen freigesetzt wird (FRANCHINI et al., 1998). Auf Grund der starken chemotaktischen Eigenschaften beider Substanzen auf neutrophile Granulozyten kamen die Autoren zu dem Schluss, dass bei einer RAO Exazerbation die (Über-) Aktivierung der Makrophagen zu dem typischen Einstrom der Neutrophilen in die Atemwege führt (FRANCHINI et al., 1998).

Die Anzahl der Makrophagen im TBS variierte von 2% bis 90,4%, wobei der Durchschnitt bei $28,38 \pm 33,37\%$ lag. Auch bei dieser Zelllinie konnte eine

Senkung der Prozentzahlen verzeichnet und so insgesamt ein zellärmeres Sekret erreicht werden, wobei dies in Bezug auf die Makrophagen in der Gruppe II deutlicher ausgeprägt war. Eine Erklärung hierfür könnte das vermehrte Auftreten von Makrophagen im TBS bei verbesserter mukoziliärer Clearance nach vorangegangener Obstruktion und Bronchospasmus sein (MAY und GEHLEN, 2009). Wird dieses Phänomen als Grundlage für das langsamere Absinken der Makrophagen in Gruppe I angenommen, so deutet dies wiederum auf ein besseres Ansprechen auf die Behandlung in dieser Gruppe hin.

3. Diskussion der inhalativen Anwendung von CpG-ODN im Vergleich zu herkömmlichen Therapieverfahren

Sowohl bei der Behandlung mit herkömmlichen pharmakologisch wirksamen Substanzen, als auch bei der Inhalation mit CpG-ODN stellt die Haltungsoptimierung einen wichtigen, unterstützenden Grundstein der Therapie dar (LÉGUILLETTE, 2003; AINSWORTH, 2010). Letztlich ist jedoch eine solche „Vermeidungsstrategie“, bei welcher es trotzdem häufig durch einen oft nur kurzen, ungewollten Staubkontakt zu akuten Krankheitsschüben kommt, für den Besitzer auf Dauer nicht zufriedenstellend und fordert eine kombinierte, medikamentöse Therapie (ROBINSON et al., 2001).

Um die entzündliche Schiene der COB zu behandeln, stellen heutzutage eindeutig die Glukokortikoide und von diesen, im deutschsprachigen Raum das Prednisolon und das Dexamethason die Wirkstoffgruppe der Wahl dar (FEY, 2006b). Durch den Einsatz dieser Stoffe wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Eikosanoiden gehemmt und die „Downregulation“ von β_2 – Adrenozeptoren verhindert (ROBINSON et al., 2001). Die Glukokortikoide gelten als die effektivsten Therapeutika in Bezug auf die Kontrolle klinischer Symptome der COB, wobei die maximal mögliche bronchospasmolytische Wirkung frühestens nach sieben Tagen, bei täglicher Medikamentenapplikation zu erwarten ist (LAVOIE et al., 2002; GERBER et al., 2011). Eine andere Studie kann bei täglicher oraler Dexamethasongabe, eine solche signifikante Verbesserung der Lungenfunktion sogar erst nach vier Wochen verzeichnen (DELUCA et al., 2008). In der eigenen Studie konnte durch die Verabreichung der CpG-ODN Formulierungen bereits nach sieben Inhalationen ein deutlicher und statistisch reproduzierbarer, therapeutischer Erfolg erzielt werden. Somit ist es bei beiden Therapieansätzen möglich, in etwa der gleichen Zeit, ähnlich gute Erfolge zu verzeichnen, wobei bei der inhalativen Verabreichung der CpG-ODN die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen, im Sinne einer Suppression der Nebennierenrindenfunktion oder das Auftreten einer Hufreherkrankung, nicht besteht.

Um dem pathogenetischen Bild des Bronchospasmus entgegen zu wirken stehen grundsätzlich die Gruppen der Sympathomimetika, der Parasympatholytika und der Phosphodiesterasehemmer zur Verfügung. Im Falle der Behandlung der COB des Pferdes besitzen die β_2 -Agonisten, im Besonderen das Clenbuterol die größte Relevanz (ROBINSON, 2001b). Es greift spezifisch an β_2 -Rezeptoren der glatten Muskelzellen an, führt neben einer Spasmolyse auch zu einer gesteigerten mukoziliären Clearance und besitzt eine antiinflammatorische Wirkung (MAIER und DERKSEN, 2000; LECLERE et al., 2011). Eine Studie von ERICHSEN und Mitarbeitern (1994) konnte bei 75 % der Probanden eine deutliche Besserung der klinischen Symptome nach Clenbuterolgabe verzeichnen. Im Vergleich dazu konnte in den eigenen Untersuchungen durch

die Anwendung der CpG-ODN eine Verbesserung nahezu aller untersuchten Parameter bei 95 % der Studienteilnehmer erreicht werden.

Der β_2 -Agonist Clenbuterol wird in der Pferdemedizin, im Speziellen bei der Therapie der COB oftmals in Form eines Kombinationspräparates mit Dembrexin verabreicht, was die wässrige Sekretion des Bronchialepithels steigert. Zusätzlich besitzt es, genau wie das Clenbuterol, eine starke sekretomotorische Wirkung (FEY, 2006b; LECLERE et al., 2011). Neben diesem Wirkstoff zählen, als beim Pferd wirksam, noch Bromhexin und Ambroxol zur Gruppe der Sekretolytika (MAIER und DERKSEN, 2000, FEY, 2006b). Weitere Stoffe zur Bekämpfung der Hyper- und Dyskrinie stellen die Mukolytika dar, welche durch die Spaltung der Mukopolysaccharide und Mukoproteine im Sekret dessen Viskosität herabsetzen (FEY, 2006b). In dieser Gruppe ist der einzige zugelassene Wirkstoff für dieses Anwendungsgebiet beim Pferd das Acetylcystein (MAIER und DERKSEN, 2000; FEY, 2006b). Grundsätzlich gilt die alleinige Anwendung von Sekretolytika bei der Therapie der COB des Pferdes als ungenügend, da weder auf die immer vorliegende Entzündungsreaktion noch auf die Bronchokonstriktion eingewirkt wird (WILLIAMSON und DAVIS, 2007).

Auf Grund der deutlichen, teils signifikanten Verbesserungen nahezu aller in der vorliegenden Studie gemessenen Parameter, kann bei der therapeutischen Anwendung der CpG-ODN von einer gleichzeitig antiinflammatorischen, bronchospasmolytischen und sekretolytischen Wirkung ausgegangen werden. Diese Tatsache stellt einen enormen Vorteil der CpG-ODN-Formulierungen gegenüber allen anderen konventionellen Medikamenten zur Behandlung der COB dar. Unterstrichen werden diese wichtigen Eigenschaften durch den, ebenfalls nachgewiesenen positiven Langzeiteffekt von mindestens sechs Wochen.

Die Verabreichung einiger genannter Wirkstoffe über eine Inhalationstherapie stellt heutzutage in der Praxis eine verbreitete Methode dar. Über die Umwidnungskaskade haben sich hierfür aus der Humanmedizin das Glukokortikoid Beclometason und der β_2 -Agonist Salbutamol bewährt (ROBINSON et al., 2001; NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Im Gegensatz zur systemischen Applikation kann über die Inhalation eine hohe Medikamentenkonzentration im betroffenen Gewebe und somit eine Dosisreduktion erreicht werden (FEY, 2006b). Zudem wird ein schnellerer Wirkungseintritt erzielt und das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen gesenkt (DURHAM, 2001). Diese Vorteile lassen sich gleichermaßen auf das verwendete Inhalationsprotokoll in der vorliegenden Studie übertragen. Die signifikant positive Wirksamkeit inhalativ verabreichter kurz- oder langwirkender β_2 -Sympatomimetika auf den Atemwegswiderstand konnte mehrfach bewiesen werden (CAMARGO et al., 2007; BERTIN et al., 2011). Vergleichend hierzu war in den eigenen statistischen Berechnungen bei 95 % der Probanden ein deutliches, wenn auch nicht signifikantes Absinken des Atemwegswiderstands durch die inhalative Behandlung mit CpG-ODN zu verzeichnen.

Alle bereits genannten, konventionellen Methoden stellen rein symptomatische und in der Praxis übliche Therapieverfahren der COB dar. Dem gegenüber zeigt sich ein deutlicher Vorteil bei der Anwendung der CpG-ODN, welche am immunologischen Geschehen und somit an der zugrunde liegenden Ätiologie der Krankheit angreifen. Im Ganzen erscheint es heutzutage sehr wahrscheinlich, dass die immunpathologischen Vorgänge der COB auf eine gestörte Th1/Th2-Balance mit einer Verschiebung zur übermäßigen Th2-Antwort zurückzuführen sind (HOROHOV et al., 2009; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Durch die gezielte Inhalation der CpG-ODN ist es möglich, eine bakterielle oder virale Infektion zu simulieren und eine spezifische Th1-Immunantwort zu provozieren.

Durch diesen Effekt wird zusätzlich die allergisch bedingte Th2-Antwort des Immunsystems herunterreguliert und somit den typischen Symptomen einer Überempfindlichkeitsreaktion, im Sinne einer COB Exazerbation vorgebeugt.

Insgesamt erscheint der inhalative Einsatz von CpG-ODN zur Therapie der COB des Pferdes als äußerst wirksam. Die Eigenschaften der Formulierungen, wie der schnelle Wirkungseintritt nach nur sieben Inhalationen und der nachgewiesene Langzeiteffekt, sind als durchweg positiv zu bezeichnen. Ein großer Vorteil gegenüber allen anderen Therapieansätzen stellt zweifelslos das komplette Ausbleiben von unerwünschten Nebenwirkungen dar. Durch die Verabreichung über ein Inhalationssystem ist die Applikation der CpG-ODN nicht nur sehr einfach und im Stall gut durchführbar, sondern ermöglicht zusätzlich eine Dosisreduktion auf ein Minimum. Nachteilig zeigt sich hierbei die aufwendige Herstellung und kurze Haltbarkeit der Inhalationslösung.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl die alleinige Inhalation der ausgewählten CpG-ODN/GNP-Lösung, als auch eine kombinierte Lösung mit spezifischen Allergenen sehr gut verträglich ist und kurzfristig, ebenso wie längerfristig eine, auf das Krankheitsbild der COB spezifische Wirkung aufweist. Die inhalative Behandlung stellte sich als einfache und praktisch anzuwendende Therapiemethode dar und wurde von den Pferden problemlos akzeptiert.

Insgesamt ließen sich in beiden Gruppen, bei allen untersuchten Parametern deutliche, teils signifikante Verbesserungen erzielen. Diese Ergebnisse beeindrucken durch die Tatsache, dass dies ohne andere Medikation oder Managementveränderung und mit einer, mit sieben Inhalationen relativ kurzen Behandlungsdauer erreicht werden konnte.

Ein Langzeiteffekt wurde in Gruppe I bei nahezu allen gemessenen Werten (außer pCO_2) nachgewiesen. In Gruppe II war dies bei 80 % der angewandten Untersuchungsmethoden der Fall, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen nicht errechnet werden konnte. Die deutlichste Diskrepanz zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich in der zytologischen Untersuchung des Tracheobronchialsekrets. Hier lassen die erzielten Ergebnisse eine gezielte Beeinflussung des equinen pulmonalen Immunsystems durch die kombinierte Therapie mit spezifischen Allergenen vermuten.

Durch seine lokale Wirkung im Lungengewebe und seinem nachgewiesenen Langzeiteffekt weist das verwendete inhalative Therapieverfahren, in Bezug auf unerwünschte Nebenwirkungen und finanzielle Aspekte, deutliche Vorteile gegenüber bisherigen systemischen Dauertherapien auf.

Aus diesen Gründen sollten die positiven Erkenntnisse dieser Arbeit in weiterführenden Studien an höheren Patientenzahlen, sowie in Dosis-Wirkungsstudien näher untersucht werden. Im Besonderen die Auswahl der Allergene, die Allergenmenge und das Inhalationsprotokoll müssen weiteren Untersuchungen Stand halten. Denkbar wären hier kürzere Verabreichungsintervalle der Allergene, um den hyposensibilisierenden Effekt weiter zu steigern (SENTI et al., 2009). Auch zusätzliche Inhalationen der CpG-ODN nach längeren zeitlichen Abständen im Sinne einer „Boosterung“ könnten die positiven Wirkungen weiter potenzieren.

Grundsätzlich sollte der Erforschung des immunologischen Geschehens (Th1-Shift), welches der COB zugrunde liegt, große Beachtung geschenkt werden. Mit weiteren Erkenntnissen aus diesem Bereich könnten die therapeutischen Effekte der CpG-ODN in Kombination mit spezifischen Allergenen eventuell verstärkt und/oder verlängert werden.

VI Zusammenfassung

Sabine Geis

Spezifische Immuntherapie COB kranker Pferde mittels inhalativer Verabreichung einer nanopartikulär gebundenen CpG-ODN Sequenz in Kombination mit definierten Allergenen

Als ätiologisch relevant gilt bei der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes eine anfangs spezifische und im weiteren Verlauf der Erkrankung relativ unspezifische Hyperreagibilität auf definierbare Antigene und irritierende Reize. Beim immunologischen Geschehen der COB geht man heutzutage trotz variierender Ergebnisse mehrerer Autoren von einer gestörten Th1/Th2-Balance mit einer Verschiebung zur übermäßigen Th2-Antwort und einer verzögerten, IgE-unabhängigen Typ-IV-Immunreaktion aus.

In der vorliegenden Arbeit sollte der spezifisch immunmodulatorische Effekt durch inhalativ verabreichte Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) zeitlich erfasst werden. Ein weiteres Ziel war es, zu überprüfen ob die positive Wirkung durch die kombinierte Inhalation von A-Typ CpG-ODN und spezifischen Allergenen potenziert werden kann. Die Inhalation der CpG-ODN sollte einen immunmodulatorischen Effekt (Th1-Shift) induzieren und somit für eine schnelle und längerfristige Linderung der COB-Symptomatik sorgen. In vorangegangenen in vitro und tierexperimentellen in vivo Studien konnte dieser Effekt bereits nachgewiesen werden. Um die CpG-ODN vor einem vorzeitigen Abbau durch körpereigene Nukleasen zu schützen und eine Wirkungsverstärkung in den Zielzellen zu erreichen wurden Gelatinenanopartikel (GNP) als Transportsystem für die Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide verwendet.

Insgesamt wurden 21 an COB erkrankte Pferde in die Studie eingeschlossen. Im ersten Untersuchungsblock, vor der Therapie, erfolgte bei allen Tieren eine klinische und labordiagnostische Untersuchung inklusive Blutgasanalyse, eine Tracheobronchoskopie inklusive zytologischer Tracheobronchialsekret (TBS)-Analyse, eine indirekte Interpleuraldruckmessung und ein funktioneller in vitro Test (FIT). Die Studienteilnehmer wurden anhand dieser Untersuchungsbefunde in drei Erkrankungsstufen (hochgradig, mittelgradig, geringgradig) eingeteilt und schließlich per Los zwei Hauptgruppen zugeordnet. Zwei Pferde schieden nach der Eingangsuntersuchung aus Gründen, welche nicht mit der Studie in Zusammenhang standen aus. Zehn Pferde wurden mit entsprechend ausgewählten Allergenen und nanopartikulär gebundenen CpG-ODN inhaliert (Gruppe I), neun Pferde erhielten die alleinige Inhalation der nanopartikulär gebundenen CpG-ODN (Gruppe II). Das Inhalationsprotokoll sah insgesamt sieben Inhalationen im Abstand von zwei Tagen vor. Zudem wurde die Menge der inhalierten Allergene bei der entsprechenden Gruppe während der Therapie gesteigert.

Nach der siebten Inhalation (2. US) und sechs Wochen später (3. US) erfolgten zwei weitere Untersuchungen. Mögliche Therapieerfolge sollten anhand klinischer und endoskopischer Parameter, sowie anhand zytologischer Untersuchung des Tracheobronchialsekrets sowohl direkt nach der Behandlung, als auch mit größerem zeitlichem Abstand erkannt werden.

Während der Dauer der Studie konnten bei keinem der Teilnehmer lokale oder systemische Unverträglichkeiten festgestellt werden. Diese Tatsache spricht für die sehr gute Verträglichkeit des gewählten Inhalationsprotokolls.

Insgesamt konnten wie bei den Ergebnissen der Eingangsuntersuchung, auch bei den Ergebnissen der zwei weiteren Untersuchungen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Beide Gruppen zeigten direkt nach siebenmaliger Inhalation eine deutliche Verbesserung der Ruheatemfrequenz, welche sich als nur knapp nicht signifikant darstellte. Die Verbesserung in der 3. Untersuchung hingegen erwies sich in Gruppe II als signifikant, der Durchschnittswert der Gruppe I erreichte zu diesem Zeitpunkt einen nahezu physiologischen Wert.

Die Auswertung der Auskultationsbefunde zeigte ein statistisch signifikantes Absinken der Score-Punkte in Gruppe I in beiden Folgeuntersuchungen. Die Gruppe II konnte eine solche statistische Signifikanz in der 3. Untersuchung erreichen.

Eine deutliche Verbesserung war bei allen Werten der arteriellen Blutgasanalyse in beiden Gruppen zu erkennen. In der Gruppe mit Allergenen war diese in der 3. Untersuchung bei den Parametern p_aO_2 und $A-aDO_2$ als signifikant zu bezeichnen. Diese Ergebnisse in Kombination mit dem Rückgang der Ruheatemfrequenz zeigen, dass der zuvor hypoxischen Stoffwechsellage, bedingt durch einen gestörten pulmonalen Gasaustausch, mittels der Inhalation mit CpG-ODN alleine, wie auch in Kombination mit Allergenen entgegengewirkt werden kann.

Durch die siebenmalige Inhalationstherapie konnte in beiden Gruppen ein kurzfristiges, wie auch längerfristiges, deutliches Absinken der Interpleuraldruckdifferenz erreicht werden, was als Hinweis für eine Abnahme der vorliegenden Bronchokonstriktion zu werten ist.

Sowohl die Gesamtscore-Punkte, wie auch die Punkte des Endoskopiescores nahmen in Gruppe I sowohl direkt nach der Therapie, wie auch sechs Wochen später signifikant, teils hoch signifikant ab. In Gruppe II war diese Signifikanz in der 3. Untersuchung des Gesamtscores und der Sekretkonsistenz zu sehen.

Auffällig war, dass die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten im TBS in der Gruppe I im Laufe der Untersuchungen deutlich sanken, wobei sie in Gruppe II nahezu konstant blieben.

Nach der Betrachtung aller Ergebnisse kann sowohl in Gruppe I als auch in Gruppe II eine deutliche Besserung aller Untersuchungsbefunde verzeichnet werden. Ein positiver Langzeiteffekt konnte mit dem durchgeführten Therapieprotokoll in Gruppe I bei nahezu allen gemessenen Parametern nachgewiesen werden. In Gruppe II war dies bei 80 % der angewandten Untersuchungsmethoden der Fall.

Insgesamt konnte mit der hier vorgestellten Methode eine alternative Behandlungsweise der COB des Pferdes zu den bereits etablierten Methoden erarbeitet werden. Die Kombination der CpG-ODN mit spezifischen Allergenen scheint, in Bezug auf die untersuchten Parameter und dem zum Einsatz gekommenen Verabreichungsprotokoll, keinen Vorteil im Vergleich zu der alleinigen Inhalation der CpG-ODN zu haben.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit müssen in weiterführenden Studien an höheren Patientenzahlen, sowie in Dosis-Wirkungsstudien überprüft werden. Im Besonderen die Auswahl der Allergene, die Allergenmenge und das Verabreichungsintervall müssen weiteren Untersuchungen Stand halten.

VII Summary

Sabine Geis

Specific Immunotherapy in horses affected with RAO by using a nebulized nanoparticle-bound CpG-ODN sequence in combination with defined allergens.

The recurrent airway obstruction (RAO) in horses is etiologically characterized by an initially specific hyperresponsiveness to defined allergens and irritating stimuli, which becomes more and more unspecific when the disease progresses. Despite varying results obtained by different authors, it is generally assumed that an imbalance in the Th1/Th2 response with a shift to an excessive Th2 response and therefore a delayed, IgE-independent type IV immune response is the main immunologic process in horses with RAO.

The present study aimed to assess the specific immunomodulatory effect of inhalative administered cytosine-phosphate-guanine-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) over time. As a further goal, the study intended to verify the enhanced positive effect of a combined inhalation of A-class CpG-ODN and specific allergens. The inhalation of CpG-ODN should induce an immunomodulatory effect (Th1-Shift) and therefore alleviate RAO-symptoms quickly and in the longer term. Previous in vitro and animal-in vivo studies were able to proof this effect. In order to prevent a premature reduction of CpG-ODN by endogenous nucleases and furthermore to potentiate their effect in target cells, gelatin nanoparticles (GNP) were used as a transportation system for the cytosine-phosphate-guanine-oligodeoxynucleotides.

The study population contained 21 horses affected by RAO. Prior to the therapy, clinical and laboratory examinations of all horses were performed. The latter consisted of arterial blood gas analysis, a tracheobronchoscopy including a cytological analysis of the tracheobronchial secretion (TBS), an indirect measurement of the interpleural pressure and a functional in vitro test (FIT). Based on the results of these examinations, the horses were grouped into three levels of disease (mild, moderate, severe) and assigned by lot to two main groups. Ten horses received inhalation treatment with specific allergens and nanoparticle-bound CpG-ODN (group I), nine horses only received nanoparticle-bound CpG-ODN (group II) by inhalation. The inhalation protocol provided a total number of seven inhalations every second day. Additionally, within group I the amount of the specific allergens was gradually increased over the course of the inhalation treatment.

A second examination was performed after the last inhalation and a third examination six weeks after the end of the treatment protocol. Possible therapeutic success should be determined by clinical and endoscopic parameters, as well as tracheobronchial secretion cytology, both directly after the treatment and after a longer time span.

No local or systemic intolerance of the treatment occurred in any participants throughout the study. This suggests a very good tolerance of the inhalation protocol chosen for this study.

Neither the results of the first examination nor the results of the additional examinations led to statistically significant differences between the corresponding groups.

Both groups showed a marked improvement of the respiratory rate in rest directly after the last inhalation when compared to the first examination. This

improvement was close to statistical significance. At the time of the third examination, group II showed a significant improvement, whereas the mean of group I reached almost physiological levels.

Concerning the auscultation results, group I showed a statistically significant decrease of the score-points in both follow-up examination. This statistical significance was reached by group II at the third examination.

All values of the arterial blood gas analysis showed a distinct improvement in both groups after treatment. In the group treated with allergens (group I), these improvement of the parameters paO_2 and $A-aDO_2$ was significant at the third examination. In combination with the improved respiratory rate at rest, these results suggest that the inhalation treatment only with CpG-ODN as well as in combination with specific allergens is able to counteract the hypoxic metabolism caused by the abnormal gas exchange.

Due to the inhalation treatment both, a short- and long-term reduction of the interpleural pressure could be achieved for both groups. This suggests a reduction of the existing bronchoconstriction.

In group I both, the overall score and the endoscopy score significantly decreased directly after treatment as well as six weeks later. In some cases, the difference was even highly significant. Such a significant improvement was obtained for group II in the overall score and the tracheobronchial secret texture at the third examination.

Strikingly, the percentage of neutrophil granulocytes in TBS decreased distinctly in group I throughout the examinations, whereas in group II they remained almost constant.

Considering all findings, both group I and group II showed a marked improvement of all examination results. With the chosen treatment protocol in group I, a positive long-term effect on nearly all measured parameters was achieved. In group II 80% of the applied examination methods led to the same conclusion.

The presented method provides an alternative treatment option for horses with RAO to established treatment protocols. Regarding the examined parameters and the chosen treatment protocol, the combination of CpG-ODN and specific allergens seems to have no advantage over the use of CpG-ODN alone.

The results of this study should be reviewed in further studies involving larger patient groups as well as in dose-response studies. Especially the selection of the allergens, the amount of allergens and the administration interval must stand up to further investigations.

VIII Literaturverzeichnis

ABRAMSON M, PUY R, WEINER J (1999): Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 54 (10), S. 1022–1041.

AINSWORTH DM (2010): Review of Recurrent Airway Obstruction (RAO, Heaves): Diagnosis and Treatment Options. *Proceedings of the AAEP Focus Meeting-Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases*, Salt Lake City, UT, USA: 93–99.

AINSWORTH DM, CHEETHAM J (2010): Disorder of the Respiratory System. In: REED SM, BAYLY WM, SELLON DC (Hrsg.), *Equine internal medicine*. Saunders Elsevier 3. Aufl., St. Louis, Mo, 290–371.

AINSWORTH DM, GRÜNIG G, MATYCHAK MB, YOUNG J, WAGNER B, ERB HN, ANTCZAK DF (2003): Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 96: 83–91.

ARMSTRONG PJ, DERKSEN FJ, SLOCOMBE RF, ROBINSON NE (1986): Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *The American Review of Respiratory Disease* 133: 357–361.

AUDIBERT FM, LISE LD (1993): Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 174–178.

AVIZA GA, AINSWORTH DM, EICKER SW, SANTIAGO MA, DIVERS TJ, PERKINS GA (2001): Outcome of horses diagnosed with and treated for heaves (recurrent airway obstruction). *Equine Veterinary Education* 13: 243–246.

BASELGIA S, DOHERR M G, MELLOR P, TORSTEINSDOTTIR S, JERMANN T, ZURBRIGGEN A, JUNGI T, MARTI E (2006): Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal* 38 (1), S. 40–46.

BAUER S, KIRSCHNING CJ, HÄCKER H, REDECKE V, HAUSMANN S, AKIRA S, WAGNER H, LIPFORD GB (2001): Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 9237–9242.

BERTIN FR, IVESTER KM, COUËTIL LL (2011): Comparative efficacy of inhaled albuterol between two hand-held delivery devices in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal*, 43 (4): 393–398

BOERMA S, MEEUS P, SASSE HHL (1986): Intrathoracic Pressure in the Horse. Correlation between Intrapleural and Esophageal Pressure. In: DEEGEN E (Hrsg.), *Lung function and respiratory diseases in the horse*. Hippatrika-Verl.-Ges, Calw, 49–51.

BOHLE B (2002): CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *International archives of allergy and immunology*, 129: 198–203.

BOURQUIN C, ANZ D, ZWIOREK K, LANZ A, FUCHS S, WEIGEL S, WURZENBERGER C, BORCH P VON DER, GOLIC M, MODER S, WINTER G,

- COESTER C, ENDRES S (2008): Targeting CpG Oligonucleotides to the Lymph Node by Nanoparticles Elicits Efficient Antitumoral Immunity. *The Journal of Immunology*, 181: 2990–2998.
- BOUSQUET J, MAASCH H, MARTINOT B, HEJJAOUI A, WAHL R, MICHEL FB (1988): Double-blind placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids: II. Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 82 (3, Part 1), 439–446.
- BRACHER V, FELLEBERG R VON, WINDER CN, GRUENIG G, HERMANN M, KRAEHENMANN A (1991): An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Veterinary Journal* 23: 136–141.
- BROIDE DH (2001): Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108: S. 65.
- BRUENNLEIN G (2001): Funktioneller in-vitro-Test (FIT) für Typ I-Allergien beim Pferd: Nachweis allergischer Sensibilisierung bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB) sowie Einflüsse verschiedener Therapiemaßnahmen auf den Sensibilisierungsgrad von Patienten. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- BRUNNER P, DIX R (1988): Textural changes of the bronchial epithelium in horses. At the same time a contribution to the structure of the bronchial basement membrane. *Berliner und Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift* 101: 1–10.
- BUESS C, ISLER R, PLOCKI KA VON, AUER J, GUGGENBÜHL W (1993): Konstruktion eines Messgerätes zur präzisen Analyse der Lungenfunktion beim Pferd in Ruhe und unter Belastung. *Pferdeheilkunde* 9: 151–155.
- CAMARGO FC, ROBINSON NE, BERNEY C, EBERHART S, BAKER S, DETOLVE P, DERKSEN FJ, LEHNER AF, HUGHES C, TOBIN T (2007): Trimetoquinol: bronchodilator effects in horses with heaves following aerosolized and oral administration. *Equine Veterinary Journal*, 39, 215-220.
- CLARKE AF (1993): Stable dust - threshold limiting values, exposures variables and host risk factors. *Equine Veterinary Journal* 25: 172–174.
- COESTER CJ, LANGER K, VAN BRIESEN H, KREUTER J (2000): Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of microencapsulation* 17: 187–193.
- CORDEAU M, JOUBERT P, DEWACHI O, HAMID Q, LAVOIE JP (2004): IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97: 87–96.
- COSTA LRR, SEAHORN TL, MOORE RM, TAYLOR HW, GAUNT SD, BEADLE RE (2000): Correlation of clinical score, intrapleural pressure, cytologic findings of bronchoalveolar fluid, and histopathologic lesions of pulmonary tissue in horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 61: 167–173.
- COUËTIL LL, HOFFMAN AM, HODGSON J, BUECHNER-MAXWELL V, VIEL L, WOOD JLN, LAVOIE J (2007): Inflammatory airway disease of horses. *Journal of*

veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 21: 356–361.

COUËTIL LL et WARD MP (2003): Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990–1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1645-1650.

DAVIS E et RUSH BR (2002): Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 18: 453-467.

DEBRUE M, HAMILTON E, JOUBERT P, LAJOIE-KADOCH S, LAVOIE J (2005): Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105: 25–31.

DECONTO I (1983): Zytologische und bakteriologische Untersuchungen des Tracheobronchialsekretes bei chronisch lungenkranken Pferden. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.

DEEGEN E, DROMMER W, KLEIN HJ, KAUP FJ (1987): Zur Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis beim Pferd: Klinische und funktionelle Parameter sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. *17. Kongress der DVG. Leitthema 1: "Bestandsprophylaxe und -therapie"*. Bad Nauheim: 242–255.

DEEGEN E, GLITZ F (2002): Atmungsorgane. In: WISSDORF H, GERHARDS H, HUSKAMP B, DEEGEN E (Hrsg.), *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. M. & H. Schaper 2. Auflage, Alfeld (Leine), 830–831.

DEEGEN E, KLEIN HJ (1987): Interpleuraldruckmessung und Bronchospasmodolysetest mit einem transportablen Ösophagusdruckmeßgerät beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 3: 213–221.

DEEGEN E, MÜLLER P (1983): Die Bedeutung von "air trapping" bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis. *Tierärztliche Praxis* 11: 77–84.

DELUCA L, ERB HN, YOUNG JC, PERKINS GA, AINSWORTH DM (2008): The Effect of Adding Oral Dexamethasone to Feed Alterations on the Airway Cell Inflammatory Gene Expression in Stabled Horses Affected with Recurrent Airway Obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22 (2): 427-435.

DERKSEN FJ (1993): Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition. *Equine Veterinary Journal* 25: 257–258.

DERKSEN FJ, ROBINSON NE (2002): Overview of the equine respiratory system. *Equine Respiratory Diseases* (P. Lekeux, Ed.). *International Veterinary Information Service*, Ithaca, New York.

DERKSEN FJ, ROBINSON NE, SCOTT JS, STICK JA (1988): Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *American journal of veterinary research* 49: 933–938.

DERKSEN FJ, SCOTT JS, MILLER DC, SLOCOMBE RF, ROBINSON NE (1985): Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *The American review of respiratory disease* 132: 1066–1070.

- DIECKMANN M, DEEGEN E (1990): Klinische Bedeutung der Tracheobronchialsekret-Zytologie. *Pferdeheilkunde* 6: 101–110.
- DIXON PM (1978): Pulmonary Artery Pressures in Normal Horses and in Horses affected with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Equine Veterinary Journal* 10: 195–198.
- DIXON PM, RAILTON DI, MCGORUM BC (1995a): Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. *Equine Veterinary Journal* 27: 416–421.
- DIXON PM, RAILTON DI, MCGORUM BC (1995b): Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine Veterinary Journal* 27: 422–427.
- DIXON PM, RAILTON DI, MCGORUM BC (1995c): Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. *Equine Veterinary Journal* 27: 428–435.
- DURHAM A (2001): Update on therapeutics for obstructive pulmonary diseases in horses. *In Practice* 23: 474–481.
- EMPEY DW, LAITINEN LA, JACOBS L, GOLD WM, NADEL JA (1976): Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *The American review of respiratory disease* 113: 131–139.
- ERICHSEN DF, AVIAD AD, SCHULTZ RH, KENNEDY TJ (1994): Clinical efficacy and safety of clenbuterol HCl when administered to effect in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Veterinary Journal* 26, 331–336.
- EVANS AG, PARADIS MR, O'CALLAGHAN M (1992): Intradermal testing of horses with chronic obstructive pulmonary disease and recurrent urticaria. *American journal of veterinary research* 53 (2): 203–208.
- EWART SL, ROBINSON NE (2007): Genes and respiratory disease: a first step on a long journey. *Equine Veterinary Journal* 39: 270–274.
- FEIGE K, FÜRST A, ESER MW (2002): Auswirkungen von Haltung, Fütterung und Nutzung auf die Pferdegesundheit unter besonderer Berücksichtigung respiratorischer und gastrointestinaler Krankheiten. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 144: 348–355.
- FEY K (2006a): COPD und Asthma in der Humanmedizin versus RAO, CB und COB beim Pferd. *pferde spiegel* 9: 118–125.
- FEY K (2006b): Nichtinfektiöse Krankheiten der tiefen Atemwege und der Lunge. Chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis. In: DIETZ O, HUSKAMP B (Hrsg.), *Handbuch Pferdepraxis*. Enke 3. Aufl., Stuttgart, 326–332.
- FINK U (1998): Veränderungen der Lungenfunktion nach Inhalation eines Futter-Pellet-Staubes bei klinisch lungengesunden Pferden. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.

FLEISCH A (1925): Der Pneumotachograph; ein Apparat zur Geschwindigkeitsregistrierung der Atemluft. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 209: 713-722.

FONSECA DE, KLINE JN (2009): Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 256–262.

FRANCHINI M, GILLI U, AKENS MK, FELLEBERG RV, BRACHER V (1998): The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Veterinary Immunology Immunopathology* 66: 53-65.

FUNCH-NIELSEN H, ROBERTS CA, WEEKES JS, DEATON CM, MARLIN DJ (2001): Evaluation of a new spacer device for delivery of drugs into the equine respiratory tract. *Proceedings of the WEAS-CRS Symposium* Vol. 56

GEHLEN H, NIEDERMAIER G, MAY A (2009): Was bringt die Röntgen- und Ultraschalluntersuchung bei Lungenerkrankungen des Pferdes? *Pferdeheilkunde* 25: 288–301.

GEIBEN T (2003): Untersuchungen zum Sommerexzem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N® auf die Typ I–Allergie der Pferde. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.

GELL PG, COOMBS RR (1963): The classification of allergic reactions underlying disease. In: COOMBS RR, GELL PG (Hrsg.), *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

GERBER H (1997): Krankheiten des Atmungsapparates in: WINTZER HJ (Hrsg.): *Krankheiten des Pferdes*. 2. Aufl. Verlag Parey, Berlin: 49–55.

GERBER V, ROBINSON NE, LUETHI S, MARTI E, WAMPFLER B, STRAUB R (2003): Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Veterinary Journal* 35: 491–495.

GERBER V, SCHOTT II HC, ROBINSON NE (2011): Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Veterinary Journal* 43: 153-158.

GERBER V, STRAUB R, MARTI E, HAUPTMAN J, HERHOLZ C, KING M, IMHOF A, TAHON L, ROBINSON NE (2004): Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal* 36: 576–582.

GERBER V, SWINBURNE J. E., BLOTT S. C., NUSSBAUMER P, RAMSEYER A, KLUKOWSKA-RÖTZLER J., DOLF G., MARTI E, BURGER D., LEEB T (2008): Genetik der rezidivierenden Atemwegsobstruktion (RAO). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 115: 271–275.

GILGER BC, WILKIE DA, DAVIDSON MG, ALLEN JB (2001): Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis. *American journal of veterinary research* 62: 1892–1896.

GILLISSEN A (2006): Pathophysiologie. In: Gillissen A (Hrsg.), *Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung*. Uni-Med-Verlag, 3. Auflage, Bremen, 56–82.

- GILLISSEN A, RICHTER F (2002): Ursächliche Faktoren. In: PFORTE A (Hrsg.), *COPD - chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen und Komplikationen*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1. Aufl., Berlin, 7–28.
- GINA (2012): Global Initiative for Asthma: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. <http://www.ginasthma.org>.
- GOLD (2013): Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. <http://www.goldcopd.org>.
- GRABNER A (2005a): Spezielle Untersuchungen beim Pferd. Arterielle Blutgasanalyse. In: KRAFT W, DÜRR UM (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer, 6. Auflage, Stuttgart, 429–430.
- GRABNER A (2005b): Tracheobronchialsekret-Zytologie und bronchoalveoläre Lavage beim Pferd. In: KRAFT W, DÜRR UM (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer, 6. Auflage, Stuttgart, 324–330.
- GRATZEK AT, KASWAN RL, MARTIN CL, CHAMPAGNE ES, WHITE SL (1995): Ophthalmic cyclosporine in equine keratitis and keratouveitis: 11 cases. *Equine Veterinary Journal* 27: 327–333.
- HALLIWELL RE, FLEISCHMAN JB, MACKAY-SMITH M, BEECH J, GUNSON DE (1979): The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174: 277–281.
- HALLIWELL RE, MCGORUM B, IRVING P, DIXON P (1993): Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 38: 201–215.
- HARE JE, VIEL L (1998): Pulmonary Eosinophilia Associated with Increased Airway Responsiveness in Young Racing Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12: 163–170.
- HARTMANN G, WEERATNA RD, BALLAS ZK, PAYETTE P, BLACKWELL S, SUPARTO I, RASMUSSEN WL, WALDSCHMIDT M, SAJUTHI D, PURCELL RH, DAVIS HL, KRIEG AM (2000): Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* 164: 1617–1624.
- HERHOLZ C, STRAUB R, LÜTHI S, IMHOF A, BUSATO A (2002): Differences in Pulmonary Functional Indices Derived from the Single-Breath Diagram for CO₂ (SBD-CO₂) in Horses Related to Age, Sex and Usage. *Veterinary Research Communications* 26: 467-478.
- HOFFMAN AM (2002): The prescience to measure airway reactivity in horses without heaves. *Pferdeheilkunde* 18: 622-624.
- HOROHOV DW, BEADLE RE, MOUCH S, POURCIAU SS (2005): Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108: 237–246.
- HOROHOV DW, MILLS WR, GLUCK M (2009): Specific and innate immunity in the lung as it relates to equine RAO. In: TESSIER C, GERBER V (Hrsg.), *4th*

World Equine Airways Symposium (WEAS). Pabst Science Publishers, Bern, Switzerland.

HUMBER KA, BEECH J, CUDD TA, PALMER JE, GARDNER SY, SOMMER MM (1991): Azathioprine for treatment of immune-mediated thrombocytopenia in two horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199: 591–594.

HUNSINGER B (2003): Diagnostik und Spezifische Immuntherapie allergisch bedingter Erkrankungen. *pferde spiegel* (4), S. 10–14.

IHMELS S (2012): Vergleichende Untersuchungen der Vitalparameter bei verschiedenen Pferderassen. *Inaugural-Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München.

JANEWAY C, MURPHY KP (2009): *Janeway Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl, 7. Aufl., Heidelberg.

JOST U, KLUKOWSKA-RÖTZLER J, DOLF G, SWINBURNE JE, RAMSEYER A, BUGNO M, BURGER D, BLOTT SC, GERBER V (2007): A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Veterinary Journal* 39: 236–241.

KÄNGSTRÖM L (1968): The Radiological Diagnosis of Equine Pneumonia. *Veterinary Radiology* 9: 80–88.

KANEENE JB, ROSS A, MILLER R (1997): The Michigan equine monitoring system. II. Frequencies and impact of selected health problems. *Preventive Veterinary Medicine* 29: 277–292.

KAUL S (1998): Typ I Allergien beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in vitro Nachweises. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.

KAUP F, DROMMER W, DEEGEN E (1990): Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I. *Equine Veterinary Journal* 22: 343–348.

KELLER H, FAULSTICH M, ELKER M, GRELL M, WUSCHKO S, REHDERS JH (2001): Klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von N-Acetylcystein bei der Behandlung der COB/COPD des Pferdes, *Praktischer Tierarzt*, 82, 108–117.

KLEIBER C, MCGORUM B, HOROHOV D, PIRIE R, ZURBRIGGEN A, STRAUB R (2005): Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104: 91–97.

KLEIN HJ, DEEGEN E (1986a): Beurteilung von Blutgasparametern des arteriellen Blutes von Pferden unter besonderer Berücksichtigung der alveoloarteriellen Sauerstoffdifferenz. *Pferdeheilkunde* 2: 331–336.

KLEIN HJ, DEEGEN E (1986b): Histamine inhalation provocation test: method to identify nonspecific airway reactivity in equids. *American journal of veterinary research* 47: 1796–1800.

KLEIN HJ, DEEGEN E (1987): Die interpleurale Druckmessung-eine Methode zur Beurteilung der Lungenmechanik beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 3: 141–147.

KLEIN HJ, OFFENEY J (1990): Die differentialdiagnostische Bedeutung der röntgenologischen Thoraxuntersuchung beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 6: 49–54.

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. *Pharmaceutical research* 29: 1650–1657.

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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144: 79–87.

KLINE JN (2007): Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunologic Research* 39: 279–286.

KOCH C, STRAUB R, RAMSEYER A, WIDMER A, ROBINSON NE, 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 Veterinary Journal*, 39, 107-112.

KRAUS B (1982): Formation of Giant Cells in Vivo. *Immunobiology* 161: 290–297.

KRIEG AM (2002a): CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology* 20: 709–760.

KRIEG AM (2002b): From A to Z on CpG. *Trends in immunology* 23: 64–65.

KRIEG AM (2006): Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature reviews. Drug discovery* 5: 471–484.

KRIEG AM, YI AK, MATSON S, WALDSCHMIDT TJ, BISHOP GA, TEASDALE R, KORETZKY GA, KLINMAN DM (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546–549.

KROEGEL C (2002): Definition, Einteilung und begriffliche Abgrenzung des Asthma bronchiale. In: KROEGEL C (Hrsg.), *Asthma bronchiale. Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Thieme-Verlag, 2. Auflage, Stuttgart.

LAVOIE JP, LÉGUILLETTE R, PASLOSKE K, CHARETTE L, SAWYER N, GUAY D, MURPHY T, HICKEY GJ (2002): Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 63: 579-585.

LAVOIE JP, MAGHNI K, DESNOYERS M, TAHA R, MARTIN JG, HAMID QA (2001): Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164: 1410–1413.

LECLERE M, LAVOIE-LAMOUREUX A, LAVOIE JP (2011): Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16: 1027–1046.

LECLERE M, LEFEBVRE-LAVOIE J, BEAUCHAMP G, LAVOIE JP (2010): Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Veterinary Journal*, 42, 316-321.

LÉGUILLETTE R (2003): Recurrent airway obstruction—heaves. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 19: 63–86.

LIU T, NERREN J, MURRELL J, JUILLARD V, EL GARCH H, MARTENS R, COHEN N (2008): CpG-Induced Stimulation of Cytokine Expression by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Foals and Their Dams. *Journal of Equine Veterinary Science* 28: 419–426.

LOEWENSTEIN C, MUELLER RS (2009): A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology* 20: 84–98.

LORCH G, HILLIER A, KWOCZKA KW, SAVILLE WJ, KOHN CW, LEROY BE (2001): Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of a radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 218 (8), S. 1314–1322.

LUNN P, HOROHOV D (2010): The equine immune system. In: REED SM, BAYLY WM, SELLON DC (Hrsg.), *Equine internal medicine*. Saunders Elsevier-Verlag, 3. Auflage, St. Louis, Mo, 2–56.

MAIR TS (1996): Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture. *Veterinary record* 138: 89–91.

MAIR TS, DERKSEN FJ (2000): Chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Equine Veterinary Education* 12: 35–44.

MARSHALL JD, ABTAHI S, EIDEN JJ, TUCK S, MILLEY R, HAYCOCK F, REID MJ, KAGEY-SOBOTKA A, CRETICOS PS, LICHTENSTEIN LM, VAN NEST G (2001): Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes TH1 cytokine expression while downregulating TH2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108: 191–197.

MARTI E, GERBER H, ESSICH G, OULEHLA J, LAZARY S (1991): The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Veterinary Journal* 23: 457-460.

MAY A, GEHLEN H (2009): Durchführung, Analyse und Aussagekraft von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei Pferden mit Lungenerkrankungen. *Pferdeheilkunde* 25: 310–320.

MCGORUM BC, DIXON PM (1993): Evaluation of local endobronchial antigen challenges in the investigation of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Veterinary Journal* 25: 269–272.

MCGORUM BC, DIXON PM (1999): Summer pasture associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD). *Equine Veterinary Education* 11: 121–123.

MCGORUM BC, DIXON PM, HALLIWELL RE (1993a): Evaluation of intradermal mould antigen testing in the diagnosis of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Veterinary Journal* 25: 273–275.

MCGORUM BC, DIXON PM, HALLIWELL RE (1993b): Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Veterinary immunology and immunopathology* 36: 207–222.

MCGORUM BC, DIXON PM, HALLIWELL RE (1993c): Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Veterinary Journal* 25: 261–267.

MCGORUM BC, DIXON PM, HALLIWELL RE (1993d): Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36: 223–237.

MCGORUM BC, ELLISON J, CULLEN RT (1998): Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Veterinary Journal* 30: 430–434.

MCPHERSON, EA, LAWSON GH, MURPHY JR, NICHOLSON JM, FRASER JA, BREEZE RG, PIRIE HM (1978): Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. *Equine Veterinary Journal* 10: 47–53.

MCPHERSON EA, LAWSON GH, MURPHY JR, NICHOLSON JM, BREEZE RG, PIRIE HM (1979): Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine Veterinary Journal* 11: 159–166.

MCPHERSON EA, THOMSON JR (1983): Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: Nature of the disease. *Equine Veterinary Journal* 15: 203–206.

MESSER NT, ARNOLD K (1991): Immune-mediated hemolytic anemia in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198: 1415–1416.

MOORE BR, KRAKOWKA S, MCVEY DS, CUMMINS JM, ROBERTSON JT (1997): Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid of Standardbred racehorses with inflammatory airway disease: response to interferon-alpha. *Equine Veterinary Journal* 29: 142–147.

MORRIS DO, LINDBORG S (2003): Determination of 'irritant' threshold concentrations for intradermal testing with allergenic insect extracts in normal horses. *Veterinary Dermatology* 14 (1), S. 31–36.

MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136: 2348–2357.

MUTWIRI G, PONTAROLLO R, BABIUK S, GRIEBEL P, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, MENA A, TSANG C, ALCON V, NICHANI A, IOANNOU X, GOMIS S, TOWNSEND H, HECKER R, POTTER A, BABIUK LA (2003): Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Veterinary immunology and immunopathology* 91: 89–103.

MUTWIRI GK, NICHANI AK, BABIUK S, BABIUK LA (2004): Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Controlled Release* 97 (1): 1-17

NAYLOR JM, CLARK EG, CLAYTON HM (1992): Chronic obstructive pulmonary disease: Usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Canadian Veterinary Journal* 33, 591–598 33: 591–598.

NIEDERMAIER G, GEHLEN H (2009): Möglichkeiten der Inhalationstherapie zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 25: 327–332.

NYMAN G, BJORK M, FUNKQUIST P (1999): Gas exchange during exercise in standardbred trotters with mild bronchiolitis. *Equine Veterinary Journal* 30: 96-101.

OHNESORGE B, TRÖTSCHEL C, DEEGEN E (1998): Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 14: 450–455.

ÓLAFSDÓTTIR GSV, TORSTEINSDÓTTIR S (2004): In vitro Stimulation of Horse Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) with Adjuvant Peptides and CpG Motifs on a Vector. In: ICELANDIC VETERINARY ASSOCIATION (Hrsg.), *International Symposium on Diseases of the Icelandic Horse*, 2004, Selfoss, Iceland.

ORTOLANI C, PASTORELLO EA, INCORVAIA C, ISPANO M, FARIOLI L, ZARA C, PRAVETTONI V, ZANUSSI C (1994): A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with an alginate-conjugated extract of *Parietaria Judaica* in patients with *Parietaria* hay fever. *Allergy* 49 (1), S. 13–21.

OTTO B, VERSPOHL J, WISSDORF H (2002): Brustkorb, Atmungsmuskeln und Brusthöhle mit Inhalt. In: WISSDORF H, GERHARDS H, HUSKAMP B, DEEGEN E (Hrsg.), *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. M. & H. Schaper-Verlag, 2. Auflage, Alfeld (Leine), 636.

PIRIE RS, COLLIE DDS, DIXON PM, MCGORUM BC (2002a): Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. *Equine Veterinary Journal* 34: 337–342.

PIRIE RS, COLLIE DDS, DIXON PM, MCGORUM BC (2003a): Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33: 676–683.

PIRIE RS, DIXON PM, COLLIE DDS, MCGORUM BC (2001): Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Veterinary Journal* 33: 311–318.

- PIRIE RS, DIXON PM, MCGORUM BC (2003b): Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33: 1183–1189.
- PIRIE RS, MCLACHLAN G, MCGORUM BC (2002b): Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS. *Equine Veterinary Journal* 34: 332–336.
- 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 149-156.
- RANKIN R, PONTAROLLO R, IOANNOU X, KRIEG AM, HECKER R, BABIUK LA, 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 development* 11: 333–340.
- REINHARD H, DENAC M, SPÖRRI H (1972): Die Bestimmung des Atemvolumens durch Impedanzmessung beim Pferd. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 19: 843–850.
- REINHOLD P, BECHER G, ROTHE M (2000): Evaluation of the measurement of leukotriene B4 concentrations in exhaled condensate as a noninvasive method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves. *American Journal of Veterinary Research* 61: 742-749.
- REITEMEYER H, KLEIN HJ, DEEGEN E (1986): The effect of sedatives on lung function in horses. *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum* 82: 111–120.
- RENZ H, BECKER WM, BUFE A, KLEINE-TEBBE J, RAULF-HEIMSOTH M, SALOGA J, Werfel T, Worm M (2002): In-vitro-Allergiediagnostik. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). Arbeitsgruppe "In-vitro-Allergiediagnostik" der Sektion Immunologie. *Allergo Journal* 11 (8), S. 492–506.
- ROBINSON NE (2001a): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Veterinary Journal* 33: 5–19.
- ROBINSON NE (2001b): Recurrent Airway Obstruction (Heaves). In: LEKEUX P (Hrsg.): *Equine Respiratory Disease*, International Veterinary Information Service, Ithaca, New York USA.
- ROBINSON NE (2006): COPD, RAO, Heaves, IAD: Sorting out the Phenotypes of Chronic Airway Disease in the Horse - *Proceedings of ACVP and ASVCP Meeting* - Tucson, 2006.
- ROBINSON NE (2011): Equine Chronic Airway Disease Pathogenesis and Management. In: *Proceedings of the 12th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 2011 - Hyderabad, India.
- ROBINSON NE, BERNEY H, DEFEIJTER-RUPP H, JEFcoat AM, CORNELISSE C, GERBER V, DERKSEN FJ (2002): Mucus, cough, airway

obstruction and inflammation. In: HOFFMANN A, ROBINSON NE et WADE JF (Hg.): *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Boston, USA, 30th September-3rd October 2002. Havemeyer Foundation Monograph Series (9).

ROBINSON NE, DERKSEN FJ, BERNEY C, GOOSSENS L (1993): The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Veterinary Journal* 25: 299–303.

ROBINSON NE, DERKSEN FJ, JACKSON CA, PERONI D, GERBER V (2001): Management of heaves. *Equine Veterinary Education* 13: 247–259.

ROBINSON NE, DERKSEN FJ, OLSZEWSKI MA, BUECHNER-MAXWELL VA (1996): The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *British Veterinary Journal* 152: 283–306.

ROBINSON NE, DERKSEN FJ, OLSZEWSKI M, BERNEY C, BOEHLER D, MATSON C, HAKALA J (1999): Determinants of the Maximal Change in Pleural Pressure during Tidal Breathing in COPD-Affected Horses. *The Veterinary Journal* 157: 160–165.

ROBINSON NE, OLSZEWSKI MA, BOEHLER D, BERNEY C, HAKALA J, MATSON C, DERKSEN FJ (2000): Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Veterinary Journal* 32: 393–400.

ROHWER J, KOBELT C, LEIBOLD W (2008): Aspekte zur Prävalenz und Persistenz des Sommerkzems beim Pferd: Vergleichende Betrachtung von klinischer Ausprägung und zellulärer Allergiediagnostik in vitro. *Pferdeheilkunde* 24: 411–418.

RUSH BR, FLAMINIO MJ (2000): Immunomodulation in horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 16: 183-97.

SAGE AM, VALBERG S, HAYDEN DW, FIRSHMAN AM, JACOB K (2006): Echocardiography in a Horse with Cor Pulmonale from Recurrent Airway Obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20: 694–696.

SASSE HH (1995): COB Prognose und Behandlungsmaßnahmen: COPD-Prognosis and Therapy. *Der Praktische Tierarzt* 76: 66–69.

SCHMALLENBACH KH, RAHMAN I, SASSE HH, DIXON PM, HALLIWELL RE, MCGORUM BC, CRAMERI R, MILLER HR (1998): Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Veterinary immunology and immunopathology* 66: 245–256.

SCHMIDT-WEBER CB (2008): Th17 and treg cells innovate the TH1/TH2 concept and allergy research. *Chemical immunology and allergy* 94: 1–7.

SCHNEBERGER D, CALDWELL S, SURI SS, SINGH B (2009): Expression of Toll-Like Receptor 9 in Horse Lungs. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 292: 1068–1077.

SCHOON HA, DEEGEN E (1983): Histopathologie der chronisch obstruktiven Bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden. *Tieraerztliche Praxis* 11: 213–221.

SEAHORN TL, BEADLE RE (1993): Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202: 779–782.

SEAHORN TL, BEADLE RE, MCGORUM BC, MARLEY CL (1997): Quantification of antigen-specific antibody concentrations in tracheal lavage fluid of horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 58: 1408–1411.

SENTI G, JOHANSEN P, HAUG S, BULL C, GOTTSCHALLER C, MÜLLER P, PFISTER T, MAURER P, BACHMANN MF, GRAF N, KÜNDIG TM (2009): Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39: 562–570.

SPIEGELBERG HL, RAZ E (2002): DNA-based approaches to the treatment of allergies. *Current opinion in molecular therapeutics* 4: 64–71.

STEPNIK CT, OUTERBRIDGE CA, WHITE SD, KASS PH (2011): Equine atopic skin disease and response to allergen-specific immunotherapy: a retrospective study at the University of California-Davis (1991-2008). *Veterinary Dermatology* 23 (1), S. 29–e7.

STORNI T, RUEDL C, SCHWARZ K, SCHWENDENER RA, RENNER WA, BACHMANN MF (2004): Nonmethylated CG Motifs Packaged into Virus-Like Particles Induce Protective Cytotoxic T Cell Responses in the Absence of Systemic Side Effects. *The Journal of Immunology* 172: 1777–1785.

THOMSON JR ET MCPHERSON EA (1983): Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 2: Therapy. *Equine Veterinary Journal* 15: 207-210.

THOMSON JR, MCPHERSON EA (1984): Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Veterinary Journal* 16: 35–38.

TIGHE H, TAKABAYASHI K, SCHWARTZ D, VAN NEST G, TUCK S, EIDEN JJ, KAGEY-SOBOTKA A, CRETICOS PS, LICHTENSTEIN LM, SPIEGELBERG HL, RAZ E (2000): Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: 124–134.

TIZARD I (1993): Treatment of respiratory disease by means of immunomodulators, In: *12th Annual Meeting of the Veterinary Comparative Respiratory Society*, Kennett Square.

TOKUNAGA T, YAMAMOTO H, SHIMADA S, ABE H, FUKUDA T, FUJISAWA Y, FURUTANI Y, YANO O, KATAOKA T, SUDO T, MAKIGUCHI N, SUGANUMA T (1984): Antitumor Activity of Deoxyribonucleic Acid Fraction From Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, Physicochemical Characterization, and Antitumor Activity. *Journal of The National Cancer Institute* 72: 955–962.

TOKUNAGA T, YAMAMOTO S, NAMBA K (1988): A synthetic single-stranded DNA, Poly(dG, dC), induces Interferon- α/β and - γ , augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Cancer Science* 79: 682–686.

TRAUB PM (2005): Klinische und immunologische Untersuchungen zur Ausprägung der Chronisch Obstruktiven Bronchitis des Pferdes: Gibt es Hinweise auf eine hyperreagible und eine dyskrinische Form? *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.

TREMBLAY GM, FERLAND C, LAPOINTE JM, VRINS A, LAVOIE JP, CORMIER Y (1993): Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Veterinary Journal* 25: 194-197.

TSENG C, SU W, YEN K, YANG K, LIN F (2009): The use of biotinylated-EGF-modified gelatin nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. *Biomaterials* 30: 3476–3485.

VOLLMER J, KRIEG AM (2009): Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced drug delivery reviews* 61: 195–204.

VOLLMER J, WEERATNA R, PAYETTE P, JURK M, SCHETTER C, LAUCHT M, WADER T, TLUK S, LIU M, DAVIS HL, KRIEG AM (2004): Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European journal of immunology* 34: 251–262.

WAGNER R, HUNSINGER B (2005): Serologische Allergietests und spezifische Immuntherapie. *pferde spiegel* 8 (02), S. 59–62.

WEINER GJ (2000): The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 455–463.

WELTE T, KÖHNLEIN T, GOLPON H (2002): Pathogenese. In: PFORTE A (Hrsg.), *COPD - chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen und Komplikationen*. Blackwell Wissenschafts-Verlag 1. Aufl., Berlin, 29–40.

WILLIAMSON KK, DAVIS MS (2007): Evidence-based respiratory medicine in horses. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 23 (2): 215-227.

WILLOUGHBY RA ET MCDONELL WN (1979): Pulmonary function testing in horses. *Veterinary Clinic of North America Large Animal Practice* 1: 171-196.

WILSON KD, JONG SDD, KAZEM M, LALL R, HOPE MJ, CULLIS PR, TAM YK (2009): The combination of stabilized plasmid lipid particles and lipid nanoparticle encapsulated CpG containing oligodeoxynucleotides as a systemic genetic vaccine. *The Journal of Gene Medicine* 11: 14–25.

WIRTZ H (2002): Klinik und Diagnostik. In: PFORTE A (Hrsg.), *COPD - chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen und Komplikationen*. Blackwell Wissenschafts-Verlag 1. Aufl., Berlin, 41–162.

WISSDORF H, OTTO B, GERHARDS H, HUSKAMP B (2002): Hals, Collum. Intravenöse Injektion in die V. jugularis externa. In: WISSDORF H, GERHARDS H, HUSKAMP B, DEEGEN E (Hrsg.), *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. M. & H. Schaper-Verlag, 2. Auflage, Alfeld (Leine), 265–266.

WONG DM, BUECHNER-MAXWELL VA, MANNING TO (2005a): Equine skin: Structure, immunologic function, and methods of diagnosing disease. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, S. 463–472.

WONG DM, BUECHNER-MAXWELL VA, MANNING TO, WARD DL (2005b): Comparison of results for intradermal testing between clinically normal horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research* 66 (8), S. 1348–1355.

WOOD JLN, NEWTON JR, CHANTER N, MUMFORD JA (2005a): Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 120–126.

WOOD JLN, NEWTON JR, CHANTER N, MUMFORD JA (2005b): Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Veterinary Journal* 37: 236–242.

WOODS PSA, ROBINSON NE, SWANSON MC, REED CE, BROADSTONE RV, DERKSEN FJ (1993): Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Veterinary Journal* 25: 208–213.

YAMAMOTO S, KURAMOTO E, SHIMADA S, TOKUNAGA T (1988): In vitro Augmentation of Natural Killer Cell Activity and Production of Interferon- α/β and γ with Deoxyribonucleic Acid Fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Cancer Science* 79: 866–873.

YAMAMOTO S, YAMAMOTO T, SHIMADA S, KURAMOTO E, YANO O, KATAOKA T, TOKUNAGA T (1992): DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiology and immunology* 36: 983–997.

YI AK, CHANG M, PECKHAM DW, KRIEG AM, ASHMAN RF (1998): CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *Journal of immunology* 160: 5898–5906.

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. *Pharmaceutical Research* 25: 551-562.

IX ANHANG**1. Untersuchungspläne****1.1 Signalement- und Anamnesebogen****Anamnese**

Name des Besitzers/Halters: _____

Patientenname: _____

Alter: _____ Rasse: _____

Geschlecht: _____ Gewicht: _____ Stockmaß: _____

Nutzung: _____ Haltung: _____

Impfungen: _____

Entwurmungen: _____

Vorbehandlungen: _____

Nasenausfluss (wann, wie oft, einseitig/beidseitig, Aussehen):

Husten (wann, wie oft): _____

Atmung in Ruhe/ bei Anstrengung: _____

Sonstige Erkrankungen: _____

Welche klinischen Symptome treten auf? _____

Wann sind das erste Mal Symptome aufgetreten? _____

1.2 Allgemeine Untersuchung

Vor jeder Untersuchung und vor jeder Inhalation wurde das Allgemeinbefinden der Pferde nach folgendem Schema beurteilt:

Allgemeinuntersuchung			
Allgemeinbefinden		Verhalten	
Haltung		Ernährungszustand	
Habitus		Atemfrequenz/-typ	
Pflegezustand		Pulsfrequenz	
Temperatur		Nasenausfluss	
Schleimhäute/KFZ		Augenausfluss	
Husten auslösbar		Lymphknoten	
Auskultation Lunge		Auskultation Herz	

Zudem wurde die Verträglichkeit der Behandlung nach einem modifizierten Schema (modifiziert nach 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) mit nachfolgenden Parametern beurteilt, wobei Reaktionen ab der Stufe 1 als Unverträglichkeit gewertet wurden und zum Abbruch der Behandlung führen:

1) Allergische /immunologische Reaktionen

	1	2	3	4	5
Allergie/ Hypersensitivität	Urtikaria, vorübergehend	Hautauschlag, Urtikaria, Dyspnoe	Systemischer Bludruckabfall +/-Urticaria, parenterale Medikation notwendig, Ödembildung	Anaphylaxie mit notwendiger par-enteraler Medikation	Tod
Autoimmun- reaktion	Asympto- matische, serologische oder andere Hinweise auf Autoimmun- reaktion, normale Organfunktion ohne Indikation f. Behandlung	Nachweis einer Auto- immunreaktion die ein nicht essentielles Organ oder eine nicht essentielle Funktion betrifft (Bsp. Hypothyreose)	Reversible Reaktion mit Beeinträchtigung eines essentiellen Organs oder andere Nebenwirkung en	Lebens- bedrohliche Autoimmun- reaktionen	Tod

Vasculitis (nicht bei perivaskuläre Injektion)	Mild, keine Indikation f. Behandlung	Symptomatische Therapie mit nicht-steroidalen Medikamenten	Behandlung mit steroidalen Medikamenten indiziert	Ischämische Reaktionen, Amputation oder chir. débridement indiziert	Tod
Reaktion nach Inhalation	Rötung	vermehrte Sekretion, follikuläre Hyperplasie	Bronchospasmus	Trachealkollaps, Atemnot, Dyspnoe	Tod
Andere	Mild	moderat	erheblich	lebensbedrohlich	Tod

2. Dermatologie:

	1	2	3	4	5
Hämatome (ohne Vorhandensein von Thrombozytopenie)	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert		--	-
Alopezie	Ggr. Ausdünnung des Haarkleids (Injektionsstelle)	Ggr. generalisierte Ausdünnung des Haarkleids	Generalisierter Haarverlust	-	-
Erythem	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert, aber erst bei genauer Untersuchung sichtbar	Generalisiert, leicht sichtbar bei Untersuchung	-	-
Hyperpigmentation	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert			
Hypopigmentation	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert			
Reaktionen an der Injektionsstelle	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 Lebensfunktionen einschränkt	-
Photosensitivität	Schmerzloses Erythem	Schmerzhaftes Erythem	Erythem mit Schuppenbildung	Lebensbedrohlich	Tod
Juckreiz	Mild oder lokalisiert	Intensiv oder großflächig auftretend	Intensiv, großflächig auftretend mit Einschränkung der tägl. Lebensfunktionen	-	-
Ausschlag: Schuppenbildung	Papeln/Pusteln oder Erythem ohne weitere Symptome	Papeln/Pusteln oder Erythem mit Juckreiz oder weiteren	Erhebliche, generalisierte Hautrötungen oder Papeln/Pusteln oder	Generalisiert exfoliative, ulzerative oder bullöse Dermatitis	Tod

		Symptomen, lokalisierte Schuppenbildung oder weitere Läsionen, < 50% der Körperoberfläche betreffend	vesikuläre Veränderungen; Schuppenbildung, > 50% der Körperoberfläche betreffend		
Ausschlag: Akne	Keine Behandlung angezeigt	Behandlung angezeigt	Begleitet von Schmerz, Ulzeration oder Schuppenbildung		
Ausschlag: Erythema multiforme	-	Stellenweise, nicht generalisierte Erhöhungen	Erheblich, generalisierter Ausschlag o. schmerzhafte Stomatitis, i.v. Substitution, Zusatzfütterung angezeigt	Lebensbedrohlich	Tod
Urtikaria	-	Vorübergehend	Behandlung für < 24 h angezeigt	Behandlung für > 24 h angezeigt	
Hautablösung	Dezente Hautablösung, nur bei genauer Untersuchung bemerkbar	Hautablösung leicht bemerkbar, aber keine klumpige Exfoliation ggr. Krustenbildung	Hautablösung leicht bemerkbar, mit Exfoliation bei der Untersuchung	-	-
Weitere	mild	moderat	erheblich	Lebensbedrohlich	Tod

3. Konstitutionelle Auswirkungen

	1	2	3	4	5
Lethargie	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
Fieber (wenn keine Neutropenie; physiologisch Pferd: 37,0-38,0)	Erhöhung der Normaltemperatur < 5°C	Erhöhung der Normaltemperatur > 5-8 °C	Erhöhung der Normaltemperatur >8-10 °C	Erhöhung der Normaltemperatur >10 °C	Tod
Hypothermie	--	36,0- 33 ° C	33-30 ° C	< 30 ° C oder lebensbedrohliche Konsequenzen	Tod
Gewichtsverlust	5-10% des Ausgangsgewichts, keine Intervention angezeigt	10-20% des Ausgangsgewichts, Zusatzfütterung angezeigt	>20 % des Ausgangsgewichtes	-	Tod
Andere	mild	moderat	erheblich	Lebensbedrohlich	Tod

4. Auswirkungen auf Muskeln / Weichteilgewebe

	1	2	3	4	5
Arthritis (nicht-septisch)	Ggr. Schmerz mit Entzündung oder Gelenkschwellung, ohne Funktionsbeeinträchtigung	Moderate Schmerzen, mit Entzündung oder Gelenkschwellung, mit funktionsbeeinträchtigung, aber ohne Beeinträchtigung der täglichen Lebensfunktionen	Erhebliche Schmerzen mit Entzündung oder Gelenkschwellung, Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Lebensbedrohliche Einschränkungen	-
Extremitäten (Lahmheit)	Lahmheit nur dem erfahrenen Beobachter auffallend	Bewegungseinschränkung d. Gliedmaße, kann sich aber über weitere Strecken fortbewegen	Erhebliche Lahmheit (4/5)	Lahmheit (5/5)	-
Muskelschwäche (generalisiert-lokalisiert)	Asymptomatisch, Schwäche bei klin. US auffallend	Symptomatische Muskelschwäche, ohne Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Symptomatische Muskelschwäche, Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Lebensbedrohliche Einschränkungen	Tod
Myositis	Ggr. Schmerz, ohne Funktionsbeeinträchtigung	Funktionsbeeinträchtigende Schmerzen, keine Beeinträchtigung der täglichen Lebensfunktionen	Schmerzen mit Beeinträchtigung der täglichen Lebensfunktionen		Tod
Weichteilnekrose	-	Lokale Wundbehandlung medizinische Intervention angezeigt	Operatives Débridement oder weitere invasive Intervention indiziert	Lebensbedrohlich, notfallmäßige, invasive Intervention indiziert	Tod
Weitere	Mild	moderat	erheblich	Lebensbedrohlich	Tod

Charcot-Leyden-Kristalle	keine wenige viele	_____ _____ _____
Creola-Körperchen	keine wenige viele	_____ _____ _____
Eosinophile Granulozyten	keine wenige viele	_____ _____ _____
Bakterien	keine wenige viele intrazellulär/ extrazellulär	_____ _____ _____ _____
Epithelzellen	keine wenige viele	_____ _____ _____
Epithelzellen mit Einschlüssen	keine wenige viele	_____ _____ _____
Curshmannspiralen	keine wenige viele	_____ _____ _____
Konidien/Hyphen	keine wenige viele	_____ _____ _____
Mastzellen	keine wenige viele	_____ _____ _____

Ventigraphische Untersuchung

Interpleurale Druckdifferenz	2-4cm H ₂ O (gesund)	_____
	4,1-6cm H ₂ O	_____
	6,1-15cm H ₂ O	_____
	> 15cm H ₂ O	_____

2. Fragebogen zur Anamneseerhebung

Fragebogen

1. Wie wird ihr Pferd gehalten?

- Box Paddock Offenstall Weide

2. Bei Boxenhaltung:

a. Aus welchem Material sind die Boxenwände?

- Holz Fliesen Sonstige: _____

b. Bekommt der Boxennachbar ihres Pferdes andere Einstreu und/oder anderes Raufutter?

Wenn ja, welche/-s: _____

3. Welche Einstreu wird bei ihrem Pferd verwendet?

- Stroh Sägemehl Sägespäne Torf Sonstige: _____
(aus dem Sägewerk) (Bsp. Allspan®)

4. Was wird gefüttert?

- Silage Heu-trocken Heu-naß Heucobs Pellets
 Gras Müsli-trocken Müsli-naß Sonstiges: _____

5. Wann sind die Symptome (Husten, Nasenausfluss, erschwerte Atmung etc.) am deutlichsten?

- a)** Frühling Sommer Herbst Winter
b) Auf der Koppel In der Box
c) vor Belastung während Belastung nach Belastung
d) Sonstige Situationen: _____

6. Wo wird ihr Pferd meistens bewegt?

- Im Gelände in der Halle auf dem Reitplatz Sonstiges: _____

7. Wird die Reithalle/der Reitplatz bei trockenem Wetter bewässert?

- Ja Nein

8. Welche Bäume/Sträucher wachsen in direkter Nähe zum Stall?

- Zuckerahorn Schwarzbirke Schindelborkige Hickorynuss
 Roteiche Amerikanische Esche Amerikanische Buche
 Platane Schwarze Walnuss Amerikanische Weißulme
 Schwarzweide Schwarzpappel Sonstige: _____

9. Haben sie in Zusammenhang mit den Symptomen (Husten, Nasenausfluss, erschwerte Atmung etc.) sonstig Auffälligkeiten bemerkt:

3. Bewertung der Befunde (Scoringssystem)

Lungenscoring

Parameter		Punkte
Husten auslösbar	nein ja	0 1
Husten	keiner vorberichtlich selten vorberichtlich mehrmals täglich spontan, bzw. vorberichtlich anfallsweise	0 1 2 3
Nasenausfluss	keiner ggr. serös ggr.-mgr. sero-mukös hgr. mukös	0 1 2 3
Atemfrequenz in Ruhe	≤ 16 / min. 17 – 22 / min. ≥ 23 / min.	0 2 3
Atemtyp	costoabdominal ggr. abdominal verstärkt deutlich abdominal verstärkt Nüsternblähen in Ruhe	0 2 3 4
Dampfrinne, Zwischenrippenatmung	nein ja	0 3
Lungenauskultation	physiologisch ggr. inspiratorisch verschärft inspiratorisch verschärft und ggr. expiratorische Atemgeräusche mgr. in- und expiratorische Atemgeräusche und/oder tracheale Rasselgeräusche hgr. expiratorische Atemgeräusche und/oder Hiemen, Giemen	0 1 2 3 4
Lungenfeld	physiologisch ggr. vergrößert deutlich vergrößert	0 1 2
p _a O ₂ in mmHg	> 95 90 – 95 80 – 90 65 – 80 < 65	0 1 2 3 4
p _a CO ₂ in mmHg	≤ 45 > 45	0 2
A-aDO ₂ in mmHg	< 10 10 – 15 15 – 25 > 25	0 1 2 3

ΔPpl max in cm H ₂ O	< 4,6		0
	4,6 – 12,5		1
	12,5 - 20,3		2
	> 20,3		3
Trachealsekretmenge	Scoring nach GERBER et al.		
	< 1	kein Sekret erkennbar	0
	1 < 2	kleine, vereinzelte Sekretflocken	1
	2 < 3	größere Sekretflocken, schmale unterbrochene Sekretstraße	2
	3 ≤ 4	durchgehende Sekretstraße	3
	> 4 - 5	Sekretsee, extreme Menge an Sekret	4
Trachealsekretkonsistenz	≤ 2	serös, flüssig, fließend	1
	> 2 – 4	serös bis viskös, nicht fließend	2
	≥ 4 – 5	hochviskös, zäh	3
Schleimhautschwellung	keine Schleimhautschwellung		0
	ggr. bis mgr. Schwellung der Bifurcatio tracheae		1
	hgr. Schwellung der Bifurcatio tracheae, kaum zu erkennende Trachealspangen		2
Neutrophile Granulozyten	< 30 %		0
	30 – 50 %		3
	> 50 %		4
Makrophagen	vereinzelt		0
	vermehrt		1
	viele		2
Curschmann-Spiralen	keine		0
	wenige		3
	viele		4

Einteilung anhand der Summe der erreichten Punktzahl in vier Erkrankungsgrade:

gesund	0 – 4 Punkte
geringgradige COB	5 – 21 Punkte
mittelgradige COB	22 – 38 Punkte
hochgradige COB	39 – 54 Punkte

4. Gerätschaften, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Tab. 21: Zum Einsatz gekommene Geräte.

Gerät	Firma
Aeroneb® Go Micropump Nebulizer	Aerogen, Galway, Irland
BALF Katheter	Bivona Inc., Gary, USA
EBA 20 Kleincentrifuge	Zentrifugen Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Equine Haler	Equine HealthCare Aps, Hoersholm, Dänemark
ETM VET 175 Endoskop	Endoskopische Technik GmbH, München, Deutschland
IRMA TruPoint® Blood Analysis System	ITC, Edison, NJ
Olympus CLV-U40 Lichtquelle	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Venti-Graph, Modell PG100/REC	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland

Tab. 22: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Firma
BD Discardit™II, 2ml, 10ml, 20ml Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BD Microlance™, 22G 0,7 mm x 30 mm, 18G 1,2 x 50mm, Kanüle	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
IRMA TruPoint® Blood Analysis System, BG Cartridge	ITC, Edison, NJ
Mullkompressen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter, Deutschland
Objektträger 50 Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Sarstedt Monovette®, 2ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Standard Micro Test Tube 3810X	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

Tab. 23: Angewendete Reagenzien.

Reagenz	Firma
A Klasse 2216 CpG-ODN	Firma Biomers GmbH, Ulm, Deutschland
Artuветrin (Allergenlösungen)	Artu Biologicals Europe BV, Lelystad, Netherlands
Diff-Quick staining set	Medion diagnostics, Düdingen, Schweiz
Dolorex® 10 mg/ml Injektionslösung Butorphanol, für Pferde, Hunde und Katzen	MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz
Domidine®, 10mg/ml Injektionslösung Detomidinhydrochlorid, für Pferde und Rinder	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Gelatinenanopartikel	Hergestellt vom Department für Pharmazie und Pharmazeutische Technologie der LMU München
PBS Dulbecco	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Septoderm Haut	Dr. Schuhmacher GmbH, Melsungen, Deutschland

5. Danksagung

Zum Abschluss möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich mich recht herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Überlassung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas und die stets freundliche Unterstützung bedanken. Ebenso verdanke ich ihr die Bereitstellung aller benötigten Mittel.

Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Dr. John Klier für die sehr gute Betreuung und die stets große Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen und Problemen.

Ganz herzlich danke ich auch meiner Kollegin Jeanette Steuer, ohne deren Mithilfe die praktische Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer, Herrn Prof. Dr. Ralf Müller, Herrn PD Dr. Sven Reese und Frau Dr. Karin Weber bedanken, welche alle durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an alle Pferdehalter und -besitzer für die Mitwirkung an dieser Studie.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich in meiner Ausbildung stets unterstützt haben und ohne die ich bis hierhin nie gekommen wäre.

Zuletzt danke ich besonders meinen Freunden Resl und Ferdi für die allzeit „tatkräftigen“ Motivationshilfen und meinem Tobi für seine bis zuletzt große Geduld und Unterstützung in allen Phasen.

6. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

7. Selbstständigkeitserklärung

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

München, den 03.06.2015

(Sabine Geis)