

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

**Procalcitonin und proinflammatorische Zytokine  
in der bronchoalveolären Lavage  
beim lungenkranken Pferd  
unter inhalativer Glukokortikoidtherapie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Anna Cristina Pelli**  
Tierärztin  
aus Marsciano (Italien)

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3863

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. Jörg R. Aschenbach  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Horses; chronic obstructive pulmonary disease; inflammation; cytokines;  
inhalation; glucocorticoids; clinical examination; blood gas; bronchoscopy;  
cytology; radiography

Tag der Promotion: 10.11.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-778-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

Für  
meine Familie



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b> .....	3
<b>2.1 Immunologische Grundlagen</b> .....	3
2.1.1 Angeborene und adaptive Immunität.....	3
2.1.2 Immunregulation .....	4
2.1.2.1 Differenzierung der T-Helferzellen (CD4+).....	4
2.1.2.2 Die Th1/Th2/Th17/Treg - Balance .....	6
2.1.2.3 Zytokine.....	9
<b>2.2 Chronische Lungenkrankheiten bei Pferd und Mensch</b> .....	12
2.2.1 Chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes .....	12
2.2.1.1 Allgemeine Aspekte und Definitionen .....	12
2.2.1.2 Ätiologie und Erbllichkeit der COB.....	13
2.2.1.3 Immunologische Mechanismen der Entzündung bei COB .....	13
2.2.1.4 Pathophysiologie und klinische Ausprägung der COB .....	19
2.2.1.5 Therapie der COB .....	20
2.2.1.6 COB-ähnliche Erkrankungen des Menschen: Asthma bronchiale und COPD ....	22
2.2.2 Inflammatory Airway Disease (IAD) des Pferdes.....	24
2.2.3 Interstitielle Pneumopathien des Pferdes .....	25
2.2.4 Interstitielle Pneumopathien des Menschen .....	26
2.2.5 (Sub)-Akute Pneumonien des Pferdes .....	27
2.2.6 (Sub)-Akute Pneumonien des Menschen .....	27
<b>2.3 Procalcitonin</b> .....	28
2.3.1 Aufbau und Biochemie von PCT .....	28
2.3.2 Induktion der PCT-Synthese in verschiedenen Geweben und Zellen.....	29
2.3.3 Modulation der PCT-Induktion.....	30
2.3.4 Biologische Wirkungen von PCT .....	30
2.3.5 PCT als Marker in der Humanmedizin.....	32

2.3.5.1 Positive Eigenschaften des PCTs und Vergleich mit anderen Biomarkern.....	32
2.3.5.2 PCT als Marker von Infektion und Sepsis .....	33
2.3.5.3 PCT als Marker von Atemwegserkrankungen.....	34
2.3.5.4 Moderne Methoden zum Nachweis von PCT in der Humanmedizin .....	38
2.3.6 PCT als Marker in der Tiermedizin .....	39
2.3.6.1 PCT als Marker beim Pferd .....	39
2.3.6.2 PCT als Marker bei anderen Tierarten.....	41
<b>2.4 Glukokortikoid-Therapie .....</b>	<b>42</b>
2.4.1 Die inhalative Glukokortikoid-Therapie bei Mensch und Pferd.....	42
2.4.2 Molekulare Mechanismen der Glukokortikoid-Wirkung.....	43
2.4.3 Einfluss von Glukokortikoiden auf Immunmechanismen und Biomarker der Entzündung .....	45
2.4.3.1 Effekte auf Zellen der Atemwege und des Immunsystems.....	45
2.4.3.2 Effekte auf die Freisetzung bestimmter Zytokine .....	46
2.4.3.3 Effekte auf Procalcitonin .....	47
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Patientengut.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Studiendesign.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Klinische Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Allgemeine Untersuchungen .....	50
3.3.1.1 Klinische Allgemeinuntersuchung .....	50
3.3.1.2 Blutuntersuchung und venöse Blutproben .....	51
3.3.2 Spezielle Untersuchung der Atemwege.....	51
3.3.2.1 Klinische Untersuchung der Atemwege .....	51
3.3.2.2 Arterielle Blutgasanalyse .....	52
3.3.2.3 Belastungstest.....	52
3.3.2.4 Röntgenologische Untersuchung der Lunge .....	52
3.3.2.5 Intrapleuraldruck-Messung .....	53
3.3.2.6 Endoskopie und bronchoalveoläre Lavage .....	54
3.3.2.7 TBS- und BALF-Analyse.....	54
3.3.3 Score-System .....	55
3.3.4 Diagnosestellung und Einteilung in Gruppen.....	58

3.3.4.1 Gruppe 1: „Lungengesund“ .....	58
3.3.4.2 Gruppe 2: „RAO oder COB in Exazerbation“ .....	59
3.3.4.3 Gruppe 3: „IAD oder COB in Remission“ .....	59
3.3.4.4 Gruppe 4: „Chronisch interstitielle Pneumopathie“ .....	59
3.3.4.5 Gruppe 5: „Akute oder subakute Pneumonie“ .....	59
3.3.5 Inhalative Therapie .....	59
<b>3.4 Labordiagnostik</b> .....	<b>60</b>
3.4.1 Sandwich-ELISA .....	60
3.4.2 ELISA zur Quantifizierung von equinem Procalcitonin .....	60
3.4.2.1 Protokoll für die Messung von Procalcitonin in Blutplasma .....	60
3.4.2.2 Protokoll für die Messung von Procalcitonin in der BALF .....	61
3.4.2.3 Charakterisierung des ELISAs für die Anwendung mit BALF .....	62
3.4.3 ELISA zur Quantifizierung verschiedener Interleukine .....	62
3.4.3.1 Protokoll für die Messung von Interleukinen in der BALF .....	62
<b>3.5 Statistische Auswertung</b> .....	<b>63</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1 Patientengut und Gruppeneinteilung</b> .....	<b>64</b>
<b>4.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen</b> .....	<b>64</b>
4.2.1 Ergebnisse zu allgemeinen, klinischen Parametern .....	64
4.2.2 Ergebnisse zu lungenspezifischen, klinischen Parametern .....	64
4.2.2.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Atemwege .....	64
4.2.2.2 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse .....	67
4.2.2.3 Ergebnisse des Belastungstests .....	68
4.2.2.4 Ergebnisse der röntgenologischen Untersuchung der Lunge .....	68
4.2.2.5 Ergebnisse der Intrapleuraldruck-Messung .....	69
4.2.2.6 Ergebnisse der Tracheobronchoskopie .....	70
4.2.2.7 Ergebnisse von bronchoalveolärer Lavage und zytologischer Diagnostik .....	72
4.2.2.8 Ergebnisse des klinischen Scores .....	75
<b>4.3 Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen</b> .....	<b>76</b>
4.3.1 Ergebnisse von Procalcitonin .....	76
4.3.1.1 Ergebnisse der Charakterisierung des ELISAs für die Anwendung mit BALF .....	76
4.3.1.2 Ergebnisse zur Bestimmung der LODs .....	76

4.3.1.3 Ergebnisse zu Procalcitonin in der BALF .....	77
4.3.1.4 Ergebnisse zu Procalcitonin in Blutplasma .....	79
4.3.2 Ergebnisse der Interleukine.....	80
4.3.2.1 Ergebnisse zu Interleukin-1 $\beta$ in der BALF.....	80
4.3.2.2 Ergebnisse zu Interleukin-6 in der BALF.....	81
4.3.2.3 Ergebnisse zu Interleukin-17 in der BALF.....	82
<b>4.4 Ergebnisse der Therapiegruppe.....</b>	<b>85</b>
4.4.1 Patienten.....	85
4.4.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen nach Therapie.....	86
4.4.2.1 Ergebnisse zu allgemeinen, klinischen Parametern nach Therapie .....	86
4.4.2.2 Ergebnisse zu lungenspezifischen, klinischen Parametern nach Therapie .....	86
4.4.3 Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen nach Therapie .....	94
4.4.3.1 Ergebnisse zu Procalcitonin in der BALF nach Therapie .....	94
4.4.3.2 Ergebnisse zu Interleukin-1 $\beta$ in der BALF nach Therapie .....	96
4.4.3.3 Ergebnisse zu Interleukin-6 in der BALF nach Therapie .....	97
4.4.3.4 Ergebnisse zu Interleukin-17 in der BALF nach Therapie .....	99
<b>4.5 Korrelationen .....</b>	<b>101</b>
4.5.1 Korrelationen von Procalcitonin.....	101
4.5.2 Korrelationen der Interleukine .....	101
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1 Studiendesign: Ziele, Vor- und Nachteile .....</b>	<b>104</b>
<b>5.2 Patientengut: Auswahlkriterien und allgemeine Merkmale .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3 Gruppeneinteilung und Score-System.....</b>	<b>106</b>
<b>5.4 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchungen.....</b>	<b>107</b>
5.4.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung .....	107
5.4.2 Diskussion der Ergebnisse der speziellen Untersuchungen der Atemwege .....	108
5.4.2.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Atemwege .....	108
5.4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse.....	108
5.4.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Belastungstests.....	109
5.4.2.4 Diskussion der Ergebnisse der röntgenologischen Untersuchung der Lunge...109	
5.4.2.5 Diskussion der Ergebnisse der Intrapleuraldruck-Messung .....	110
5.4.2.6 Diskussion der Ergebnisse der Tracheobronchoskopie .....	110



5.4.2.7 Diskussion der Ergebnisse der BAL und der zytologischen Diagnostik.....	111
<b>5.5 Diskussion der Ergebnisse der Laboruntersuchungen .....</b>	<b>112</b>
5.5.1 Diskussion der Bestimmung von Procalcitonin.....	112
5.5.1.1 PCT: Auswahl von Proben und geeigneter Nachweismethodik.....	112
5.5.1.2 Procalcitonin in der BALF .....	113
5.5.1.3 Procalcitonin in Blutplasma.....	115
5.5.2 Diskussion der Bestimmung der Interleukine .....	118
5.5.2.1 Interleukine: Auswahl von Proben und geeigneter Nachweismethodik .....	118
5.5.2.2 Interleukin-1 $\beta$ in der BALF .....	118
5.5.2.3 Interleukin-6 in der BALF .....	120
5.5.2.4 Interleukin-17 in der BALF .....	122
5.5.2.5 Einfluss verschiedener Faktoren auf das Zytokinmuster.....	124
5.5.2.6 Zusammenhang zwischen PCT und den gemessenen Interleukinen.....	125
<b>5.6 Diskussion der Ergebnisse der inhalativen Therapie .....</b>	<b>126</b>
5.6.1 Auswirkungen der Therapie auf den klinischen Status .....	126
5.6.2 Auswirkungen der Therapie auf die bestimmten Entzündungsmarker.....	127
5.6.2.1 Auswirkungen von Budesonid auf Procalcitonin in der BALF .....	127
5.6.2.2 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-1 $\beta$ in der BALF.....	128
5.6.2.3 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-6 in der BALF.....	129
5.6.2.4 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-17 in der BALF.....	130
<b>5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>130</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>133</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>136</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>138</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>169</b>
9.1 Patientenkollektiv .....	169
9.2 Berechnung der LODs für die PCT-ELISAs .....	171
9.3 Angewandte Materialien, Geräte, Pulver und Lösungen .....	172
9.4 Untersuchungsprotokoll 1: Anamnese und Signalement.....	177
9.5 Untersuchungsprotokoll 2: Klinische Untersuchungen - Tag 1.....	178
9.6 Untersuchungsprotokoll 3: Klinische Untersuchungen - Tage 2 und 3 .....	180
9.7 Untersuchungsprotokoll 4: Belastungstest.....	182

9.8 Untersuchungsprotokoll 5: TBS-Zytologie.....	183
9.9 Untersuchungsprotokoll 6: BALF-Zytologie.....	184
<b>10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>185</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>186</b>
<b>12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>187</b>

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ergebnisse von Studien zur Beteiligung proinflammatorischer Zytokine an der Entstehung der COB beim Pferd. ....	18
Tab. 2: Ausgewählte Interventionsstudien zur Steuerung der antibiotischen Behandlung (AB) verschiedener Atemwegserkrankungen mittels PCT-Messung. ....	37
Tab. 3: Schematische Darstellung des dreitägigen Untersuchungsprotokolls. ....	50
Tab. 4: Numerische Graduierung zur Beurteilung der Ausprägung der Röntgenbefunde. ....	53
Tab. 5: Beurteilung der endoskopischen Befunde nach DIECKMANN (1987). ....	56
Tab. 6: Modifiziertes Score-System nach OHNESORGE et al. (1998). ....	57
Tab. 7: Einteilung der Patienten nach unterschiedlichen Krankheitsgraden anhand von Score-Punkten, modifiziert nach OHNESORGE et al. (1998). ....	58
Tab. 8: Übertragung der Punktzahlen aus dem DIECKMANN-Score (1987) in das modifizierte Score-System nach OHNESORGE et al. (1998). ....	58
Tab. 9: Ergebnisse zu einigen Parametern der klinischen Untersuchung der Atemwege, welche Eingang in den klinischen Score fanden. ....	65
Tab. 10: Übersicht zur Einteilung der Pferde in verschiedene Diagnose-Gruppen. ....	66
Tab. 11: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen bzw. Medianwerte (Minimum-Maximum) der arteriellen Blutgase [mm Hg] bei den verschiedenen Gruppen. ....	67
Tab. 12: AaDO <sub>2</sub> -Werte [mmHg] bei den verschiedenen Gruppen mit jeweilig zugeteilter Score-Punktzahl. ....	67
Tab. 13: Ergebnisse der Belastungstests gruppenvergleichend dargestellt. ....	68
Tab. 14: Ergebnisse bronchialer Verdickungen bei der Röntgenuntersuchung der Lunge. ....	69
Tab. 15: Ergebnisse interstitieller Verschattungen bei der Röntgenuntersuchung der Lunge. ....	69
Tab. 16: Ergebnisse der IPD-Messungen [cm H <sub>2</sub> O]. ....	70
Tab. 17: Signifikanzen (p) von Gruppenunterschieden hinsichtlich Menge und Viskosität des tracheobronchialen Sekrets. P-Werte $\leq$ 0,05 sind in grau markiert. ....	71
Tab. 18: Gruppenvergleichende Übersicht zum Ausprägungsgrad der endoskopischen Befunde. ....	71
Tab. 19: Medianwerte (Minimum-Maximum) des prozentualen Zellgehalts der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen. ....	73
Tab. 20: Signifikanzen (p) der Gruppenunterschiede hinsichtlich Zellgehalt der bronchoalveolären Lavagen. ....	74

Tab. 21: Übersicht zu denen anhand prozentualer Zahlen an neutrophilen Granulozyten in der BALF vergebenen Score-Punkten bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen.....	74
Tab. 22: Ergebnisse des klinischen Scores bei den verschiedenen Gruppen mit jeweiligem Schweregrad der bestehenden Lungenerkrankung. ....	75
Tab. 23: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten (IaA-CV, IeA-CV) sowie Wiederfindungsrate ( <i>recovery</i> ) für den „BALF-ELISA“ .....	77
Tab. 24: Übersicht zu den Patienten, die einer Plasma-Untersuchung auf Procalcitonin unterzogen wurden.....	79
Tab. 25: Medianwerte (Minimum-Maximum) der PCT-Konzentrationen [ng/ml] in Blutplasma. ....	80
Tab. 26: Medianwerte (Minimum-Maximum) der gemessenen Entzündungsmarker-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage.....	84
Tab. 27: Therapie-Gruppe.....	85
Tab. 28: Allgemeine, klinische Parameter im Vergleich vor und nach Therapie.....	86
Tab. 29: Gruppenvergleichende Darstellung der Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse vor und nach Therapie.....	88
Tab. 30: AaDO <sub>2</sub> -Werte [mmHg] bei den verschiedenen Gruppen vor und nach Therapie mit jeweilig zugeteilter Score-Punktzahl. ....	88
Tab. 31: Gruppenvergleichende Übersicht zu den Röntgenbefunden der Therapie-Einheit. ....	89
Tab. 32: Gruppenvergleichende Übersicht zum Ausprägungsgrad endoskopischer Befunde vor und nach Therapie.....	90
Tab. 33: Medianwerte (Minimum-Maximum) des Zellgehalts (%) der BALF vor und nach Therapie bei den verschiedenen Gruppen.....	92
Tab. 34: Übersicht zu den anhand prozentualer Zahlen an neutrophilen Granulozyten in der BALF vergebenen Score-Punkten vor und nach Therapie.....	93
Tab. 35: Gesamtscore-Punktzahlen bei den verschiedenen Gruppen vor und nach Therapie. ....	94
Tab. 36: Darstellung von klinischem Gesamtscore (Punktzahl), neutrophilen Granulozyten (NG, %) und PCT-Konzentrationen (PCT, ng/ml) in der BALF vor und nach Therapie. ....	96
Tab. 37: Medianwerte (Minimum-Maximum) der Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker in der BALF vor und nach Therapie im Gruppenvergleich.....	99
Tab. 38: Übersicht zu Korrelationen ( $r_s$ ) zwischen den in BALF und Blutplasma gemessenen Entzündungsmarkern und ausgewählten lungenspezifischen klinischen Parametern. ....	103
Tab. 39: Übersicht zum Patientenkollektiv dieser Studie. ....	169
Tab. 40: Übersicht zu den unter den Nachweisgrenzen (LODs, <i>limits of detection</i> ) der jeweiligen ELISAs (RIEGER et al., 2014) liegenden PCT-Konzentrationen. ....	171

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Positive Feedback-Mechanismen im Rahmen der Th-Zell-Polarisierung, modifiziert nach SCHMIDT-WEBER (2007).....	8
Abb. 2: Merkmale von Asthma und COPD, modifiziert nach BARNES (2000). ....	23
Abb. 3: PCT-Richtwerte zur Leitung einer antibiotischen Behandlung (AB) bei Erkrankungen der Atemwege des Menschen, modifiziert nach SCHUETZ et al. (2007). ....	37
Abb. 4: PCT-Konzentrationen (0 bis 250 ng/ml) in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n = 63).....	78
Abb. 5: IL-1 $\beta$ -Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n = 68).....	81
Abb. 6: IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n = 68).....	82
Abb. 7: IL-17 [OD-Werte] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n = 68)..	83
Abb. 8: PCT-Konzentrationen [ng/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12).....	95
Abb. 9: IL-1 $\beta$ -Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12). ....	97
Abb. 10: IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12). ....	98
Abb. 11: IL-17 [OD-Werte] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12). ....	99



## Abkürzungsverzeichnis

<b>AaDO<sub>2</sub></b>	Alveoloarterielle Sauerstoffdruck-Differenz
<b>AB</b>	Antibiotische Behandlung
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACCP</b>	<i>American college of chest physicians</i>
<b>ACVIM</b>	<i>American college of veterinary internal medicine</i>
<b>AF</b>	Atemfrequenz
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>ALI</b>	<i>Acute lung injury</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i>
<b>AP-1</b>	<i>Activator protein-1</i>
<b>AQH</b>	<i>American quarter horse</i>
<b>ARDS</b>	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>ATS</b>	<i>American thoracic society</i>
<b>-B</b>	Biotinyliert
<b>BAL</b>	Bronchoalveoläre Lavage
<b>BALF</b>	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
<b>BE</b>	Bronchialepithelzellen
<b>BID</b>	<i>Bis in die</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serum-Albumin
<b>CAP</b>	<i>Community acquired pneumonia</i>
<b>CCP-1</b>	Katalalzin
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
<b>CIP</b>	Chronisch interstitielle Pneumopathie
<b>C<sub>ist</sub></b>	Konzentration, Istwert
<b>CK</b>	Kreatinkinase
<b>cm H<sub>2</sub>O</b>	Zentimeter Wassersäule
<b>COB</b>	Chronisch obstruktive Bronchitis
<b>COPD</b>	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
<b>CpG</b>	Cytosin-Phosphat-Guanosin
<b>CR</b>	<i>Cross reactivity</i>
<b>CRP</b>	C-reaktives-Protein
<b>C<sub>soll</sub></b>	Konzentration, Sollwert
<b>CT</b>	Calcitonin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>E. Coli</b>	<i>Escherichia coli</i>

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EG</b>	Eosinophile Granulozyten
<b>ELA</b>	<i>Equine lymphocyte antigen</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ePCT</b>	Equines Procalcitonin
<b>erPCT</b>	Equines rekombinantes Procalcitonin
<b>ERS</b>	<i>European respiratory society</i>
<b>ERU</b>	Equine rezidivierende Uveitis
<b>EU</b>	Endoskopische Untersuchung
<b>Ex.</b>	Exazerbation
<b>FDA</b>	<i>Food and drug administration</i>
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Einsekundenkapazität
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Inspiratorischer Sauerstoffanteil
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
<b>ggr.</b>	Geringgradig
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GR</b>	Glukokortikoid-Rezeptor
<b>HAP</b>	<i>Hospital acquired pneumonia</i>
<b>hgr.</b>	Hochgradig
<b>hPCT</b>	Humanes Procalcitonin
<b>HRP</b>	<i>Hoseradish peroxidase</i>
<b>IaA-CV</b>	Intra-Assay Variationskoeffizient
<b>IAD</b>	<i>Inflammatory airway disease</i>
<b>IeA-CV</b>	Inter-Assay Variationskoeffizient
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IHC</b>	Immunohistochemie
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILE</b>	Interstitielle Lungenerkrankungen
<b>IL-Ra</b>	Interleukin-Rezeptor-Antagonist
<b>iNOS</b>	Induzierbare Stickstoffmonoxyd Synthase
<b>IPD</b>	Intrapleuraldruck
<b>iTreg</b>	Induzierte regulatorische T-Zellen
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>KGW</b>	Körpergewicht
<b>KS</b>	Klinischer Score
<b>LI</b>	Leistungsinsuffizienz
<b>LOD</b>	<i>Limit of detection</i>
<b>LOD<sub>Abs</sub></b>	<i>Limit of detection</i> , Absorptionswert
<b>LOD<sub>Konz</sub></b>	<i>Limit of detection</i> , Konzentrationswert
<b>LOQ</b>	<i>Limit of quantification</i>



---

<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LY</b>	Lymphozyten
<b>M</b>	Molar
<b>mAK</b>	Monoklonale Antikörper
<b>MAP</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>mgr.</b>	Mittelgradig
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>MP</b>	Makrophagen
<b>mRNA</b>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<b>MUC</b>	Mucin
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>MZ</b>	Mastzellen
<b>n</b>	Anzahl der Fälle
<b>n. n.</b>	Nicht nachgewiesen
<b>NA</b>	Nasenausfluss
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
<b>NG</b>	Neutrophile Granulozyten
<b>nGRE</b>	<i>Negative glucocorticoid response elements</i>
<b>NHAP</b>	<i>Nursing house acquired pneumonia</i>
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NLRP3</b>	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
<b>NT</b>	Nach Therapie
<b>nTreg</b>	Natürliche regulatorische T-Zellen
<b>NW</b>	Nullwert
<b>o.b.B.</b>	Ohne besonderen Befund
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCT</b>	Procalcitonin
<b>PMN</b>	Polymorphonukleäre Zellen
<b>PMZ</b>	Pulmonale monozytäre Zellen
<b>POCT</b>	<i>Point of care testing</i>
<b>PSI</b>	<i>Pneumonia severity index</i>
<b>RAO</b>	<i>Recurrent airway obstruction</i>
<b>Rem.</b>	Remission

<b>Rö. Br.</b>	Bronchiale Röntgenbefunde
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>
<b><math>r_s</math></b>	Korrelationskoeffizient nach Spearman
<b>RT-PCR</b>	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
<b>SCCM</b>	<i>Society of critical care medicine</i>
<b>SIRS</b>	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
<b>SP-RAO</b>	<i>Summer pasture-associated recurrent airway obstruction</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<b>T</b>	Tage
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS</b>	Tracheobrochiales Sekret
<b>TBS-M.</b>	Menge des tracheobronchialen Sekrets
<b>TBS-V.</b>	Viskosität des tracheobronchialen Sekrets
<b>TCR</b>	<i>T-cell receptor</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>Th</b>	T-Helfer
<b>TIRF</b>	<i>Total internal reflection fluorescence</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Treg</b>	Regulatorische T-Zellen
<b>VAP</b>	<i>Ventilator associated pneumonia</i>
<b>VT</b>	Vor Therapie
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b><math>\Delta P_{pl_{max}}</math></b>	Maximale Intrapleuraldruck-Differenz

## 1. EINLEITUNG

Atemwegserkrankungen haben in Human- und Pferdemedizin große Bedeutung. In der menschlichen Population sorgen sie für hohe Morbiditäts- und Mortalitätszahlen, während bei Pferden eine Leistungsinsuffizienz infolge respiratorischer Probleme zur Ausscheidung aus dem Turniersport führen kann. Aufgrund des weiten Spektrums an möglichen Erkrankungen und der unspezifischen Symptomatik ist eine korrekte Beurteilung oftmals schwierig. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit, geeignete Biomarker zu finden, welche die Diagnostik auf diesem Gebiet erleichtern können (WRÓBLEWSKI und MARCISZ, 2009; BARTON et al., 2014b).

Procalcitonin (PCT), das Vorläuferprotein des Hormons Calcitonin, ist in der Humanmedizin als Anzeiger infektiöser Prozesse bereits etabliert. Durch die rasche Induktion und die gute Korrelation mit dem klinischen Status der Patienten stellt sich PCT als äußerst dynamischer Marker mit hohem prädiktivem Wert dar. Neben dem Haupteinsatzgebiet der Sepsisdiagnostik wird PCT auch zur Differenzierung bzw. Verlaufskontrolle respiratorischer Erkrankungen des Menschen eingesetzt (MEISNER, 2010). Obwohl die Blutspiegel niedriger sind als bei Patienten mit systemischer Infektion, ist eine Differenzierung verschiedener Pneumonieformen mittels PCT dennoch möglich (PRAT et al., 2003; PRAT et al., 2006; PIACENTINI et al., 2011; NIU et al., 2013). Bei chronischen Atemwegserkrankungen des Menschen wie Asthma und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) wird PCT zur Identifizierung bakteriell bedingter Exazerbationen angewandt. In diesem Fall erleichtert es die Entscheidung für oder gegen einen Antibiotikaeinsatz und dient zur Steuerung der damit verbundenen Behandlungsdauer (BRIGHTLING, 2013; TANG et al., 2013). Die genauen Mechanismen der PCT-Induktion im Rahmen bakterieller Infektionen sind noch weitgehend unbekannt, allerdings wurde eine Interaktion des Vorläuferhormons mit proinflammatorischen Zytokinen (u. a. Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6) bereits nachgewiesen (OBERHOFFER et al., 1999; NIJSTEN et al., 2000). In der Tiermedizin ist der Einsatz von PCT-Diagnostik noch nicht weit verbreitet, was in erster Linie auf das Fehlen speziesspezifischer Nachweismethoden zurückzuführen ist. Im Jahre 2014 entwickelten RIEGER und Kollegen erstmals einen ELISA-Test zum Nachweis von PCT in equinem Blutplasma. Dieser wurde zur Differenzierung gesunder und septischer Pferde sowie im Rahmen der Kolikdiagnostik bereits eingesetzt (RIEGER et al., 2014; TESCHNER et al., 2015).

Die *recurrent airway obstruction* (RAO) bzw. chronisch obstruktive Bronchitis (COB) ist eine verbreitete Atemwegserkrankung älterer Pferde, die einige Ähnlichkeiten sowohl mit dem Asthma bronchiale als auch mit der COPD des Menschen aufweist (ROBINSON, 2001). Die equine IAD (*inflammatory airway disease*) stellt eine weitere entzündliche Veränderung der Atemwege dar. Diese betrifft vornehmlich jüngere Sportpferde und wird zurzeit als mögliche Vorläufererkrankung der COB diskutiert (COUÉTIL et al., 2007). Bei der RAO bzw. COB des Pferdes wechseln sich akute Krankheitsschübe (Exazerbation) mit nahezu asymptomatischen Zuständen (Remission) ab. Während beim Menschen sowohl Asthma- als auch COPD-Exazerbationen durch bakterielle oder virale Infektionen entstehen, konnte dies für die RAO bzw. COB des Pferdes nicht nachgewiesen werden (ROBINSON, 2001). An

der Pathogenese der IAD wird dagegen eine Beteiligung bakterieller Keime vermutet (WOOD et al., 2005). Interstitielle Pneumopathien stellen weitere respiratorische Erkrankungen der Pferde dar, die zu irreversiblen Veränderungen der Lungenstruktur (Fibrose) führen können. Obwohl auch in diesem Fall vorausgegangene Atemwegsinfekte eine Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielen können, sind die verantwortlichen Keime im fortgeschrittenen Stadium meist nicht mehr nachweisbar (WILKINS und LASCOLA, 2015). Abschließend kommen beim Pferd auch rein infektiöse Pneumonien vor. Diese sind in der latenten bzw. akuten Phase oftmals schwer zu erkennen, da typische Symptome wie Fieber, Mattigkeit und mukopurulenten Nasenausfluss zu diesem Zeitpunkt fehlen können (REUSS und GIGUÈRE, 2015).

Für eine sichere Diagnosestellung ist die Durchführung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) in der Pferdemedizin unabdingbar (BARTON et al., 2014a). Durch die zytologische Untersuchung der Spülflüssigkeit lassen sich krankheitstypische Zellmuster deutlich erkennen (z. B. Neutrophilie bei RAO bzw. COB und IAD sowie erhöhte Makrophagenzahlen bei interstitiellen Lungenerkrankungen) (ROBINSON, 2001; COUËTIL et al., 2007; WILKINS und LASCOLA, 2015). Um die immunpathogenetischen Vorgänge dieser Erkrankungen besser zu verstehen, wurde außerdem in den letzten Jahren die Ausprägung zahlreicher Mediatoren in der BAL-Flüssigkeit (BALF) vornehmlich auf transkriptioneller Ebene näher untersucht (PIRIE, 2014b).

Das erste Ziel dieser Studie war es, die Konzentrationen von equinem PCT in Blutplasma und BALF gesunder und chronisch lungenkranker Pferde zu bestimmen. Dazu kam ein speziell für diese Tierart entwickelter ELISA-Test zum Einsatz (RIEGER et al., 2104), welcher im Rahmen der vorliegenden Studie zusätzlich zur Anwendung mit BALF-Proben validiert wurde.

Des Weiteren sollten die Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Interleukine in der BALF gesunder und chronisch lungenkranker Pferde ermittelt werden. Dabei wurden die Interleukine 1 $\beta$  und 6 gewählt, welche bei verschiedenen Lungenerkrankungen erwiesenermaßen an der Entstehung bzw. Erhaltung der Entzündung beteiligt sind (THACKER, 2006) und wie bereits erwähnt ebenfalls zur Procalcitonininduktion beitragen. Außerdem wurde das Interleukin-17 untersucht, welches beim Pferd scheinbar eher an der chronischen Phase der Lungenentzündung sowie an der Neutrophilenrekrutierung beteiligt ist (MENSIKOVA et al., 2013).

Eventuell bestehende Korrelationen sowohl zwischen den verschiedenen Entzündungsmarkern (PCT, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17) als auch zwischen den Proteinen und dem klinischen Zustand der Patienten (Lungenfunktion, Röntgenbefunde, Endoskopiebefunde, BALF-Zytologie, Score-System) sollten ebenfalls untersucht werden.

Da sich die inhalative Verabreichung von Glukokortikoiden in Kombination mit einer konsequenten Haltungsoptimierung als effektiver Therapieweg für die COB des Pferdes erwiesen hat (PIRIE, 2014a), wurden abschließend zwölf an COB bzw. IAD erkrankte Pferde einer zehntägigen Inhalation mit Budesonid unter staubarmer Aufstallung unterzogen. Im Anschluss an die Therapie wurden die Veränderungen des klinischen Status der Patienten sowie der Einfluss des Glukokortikoids auf die Konzentrationen der besagten Entzündungsmarker in der BALF untersucht.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Immunologische Grundlagen

#### 2.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Der grundlegende Aufbau des equinen Immunsystems soll nachfolgend dargestellt werden. Eine detailliertere Beschreibung dazu findet sich in LUNN und HOROHOV (2004b).

Das angeborene Immunsystem agiert als erste Stufe der Abwehr. In erster Linie werden Pathogene durch physikalische Barrieren daran gehindert, den Körper anzugreifen. Dazu zählen die Haut und Schleimhäute sowie die in den verschiedenen Milieus herrschenden pH-Werte. Im Respirationstrakt werden eingedrungene Keime in Schleim gefangen und durch zilientragende Zellen des Flimmerepithels aufwärts transportiert, heruntergeschluckt und im Magen durch Säurebildung zerstört. Bei Überwindung der mechanischen Barrieren durch die Pathogene werden im Körper weitere unspezifische Abwehrmechanismen eingeleitet. Dazu zählen die Aktivierung bestimmter Protease-Kaskaden (Komplementsystem), die direkte Vernichtung pathogener Keime durch Makrophagen (Phagozytose), neutrophile Granulozyten (Phagozytose, „*respiratory burst*“) und natürliche Killerzellen sowie die Sezernierung verschiedener Botenstoffe (Akute-Phase-Proteine, Lipidmediatoren, proinflammatorische Zytokine).

Im Gegensatz zur unspezifischen Immunantwort durch das angeborene System verfügt das erworbene oder adaptive Immunsystem über eine hohe Spezifität. Durch das sogenannte „immunologische Gedächtnis“ wird die Immunantwort an die Pathogene angepasst und diese mittels bestimmter Antikörper und Effektor-Zellen gezielt bekämpft. Hauptspieler sind hierbei jeweils B-Lymphozyten (humorale Immunität) und T-Lymphozyten (zelluläre Immunität). Beide entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. B-Zellen durchlaufen ihre weitere Entwicklung bei Säugetieren ebenfalls im Knochenmark und sind dann vor allem in Milz und Lymphknoten zu finden. Im zirkulierenden Blut sind sie nur zu ca. 15 % vertreten. Bei Antigenkontakt findet eine weitere Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen bzw. B-Gedächtniszellen statt. Antikörper (Ak) bzw. Immunglobuline (Ig) sind in der Lage, gelöstes und zellgebundenes Antigen in seiner ursprünglichen Konformation zu binden und zu neutralisieren. Beim Pferd sind bis heute fünf Antikörper-Klassen bekannt, welche nach dem „*Immunoglobulin and Fc-Receptor Workshop*“ auf dem „*6th International Veterinary Immunology Symposium*“ in Uppsala, Schweden (2001) einer neuen Nomenklatur folgen. Danach wird beim Pferd zwischen Genen, die für IgA, IgE, IgG (Subklassen 1-7), IgM und IgD kodieren, unterschieden. Jedoch erfolgte eine direkte Bestimmung der Antikörper aus Serum oder weiteren Körperflüssigkeiten bisher nur für die Isotypen IgM, IgG1, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgE und IgA (WAGNER B., 2006). Anders als bei B-Lymphozyten reifen T-Zellen im Thymus. Hier erfolgt eine strenge Selektion, wobei weniger als 3 % unreifer Thymozyten den Entwicklungsprozess überstehen. T-Lymphozyten besitzen zur Erkennung von Antigenen einen Rezeptor-Komplex, der sich aus dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem

Co-Rezeptor CD3 zusammensetzt. Die Abkürzung „CD“ steht für „*cluster of differentiation*“ und wird in der Immunologie angewandt, um bestimmte Oberflächenmoleküle zu definieren, welche als Rezeptoren bzw. Liganden fungieren. Unter den T-Zell-Rezeptoren wird zwischen  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -Heterodimeren differenziert. Wie beim Menschen finden sich auch beim Pferd nur wenige Rezeptoren des  $\gamma/\delta$ -Subtyps und diese kommen vor allem auf Schleimhautoberflächen vor (HOROHOF, 2015). T-Lymphozyten werden außerdem anhand der Expression weiterer Oberflächenmoleküle in zytotoxische Effektor-Zellen (CD8+) und regulatorische T-Helferzellen (CD4+) unterteilt. Erstere sind in der Lage, die Apoptose infizierter Zellen zu induzieren, während T-Helferzellen (Th) durch die Produktion bestimmter Zytokine die Immunantwort steuern. Der größte Unterschied zwischen B- und T-Zellen besteht darin, dass Letztere nur „verarbeitete“ Antigene in Verbindung mit körpereigenen Molekülkomplexen, sogenannten „*major histocompatibility complexes*“ (MHC), erkennen können. Beim Pferd wird der MHC auch ELA (*equine lymphocyte antigen*) genannt und hat in Aufbau und Funktion große Ähnlichkeit mit dem humanen Komplex (HOROHOF, 2015).

## 2.1.2 Immunregulation

### 2.1.2.1 Differenzierung der T-Helferzellen (CD4+)

Nach dem ersten Antigen-Kontakt mittels MHC-II-Präsentation erfolgt eine Differenzierung naiver T-Helferzellen in verschiedene Subklassen, welche die Art der Immunantwort an die vorkommenden Pathogene anpassen. Dieser Prozess wird durch das Vorhandensein bestimmter Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren stark beeinflusst. Des Weiteren spielen einige Transkriptionsfaktoren (u. a. STAT-Proteine, *signaling transducer and activator of transcription*) eine entscheidende Rolle (KOLLS, 2013). Im Folgenden sind die einzelnen Untergruppen ausdifferenzierter CD4+-Effektorzellen und deren Entwicklungsmechanismen zusammengefasst.

#### 2.1.2.1.1 Th1/Th2-Modell

Die ersten Hinweise für eine Differenzierung von T-Helferzellen ergaben sich aus den Untersuchungen von MOSMANN und COFFMAN (1986) an CD4-T-Zell-Klonen von Mäusen, welche in zwei unterschiedliche Populationen unterteilt wurden (Th1 und Th2). Diese Klassifizierung erfolgte anhand von sezernierten Zytokinen und der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. Somit produzierten Th1-Zellen in erster Linie IFN- $\gamma$ , IL-2 und Lymphotoxin. Im Gegensatz dazu sezernierten Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Ähnliche Zytokinmuster wurden auch bei polarisierten Th1- und Th2-Zellen des Menschen beobachtet, allerdings war hier die Freisetzung bestimmter Interleukine (-2, -6, -10 und -13) nicht so streng an eine einzige Unterklasse gebunden (MOSMANN und SAD, 1996). Die Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung der zwei Th-Untergruppen steuern, sind ebenfalls unterschiedlich: GATA3 bzw. STAT6 für Th2 und Tbet bzw. STAT 4 für Th1 (KOLLS, 2013). Funktionell gesehen bewirkt der Th1-Subtyp eine zellvermittelte Immunantwort, während Th2-Zellen die Antikörperbildung (v.a. IgE) steigern und oft in Verbindung mit allergischen Geschehen stehen (MOSMANN und SAD, 1996).

Auch beim Pferd konnte eine Polarisierung der Helferzellen in Th1- und Th2-Lymphozyten nachgewiesen werden (AGGARWAL und HOLMES, 1999; GILGER et al., 1999). Die Beteiligung von Th-1- bzw. Th-2-medierten Prozessen an der Entstehung verschiedener Pferdekrankheiten wie z. B. der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU), der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) und der chronischen Form der Culicoides-Hypersensitivität (Sommerekzem) ist bereits bekannt (LUNN und HOROHOV, 2004b) und wird weiterhin untersucht.

#### 2.1.2.1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Lymphozyten haben die Funktion, erworbene und adaptive Immunreaktionen des Organismus zu modulieren. Sie können die exzessive Vermehrung von T-Zellen verhindern (daher auch der Name „Suppressor-T-Zellen“) und regulieren sowohl Th1- als auch Th-2-gesteuerte Immunantworten (HAWRYLOWICZ und O’GARRA, 2005). Natürliche regulatorische T-Lymphozyten (nTreg) entstehen im Thymus und machen etwa 5-10 % aller CD4+-Zellen bei Maus und Mensch aus. Diese sind durch eine hohe Expression des Oberflächenmoleküls CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) charakterisiert, deshalb werden sie auch als CD4+CD25+-Zellen bezeichnet. Allerdings ist dieser Rezeptor nicht spezifisch, da er auch von anderen aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird. In der Peripherie sind solche Zellen ebenfalls zu finden und werden als „induzierte regulatorische T-Zellen“ (iTreg) definiert (HAWRYLOWICZ und O’GARRA, 2005). Die Differenzierung naiver T-Zellen in nTreg wird durch den Transkriptionsfaktor FOXP3 gesteuert. Anhand der sezernierten Mediatoren konnten murine und humane Treg in verschiedene Gruppen unterteilt werden (HAWRYLOWICZ und O’GARRA, 2005):

- IL-10 produzierende regulatorische CD4+-Zellen
- IL-10, IFN- $\gamma$  und IL-5 produzierende regulatorische CD4+-Zellen (auch als Treg1 bzw. regulatorische T1-Zellen bekannt)
- TNF- $\beta$  produzierende regulatorische CD4+-Zellen (regulatorische Th3-Zellen)

Diese Unterklassen unterscheiden sich alle von der ursprünglichen Form der natürlichen regulatorischen T-Zellen (HAWRYLOWICZ und O’GARRA, 2005).

Beim adulten Pferd wurden bisher zwei Treg-Unterklassen identifiziert:

- Treg1-ähnliche CD4+-Zellen, welche ebenfalls durch die Bildung von IL-10 und IFN- $\gamma$  charakterisiert sind (WAGNER B. et al., 2008).
- FOXP3-exprimierende CD4+-Zellen, welche unter peripheren mononukleären Zellen des Blutes und in den *Cup*-Zellen des Endometriums gefunden wurden (DE MESTRE et al., 2010).

### 2.1.2.1.3 Th17-Zellen

Die kürzlich entdeckte Th17-Klasse, welche eine eigenständige und unabhängige Abstammung von den anderen Th-Gruppen zeigt, ist durch die Bildung von IL-17 (oder IL-17A), IL-17F, IL-21, IL-22 und beim Menschen zusätzlich IL-26 charakterisiert. Th-17-Lymphozyten entwickeln sich unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ , ROR $\alpha$  und STAT3. Eine solche Differenzierung kann durch die Mediatoren IL-6 und TGF- $\beta$  stimuliert werden (KOLLS, 2013). Die vor allem an Mausmodellen durchgeführten Forschungen zeigen eine deutliche proinflammatorische Rolle der Th-17-Zellen. Durch das Leitzytokin IL-17 wird die Bildung proinflammatorischer Mediatoren (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) und die Induktion einiger Chemokine (u. a. IL-8) stimuliert. Die Neutrophilen-Rekrutierung stellt ebenfalls eine wichtige Folge der Th-17-medierten Entzündung dar (SCHMIDT-WEBER et al., 2007).

Beim Pferd wurde das Interleukin-17 ebenfalls charakterisiert und seine Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen diskutiert (MENSIKOVA et al., 2013).

### 2.1.2.1.4 Follikuläre T-Helferzellen (Tfh)

Eine weitere Untergruppe wird von den follikulären T-Helferzellen gebildet. Diese sind in sogenannten Keimzentren sekundärer Lymphgewebe lokalisiert. Hier steuern sie vor allem die Aktivierung von B-Zellen und regulieren das Wechseln verschiedener Immunglobulin-Isotypen („*switching*“). Somit spielen sie für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des immunologischen Gedächtnisses eine zentrale Rolle. Ob und wie genau diese Zellen mit weiteren Th-Untergruppen in Verbindung stehen, ist noch nicht vollständig geklärt (ZHU et al., 2010).

### 2.1.2.1.5 Weitere Th-Subklassen

In letzter Zeit wurde beim Menschen das Vorhandensein zweier weiterer Th-Untergruppen postuliert: Th9- und Th22-Zellen mit den jeweiligen Leitzytokinen IL-9 und IL-22. Das Interleukin-9, welches auch von Th2-Zellen produziert wird, spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von humanem Asthma. Das Interleukin-22 wird auch von Th17-Zellen und bestimmten hautspezifischen NK-Zellen sezerniert. Eine Beteiligung von IL-22 an der Entstehung von Hauterkrankungen wird diskutiert (ZHU et al., 2010).

### **2.1.2.2 Die Th1/Th2/Th17/Treg - Balance**

Um eine adäquate Immunantwort auszubilden, müssen die verschiedenen T-Helferzellen in einer Art Gleichgewicht zusammenarbeiten (sogenannte „Immunbalance“). Wenn dieses Gleichgewicht gestört ist, kommt es zu krankhaften Geschehen wie Allergien oder autoimmune Reaktionen des Organismus. Auch für physiologische Prozesse wie Wachstum und Schwangerschaft spielt die Erhaltung dieses Th-Gleichgewichtes eine entscheidende Rolle (MOSMANN und SAD, 1996). Die komplexe Kreuzregulierung zwischen den Th-Subtypen ist für die Erhaltung der Balance essenziell und erfolgt mittels verschiedener



Mechanismen. Einerseits wird schon auf transkriptioneller Ebene durch die gegenseitige Suppression verschiedener Faktoren entschieden, welche Zelllinie sich aus den naiven T-Lymphozyten entwickeln soll. Des Weiteren erfolgt die Steuerung der Th-Polarisierung über sogenannte „positive-Feedback-Mechanismen“. Eine vereinfachte Darstellung dieser komplexen Regulation stellt Abbildung 1 dar. Demnach sind IL-6 (Th17), IL-4 (Th2) und TGF- $\beta$  bzw. IL-10 (Treg) in der Lage, eine Polarisierung auf den jeweiligen Th-Phenotyp zu favorisieren. IFN- $\gamma$  kann die Bildung von Th1-Zellen direkt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Tbet und indirekt über die Anregung IL-12-produzierender dendritischer Zellen beeinflussen. TGF- $\beta$ , essenzieller Wachstumsfaktor für die Bildung von Th17- und Treg-Zellen, inhibiert gleichzeitig die Transkriptionsfaktoren Tbet (Th1) und GATA-3 (Th2). T-Helferzellen interagieren im Rahmen der Immunantwort nicht nur untereinander bzw. mit anderen lymphoiden Zellen, sondern haben auch Einfluss auf Gewebezellen und leiten diese in der Ausbildung der Immunreaktion an. Dadurch erfolgt eine Steuerung auch auf lokaler Ebene und die Immunreaktion kann an die Bedürfnisse der betroffenen Organe besser angepasst werden (SCHMIDT-WEBER et al., 2007).

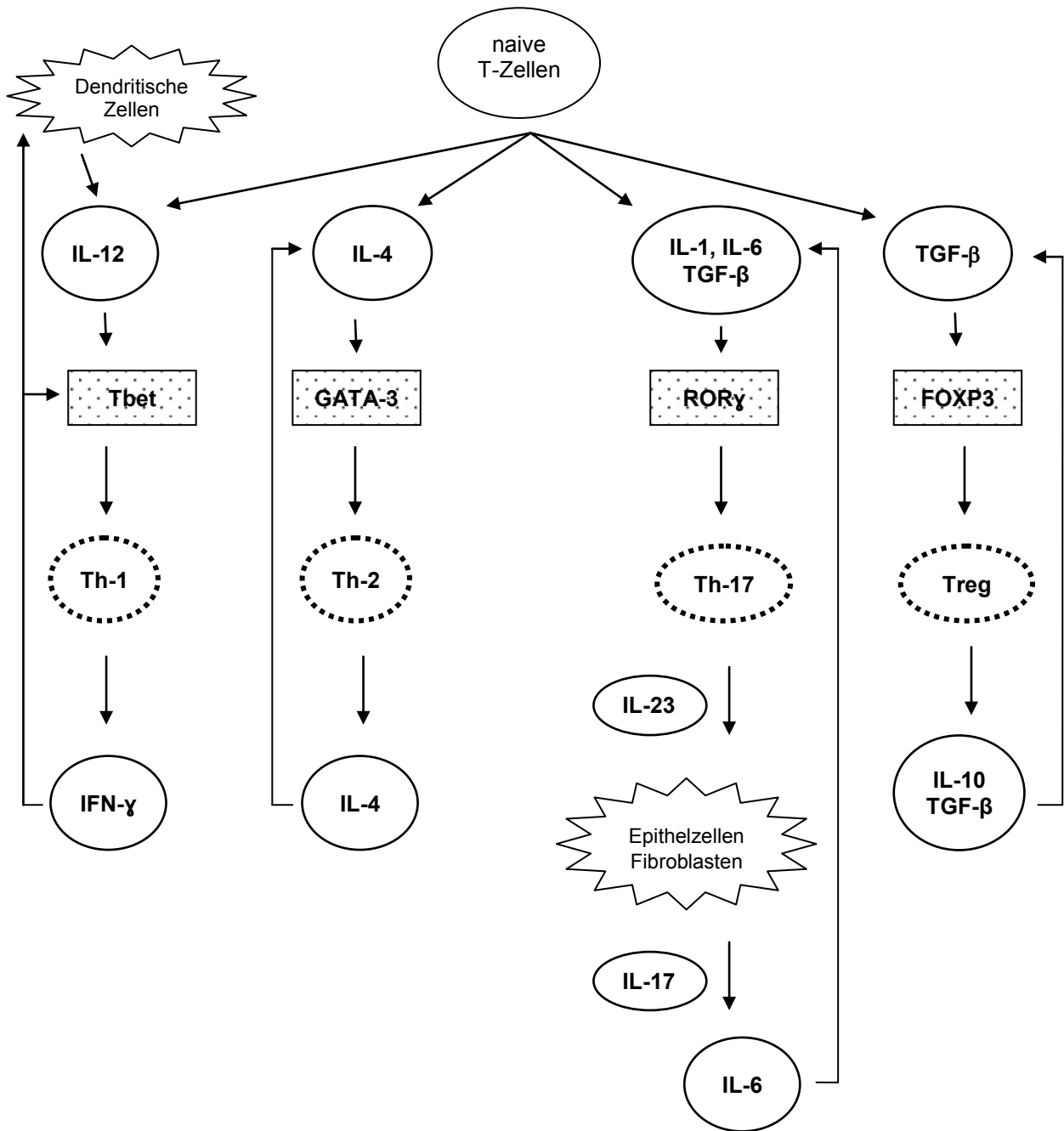


Abb. 1: Positive Feedback-Mechanismen im Rahmen der Th-Zell-Polarisierung, modifiziert nach SCHMIDT-WEBER (2007).

### 2.1.2.3 Zytokine

Zytokine sind Proteine (< 80 kDa Masse), welche von verschiedenen Zellen produziert werden und der Zell-Zell-Interaktion dienen. Sie können sowohl auf die sezernierende Zelle (autokrin) als auch auf andere Zellen (parakrin bzw. endokrin) wirken. Die Freisetzung verschiedener Zytokine erfolgt meist gleichzeitig, sodass für unterschiedliche Erkrankungen auch unterschiedliche Zytokin-Muster gebildet werden. Im Kontext von Atemwegserkrankungen können Zytokine anhand ihrer Funktion folgend klassifiziert werden (CHUNG, 2001):

- proinflammatorische Zytokine
- T-Zell-assoziierte Zytokine
- Chemokine
- Wachstumsfaktoren
- anti-inflammatorische Zytokine

Aktiviert T-Zellen können, wie oben bereits beschrieben, verschiedene Interleukine freisetzen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), welche die Art der Immunantwort bestimmen (z. B. Th1- oder Th2-Typ). Eine weitere Zytokin-Klasse besteht aus Chemokinen, welche Leukozyten in bestimmte Gewebe locken. Wichtigster Vertreter dieser Gruppe ist das Interleukin-8 (IL-8). Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- $\beta$  steuern die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben verschiedener Zellen. Außerdem spielen sie in *Remodeling*-Prozessen der Atemwege eine wichtige Rolle. Anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 haben die Aufgabe, entzündliche Prozesse zu regulieren bzw. zu beenden (CHUNG, 2001). Proinflammatorische Zytokine sind die ersten Mediatoren, die zu Beginn einer entzündlichen Reaktion induziert werden. Sie werden von verschiedenen Zellen, in erster Linie jedoch von Monozyten und Makrophagen, freigesetzt und modulieren verschiedene immunologische Prozesse. Wenn sie allerdings übermäßig ausgeschüttet werden, können sie krankhafte Geschehen verschlimmern (MURTAUGH et al., 1996). Im folgenden Abschnitt wird der Schwerpunkt auf die in dieser Studie bestimmten proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-17 und deren Effekte gelegt. Die Mitbeteiligung dieser Mediatoren an der Entstehung bestimmter Lungenkrankheiten des Pferdes wird in den Abschnitten über die jeweiligen Krankheitsbilder näher beschrieben (siehe Paragraph 2.2).

#### 2.1.2.3.1 Interleukin-1 $\beta$

Das 17 kDa schwere Glykoprotein „Interleukin-1 $\beta$ “ ist das am besten erforschte Zytokin aus der IL-1-Familie. Zu dieser Gruppe gehört außerdem das Interleukin-1 $\alpha$ , welches nur etwa 23 % strukturelle Homologie zum 1 $\beta$ -Typ besitzt. Beide Interleukine entfalten ihre biologischen Wirkungen über denselben Rezeptor (IL-Rezeptor Typ I) und ein Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) ist ebenfalls bekannt (DINARELLO, 1997; KRAUSE et al., 2012). Das equine Zytokin zeigt bezüglich der Aminosäuresequenz eine relativ hohe Homologie sowohl zu humanem (66,7 %) als auch zu murinem (61,8 %) IL-1 $\beta$  (KATO et al., 1995). Dieses

Interleukin wird von verschiedenen Zellen gebildet. Hauptproduzenten sind Blut-Monozyten, Gewebe-Makrophagen und dendritische Zellen, wobei auch die Freisetzung durch B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und nicht-lymphoide Zellen bekannt ist. Die Aktivierung IL-1- $\beta$ -sezernierender Zellen erfolgt über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), welche die Transkription von pro-IL-1- $\beta$  über den *nuclear-factor- $\kappa$ -B* (NF- $\kappa$ B) hochregulieren. Anschließend wird pro-IL-1 $\beta$  über das Enzym „Caspase-1“ in die reife Form überführt. Die Caspase-1-Aktivierung erfolgt mittels sogenannter „Inflammasome“. Diese sind zytosolische Multiprotein-Komplexe, welche Pathogene bzw. bestimmte Gefahren-Signale detektieren und anschließend die IL-1 $\beta$ -Bildung über die Caspase-1 stimulieren können. Das bis heute am besten charakterisierte Inflammasom ist das NLR-Protein 3 (NLRP3) (KRAUSE et al., 2012). Das Interleukin-1- $\beta$  ist ein essenzieller Mediator im Rahmen der akuten Entzündung und unterstützt den Körper in der Abwehr pathogener Organismen. Allerdings ist es auch an der Entstehung autoimmuner und allergischer Geschehen beteiligt. Unter den wichtigsten immunologischen Funktionen ist die Aktivierung von T- und B-Zellen zu nennen. IL-1 $\beta$  fördert die Expression von IL-2-Rezeptoren auf T-Lymphozyten und stimuliert die Antikörperbildung durch B-Lymphozyten und deren Proliferation. Die Th-17-Zell-Differenzierung wird ebenfalls favorisiert (KRAUSE et al., 2012). Des Weiteren stimuliert das Interleukin-1 $\beta$  die Freisetzung anderer Zytokine wie IL-6 und IL-8 und besitzt dadurch indirekt eine chemotaktische Wirkung. Endothelzellen exprimieren unter Einfluss von IL-1 $\beta$  vermehrt Adhäsionsmoleküle. Außerdem ist beschrieben, dass Interleukin-1- $\beta$  die Bildung von Fibroblasten und die Fibronectin- und Kollagen-Synthese steigert (CHUNG, 2001). Die Mitbeteiligung von IL-1 $\beta$  an der Entstehung von Arthritiden durch Förderung knorpelzerstörender Prozesse ist ebenfalls bekannt (MURTAUGH et al., 1996). Die physiologischen bzw. pathologischen Effekte von Interleukin-1 werden durch die Balance zwischen dem Interleukin selbst und seinem Antagonisten (IL-1Ra) bestimmt. Dieses Gleichgewicht ist bei der Entstehung von verschiedenen IL-1-medierten Krankheiten (u. a. Asthma) gestört. Somit stellt die Verabreichung von IL-1-Ra eine therapeutische Möglichkeit dar, die sowohl anhand von Tiermodellen als auch direkt an Menschen weitergehend untersucht wird (AREND, 2002).

#### 2.1.2.3.2 Interleukin-6

Das circa 21 kDa schwere Glykoprotein „Interleukin-6“ wurde beim Pferd ebenfalls charakterisiert und zeigt in seinem Aufbau große Ähnlichkeiten zum humanen (77,6 %) sowie zum murinen (64 %) Zytokin (SWIDERSKI et al., 2000). Es wird in erster Linie von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert (v. a. Makrophagen). Des Weiteren wird IL-6 von B-Zellen, einigen T-Helferzellen und verschiedenen nicht-lymphoiden-Zellen (z. B. Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten und Astrozyten) vornehmlich in Zellstresssituationen oder unter dem Einfluss anderer Zytokine (u. a. IL-1 $\beta$ ) sezerniert. Das Interleukin-6 entfaltet seine Wirkungen über den gleichnamigen Rezeptor (IL-6R), welcher auf Leukozyten und Hepatozyten exprimiert wird. Um die Signaltransduktion einzuleiten, muss der IL-6-Rezeptor-Komplex zunächst an das Protein gp130 binden. Durch diese Assoziation wird dann eine Signaltransduktionskaskade eingeleitet, welche mit der Aktivierung des Haupttranskriptionsfaktors STAT-3 endet. Da nicht alle Zellen einen IL-6-Rezeptor besitzen, wurde außerdem ein alternativer Weg (*trans-signaling pathway*) zur

Aktivierung IL-6-sezernierender Zellen entdeckt. Durch mRNA *Splicing* oder durch direkte Spaltung membrangebundener IL-6-Rezeptoren mittels Metalloproteinasen, entstehen lösliche IL-6-Rezeptoren (sIL6-R). Das Interleukin bindet also an sIL6R und dieser Komplex kann ebenfalls die Transduktion über gp130 aktivieren. Eine der Hauptaufgaben von Interleukin-6 ist die Steuerung der Differenzierung von T-Helferzellen. Die Th2-Antwort wird mittels Steigerung der IL-4-Freisetzung favorisiert und gleichzeitig wird eine Th1-Antwort unterdrückt. Des Weiteren fördert IL-6 in Zusammenarbeit mit TGF- $\beta$  den Th-17-Subtyp. Interleukin-6 unterstützt außerdem die humorale Immunreaktion, in dem es die Entstehung von Plasmazellen stimuliert (RINCON und IRVIN, 2012). Als wichtigstes proinflammatorisches Zytokin für die Entstehung der Akuten-Phase-Reaktion regt IL-6 die Freisetzung der Akute-Phase-Proteine aus der Leber an. Gleichzeitig wird die Produktion von Albumin und Transferrin vermindert. Interleukin-6 hat auch eine modulierende Wirkung auf die entzündliche Reaktion, da es zur Downregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  befähigt ist (MURTAUGH et al., 1996). Abschließend spielt Interleukin-6 auch bei der Entstehung verschiedener Krankheiten eine wichtige Rolle. Beim Menschen ist die aktive Beteiligung von IL-6 an der Pathogenese von Lungenkrankheiten wie Asthma und COPD bereits bekannt (RINCON und IRVIN, 2012).

#### 2.1.2.3.3 Interleukin-17

Interleukin-17, auch als IL-17A bekannt, gilt als Prototyp-Mitglied der IL-17-Familie. Dieses homodimerische Glykoprotein besteht beim Menschen aus 155 Aminosäuren und hat ein Gewicht von etwa 35 kDa. Größte strukturelle sowie funktionelle Ähnlichkeit zeigt IL-17A mit dem verwandten IL-17F, und das Vorkommen eines IL-17A-IL17-F Heterodimers mit proinflammatorischer Wirkung wurde sowohl im humanen als auch im murinen Modell bewiesen (IVANOV und LINDEN, 2008). Beim Pferd wurde IL-17 ebenfalls charakterisiert und dabei wurde eine Homologie zwischen equiner und humaner Aminosäuresequenz von ca. 76 % festgestellt (TOMPKINS et al., 2010). Neben Th17-Zellen können auch einige  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie CD8+-Zellen und natürliche Killerzellen das Interleukin sezernieren. Die mögliche Freisetzung von IL-17 mRNA durch Paneth-Zellen des Darmes, Monozyten und Granulozyten wird vermutet. Ein Rezeptor für Interleukin-17 (IL-17R) konnte in vielen Körperzellen nachgewiesen werden, und über diesen können verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden (Jak/STAT oder MAPK) (MENSIKOVA et al., 2013). Das Interleukin-17 hat mehrere Funktionen, welche allgemein zu einer Steigerung der Entzündungsreaktion führen. In verschiedenen Körperzellen (Fibroblasten, endotheliale und epitheliale Zellen) fördert IL-17 die Freisetzung von Chemokinen (u. a. IL-8), Wachstumsfaktoren (G-CSF und GM-CSF) und anderen proinflammatorischen Zytokinen (IL-6 und IL-1 sowie TNF- $\alpha$  aus Makrophagen). Des Weiteren promotet IL-17 die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (u. a. MMP-3 und -9) und antimikrobiellen Peptiden (SHABGAH et al., 2014) und unterstützt zusammen mit IL-6 die Freisetzung bestimmter Muzine (MUC5AC, MUC5B) aus Epithelzellen des humanen Respirationstraktes. Durch all diese Effekte wird die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Entzündungsort aktiviert, was zur weiteren Amplifizierung der Entzündungsreaktion führt (IVANOV und LINDEN, 2008). In den letzten Jahren ist das Interesse für die Rolle von IL-17 in der Entstehung verschiedener Krankheiten

sowohl beim Tier als auch beim Mensch stetig gewachsen. In der Humanmedizin wird IL-17 mit vielen autoimmunen bzw. entzündlichen Prozessen (z. B. rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, chronische entzündliche Darmerkrankungen) und mit bestimmten Lungenkrankheiten (Asthma, COPD) assoziiert (LINDEN et al., 2005; COSMI et al., 2011; SHABGAH et al., 2014). Beim Pferd wird vor allem die Beteiligung von IL-17 an der Pathogenese verschiedener Atemwegserkrankungen (IAD, COB, Rhodokokkose) diskutiert (MENSIKOVA et al., 2013).

## 2.2 Chronische Lungenkrankheiten bei Pferd und Mensch

In diesem Abschnitt werden die bei den Patienten dieser Studie diagnostizierten Erkrankungen der tiefen Atemwege beschrieben. Entsprechende Krankheitsbilder des Menschen sind ebenfalls kurz aufgeführt.

### 2.2.1 Chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes

#### 2.2.1.1 Allgemeine Aspekte und Definitionen

In gemäßigten Klimazonen ist die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) die am häufigsten vorkommende, nicht infektiöse Atemwegserkrankung des Pferdes (FEY, 2006b) sowie die verbreitetste Ursache für chronischen Husten und Leistungsminderung bei dieser Tierart (PIRIE, 2014b). In Großbritannien wurde für COB eine Prävalenz von 14 % geschätzt (HOTCHKISS et al., 2007). Des Weiteren fanden einige Autoren heraus, dass das steigende Alter, die Haltungsform (Stallhaltung bzw. städtische Gebiete), die Saison (Winter und Frühjahr) und vorausgegangene Infektionen der Atemwege sowie eine frühe Exposition mit Heu oder Stroh wichtige Risikofaktoren für diese Erkrankung darstellen (COUËTIL und WARD, 2003; HOTCHKISS et al., 2007). In der englischen Literatur wird dieses Krankheitsbild als *recurrent airway obstruction* (RAO) (rezidivierende Atemwegsobstruktion) oder *heaves* (Dämpfigkeit) bezeichnet. Darunter versteht man eine bei adulten Pferden wiederkehrende und durch die Inhalation organischer Stäube verursachte Obstruktion der Atemwege. Akute Zustände mit starker Ausprägung der Symptomatik werden dabei als „Exazerbation“ bezeichnet. Sobald die auslösenden Faktoren eliminiert werden (Haltungsoptimierung) oder Bronchodilatoren verabreicht werden, gehen die klinischen Symptome meistens zurück. Entzündung und Obstruktion können in geringem Ausmaß bestehen bleiben (sogenannte „Remission“) (ROBINSON, 2001). Der ursprüngliche Terminus „COPD“ wurde im Jahre 2000 in Folge eines internationalen Workshops abgeschafft. Die in der Humanmedizin als *chronic obstructive pulmonary disease* benannte Krankheit ist im Vergleich zur RAO ein nahezu irreversibler Prozess, welcher auch bezüglich seiner Entstehung deutliche Unterschiede zur equinen Krankheit zeigt (ROBINSON, 2001). Die RAO muss außerdem von weiteren entzündlichen Prozessen der Atemwege des Pferdes abgegrenzt werden, wie zum Beispiel der IAD (*inflammatory airway disease*) und der SP-RAO (*summer pasture-associated recurrent airway obstruction*). Erstere stellt eine mildere

Form der Atemwegsentzündung dar und kann auch bei jüngeren Pferden auftreten (siehe dazu Paragraph 2.2.2). Die SP-RAO ist klinisch nicht von der klassischen Form zu unterscheiden, allerdings tritt diese Erkrankung vornehmlich während des sommerlichen Weideaufenthaltes auf. Durch staubarme Aufstallung ist eine Besserung bis sogar zum Verschwinden der klinischen Symptomatik möglich. Der Hauptunterschied zur klassischen Form scheint die Inhalation verschiedener Substanzen zu sein: Schimmelpilze und Staubpartikel bei RAO bzw. bestimmte Gras-Pollenkörner bei SP-RAO. Die genaue Ätiologie der SP-RAO ist allerdings noch nicht geklärt und ein saisonales Auftreten beider Formen bei denselben Pferden wurde ebenfalls beschrieben (PIRIE, 2014b). In dieser Studie soll weiterhin der deutsche Begriff „chronisch obstruktive Bronchitis“ eingesetzt werden. Dieser ist zwar umfassender als der englische Terminus „RAO“, da er auch subklinische Verläufe (ohne Exazerbation) mit einschließt, allerdings überschneiden sich die mit den zwei Bezeichnungen verbundenen Krankheitsbilder im Wesentlichen (FEY, 2006b).

### **2.2.1.2 Ätiologie und Erbllichkeit der COB**

Die COB des Pferdes stellt ein multifaktorielles Geschehen dar, welches von umweltassoziierten und genetischen Faktoren abhängt (ROBINSON, 2001). Stallhaltung und vermehrte Exposition zu staubreichem Heu und Stroh führen zu einer Überreaktion und daraus folgt eine Entzündung der Atemwege. Heuballen mit hohem Feuchtigkeitsgehalt bilden ein optimales Milieu für die Entwicklung von Schimmelpilzen (*Aspergillus fumigatus*) und bestimmten Bakterien (*Faenia rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris*). Des Weiteren stellen Milben, inorganische Stäube und toxische Gase (z. B. Ammoniak in schlecht ventilierten Ställen) potenzielle proinflammatorische Agenzien dar (PIRIE, 2014b). Die Luftverschmutzung in Stadtgebieten wird ebenfalls als favorisierender Faktor für die Entstehung von COB diskutiert (HOTCHKISS et al., 2007). Diese Überreaktion der Pferde scheint genetische Grundlagen zu haben, da familiäre Häufungen bereits beschrieben wurden (MARTI et al., 1991; RAMSEYER et al., 2007). Ein polygenetischer autosomaler Erbgang wird vermutet (MARTI et al., 2008).

### **2.2.1.3 Immunologische Mechanismen der Entzündung bei COB**

Trotz der Durchführung vieler Studien sind die genauen immunologischen Vorgänge der COB aufgrund ihrer Komplexität bis heute nicht vollständig geklärt (MORAN und FOLCH, 2011). Im Folgenden werden nur ausgewählte Aspekte dieses weiten Gebietes vorgestellt.

#### 2.2.1.3.1 Allergische Reaktion

Die infolge inhalierter Noxen entstehende Hyperreagibilität der Atemwege spricht für eine allergische Komponente der Entzündung. Studien zu IgE und somit einer Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion, wie es bei humanem Asthma der Fall ist, wurden bei an chronischer Bronchitis erkrankten Pferden durchgeführt. Insgesamt sprechen diese allerdings eher gegen eine rasche IgE-medierte Immunreaktion (MARTI, 2009). Während beim Mensch eine sofortige Bronchokonstriktion eintritt, zeigen Pferde eine verzögerte

Ausprägung der klinischen Symptome (HOROHOV et al., 2009). Außerdem wird die Rolle von Mastzellen, welche für die Entstehung klassischer Typ-I-Reaktionen verantwortlich sind, bei der Entstehung der equinen COB kontrovers diskutiert (PIRIE, 2014b). Nach neuerer Erkenntnis ist eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV) vornehmlich an der Entstehung der COB beteiligt (WAGNER B., 2009). Die für COB typische Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe könnte des Weiteren durch Immunkomplex-Ablagerungen hervorgerufen werden und somit Ausdruck einer Typ-III-Immunreaktion sein (MORAN und FOLCH, 2011).

#### 2.2.1.3.2 Proinflammatorische Mediatoren und T-Zell-Reaktion

Zur Beteiligung verschiedener Mediatoren (proinflammatorisch, T-Zell-assoziiert, chemotaktisch) an der Entstehung der COB des Pferdes wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, welche zum Teil widersprechende und verwirrende Ergebnisse zeigen (Tabelle 1). Die meisten Untersuchungen erfolgten an kleinen Patientenkollektiven, in denen COB-anfällige Pferde mit gesunden Kontrolltieren verglichen wurden. Eine Beprobung der Patienten fand dabei sowohl im Stadium der Remission (asymptomatische Phase unter optimierter Haltung) als auch nach natürlichem *challenge* (Exazerbation der Symptomatik nach Aufstallung bzw. Stimulierung mit schimmeligem Heu) statt. In einigen Fällen wurden außerdem bestimmte Zellarten aus dem Probenmaterial isoliert und zusätzlich *ex vivo* bzw. *in vitro* mittels verschiedener Agenzien stimuliert (AINSWORTH et al., 2006; LAAN et al., 2006a; AINSWORTH et al., 2007; LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2012a). Die kleinen Stichproben, die Variabilität bezüglich des angewandten Probenmaterials und der Analysemethoden sowie die genauen Zeitpunkte der Probenentnahme (im Voraus festgestellt oder nach Eintritt der klinischen Symptomatik) stellen laut PIRIE (2014a) mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse dar.

Bei der Untersuchung des proinflammatorischen Interleukins-1 $\beta$  in der BALF konnten verschiedene Autoren einen Anstieg auf transkriptioneller Ebene während der Exazerbation beweisen (GIGUÈRE et al., 2002; PIETRA et al., 2007; PADOAN et al., 2013). SARLI und Kollegen (2011) konnten außerdem mittels *Western blot* das Interleukin in BALF auf direktem Wege nachweisen und fanden eine Steigerung der Proteinwerte während der gesamten *Challenge*-Periode (12 Tage). Diese korrelierten des Weiteren mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten aus den bronchoalveolären Spülungen. LAAN et al. (2006a) demonstrierten, dass die Alveolarmakrophagen COB-anfälliger Pferde sechs bzw. 24 Stunden, nachdem die Tiere der Inhalation bestimmter Antigene ausgesetzt wurden, signifikant erhöhte Mengen an IL-1 $\beta$  exprimierten. In weiteren Studien zeigten die aus den Atemwegen der Patienten isolierten mononukleären Zellen nach 14- bzw. eintägigem *challenge* keine signifikanten Unterschiede in der IL-1 $\beta$ -Expression. Nach zusätzlicher *In-vitro*-Stimulierung der Zellen mit bestimmten Antigenen wurde zwar ein Anstieg detektiert, allerdings war dieser in ähnlichem Ausmaß auch bei gesunden Kontrollpferden vorhanden (AINSWORTH et al., 2007; REYNER et al., 2009). JOUBERT et al. (2011) führten über zwei Jahre eine Studie durch und beprobten dabei sechs Tiere pro Sommer, jeweils 24 Stunden und neun Tage nach *challenge*-Beginn. Anschließend wurden Makrophagen aus den gesammelten BALF-Proben isoliert und auf IL-1 $\beta$ -mRNA untersucht: Signifikante Gruppenunterschiede konnten zu



keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Ein positiver Zusammenhang zwischen dem Interleukin und den neutrophilen Granulozyten aus der zytologischen BALF-Untersuchung wurde festgestellt, allerdings zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der zwei Versuche. Die Arbeitsgruppe von PADOAN (2013) konnte eine Erhöhung der IL-1 $\beta$ -mRNA nur in der BALF von Patienten mit COB in Exazerbation im Vergleich zu gesunden Kontrollpferden nachweisen, während in Bronchialepithel-Biopsien derselben Pferde keine Unterschiede im Zytokinmuster entdeckt wurden. Untersuchungen zur systemischen Ausprägung von IL-1 $\beta$  bei COB wurden ebenfalls durchgeführt. In einer Studie zeigten aus dem Blut COB-anfälliger Pferde isolierte Leukozyten nach *Ex-vivo*-Stimulation mit bakteriellen Produkten eine erhöhte Transkriptionsrate für das proinflammatorische Interleukin (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2012a). Anders fand die Arbeitsgruppe von JOUBERT (2008) bei im Kreislauf zirkulierender neutrophiler Granulozyten keinerlei Unterschiede in der IL-1 $\beta$ -mRNA-Produktion, weder zwischen erkrankten und gesunden Pferden noch zwischen COB-Patienten in Exazerbations- und Remissionsphase.

Auch die Bestimmung von Interleukin-6 war Gegenstand vieler Studien und auch hier ergaben sich aus den Untersuchungen divergierende Ergebnisse. GIGUÈRE und Kollegen (2002) gelang der Nachweis von IL-6-Transkripten in BALF nicht. Während PIETRA und Kollegen (2007) von einem Anstieg von IL-6-mRNA in der BALF exazerbierter Pferde berichten (drei Tage nach *Challenge*-Beginn), konnten PADOAN et al. (2013) weder in der BALF noch im Bronchialepithel signifikante Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Patienten nachweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Studien von RIIHIMÄKI et al. (2008a, 2008b) erzielt: Eine erhöhte Menge an IL-6-Transkripten (RT-PCR) bzw. an Protein (Immunohistochemie) wurde weder im Bronchialepithel noch in BALF-Proben detektiert. In letzteren konnte nur eine Korrelation zwischen der IL-8- und IL-6-mRNA gezeigt werden. Nach der Inhalation von Heustaublösung durch COB-anfällige und gesunde Pferde, fanden LAAN und Kollegen (2006a) heraus, dass aus der BALF isolierte Makrophagen eine höhere IL-6-Transkriptionsrate aufweisen. Da dies vor allem bei gesunden Probanden der Fall war, vermuten die Autoren eine vorwiegend anti-entzündliche Funktion des Zytokins im Rahmen der COB-Entstehung.

Die Rolle des Interleukins-17 in der Pathogenese von COB beim Pferd wurde erstmals durch die Arbeitsgruppe von DEBRUE (2005) untersucht. Diese waren in der Lage, in den BAL-Spülproben von COB-empfindlichen Pferden 35 Tage nach *Challenge*-Beginn erhöhte IL-17-mRNA-Mengen zu messen. Allerdings korrelierten diese nicht mit der in der BALF der COB-Patienten erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten. AINSWORTH et al. (2006) fanden 14 Tage nach Aufstallung eine erhöhte IL-17-Expression in der BALF von COB-Pferden im Vergleich zu gesunden Pferden. Ein signifikanter Anstieg der IL-17-mRNA-Werte bei exazerbierten Tieren im Vergleich zur asymptomatischen Phase wurde allerdings erst an Tag 35 erreicht. Während auch die Arbeitsgruppe von PADOAN (2013) einen steigenden Trend 15 Tage nach *Challenge*-Beginn beobachtete, konnten RIIHIMÄKI und Kollegen (2008a) bei früherer Beprobung der Patienten (zwei bis acht Tage nach Beginn der Exazerbationsphase) keine signifikanten Differenzen im IL-17-mRNA-Gehalt in der BALF nachweisen. In zwei weiteren Studien wurden jeweils 14 Tage und 24 Stunden nach Staubexposition pulmonale mononukleäre Zellen isoliert und für diese keine Differenzen

bezüglich der IL-17-Transkripte zwischen den Gruppen („gesund“, „COB in Exazerbation“, „COB in Remission“) entdeckt (AINSWORTH et al., 2007; REYNER et al., 2009). Eine allgemeine Erhöhung der Zytokinexpression sowohl bei kranken als auch bei gesunden Pferden wurde nur infolge zusätzlicher *In-vitro*-Inkubation der Zellen mit bestimmten Antigenen beobachtet. Dabei wurde ein signifikanter IL-17-mRNA-Anstieg nach 14 Tagen *in vivo challenge* und sechs-stündiger *In-vitro*-Stimulierung mit Heustaublösung detektiert (AINSWORTH et al., 2007). Abschließend fanden EL ABBAS und Kollegen (2012) in der bronchoalveolären Lavage exazerbierter bzw. gesunder Pferde erhöhte Mengen des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T, welcher die IL-17-Synthese reguliert. Im Blut derselben Patienten wurden allerdings nur bei gesunden Individuen sowohl für den Transkriptionsfaktor als auch für das Zytokin erhöhte Expressionsraten gefunden.

Die Entwicklung einer Th1- oder Th2-gewichteten Immunantwort im Rahmen der equinen COB wurde weitgehend untersucht, in dem die jeweiligen Leitzytokine bzw. deren Expression in verschiedenen Geweben und Zellen untersucht wurden. Die Arbeitsgruppen von LAVOIE (2001) und CORDEAU (2004) identifizierten ein klassisches Th2-Profil in der BALF exazerbierter COB-Pferde, welches durch eine Steigerung der IL-4- und IL-5-Transkripte und einer Senkung der IFN- $\gamma$ -mRNA charakterisiert war. Im Gegensatz dazu fanden AINSWORTH et al. (2003) bei Pferden in der Exazerbationsphase keine Erhöhung der IL-4-Expression, sondern eher einen deutlichen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Transkription. Dies führte sie zum Schluss, dass die COB ein Th1-abhängiger Prozess ist. KLEIBER und Kollegen (2005) konnten für keinen der beiden Typen Hinweise finden, während weitere Arbeitsgruppen aufgrund der variablen Zytokinprofile vermuten, dass der COB des Pferdes eine gemischte Immunantwort zugrunde liegt (GIGUÈRE et al., 2002; HOROHOV et al., 2005; EL ABBAS et al., 2012). Laut HOROHOV et al. (2005) ist die akute Phase der Erkrankung durch eine Th2-Polarisierung charakterisiert, welche sich mit zunehmender Chronizität des Geschehens in Richtung einer Th1-versierten Immunantwort verschiebt. In einer neuerlich durchgeführten Arbeit konnten EL ABBAS und Kollegen (2012) kein dominierendes Th-Profil identifizieren. Aufgrund des infolge von Staubexposition beobachteten Anstiegs von IL-4 und GATA3 bei COB-Pferden sowie des FOXP3 bei gesunden Kontrollen postulieren die Autoren eine Beteiligung von Th2- und regulatorischen T-Zellen. Des Weiteren zeigten KLIER et al. (2012), dass bei Inhalation von immunmodulatorischen DNA-Abschnitten (CpG-Nanopartikel) durch COB-Patienten das Zytokinmuster zugunsten einer Th1-Antwort verschoben wurde. Dies war mit einer deutlichen Schwächung der klinischen Symptomatik und mit einer Reduzierung der Neutrophilie im tracheobronchialen Sekret verbunden. Schließlich fanden einige Autoren im Serum gesunder und erkrankter Pferde, die einem 30-tägigen *challenge* exponiert wurden, keine Unterschiede im Zytokinmuster (u. a. IL-4 und IFN- $\gamma$ ). Nur die mitbestimmten Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serum-Amyloid-A zeichneten sich in diesem Versuch als geeignete Entzündungsmarker aus (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2012b).

#### 2.2.1.3.3 Aktivierung neutrophiler Granulozyten

Circa drei bis fünf Stunden nach Beginn der Staubexposition erfolgt in den Atemwegen ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten. Dieses Geschehen ist durch Vermeidung des

Antigenkontaktes und Haltungsoptimierung reversibel und wurde unabhängig von der Entwicklung klinischer Symptome auch bei gesunden, nicht-COB-anfälligen Pferden beobachtet (LECLERE et al., 2011). Makrophagen spielen bei der Granulozytenrekrutierung eine wichtige Rolle: Durch die Sezernierung von u. a. Interleukin-1 $\beta$  wird eine Induktion des potenten Chemokins IL-8 bewirkt (FRANCHINI et al., 2000; CHUNG, 2001). Dieses wird nicht nur von den Makrophagen selbst, sondern auch von weiteren BALF-Zellen und Bronchialepithelzellen produziert (AINSWORTH et al., 2006). Neuerlich wurden auch T-Zell-assoziierte Zytokine als anlockende Faktoren vorgeschlagen. Eine erhöhte IL-17-Transkriptionsrate wurde in der BALF exazerbierter Pferde nachgewiesen. Diese war allerdings nur nach vorheriger gesteigerter IL-8-Expression nachweisbar (AINSWORTH et al., 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Th2-assoziierte Interleukin 4 über verschiedene Mechanismen ebenfalls eine Rolle in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten spielt (PIRIE, 2014b). Ob und wie diese Zellen jedoch nach Ansammlung in den Atemwegen erkrankter Tiere aktiv zur Lungenschädigung beitragen, ist noch nicht geklärt. Die erhöhte Transkription proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , IL-17 und IL-8 in der BALF erkrankter Pferde und die bei der Produktion einiger Zytokine nur schwache Mitwirkung pulmonaler mononukleärer Zellen deuten auf eine Beteiligung equiner Granulozyten hin (GIGUÈRE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2007; REYNER et al., 2009).

Tab. 1: Ergebnisse von Studien zur Beteiligung proinflammatorischer Zytokine an der Entstehung der COB beim Pferd.

Jahr	Autoren	Methode	Proben	Pferde (krank/ gesund)	Ergebnisse		
					IL-1 $\beta$	IL-6	IL-17
2002	GIGUÈRE et al.	PCR	BALF	8 (4/4)	↑	n. n.	-
2005	DEBRUE et al.	RT-PCR	BALF	8 (4/4)	-	-	↑
2006a	LAAN et al.	RT-PCR	MP (BALF)	12 (7/5)	↑	↑*	-
2006	AINSWORTH et al.	RT-PCR, IHC	BALF, BE, NG (Blut)	17 (8/9)	-	-	↑
2007	AINSWORTH et al.	RT-PCR	PMZ	15 (8/7)	(↑)*	-	↑*
2007	PIETRA et al.	RT-PCR	BALF	9 (5/4)	↑	↑	-
2008b	RIIHIMÄKI et al.	RT-PCR, IHC	BE	13 (7/6)	-	↔	-
2008a	RIIHIMÄKI et al.	RT-PCR, IHC	BALF, BE	13 (7/6)	-	↔	↔
2008	JOUBERT et al.	PCR	NG (Blut)	13 (9/4)	↔	-	-
2009	REYNER et al.	RT-PCR	PMZ	11 (6/5)	(↑)*	-	(↑)*
2011	JOUBERT et al.	PCR	BALF	12 (6/6)	↔	-	-
2011	SARLI et al.	RT-PCR, WB	BALF	12 (8/4)	↑	-	-
2012a	LAVOIE-LAMOUREUX et al.	PCR, ELISA	Blut	20 (11/9)	↑	-	-
2012	EL ABBAS et al.	PCR	BALF, Blut	7 (4/3)	-	-	(↑)**
2013	PADOAN et al.	RT-PCR	BALF, BE	7 (4/3)	↑	↔	(↑)

RT-PCR = *real time-polymerase chain reaction*, IHC = *Immunohistochemie*, WB = *Western blot*, ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*; BALF = Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit, BE = Bronchialepithel (Biopate), MP = Makrophagen, NG = Neutrophile Granulozyten, PMZ = Pulmonale Mononukleäre Zellen; n. n. = nicht nachgewiesen (unter Detektionsbereich des Assays), - = in der Studie nicht untersucht, ↑ = statistisch signifikanter Anstieg, (↑) = statistisch nicht signifikanter Anstieg, ↔ = kein Unterschied zwischen den Gruppen; \* = Anstieg auch bei gesunden Kontrollpferden, \*\* = in BALF kein direkter Anstieg der IL-17-Expression bei COB in Exazerbation, sondern nur Anstieg der Expression des Transkriptionsfaktors ROR- $\gamma$ T

#### 2.2.1.4 Pathophysiologie und klinische Ausprägung der COB

Der klinische Status der COB kann unter einzelnen Individuen in Abhängigkeit von der Antigenexposition stark variieren bzw. sehr schnell eine starke Ausprägung annehmen. Wichtige Hinweise auf die Erkrankung sind Leistungsinsuffizienz und wiederkehrender Husten bis hin zu abnormer Atemtätigkeit. Starkes Abmagern wurde bei chronisch erkrankten Tieren ebenfalls beobachtet (PIRIE, 2014b). Trotz vermehrter Schleimansammlung in den Atemwegen zeigen COB-Pferde oft nur geringen bis mittelgradigen Nasenausfluss mit vornehmlich serösem bis seromukösem Charakter (FEY, 2006b). Die auskultatorischen Befunde variieren je nach Grad der Atemwegsobstruktion: Physiologische bzw. veränderte Geräusche (expiratorisches Pfeifen oder inspiratorisches Knistern) sind also möglich (PIRIE, 2014b). Bei vorhandenem Lungenemphysem ist ein erweitertes Lungenfeld mittels Perkussion nachweisbar. Bei plötzlicher Verschlechterung des Krankheitszustandes (Exazerbation) oder bei schweren Formen der COB sind Anzeichen einer gemischten Dyspnoe üblich (inspiratorisch geblähte Nüstern, verstärkte bis doppelschlägige abdominale Ausatmung, Afteratmung). Durch die chronische Belastung bestimmter Bauchmuskeln hypertrophieren diese und schließlich entsteht während der Expiration eine sichtbare „Dampfrinne“ (FEY, 2006b). In staubarmer Umgebung zeigen die Pferde, wenn überhaupt, nur eine leichte Symptomatik (Remission). Trotz unauffälligem klinischen Status persistiert die Entzündung in den Atemwegen und ein Krankheitsausbruch kann durch erneute Antigenexposition jederzeit hervorgerufen werden (PIRIE, 2014b). Im Wesentlichen sind die folgenden drei Pathomechanismen für das Krankheitsbild der COB zuständig (FEY, 2006b).

##### 2.2.1.4.1 Bronchospasmus

Infolge chronischer Antigenbelastung erfolgt eine übermäßige oder anhaltende Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur. Diese eigentlich physiologische Abwehrmaßnahme des Körpers ist im Bereich der nicht knorpelgestützten kleinen Atemwege (*Bronchioli*) am meisten ausgeprägt. Wenn eine übermäßige Bereitschaft zur Bronchokonstriktion besteht, wird dies als „Hyperreagibilität“ bezeichnet (FEY, 2006b). Bei COB-Pferden erfolgt diese meist infolge von Kontakt mit spezifischen Antigenen, wobei eine Überreaktion auf unspezifische und ungefährliche Partikel oder Gase auch möglich ist (FEY, 2006b; LECLERE et al., 2011). Die Hyperreagibilität kann mittels aufwendiger Tests nachgewiesen werden, ist aber nicht zwingend mit dem Vorhandensein einer COB verbunden (FEY, 2006b).

##### 2.2.1.4.2 Dys- und Hyperkrinie

Neben dem Einstrom neutrophiler Granulozyten sind in den Atemwegen erkrankter Pferde deutliche Schleimansammlungen zu finden, welche ebenfalls zur Obstruktion der luftleitenden Strukturen beitragen (LECLERE et al., 2011). Das Sekret ist in seiner Zusammensetzung verändert, was auf starke histologische Umbildungen zurückzuführen ist. Darunter zählen der Verlust an zilientragenden Epithelzellen, die Hyper- und Metaplasie

schleimbildender Becherzellen und die starke Abnahme an Clara-Zellen. Durch die hohen Mukusanteile des veränderten Sekrets wird das Flimmerepithel weiterhin mechanisch geschädigt und somit der natürliche Reinigungsprozess der Atemwege gestört (FEY, 2006b; LECLERE et al., 2011).

#### 2.2.1.4.3 Schleimhaut- und Bronchialwandverdickung („*airway remodeling*“)

Weitere entscheidende Faktoren der nicht vollständig reversiblen bis hin zur irreversiblen Atemwegsobstruktion sind die infolge der chronischen Entzündung beobachteten strukturellen Umbauprozesse der Lunge (LECLERE et al., 2011). Ödeme und die bei fortgeschrittener Erkrankungsdauer mikroskopisch sichtbaren lymphozytären bzw. plasmazytären peribronchialen Infiltrate führen zu Schleimhautschwellung und Reduzierung der gasaustauschenden Gesamtläche (LECLERE et al., 2011). Die ständige Bronchokonstriktion führt zu vermehrter Proliferation und Hyperplasie der Muskelzellen, was zur irreversiblen Einengung der Atemwege beiträgt (FEY, 2006b; MORAN und FOLCH, 2011). Durch diese Veränderungen im Atemwegslumen und den abschnittweisen Verschluss der Bronchiolen während der Expirationsphase wird eine übermäßige Blähung der Alveolen (Hyperinflation, „*air trapping*“) bei COB-Patienten häufig beobachtet. Wenn die infolge extremer Luftfüllung überbelasteten elastischen Fasern der Alveolarwand reißen, entsteht ein Lungenemphysem, was allerdings einen deutlich selteneren Befund dieser Erkrankung darstellt (LECLERE et al., 2011). Der für *Remodeling*-Prozesse des Menschen entscheidende Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  konnte in der BALF von COB-Pferden mittels ELISA nicht nachgewiesen werden (DESJARDINS et al., 2004).

#### **2.2.1.5 Therapie der COB**

Da eine Heilung der Erkrankung aufgrund der persistierenden Hyperreagibilität der Atemwege nicht möglich ist, stellt eine konsequente Haltungsoptimierung im Sinne von reduzierter Staubexposition den Grundstein für eine anhaltende Besserung bzw. Stabilisierung der klinischen Symptomatik bei COB-Patienten dar (LÉGUILLETTE, 2003; FEY, 2006b). Ein hygienischer und gut ventilierter Stall oder eine Offenstallhaltung, die Nutzung von möglichst staubarer Einstreu (z. B. Späne) und die Fütterung von nassem Heu oder Grassilage tragen bereits zu einer deutlichen Besserung des klinischen Status bei. Weiterhin kann eine an das individuelle Leistungsvermögen und an den Krankheitsstatus des Pferdes angepasste Belastung hilfreich sein (FEY, 2006b).

Bei schwerwiegender klinischer Beeinträchtigung oder in Situationen, in denen ein optimiertes Management schwer fällt (z. B. Pferde im Hochleistungssport) ist eine begleitende medikamentöse Therapie empfohlen (ROBINSON, 2001). Diese richtet sich gegen die wichtigsten Pathomechanismen der COB und besteht somit aus der Kombination bronchospasmolytischer, sekretolytischer und entzündungshemmender Pharmaka (FEY, 2006b). Erstere beinhalten die drei Klassen der Anticholinergika (z. B. Atropin),  $\beta_2$ -Adrenergika (z. B. Clenbuterol) und die in der Pferdemedizin weniger wichtigen Methylxanthine. Bronchospasmolytika führen nach ihrer Gabe zu einer schnellen Entspannung der glatten Muskulatur und wirken somit der Atemnot entgegen (ROBINSON,

2001). Eine sofortige Vermeidung staubreicher Atemluft und die Verabreichung von Atropin oder des synthetischen Derivats Butylscopolamin sind also bei akut auftretender Dyspnoe (hochgradige Exazerbation) indiziert. Da diese Substanzen allerdings auf systemischer Weise agieren und einige Nebenwirkungen mit sich bringen können, ist eine eingeschränkte Nutzung dieser Medikamente angebracht (FEY, 2006b). Die orale Therapie mit dem  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Clenbuterol (0,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KGW alle 12 Stunden) ist in der Pferdemedizin weit verbreitet. Neben der bronchodilatierenden Wirkung zeigte Clenbuterol *in vitro* und *ex vivo* auch entzündungshemmendes Potential, und die bei langfristiger Gabe auftretende Toleranzentwicklung kann durch eine Kombination mit Glukokortikoiden vermieden werden (ABRAHAM et al., 2002). Infolge erhöhter Clenbuterol-Dosierungen wurden Tachykardie, Schwitzen und Nervosität beobachtet (FEY, 2006b; PIRIE, 2014b). Zur Verflüssigung des klebrigen Schleims können begleitend Sekretolytika bzw. Mukolytika wie Dembrexin (0,2 mg/kg KGW) und Acetylcystein (10 mg/kg KGW) jeweils zwei Mal täglich oral verabreicht sowie Inhalationen mit salinen Lösungen durchgeführt werden (FEY, 2006b; NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Die sogenannte „Hyperinfusionstherapie“ stellt eine weitere Möglichkeit der Sekretaauflösung dar. Die über drei aufeinanderfolgende Tage verabreichten hohen Mengen an 0,9 %-iger Kochsalzlösung (Instillation über eine Nasenschlundsonde oder intravenöse Infusion) führen zu einer Hypervolämie und Hypertonie der Lungengefäße. Durch die Senkung des osmotischen Drucks tritt schließlich Flüssigkeit in die Alveolen über, welche nach kranial abtransportiert wird und somit zur Verflüssigung des Schleims beiträgt. Diese Prozedur sollte nur unter engmaschiger tierärztlicher Überwachung erfolgen und ist beim Vorhandensein verlegter Tracheallumina und bei bekannter Herz- und/oder Niereninsuffizienz kontraindiziert (FEY, 2006b). Einige Autoren halten die Hyperinfusion allerdings für obsolet und konnten dabei keine vorteilhaften Effekte beobachten (PIRIE, 2014b).

Im Vergleich zu den bis jetzt genannten Medikamenten, welche lediglich zu einer Linderung der klinischen Symptomatik führen, kann mittels Entzündungshemmer die grundlegende Inflammation der Atemwege unterbrochen werden (ROBINSON, 2001). Mittel der Wahl sind dabei Glukokortikoide, wobei sich eine ausschleichende orale Gabe von Prednisolon (0,5-1 mg/kg KGW einmal täglich) als effektiv erwiesen hat (FEY, 2006b). Das mögliche Auftreten bekannter Kortikosteroid-Nebenwirkungen wie zum Beispiel die Entwicklung einer Hufrehe oder einer bakteriellen Infektion sollten bei der individuellen Therapieanpassung beachtet werden (LÉGUILLETTE, 2003).

Zusätzlich zur systemischen Verabreichung verschiedener Medikamente besteht auch beim Pferd die Möglichkeit einer inhalativen Therapie. Durch die niedrigeren Gesamtdosierungen wird das Auftreten von Kollateraleffekten reduziert und gleichzeitig werden auf lokaler Ebene gute Wirkstoffkonzentrationen erreicht (DUVIVIER et al., 1999). Die einfache Handhabung, die zunehmende Preiswertigkeit und die gute Toleranz der Prozedur seitens der Pferde stellen weitere positive Aspekte dieser Methode dar (NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009).

Als Aerosol wird das Gemisch aus flüssigen bzw. festen Teilchen definiert, welches in einem Gas dispergiert ist und mit diesem eingeatmet wird. Diese Partikel sollten zwischen 1 und 5  $\mu\text{m}$  groß sein, da nur in dieser Form bei genügendem Inspirationsfluss eine Sedimentation in den tiefen Atemwegen möglich ist. Größere Partikel werden vorher abgefangen und

abgeschluckt, während kleinere Aerosole mittels Ausatmung ausgeschieden werden (DUVIVIER et al., 1999; NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Auf dem Markt findet sich bereits eine große Auswahl an für das Pferd entwickelten Inhalationsgeräten. Besonders praktisch sind dabei Atemmasken mit Vorsatzkammer oder Inhalationshilfen, welche eine Anwendung von Dosieraerosolen ermöglichen. Bronchodilatoren wie Salbutamol und lipophile Kortikosteroide (Beclomethason, Budesonid und Fluticason) können per Inhalation bei akuter Atemnot verabreicht werden und auch als Langzeittherapie dienen (NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Eine Kombination beider Wirkstoffklassen ist dabei empfehlenswert, da durch die Bronchodilatation eine bessere Verteilung der Glukokortikoide erreicht wird (ROBINSON, 2001; NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Allerdings sind in Deutschland momentan keine Tierarzneimittel für diesen Zweck zugelassen, so dass eine Umwidmung humanmedizinischer Präparate nach Vorschriften des Arzneimittelgesetzes nötig ist (NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Weitere Details zur Glukokortikoid-Therapie sowie deren Auswirkung auf immunologische Vorgänge bei equinen und humanen Atemwegserkrankungen sind in Abschnitt 2.4 aufgeführt.

#### **2.2.1.6 COB-ähnliche Erkrankungen des Menschen: Asthma bronchiale und COPD**

Asthma und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) stellen bei Menschen in vielen Ländern aufgrund der hohen Prävalenz- und Mortalitätsraten ein schwerwiegendes gesundheitliches Problem dar (RINCON und IRVIN, 2012). Die chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes teilt vor allem mit dem humanen Asthma viele Gemeinsamkeiten, sodass diese Tierart als Studienmodell besonders geeignet ist (LECLERE et al., 2011; BULLONE und LAVOIE, 2015) (Abbildung 2). Beide Erkrankungen sind durch chronische Atemwegsentzündung und -obstruktion gekennzeichnet und basieren auf genetischen und umweltassoziierten Faktoren. Exazerbationen im Sinne von akuten Verschlechterungen des Krankheitsbildes sind auch bei Asthma und COPD möglich, allerdings treten sie hier meist infolge von Sekundärinfektionen auf, was einen wesentlichen Unterschied zur equinen COB darstellt (ROBINSON, 2001).

Das Asthma bronchiale kann als allergische Form bereits während der Kindheit beginnen oder erst im adulten Alter infolge respiratorischer Infektionen auftreten. Potentielle Allergene sind bestimmte Pollen, Katzenschuppen, Hausmilben und Pilze. Die typische Symptomatik beinhaltet akute Kurzatmigkeit, Husten, pfeifende Atemgeräusche und Engegefühl im Brustkorb (RINCON und IRVIN, 2012; ABRAMSON et al., 2014). Die Entzündungsreaktion der luftleitenden Wege ist durch die Beteiligung eosinophiler Granulozyten, CD4-Lymphozyten und Immunglobulinen des Subtyps E und G gekennzeichnet. Eine Th2-Polarisierung der Immunantwort wurde durch den Nachweis jeweiliger Mediatoren (IL-4, IL-5, IL-13) postuliert (CHUNG, 2001; RINCON und IRVIN, 2012). Neuerlich wird das Vorhandensein verschiedener Asthma-Phänotypen mit unterschiedlicher Ausprägung vermutet. In den meisten Fällen sind diese reversibel und sprechen gut auf eine Therapie mit Kortikosteroiden an. Allerdings sind auch schwerere Formen mit persistierender Obstruktion, Neutrophilie und der Beteiligung steroidresistenter Chemokine (z. B. IL-17) bekannt (ABRAMSON et al., 2014; MARTIN, 2014).



Die COPD des Menschen ist eine chronische Atemwegserkrankung mit progressivem Charakter, welche nur minimale Reversibilität zeigt. Sie tritt vor allem bei älteren Menschen infolge von Inhalation von Zigarettenrauch und anderer Noxen auf. Klinisch wird eine mit der Zeit fortschreitende Dyspnoe beobachtet, welche von Husten und Keuchen begleitet wird. Die COPD tritt in verschiedenen Formen auf und kann durch Parenchymschädigungen und Lungenemphysembildung sowie vermehrter Schleimproduktion gekennzeichnet sein (ABRAMSON et al., 2014). Auf zellulärer Ebene dominieren bei COPD neutrophile Granulozyten und CD8-Lymphozyten, wobei auch Makrophagen und Mastzellen eine wichtige Rolle spielen. Das Zytokinprofil ist ebenfalls anders als bei Asthma, da in diesem Falle die Interleukine 1 $\beta$  und 8 sowie der Wachstumsfaktor TNF- $\alpha$  überwiegen (CHUNG, 2001). Während sich die inhalative Verabreichung von Anticholinergika bei COPD als sehr hilfreich erwiesen hat, sind langfristige Kortikosteroidbehandlungen deutlich weniger effektiv als bei Asthma (BARNES, 2000; ABRAMSON et al., 2014).

Aufgrund der variablen Ausprägungen der zwei Erkrankungen ist eine Unterscheidung zwischen Asthma und COPD vor allem im fortgeschrittenen Alter schwierig. Bei etwa 10 % der menschlichen Population werden des Weiteren Mischformen beobachtet, welche allgemein als „keuchende Bronchitis“ („*wheezy bronchitis*“) bezeichnet werden (Abbildung 2).

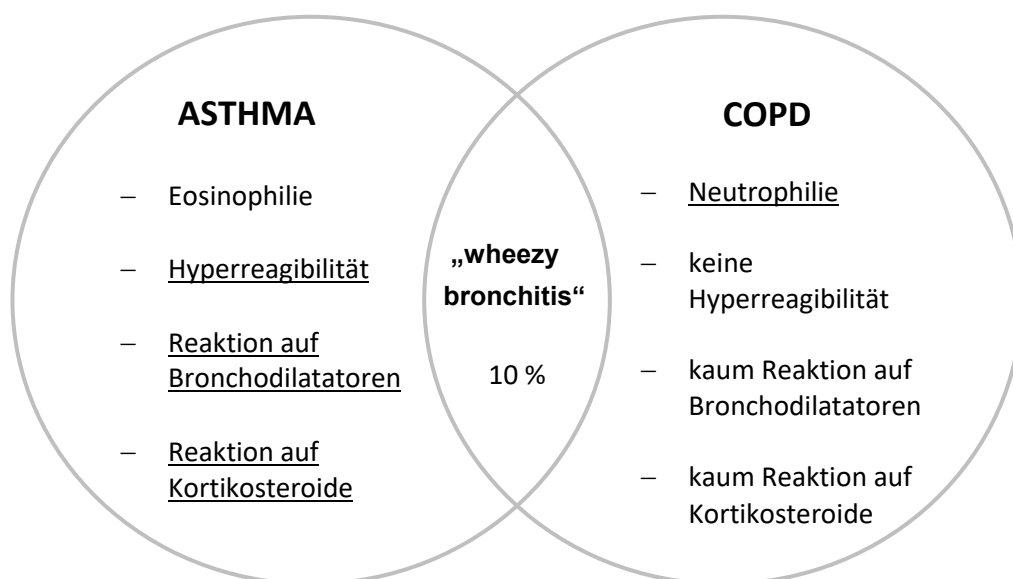


Abb. 2: Merkmale von Asthma und COPD, modifiziert nach BARNES (2000). Circa 10 % der betroffenen Patienten zeigen Charakteristika beider Erkrankungen („*wheezy bronchitis*“). Merkmale, die auch bei der COB des Pferdes auftreten, sind unterstrichen.

## 2.2.2 Inflammatory Airway Disease (IAD) des Pferdes

Bis heute ist noch nicht geklärt, ob die IAD ein eigenständiges Krankheitsbild oder eine Vorstufe der RAO des Pferdes darstellt (LECLERE und LAVOIE, 2014).

Durch eine im Jahre 2007 veröffentlichte Konsenserklärung des amerikanischen Colleges für innere Pferdemedizin (ACVIM *Consensus Statement*) ist die IAD-Erkrankung des Pferdes eine durch Husten und Leistungsminderung charakterisierte, in der BALF nachweisbare, nicht-septische Entzündung der tiefen Atemwege (COUËTIL et al., 2007). Diese kann bei Pferden jeglichen Alters auftreten, wobei hohe Prävalenzen bei jungen Rennpferden im Training (bis zu 50 %) beobachtet wurden (HUGHES et al., 2011). Der IAD-Verlauf ist meist transient, allerdings sind chronische Formen, welche in eine RAO übergehen können, ebenfalls möglich (LECLERE und LAVOIE, 2014).

Patienten mit IAD zeigen ein äußerst variables klinisches Bild und können die oben genannten Befunde, aber auch Sekretansammlungen in der Trachea, Atemgeräusche bei Auskultation, einen gestörten Gasaustausch und eine schwache bis mittelgradige Atemwegsobstruktion zeigen. Bei der zytologischen Untersuchung der BALF sind milde Neutrophilie, Lymphozytose und Monozytose typisch. Vor allem bei jungen IAD-Pferden sind des Weiteren erhöhte Anzahlen an Mastzellen (> 2 %) und eosinophile Granulozyten (> 0,1 %) kein seltener Befund (COUËTIL et al., 2007). Anhand der im zytologischen Gesamtbild dominierenden Zellart wird von neutrophiler, eosinophiler bzw. metachromatischer oder gemischter IAD-Form gesprochen (PIRIE, 2014a). Die Abgrenzung zur RAO in Exazerbation erfolgt hauptsächlich über die bei der IAD fehlende Ruhedyspnoe und die mangelnde Reaktion auf einen Provokationstest mit schimmeligem Heu. Weitere hilfreiche Unterscheidungsmerkmale stellen teilweise das Alter des betroffenen Tieres, die Krankheitsgeschichte und die zytologische Untersuchung der BALF dar. Dennoch ist eine Differenzierung zwischen IAD und RAO in Remission oft unmöglich (COUËTIL et al., 2007; LECLERE und LAVOIE, 2014).

Ätiologie und immunologische Pathomechanismen der IAD sind noch weitgehend unerforscht. Eine Assoziation zwischen IAD und Haltungsform im Sinne von vermehrter Exposition gegenüber Stallstäuben ist wahrscheinlich. Allerdings sind genauere Untersuchungen, unter Berücksichtigung der Rolle spezifischer Staubkomponenten und der individuellen, genetischen Prädisposition der betroffenen Pferdepopulationen dringend nötig (PIRIE, 2014a). Des Weiteren werden Infektionen der Atemwege als mögliche prädisponierende Faktoren für diese Erkrankung vermutet. Bei jungen Rennpferden wurde beispielsweise eine Assoziation zwischen IAD und dem positiven mikrobiologischen Nachweis bakterieller Keime im Tracheobronchialsekret nachgewiesen (WOOD et al., 2005). Studien zur Immunpathogenese der IAD wurden neuerlich von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. HUGHES und Kollegen (2011) fanden in der BALF von IAD-Pferden hohe mRNA-Mengen proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-23 und TNF- $\alpha$ ). Eine Polarisierung der Immunantwort konnte in derselben Studie allerdings nicht nachgewiesen werden. Weitere Studien demonstrierten, dass die Expression bestimmter Mediatoren in der BALF mit dem jeweiligen zytologischen Bild zusammenhängt. Demzufolge vermuten die Autoren, dass ähnlich wie bei humanem Asthma unterschiedliche Immunmechanismen für

die verschiedenen IAD-Phänotypen zuständig sind. Diesbezüglich zeigten LAVOIE et al. (2011), dass bei IAD-Patienten eine erhöhte Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  mit der Anzahl metachromatischer Zellen (Mastzellen und Basophile) korreliert, während die Menge an IL-1 $\beta$ -mRNA proportional zur BALF-Neutrophilie ist. BEEKMAN und Kollegen (2012) berichten ebenfalls von einer erhöhten Transkription verschiedener Interleukine (1 $\beta$ , 5, 6, 8 10) innerhalb der IAD-Gruppe. Des Weiteren fanden sie, dass Patienten mit hohen Anzahlen an neutrophilen Granulozyten ebenfalls erhöhte Mengen an IL-5-, IL-8- und IL-17-Transkripten in der BALF präsentieren. Bei direkten Zytokinbestimmungen (ELISA) aus der BALF erkrankter Pferde beobachteten einige Autoren bei IAD-Pferden erhöhte Konzentrationen an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (RICHARD et al., 2014) sowie IL-8 (BARTON et al., 2014a). Abschließend untersuchten LECLERE und Kollegen (2015) mittels kommerzieller ELISA-Kits die systemische Ausprägung von Akute-Phase-Proteinen in Serumproben amerikanischer Traber. Dabei war keiner der bestimmten Parameter (Haptoglobin, CRP und SAA) für eine Differenzierung zwischen IAD-Patienten und gesunden Kontrollen geeignet.

Ähnlich wie bei der equinen RAO stützt sich die IAD-Therapie auf eine konsequente Haltungsoptimierung und die medikamentöse Behebung von Entzündung und Obstruktion der Atemwege. Allerdings wurden bis heute keine Studien zum Einsatz von Bronchospasmolytika bei IAD durchgeführt und die Resultate einer inhalativen Glukokortikoid-Therapie widersprechen sich zum Teil (COUËTIL, 2014). Durch die Verabreichung von Mastzellstabilisatoren (z. B. Cromoglycinsäure) oder schwach dosiertem IFN- $\alpha$  wurden bei IAD-Patienten positive Effekte erzielt. Abschließend führte sowohl bei IAD als auch bei RAO eine zweimonatige Futterergänzung mit Omega-3-Fettsäuren unter staubarmen Bedingungen zu einer allgemeinen Besserung des Krankheitszustandes (COUËTIL, 2014).

### **2.2.3 Interstitielle Pneumopathien des Pferdes**

Der Terminus „interstitielle Pneumonie“ umfasst beim Pferd verschiedene Krankheitsbilder, welche in akuter sowie chronischer progressiver Form auftreten können (DONALDSON et al., 1998; WILKINS und LASCOLA, 2015). Im Vorbericht zeigen die Pferde oft Gewichtsverlust und Leistungsminderung (DIECKMANN et al., 1990; WILKINS und LASCOLA, 2015). Des Weiteren werden je nach Schweregrad der Erkrankung COB-ähnliche Symptome wie Husten, Nasenausfluss und erschwerte Atmung (geblähte Nüstern, „Dampfrinne“) beobachtet. Fieber kann ebenfalls vorkommen (TURK et al., 1981; DONALDSON et al., 1998; WILKINS und LASCOLA, 2015). Das Blutbild ist oft durch Leukozytose und Hyperfibrinogenämie gekennzeichnet. Mittels bildgebender Verfahren können die typischen interstitiellen Zeichnungen und die zum Teil vorkommenden, nodulären Veränderungen der Lunge sichtbar gemacht werden. Zytologische Untersuchungen von TBS und BALF zeigen meistens erhöhte Anzahlen an Makrophagen, wobei neutrophile Granulozyten auch vermehrt vorkommen können. Eine sichere Diagnose kann nur durch die Beurteilung eines Lungenbiopsats gestellt werden (WILKINS und LASCOLA, 2015). Ätiologisch kommen verschiedene Noxen für die Entstehung interstitieller Lungenerkrankungen in Frage. Beim Pferd stellen vorausgegangene Infektionen (viral sowie

bakteriell) (TURK et al., 1981; DONALDSON et al., 1998; NOUT et al., 2002), die Aufnahme pflanzlicher Toxine (*Perilla*-Keton) (VENNER, 2003; SCHMIDBAUER et al., 2004) oder die Inhalation organischer Antigene (Stäube, Pilze) (WILKINS und LASCOLA, 2015) mögliche Ursachen dar. In der akuten Phase der Erkrankung wird histologisch zunächst die Schädigung von Alveolarzellen und Lungenparenchym beobachtet. Diese ist außerdem durch Ödembildung, Ansammlung von serofibrinösem Sekret in den Alveolarlumina und Zellinfiltration („exsudative Phase“) charakterisiert. Darauf folgt ein sogenanntes „proliferatives Stadium“, in dem durch Reepithelisierung die geschädigten Strukturen ersetzt werden. In chronischen Fällen führen diese Umbauprozesse zu einer interstitiellen Lungenfibrose, welche mit einer irreversiblen Beeinträchtigung der Lungenfunktion verbunden ist (SCHMIDBAUER et al., 2004; WILKINS und LASCOLA, 2015).

Bei jungen Pferden und Fohlen werden auch plötzlich auftretende und schwer verlaufende Formen beobachtet (LAKRITZ et al., 1993). Diese wurden zunächst als „proliferative interstitielle Lungenerkrankungen“ bzw. „akute interstitielle Bronchopneumonien“ definiert. Heute werden diese Manifestationen mit den beim Menschen vorkommenden akuten progressiven Lungenversagen (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) bzw. akuten Lungenschädigungen (ALI, *acute lung injury*) gleichgestellt (WILKINS und LASCOLA, 2015). Therapeutisch hat sich der Einsatz parenteral verabreichter Kortikosteroide und eine unterstützende antibiotische Therapie im Falle von Sekundärinfektionen bewährt (DONALDSON et al., 1998; NOUT et al., 2002; WILKINS und LASCOLA, 2015).

#### **2.2.4 Interstitielle Pneumopathien des Menschen**

Interstitielle Lungenerkrankungen (ILE) kommen beim Menschen relativ selten und in verschiedenen Ausprägungen vor. Nach der Konsensusklassifikation der *European Respiratory Society* (ERS) und der *American Thoracic Society* (ATS) im Jahre 2002 werden die interstitiellen Lungenerkrankungen in vier Gruppen unterteilt: „ILE bekannter Genese“, „idiopathische interstitielle Pneumonien“ (u. a. idiopathische pulmonale Fibrose), „Granulomatöse ILE“ (u. a. Sarkoidose) und „andere Formen der ILE“ (FINK, 2014). Zur sicheren Diagnose wird wie beim Pferd die Entnahme einer Gewebeprobe empfohlen. Die häufigste ILE ist die Sarkoidose, während die idiopathische pulmonale Fibrose die zweithäufigste interstitielle Lungenerkrankung des Menschen darstellt. Diese betrifft überwiegend ältere Erwachsene und ist wegen dem chronisch progressiven Verlauf mit einer schlechten Prognose assoziiert (FINK, 2014). Außerdem können bei dieser Krankheit plötzliche Verschlechterungen (akute Exazerbationen) unbekannter Genese auftreten, welche nur schwer kontrollierbar sind und meist zum Tode der Patienten führen (NAGATA et al., 2013). Eine weitere Form der idiopathischen interstitiellen Pneumonie ist die akute interstitielle Pneumonie (FINK, 2014). Diese ist nur schwer vom akuten Lungenversagen (ARDS) unterscheidbar, welches infolge direkter (z. B. Pneumonie) oder indirekter (z. B. Sepsis, Trauma) Insulte auftreten kann. In beiden Fällen zeigt das histologische Muster diffuse Alveolarschäden, Ödembildung und die Entstehung hyaliner Membranen. Bei fortschreitendem Krankheitszustand wird des Weiteren eine progressive interstitielle Lungenfibrose beobachtet (FINK, 2014; MODRYKAMIEN und GUPTA, 2015).

### 2.2.5 (Sub)-Akute Pneumonien des Pferdes

Pneumonien sind exsudative oder proliferative Entzündungen, welche die Alveolen sowie das Lungeninterstitium betreffen können. Sie entstehen durch übermäßige Keimbelastung, wobei vorausgegangene virale Infekte und eine herabgesetzte Immunabwehr (Stress durch lange Transporte, exzessives Training) prädisponierende Faktoren darstellen (FEY, 2006a).  $\beta$ -Hämolytische Streptokokken (v. a. *S. equi subspecies zooepidemicus*) sind die bei der Bronchopneumonie des adulten Pferdes am häufigsten isolierten Keime. Allerdings können auch weitere grampositive (u. a. *Staphylococcus*), gramnegative (u. a. *Pasteurella*, *E. Coli*) und anaerobe (u. a. *Fusobacterium*) Keime beteiligt sein (REUSS und GIGUÈRE, 2015). Bei Fohlen unter sechs Monaten führt *Rhodococcus equi* zu abszedierenden lebensbedrohlichen Pneumonien (FEY, 2006a). Des Weiteren können virale (equines Influenza- und Herpesvirus) (GILKERSON et al., 2015) sowie in sehr seltenen Fällen auch mykotische Infekte und Parasiten (FEY, 2006a) ebenfalls Entzündungen im Respirationstrakt verursachen. Das klinische Bild hängt von dem Ausmaß der Erkrankung und der betroffenen Lungenbereiche ab: Akute Bronchitiden sind oft schwer zu erkennen, während bei fortschreitender Bronchopneumonie Abgeschlagenheit, Fieber, beidseitiger mukopurulenter Nasenausfluss, Husten und Dyspnoe auftreten können. Röntgenologisch können betroffene Patienten eine milde bronchointerstitielle Zeichnung bis hin zu schwereren Befunden wie Lungenabszesse zeigen (FEY, 2006a; REUSS und GIGUÈRE, 2015). Im tracheobronchialen Sekret wird eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten beobachtet. Außerdem sollte aus diesen Proben ein mikrobiologischer Keimnachweis erfolgen, sodass die antibiotische Behandlung angepasst werden kann. Im Falle septischer Pneumonien ist BAL-Flüssigkeit aufgrund der hohen Kontaminierungsgefahr und der lokalisierten Probenahme für diagnostische Zwecke eher weniger geeignet (REUSS und GIGUÈRE, 2015).

### 2.2.6 (Sub)-Akute Pneumonien des Menschen

In der Humanmedizin werden Pneumonien anhand der folgenden Triade eingeteilt: Ambulant erworbene Pneumonien (CAP, *community acquired pneumonias*), nosokomiale Pneumonien (HAP, *hospital acquired pneumonias*) und Pneumonien unter Immunsuppression (PLETZ et al., 2012). Erstere betreffen vornehmlich ältere Menschen und werden in erster Linie durch Pneumokokken verursacht. Sogenannte „atypische Erreger“ (Mykoplasmen, Legionellen und Chlamydien) und respiratorische Viren können ebenfalls beteiligt sein. In äußerst seltenen Fällen werden auch Enterobakterien und Pseudomonaden bei CAP-Patienten mit Risikofaktoren nachgewiesen (PLETZ et al., 2012). Nosokomiale Pneumonien treten etwa 48 Stunden nach Aufnahme im Krankenhaus auf und sind meistens beatmungsassoziiert (VAP, *ventilator associated pneumonias*). Ätiologisch kommen überwiegend Bakterien in Frage, während Viren und Pilze eher selten beteiligt sind. Die Diagnose der HAP ist schwierig und oft aufwendig, allerdings sollte deswegen die Einleitung einer antimikrobiellen Therapie nicht verzögert werden. Die eventuelle Beteiligung multi-resistenter Keime sollte außerdem immer berücksichtigt werden (PLETZ et al., 2012). Abschließend stellen angeborene und

erworbene Immundefekte (z. B. HIV-Infektion) ebenfalls prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer Lungenentzündung dar (PLETZ et al., 2012).

## 2.3 Procalcitonin

### 2.3.1 Aufbau und Biochemie von PCT

Im Jahre 1975 entdeckten MOYA et al. erstmals intrazelluläre Vorstufen des Hormons Calcitonin. Die genaue Struktur des Procalcitonins (PCT) ist allerdings erst seit den Achtzigerjahren bekannt (JACOBS et al., 1981; LE MOULLEC et al., 1984). Somit wissen wir heute, dass das humane PCT (hPCT) aus 116 Aminosäuren besteht und ein Gewicht von circa 13 kDa hat. Es setzt sich aus drei Abschnitten zusammen: der zentrale Kernbereich, (welcher identisch ist mit dem Endprodukt Calcitonin), ein N-Terminus und ein C-terminales Fragment (Katacalcin). Durch das CALC-I Gen auf Chromosom 11 des Menschen entsteht die erste Stufe des Proteins, das Preprocalcitonin, welches ein hydrophobes Signalpeptid besitzt. Dieses wird im endoplasmatischen Retikulum abgespalten und somit wird das Preprocalcitonin in Procalcitonin überführt. Durch weiteren proteolytischen Abbau des Procalcitonins (Entfernung von N- und C-Region) entsteht schließlich das reife Hormon Calcitonin (MARUNA et al., 2000).

Das Procalcitonin kommt nicht nur als vollständiges Protein (116 AS) vor. Das Vorhandensein verschiedener Bruchteile in Blutplasma ist ebenfalls bekannt. Zum einen zeigten WEGLÖHNER et al. (2001), dass bei Patienten mit Sepsis auch eine kürzere PCT-Form vorkommt, welche durch Spaltung der ersten zwei Aminosäuren der N-terminalen Region entsteht (114 AS). Später wurde entdeckt, dass das ursprüngliche Procalcitonin (116 AS) nach der Entstehung relativ schnell abgebaut wird und sich das Gleichgewicht mit längerem Bestehen des endotoxämischen Zustandes zu Gunsten der kürzeren PCT-Form (114 AS) verschiebt (STRUCK et al., 2009). Weitere Bruchstücke, die in humanem Blutplasma identifiziert wurden, sind die jeweiligen N- (Amino-PCT) und C- (CCP-1 bzw. Katacalcin) Bestandteile des Procalcitonins sowie ein Konjugat aus Calcitonin und Katacalcin (CT:CCP-1) (SNIDER et al., 1997).

Zuletzt ist zu erwähnen, dass zwei PCT-Typen bekannt sind (I und II), welche sich nur in der Sequenz des C-terminalen Fragments unterscheiden. Diese, wie auch das Neuropeptid *calcitonin gene related peptide* (CGRP-I), entstehen mittels differentiellem *Splicing* aus dem bereits oben genannten CALC-I-Gen. Der bereits beschriebene Syntheseprozess des Procalcitonins erfolgt unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in C-Zellen der Schilddrüse sowie in kleinerem Ausmaß auch in neuroendokrinen Zellen anderer Organsysteme. Somit zirkulieren PCT und seine Bruchteile im Blut gesunder Individuen nur in geringen Konzentrationen. Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten allerdings, dass im Falle einer Sepsis oder anderer krankhafter Prozesse, Procalcitonin auch in anderen Geweben gebildet wird, so dass erhöhte Werte im Blut betroffener Patienten nachweisbar sind (BECKER et al., 2010; MEISNER, 2010).

### 2.3.2 Induktion der PCT-Synthese in verschiedenen Geweben und Zellen

Die Entdeckung, dass erhöhte PCT-Konzentrationen im Kontext systemischer Entzündungen auch im Plasma thyroidektomierter Patienten vorkommen, führte zum Schluss, dass die Schilddrüse nicht die einzige Quelle für PCT im Organismus darstellt (ASSICOT et al., 1993; NISHIKURA, 1999). Somit wurden verschiedene Studien durchgeführt, um das Vorhandensein von Calcitonin und seiner Vorstufen in verschiedenen Geweben zu untersuchen. MÜLLER et al. (2001) fanden diesbezüglich die größten Mengen an Calcitonin-mRNA in immunologischen Geweben (u. a. Milz) sowie in Gehirn, Fett- und Hodengewebe von mit *Escherichia coli* infizierten Hamstern. Durch *In-situ*-Hybridisierung konnten sie außerdem beweisen, dass die Transkription in diesen Geweben nicht an eine bestimmte Zellart gebunden ist, sondern diffus stattfindet. RUSSWURM et al. (2001) fanden in verschiedenen Organen gesunder Menschen auch Hinweise für die Aktivität des CALC-I-Gens, wobei die höchsten Werte in Leber, Lunge, Hoden, Prostata, Nieren und Dünndarm gefunden wurden. Die Arbeitsgruppe von MORGENTHALER et al. (2003) untersuchte das Vorhandensein von Procalcitonin in Blut und Geweben von mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella typhimurium* infizierten Pavianen. Auch hier wurden erhöhte Werte für PCT sowohl in Blut als auch in verschiedenen Organen (u. a. Leber, Nieren, Fett) erkrankter Tiere nachgewiesen. Die wesentliche Rolle der Leber als PCT-Quelle wurde durch eine Studie von MEISNER und Kollegen (2003) bestätigt. Nach vollständiger Leber-Resektion an einem Pavian, konnte im Plasma des Versuchstieres, selbst nach LPS-Injektion kein Procalcitonin nachgewiesen werden. Schließlich verglichen GIUNTI et al. (2010) das Vorhandensein von PCT-mRNA in verschiedenen Geweben gesunder und erkrankter Hunde. Für beide Gruppen wurde eine erhöhte transkriptionelle Aktivität innerhalb der Schilddrüse gefunden. Zusätzlich zeigten nur die Individuen aus dem zweitgenannten Kollektiv, welche an unterschiedlichen Erkrankungen litten (Parvovirose, Leptospirose, Sepsis, Neoplasie), erhöhte PCT-mRNA-Werte in Leber, Milz und Lunge.

Die Produktion von Procalcitonin durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) wurde ebenfalls in verschiedenen Studien untersucht. Da diese Zellen durch die Sezernierung zahlreicher Mediatoren wichtige Regulatoren der Immunantwort darstellen, wurde vermutet, dass sie auch eine Quelle für Procalcitonin im Laufe entzündlicher Prozesse sein könnten. Diesbezüglich ergaben sich allerdings divergierende Meinungen: Während einige Arbeitsgruppen das Vorhandensein von PCT in PBMCs sowohl auf transkriptioneller als auch auf Protein-Ebene bestätigen konnten (OBERHOFFER et al., 1999; RUSSWURM et al., 2001; BALOG et al., 2002), war in einem Versuch an einem Vollblutmodell von MONNERET et al. (1999) nach LPS-Stimulierung kein PCT nachweisbar. Durch eine Studie von LINSCHIED et al. (2004) wurde letztlich gezeigt, dass ausschließlich adhärente mononukleäre Zellen (v. a. adhärente Monozyten) eine bedeutsame Menge an PCT sezernieren, allerdings nur für eine kurze Dauer (ca. drei bis fünf Stunden). Des Weiteren wurde in dieser Studie demonstriert, dass aktivierte Makrophagen in der Lage sind, die Expression des CALC-I-Gens in benachbarten Parenchymzellen (in diesem Fall Adipozyten) zu induzieren. Diese strenge Regelung der PCT-Induktion über Zell-Zell-Kontakte könnte die hohe Spezifität des Markers erklären und

klarstellen, warum dessen Konzentration im Blut nur in Verbindung mit systemischen entzündlichen Prozessen signifikant ansteigt (MEISNER, 2010).

### 2.3.3 Modulation der PCT-Induktion

Wie genau die Synthese von Procalcitonin im Rahmen entzündlicher Prozesse induziert wird ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Zum einen besteht die Vermutung, dass Bakterien die Freisetzung von PCT direkt stimulieren können. Sowohl *in vitro* (OBERHOFFER et al., 1999) als auch *in vivo* (DANDONA et al., 1994) wurde eine Steigerung der PCT-Synthese nach Applizierung bakterieller Endotoxine demonstriert. Da nicht nur gramnegative, sondern auch grampositive Keime in der Lage sind, die PCT-Produktion anzuregen, liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur Toxine, sondern auch weitere bakterielle Bestandteile (z. B. DNA, Fimbrien und Peptidoglykane) in diesem Prozess involviert sind (MATWIYOFF et al., 2012). Das Vorhandensein infektiöser Keime scheint tatsächlich eine Grundbedingung für die Sezernierung erhöhter Mengen an PCT im Körper zu sein. Einige Autoren beobachteten bei verschiedenen Krankheitsbildern, dass Procalcitonin nur im Rahmen septischer Geschehen (z. B. septische Verbrennungen), im Gegensatz zu den nicht-infektiösen Pendanten (z. B. nicht septische Verbrennungen), erhöht ist (BARATI et al., 2008; MATWIYOFF et al., 2012).

Eine weitere Hypothese zur PCT-Induktion stützt sich auf der Beteiligung bestimmter Mediatoren, welche die Bildung des Sepsis-Markers anregen können. Diesbezüglich zeigten einige Studien, dass ein Triggern der PCT-Synthese durch proinflammatorische Zytokine möglich ist. Während OBERHOFFER et al. (1999) von einer Steigerung der PCT-Expression in PMBCs nach Stimulierung mit IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in einem *In-vitro*-Versuch berichteten, erhielten WHANG und Kollegen (2000) eine ähnliche Erhöhung der PCT-Konzentration in Blutproben von mit TNF- $\alpha$  behandelten Hamstern. Des Weiteren zeigten NIJSTEN et al. (2000), dass auch bei Krebs-Patienten die Infusion von TNF- $\alpha$  oder IL-6 zu höheren PCT-Plasma-Spiegeln führte. Außerdem favorisierten dieselben Zytokine in dieser Studie die PCT-Produktion in einem *In-vitro*-Modell mit humanen Leberschnitten. Ob Zytokine nun direkt oder indirekt ihre stimulierenden Wirkungen auf PCT entfalten und wie genau diese Mediatoren mit den bakteriellen Stimuli zusammenwirken, bleibt allerdings unklar und weitere Arbeit ist auf diesem Forschungsgebiet gefragt.

### 2.3.4 Biologische Wirkungen von PCT

Während einige physiologische Wirkungen des Hormons Calcitonin bereits bekannt sind, wie zum Beispiel die Hemmung der Osteoklasten-Aktivität und somit die Erniedrigung des Kalzium-Blutspiegels, bleiben die biologischen Eigenschaften seiner Vorläuferproteine weitgehend unerforscht (STEINWALD et al., 1999). Die Vermutung, dass Procalcitonin nicht nur als „passiver“ Marker infektiöser Geschehen fungiert, sondern den Körper über schädliche Effekte aktiv mit beeinträchtigt, wurde durch einige Studien bestätigt.

In verschiedenen Tierexperimentellen Sepsis-Modellen war eine Erhöhung der PCT-Werte mit einer steigenden Mortalitätsrate assoziiert. NYLEN et al. (1998) demonstrierten an mit



*Escherichia Coli* infizierten Hamstern, wie die Sterblichkeitsrate in Verbindung mit der Verabreichung exogenen PCTs signifikant ansteigt. Des Weiteren erlangten sie durch eine Behandlung der septischen Hamster mittels anti-PCT-Antikörper durchaus positive Effekte (prophylaktische Behandlung: Mortalität unter 10 %, therapeutische Behandlung: Mortalität circa 50 %). In einer ähnlich aufgebauten Studie von STEINWALD und Kollegen (1999), korrelierten die Konzentrationen an totalem immunaktivem Calcitonin (von dem über 90 % Procalcitonin) im Serum septischer Hamster mit dem Grad der systemischen Infektion und mit der assoziierten Sterblichkeitsrate. Weitere Versuche wurden an Schweinen durchgeführt, welche durch intraabdominale Applizierung von *Caecum*-Inhalt und *Escherichia Coli* ebenfalls in einen septischen Zustand gebracht wurden. Außerdem wurden die Tiere zum einen drei Stunden nach Induktion der Sepsis (MARTINEZ et al., 2001) und zum anderen gleichzeitig zum infizierenden Prozedere (WAGNER K. E. et al., 2002) mit gegen porcines PCT gerichtetes Antiserum behandelt. In beiden Fällen wurde eine Verbesserung vieler physiologischer und metabolischer Parameter beobachtet, wie zum Beispiel arterieller Druck, Herzindex und Kreatinin-Wert. Des Weiteren zeigten die Gruppen behandelter Tiere deutlich höhere Überlebensraten. In neuerlich durchgeführten Versuchen an endotoxämischen Ratten registrierten die Autoren ebenfalls positive Auswirkungen nach Verabreichung eines anti-N-PCT-Antikörpers (TAVARES und MIÑANO, 2010). Dieselbe Arbeitsgruppe demonstrierte außerdem, dass die Immunneutralisierung von N-PCT auch der Entwicklung akuter Lungenschäden infolge von Sepsis entgegenwirkt. In septischen Ratten führte die Gabe von anti-N-PCT-Antikörper zu einer Schwächung der Lungenentzündung, zur Reduzierung der Infiltration des Lungengewebes mit neutrophilen Granulozyten sowie zur Verminderung der bakteriellen Lungen-Kolonisierung. Eine Senkung der pulmonalen Werte von CALCA, Procalcitonin und N-PCT infolge der Behandlung wurden ebenfalls beobachtet (TAVARES et al., 2014).

Bezüglich der Wirkungen von Procalcitonin auf zellulärer und molekularer Ebene gibt es einige Studien, welche die mögliche pro-inflammatorische Rolle des Markers unterstreichen. Durch eine *In-vitro*-Studie von WIEDERMANN et al. (2002) stellte sich heraus, dass Procalcitonin, wie sein Nachfolger Calcitonin, auch in der Lage ist, Monozyten anzulocken. Gleichzeitig führte jedoch eine Prä-Inkubation der Monozyten mit Pro- oder Calcitonin zu einer Reduzierung der Migrationsfähigkeit dieser Zellen. In derselben Studie konnten solche Effekte für Granulozyten nicht nachgewiesen werden. Aus einem weiteren Versuch ging hervor, dass humanes rekombinantes Procalcitonin dosisabhängig die phagozytierende sowie candidazide Wirkung polymorphonukleärer Zellen (PMN) inhibiert. Des Weiteren unterstützte PCT das Wachstum von *E. Coli*-Kolonien bei Inkubation sowohl mit Serum als auch mit Blut (PINCÍKOVÁ et al., 2005). WEI et al. (2008) zeigten, dass PCT, wie das bekannte Chemokin IL-8, in der Lage ist, die intrazelluläre Konzentration an ionisiertem-Kalzium in Granulozyten zu steigern. Des Weiteren beobachteten sie in derselben Studie eine PCT-assoziierte Erhöhung der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle sowohl bei Monozyten (CD14) als auch bei Granulozyten (CD16). Die positive, dosisabhängige Wirkung von Procalcitonin auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (u. a. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) ist ebenfalls bekannt (WEI et al., 2008; LIAPPIS et al., 2011). Diese fungieren aber auch, wie im vorherigen Absatz bereits beschrieben, als primäre Anreger der PCT-Synthese,

so dass die gegenseitige Stimulierung dieser Proteine ein entscheidender Punkt für die Aufrechterhaltung und Amplifizierung entzündlicher Prozesse während einer Infektion zu sein scheint (MATWIYOFF et al., 2012).

Da Stickstoffmonoxid durch seine vasodilatierende Wirkung eine zentrale Rolle im Rahmen septischer Zustände spielt, wurde durch verschiedene *In-vitro*-Versuche an glatter Gefäßmuskulatur untersucht, ob Procalcitonin die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) beeinflusst. Dabei stellte sich heraus, dass die Modulierung der NO-Produktion durch Procalcitonin ein zeitabhängiger Prozess ist. Nur die Zugabe von PCT nach Prästimulierung der glatten Muskelzellen mit LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$ ), resultierte in einer konsistenten Erhöhung sowohl der iNOS-Expression als auch der daraus folgenden NO-Synthese. Die gleichzeitige Applizierung aller Mediatoren, führte dagegen zu einer reduzierten Aktivität des Enzyms. Diese Ergebnisse untermauern also auch die Hypothese, dass Procalcitonin eher für die Unterhaltung bzw. Steigerung und nicht für die Initiierung der entzündlichen Reaktion zuständig ist (HOFFMANN et al., 2001; HOFFMANN et al., 2002).

Abschließend wurde durch die Arbeitsgruppe von SEXTON und Kollegen (2008) untersucht, ob und wie Procalcitonin mit den Rezeptoren der Calcitonin-Familie interagiert. Mittels Messung der cAMP-Aktivität stellte sich heraus, dass PCT ein potenter partieller Agonist des CGRP1-Rezeptors darstellt. Das *calcitonin gene related peptide* wird somit durch Procalcitonin daran verhindert, seine positiven Wirkungen auf den Organismus im Rahmen septischer Prozesse zu entfalten, was eine weitere Erklärung für die toxischen Mechanismen dieses Proteins sein könnte (SEXTON et al., 2008).

## **2.3.5 PCT als Marker in der Humanmedizin**

### **2.3.5.1 Positive Eigenschaften des PCTs und Vergleich mit anderen Biomarkern**

Die von MEISNER (2010, 2014) beschriebenen positiven Eigenschaften von Procalcitonin als Marker infektiöser Zustände beim Menschen sollen folgend zusammengefasst werden. Nach einem adäquaten Stimulus wird Procalcitonin rasch induziert und ist bereits innerhalb von zwei bis sechs Stunden im Blut nachweisbar, so dass eine frühzeitige Diagnose septischer Zustände möglich ist. Die höchsten Konzentrationen können nach 12 bis 48 Stunden gemessen werden. Die klinische Halbwertszeit, die bei kranken Patienten auf der Intensivstation beobachtet wurde, beträgt etwas länger als einen Tag (circa 25-30 Stunden). Außerdem stellt sich PCT als sehr dynamischer Marker mit hohem prädiktivem Wert dar. Zum einen korreliert der Parameter gut mit dem Schweregrad der Erkrankung und erlaubt somit eine Einschätzung bezüglich des Letalitätsrisikos. Zum anderen wurden, bei fortschreitender Genesung auch Rückgänge in der PCT-Plasma-Konzentration beobachtet. Im klinischen Alltag wird eine über drei Tage anhaltende Senkung des PCT-Wertes um mehr als 30 % gegenüber dem vorherigen Tag mit dem Anschlagen der Therapie und folgend mit einer günstigen Prognose verbunden. Vor allem bei Patienten mit Atemwegserkrankungen wird PCT zur Steuerung der antibiotischen Therapie herangezogen (Abschnitt 2.3.5.3.3).

Durch die strikte Regulation seiner Induktion ist PCT des Weiteren ein sehr spezifischer Anzeiger infektiöser Prozesse. Andere Messgrößen, die zurzeit in der Routinediagnostik entzündlicher Geschehen eingesetzt werden, zeigen im Vergleich zu Procalcitonin einige Mängel. Das Akute-Phase-Protein „C-Reaktives-Protein“ (CRP) zum Beispiel ist durch längere Reaktionszeiten gekennzeichnet (Tage statt Stunden) und korreliert nur schwach mit dem Krankheitsverlauf. Zusätzlich steigt CRP auch bei Entzündungen nicht-bakterieller Ursache deutlich an, so dass eine Differenzierung zwischen Inflammation und Infektion anhand dieses Markers nicht möglich ist. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 zeigt wie PCT einen guten Bezug zum Schweregrad der Erkrankung, allerdings ist auch in diesem Fall die Induktion nicht zwingend an eine bakterielle Infektion gekoppelt. Des Weiteren wird IL-6 sehr schnell gebildet und wieder abgebaut, so dass hohe Schwankungen im Blutplasma vorkommen können. Während PCT eine hohe Stabilität in der entnommenen Blutprobe (sowohl frisch als auch tiefgekühlt) aufweist und keine speziellen Maßnahmen für Lagerung und Transport benötigt, sind Zytokine deutlich komplizierter zu handhaben. Vollblut muss schnell gekühlt und abzentrifugiert werden, um den möglichen Abbau oder Neubildung der Interleukine zu vermeiden. Trotz all dieser Vorteile von Procalcitonin und seiner hohen Spezifität können auch für diesen Marker Ausnahmesituationen auftreten. Erhöhte PCT-Blutwerte wurden auch bei verschiedenen nicht-infektiösen Geschehen beobachtet, und umgekehrt sollte auch bei niedrigen Procalcitonin-Konzentrationen die Eventualität einer bakteriellen Infektion nicht *a priori* ausgeschlossen werden. Eine sichere Diagnose kann nur unter Berücksichtigung des Gesamtbildes (klinisches Bild, PCT und eventuell weitere krankheitsspezifische Parameter) gestellt werden.

### 2.3.5.2 PCT als Marker von Infektion und Sepsis

Schon in den 1970er Jahren wurde festgestellt, dass die Hypokalzämie ein häufiger Befund bei septischen Patienten ist (TAYLOR et al., 1978). Im Jahre 1993 wurde Procalcitonin erstmals durch die Arbeitsgruppe von ASSICOT als sepsisassoziiertes Protein beschrieben und in einer späteren Studie fanden MÜLLER und Kollegen (2000) eine Korrelation zwischen erniedrigten Kalziumspiegeln und erhöhten PCT-Werten im Blut schwerkranker Patienten. Unter dem Terminus „Sepsis“ versteht man in der Humanmedizin eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus, die durch eine bakterielle Infektion verursacht wird. Je nach Schweregrad werden vom *American College of Chest Physicians* (ACCP) und der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) verschiedene Stadien der systemischen Inflammation bzw. Infektion definiert (KAUR et al., 2013). Eine genaue und zeitnahe Diagnose ist bei septischen Geschehen entscheidend, um möglichst früh eine passende Therapie einzuleiten und die hohen Sterblichkeitsraten zu reduzieren. Der mikrobiologische Nachweis mittels Blutkulturen ist aufwendig und zum Teil ungenau, sodass in den letzten Jahren das Interesse an für die Diagnose infektiöser Prozesse geeigneten Markern gestiegen ist (BRUNKHORST und REINHART, 2009). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass PCT sehr schnell und spezifisch auf bakterielle Stimuli reagiert und somit eine Differenzierung zu Erkrankungen anderer Ursache wie zum Beispiel virale Infekte und Autoimmunerkrankungen ermöglicht. Außerdem ist PCT in der Lage, zwischen lokalen und schweren systemischen bakteriellen Infektionen zu unterscheiden, da im letzteren Fall

deutlich höhere Konzentrationen im Blutkreislauf auftreten (MEISNER, 2010, 2014). Eine weitere wichtige Eigenschaft dieses Markers ist die Übereinstimmung mit dem Schweregrad der Sepsis und dem klinischen Verlauf. Bei steigenden oder dauerhaft erhöhten PCT-Blutwerten ist die Progression einer einfachen Infektion zur schweren Sepsis oder gar zum septischen Schock sehr wahrscheinlich (HARBARTH et al., 2001; CASTELLI et al., 2004; KARLSSON et al., 2010). Unter dieser Indikation ist Procalcitonin in den USA als Sepsismarker durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen, allerdings wird auch hier auf die gleichzeitige Betrachtung des klinischen Status streng verwiesen (MEISNER, 2010).

### **2.3.5.3 PCT als Marker von Atemwegserkrankungen**

#### 2.3.5.3.1 Hintergrund

Der Respirationstrakt ist beim Menschen einer der Hauptaussgangspunkte für die Entwicklung schwerer systemischer Infektionen. Durch das weite Spektrum an möglichen Erkrankungen und den relativ unspezifischen klinischen Parametern (Symptomatik, CRP, Leukozyten, Röntgen) gestaltet sich eine Diagnose bzw. Differenzierung zwischen den einzelnen Krankheiten als Herausforderung für den behandelnden Arzt. Um das Risiko einer schlechten bis infausten Prognose zu vermeiden, werden Antibiotika oft direkt verschrieben, ohne dass eine klare Diagnose gestellt wurde und obwohl bekannt ist, dass viele akute Erkrankungen der tiefen Atemwege viraler Ursache sind. Aus dieser Sicht besteht die Notwendigkeit, geeignete Marker zu finden, die den diagnostischen Prozess unterstützen können und gleichzeitig dem übermäßigen Gebrauch an Antibiotika bzw. der Entstehung bakterieller Resistenzen entgegenwirken. In den letzten Jahren hat Procalcitonin also als Anzeiger infektiöser Geschehen auch in diesem Bereich an Aufmerksamkeit gewonnen (WRÓBLEWSKI und MARCISZ, 2009).

#### 2.3.5.3.2 PCT zur Diagnose und Differenzierung verschiedener Atemwegserkrankungen

Ein Großteil der Studien bezüglich der Anwendung von Procalcitonin als diagnostisches Mittel zur Identifizierung bzw. Differenzierung verschiedener humaner Atemwegserkrankungen brachte positive Ergebnisse. In den meisten Untersuchungen wurden die PCT-Konzentrationen im Blutplasma oder -serum der lungenkranken Patienten gemessen. Bereits in den 1980er Jahren fanden BECKER und Kollegen (1981) erhöhte Calcitonin-Konzentrationen im Serum von Patienten mit verschiedenen Lungenkrankheiten. In einer späteren Studie beobachteten NYLEN et al. (1996) ebenfalls signifikant höhere Blutwerte für totales Calcitonin bei Patienten mit infektiöser Lungenentzündung im Vergleich zu lungengesunden Kontrollen. Des Weiteren zeigten sie durch Gelfiltration, dass es sich bei den detektierten Proteinen größtenteils um Vorstufen des Hormons handelte (u. a. Procalcitonin).

Einige Autoren demonstrierten die Nützlichkeit von PCT für die Unterscheidung von Pneumonien verschiedener Art bzw. Ätiologie. HEDLUND und HANSSON (2000) registrierten deutlich niedrigere PCT-Werte bei Patienten mit atypischer (u. a. Mykoplasmen,

Chlamydien, Legionellen) statt typischer (u. a. Streptokokken, Staphylokokken, Pseudomonaden, hämophile Stämme) ambulant erworbener Pneumonien (CAP, *community acquired pneumonia*). Dies wurde auch später durch die Arbeitsgruppe von PRAT (2003, 2006) bestätigt: Hier waren die Procalcitonin-Konzentrationen bei durch Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) entstehenden Lungenentzündungen im Vergleich zu anderen Ätiologien besonders hoch.

Auch bei der Gegenüberstellung von durch das Influenza-Virus induzierte CAP mit dem bakteriell bedingten Pendant war eine Unterscheidung mittels PCT möglich (PIACENTINI et al., 2011). PEREIRA et al. (2013) fanden bei Patienten mit schwerer CAP, dass sehr hohe Werte mit einer Pneumokokken-Bakteriämie assoziiert sind (*cut-off*-Wert: 17 ng/ml).

Untersuchungen an Patienten, die während des Krankenhausaufenthaltes eine beatmungsassoziierte Pneumonie (VAP, *ventilator associated pneumonia*) entwickelten, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Autoren waren in der Lage, mittels der PCT-Konzentrationen im Serum beatmeter Patienten mit Verdacht auf Lungenentzündung zwischen VAP (mikrobiologischer Nachweis positiv) und nicht-VAP (mikrobiologischer Nachweis negativ) zu unterscheiden (DUFLO et al., 2002; RAMIREZ et al., 2008). Dagegen fanden LINNSEN et al. (2008) und JUNG et al. (2010), dass Procalcitonin weder in der bronchoalveolären Lavage noch im Serum einen geeigneten Marker für diese Fragestellung darstellt.

Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Messung von PCT im Kreislauf von an Tuberkulose erkrankten Patienten: Eine Abgrenzung zu klassischen Formen der Lungenentzündung (ambulant oder nosokomial) war durch die bei Tuberkulose deutlich niedrigeren PCT-Werte möglich (POLZIN et al., 2003; NIU et al., 2013).

Im Falle schwer verlaufender interstitieller Pneumonien waren die Messungen von Procalcitonin im Serum sehr hilfreich, um diese von ähnlichen Krankheitsbildern mit infektiösen Ursachen abzugrenzen und somit die richtige Therapie zu wählen (NAGATA et al., 2013).

Bei chronischen Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) wurden ebenfalls messbare PCT-Blutkonzentrationen beobachtet, allerdings bewegten sich hier die Werte in einem deutlich niedrigeren Bereich als bei bakteriellen Pneumonien (BEFADHEL et al., 2011; PORFYRIDIS et al., 2014). Nur im Falle einer bakteriell bedingten Exazerbation steigen die PCT-Werte auch bei chronischen Atemwegserkrankungen im Blut stark an, sodass hier das Protein zur Entscheidung für oder gegen eine antibiotische Behandlung genutzt werden kann (BRIGHTLING, 2013; WU et al., 2013).

Des Weiteren fanden einige Autoren erhöhte PCT-Spiegel in Blut und zum Teil auch in der BALF von Patienten mit akutem progressivem Lungenversagen (ARDS, *adult respiratory distress syndrome*) bzw. akuter Lungenschädigung (ALI, *acute lung injury*) (STILETTO et al., 2001; LEDERER et al., 2013).

Abschließend zeigten WALSH et al. (2013), wie Procalcitonin in der Auswertung von Röntgenaufnahmen helfen kann. Bei der Beurteilung der Röntgenbilder von Patienten mit verschiedenen Atemwegserkrankungen, korrelierten die im Serum gemessenen PCT-Konzentrationen mit dem Ausmaß der identifizierten Infiltrate. Auch bei der Interpretation

unbestimmter Bilder, also wo eine klare Aussage für oder gegen das Vorhandensein einer Pneumonie nicht möglich war, hatte PCT einen moderaten Vorhersagewert.

#### 2.3.5.3.3 PCT zur Steuerung der Antibiotika-Therapie

Die Möglichkeit einer PCT-gesteuerten antibiotischen Therapie wurde erstmals an Patienten mit Atemwegserkrankungen geprüft (MEISNER, 2010). Dazu wurden verschiedene Interventions- bzw. randomisierte kontrollierte Studien durchgeführt. Zunächst wurden die Patienten anhand unspezifischer Symptome wie Husten und Dyspnoe (CHRIST-CRAIN et al., 2004) ausgewählt und später auch nach speziellen Krankheitsbildern wie Pneumonie (CHRIST-CRAIN et al., 2006; STOLZ et al., 2009), exazerbierte COPD (STOLZ et al., 2007a) und Asthma (TANG et al., 2013) selektiert. Eine Übersicht mit einigen ausgewählten Studien zu dieser Thematik ist in Tabelle 2 aufgeführt. Für all diese Untersuchungen wurden dieselben Behandlungsalgorithmen angewandt, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Insgesamt wurde gezeigt, dass durch eine PCT-gestützte Diagnose die Verschreibung von Antibiotika und die damit verbundene Behandlungsdauer signifikant reduziert werden können (siehe Tabelle 2), ohne dabei die Gesundheit bzw. den Genesungsprozess des Patienten zu gefährden.

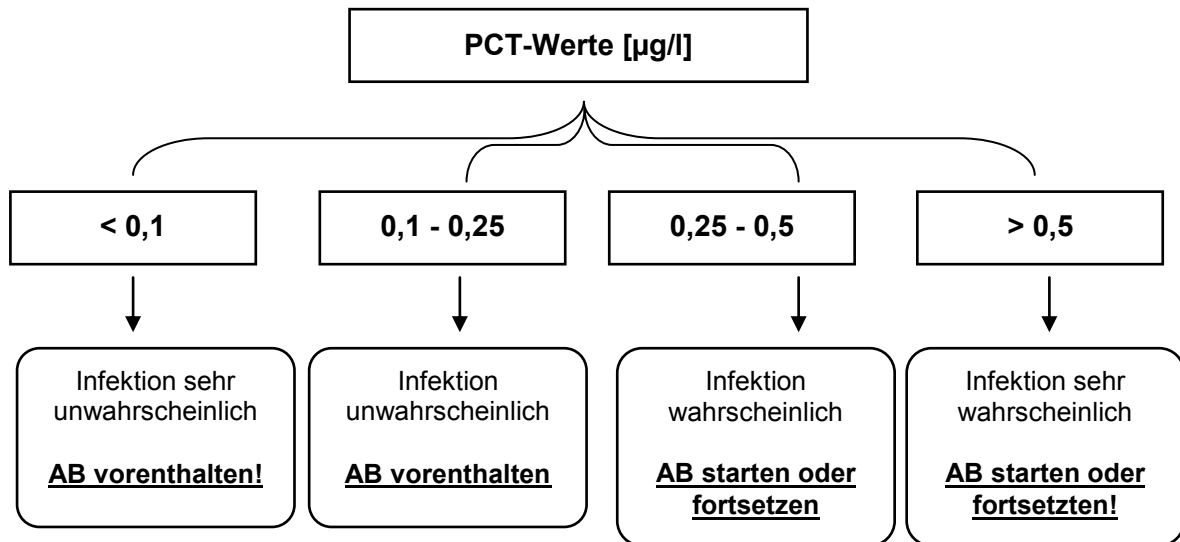


Abb. 3: PCT-Richtwerte zur Leitung einer antibiotischen Behandlung (AB) bei Erkrankungen der Atemwege des Menschen, modifiziert nach SCHUETZ et al. (2007).

Tab. 2: Ausgewählte Interventionsstudien zur Steuerung der antibiotischen Behandlung (AB) verschiedener Atemwegserkrankungen mittels PCT-Messung.

Autoren	Jahr	Studiename	Fälle	Krankheit	AB erhalten PCT-Gruppe	AB erhalten Kontrollen
CHRIST-CRAIN et al.	2004	ProRESP	243	divers	44 %	83 %
CHRIST-CRAIN et al.	2006	ProCAP	302	CAP	85 %	99 %
STOLZ et al.	2007a	ProCOLD	208	COPD	40 %	72 %
BRIEL et al.	2008	PARTI	458	divers	25 %	97 %
SCHUETZ et al.	2009	ProHOSP	1.359	divers	75,4 %	87,7 %
STOLZ et al.	2009	ProVAP	101	VAP	10 T	15 T
BURKHARDT et al.	2010	-	550	divers	21,5 %	36,7 %
TANG et al.	2013	-	255	Asthma	46,1 %	74,8 %

CAP = *community acquired pneumonia* (ambulant erworbene Pneumonie), VAP = *ventilator associated pneumonia* (beatmungsassoziierte Pneumonie), COPD = *chronic obstructive pulmonary disease* (chronisch obstruktive Lungenerkrankung), % = Anzahl der Patienten pro Gruppe, die einer antibiotischen Therapie unterzogen wurden, T = Dauer der antibiotischen Therapie in Tagen

#### 2.3.5.3.4 Prognostischer Wert von PCT bei Atemwegserkrankungen

Viele Studien zeigten, dass Procalcitonin wie bei Sepsis auch im Falle von Lungenentzündungen Hinweise bezüglich eines guten oder schlechten Verlaufs sowie hinsichtlich des Mortalitätsrisikos geben kann.

Die Arbeitsgruppe von PRAT (2006) fand, dass bei Pneumonien mit unterschiedlicher bakterieller Ätiologie hohe PCT-Konzentrationen im Blutserum mit einer Einstufung in höhere Risikoklassen des PSI-Scores (*pneumonia severity index*) korrelierten. In einer multizentrischen Studie mit CAP-Patienten waren niedrige PCT-Werte unabhängig von der PSI-Klasse mit einem geringen letalen Risiko verbunden (HUANG et al., 2008). OKIMOTO und Kollegen (2009) fanden ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen Procalcitoninspiegel im Serum und Schweregrad der ambulant erworbenen Pneumonie. Ähnlich wie DUFLO et al. (2002) demonstrierten auch SELIGMAN und Kollegen (2006) an Patienten mit beatmungsassoziierter Pneumonie, dass niedrigere PCT-Werte bzw. eine Senkung dieser in den ersten vier Behandlungstagen mit höheren Überlebensraten assoziiert sind. Auch bei im Pflegeheim erworbener Pneumonie (NHAP, *nursing home acquired pneumonia*) wurden die höchsten Markerkonzentrationen bei nicht überlebenden Patienten und bei solchen mit grampositiven Infektionen gemessen (PORFYRIDIS et al., 2014).

Bei chronischen Lungenkrankheiten ist PCT, wie in den obigen Absätzen bereits beschrieben, zur Identifizierung bakterieller Komplikationen sehr hilfreich. EMPORIADOU und Kollegen (2005) gelang es nicht, eine Differenzierung verschiedener Asthmastadien anhand von Serum-PCT bei Kindern durchzuführen. Bei unterschiedlichen Graden der Obstruktion wurden hier ähnliche Procalcitoninkonzentrationen nachgewiesen. Anders beobachteten TANG et al. (2013) bei Patienten mit schwerem Asthma signifikant höhere PCT-Werte als bei solchen mit nur moderater bzw. milder Ausprägung der klinischen Symptome. In einer Studie an Patienten mit exazerbierter COPD demonstrierten STOLZ et al. (2007b), dass PCT nur für eine kurzfristige prognostische Bewertung Bedeutung hat. Eine Senkung der Konzentrationen des Markers wurde hier 14 Tage, jedoch nicht 6 Monate nach Einstellung im Krankenhaus registriert.

Zuletzt ist die Arbeit von LEDERER et al. (2013) zu nennen, wo die Autoren, bei Patienten mit ARDS eine Korrelation zwischen Schweregrad der Lungenläsionen und Höhe der PCT-Werte in Blutserum nachweisen konnten.

#### **2.3.5.4 Moderne Methoden zum Nachweis von PCT in der Humanmedizin**

Auf dem Markt gibt es zurzeit verschiedene Assays zum Nachweis humanen Procalcitonins. All diese Verfahren basieren auf einem von der Firma BRAHMS GmbH (Henningsdorf, Deutschland) entwickelten Sandwich-Immunoassay und sind in der Lage, das intakte Protein und das Bruchstück CT:CCP-1 (Calcitonin + Katalcalcin) zu detektieren. Der aktuelle Goldstandard, der bis jetzt die weiteste Anwendung in Klinik und Wissenschaft gefunden hat, ist der automatisierte Sensitive Kryptor® der Firma BRAHMS (RASCHER, 2014). Er zeichnet sich durch eine schnelle Messzeit (19 Minuten), eine sehr gute funktionale Sensitivität (0,06 ng/ml) und einen recht weiten Messbereich (0,02-50 ng/ml bzw. bis 5000 ng/ml bei



verdünnter Probe) aus. Diese Charakteristika erlauben eine rasche PCT-Bestimmung mit der Möglichkeit, auch sehr niedrige Spiegel zu erfassen und somit auch lokale Geschehen zu identifizieren (z. B. Atemwegserkrankungen). Allerdings besteht ein schwerwiegender Nachteil darin, dass die Ausführung des Tests durch den komplexen Aufbau und die teure Ausstattung sehr aufwändig und somit nicht für den klinischen Alltag geeignet ist (WRÓBLEWSKI und MARCISZ, 2009; RASCHER, 2014).

RASCHER (RASCHER, 2014; RASCHER et al., 2014) beschreibt in ihren Arbeiten die Entwicklung eines neuen Fluoreszenz-Immunoassays für die Messung von Procalcitonin mittels eines TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-basierten Geräts. Mithilfe ihrer Arbeitsgruppe entwickelte sie zunächst einen ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) zum Nachweis humanen PCTs in EDTA-Plasma. Anschließend wurde dieser Assay auf ein von der Firma pes diagnosesysteme GmbH (Markkleeberg, Deutschland) entwickeltes Tischgerät übertragen. Durch die schnelle Messzeit (< 9 Minuten), die gute Sensitivität in Plasma (LOD, *limit of detection*: 0,04 ng/ml; LOQ, *limit of quantification*: 0,12 ng/ml) und Vollblut (LOD: 0,02 ng/ml; LOQ: 0,09 ng/ml) sowie die einfache Handhabung eignet sich das Gerät für eine patientennahe Diagnostik (POCT, *point-of-care testing*). Beim Vergleich gemessener Plasmaproben mit dem Goldstandardgerät Kryptor® von BRAHMS zeigten sich des Weiteren sehr gute Korrelationen (Korrelationskoeffizient: 0,94-0,99).

## 2.3.6 PCT als Marker in der Tiermedizin

### 2.3.6.1 PCT als Marker beim Pferd

#### 2.3.6.1.1 Charakterisierung und erste Studien zu equinem PCT

Beim Pferd wurde Procalcitonin erstmals durch die Arbeitsgruppe von TORIBIO charakterisiert (TORIBIO et al., 2003). Die Untersuchungen seiner Arbeitsgruppe zeigten, dass equines PCT (ePCT: 115 AS und 12,5 kDa Gewicht) eine große Übereinstimmung mit humanem PCT besitzt (insgesamt 74 %). Im Kernbereich, der die Sequenz des Calcitonins beinhaltet, beträgt diese Homologie sogar 90 %, während die Ähnlichkeit im Bereich des Katalcalcins am niedrigsten ist (38 %). Mittels *real-time* PCR fanden TORIBIO und Kollegen (2003) außerdem heraus, dass Calcitonin (und somit auch seine Vorläufer) nicht nur in der Schilddrüse, sondern auch in Leber und Hypophyse des Pferdes exprimiert werden.

Eine mit akuten Krankheitszuständen einhergehende Hypokalzämie wurde wie beim Menschen auch bei dieser Tierart beobachtet (TORIBIO, 2011a). Erniedrigte Blutkalziumspiegel wurden bei adulten Pferden mit schwerer Kolik (GARCIA-LOPEZ et al., 2001) bzw. Entzündung des Darmes (TORIBIO et al., 2001) und bei adulten Pferden mit induzierter Endotoxämie (TORIBIO et al., 2005) beobachtet. Bei Fohlen, bei denen die Entwicklung einer Sepsis in den ersten Lebenstagen als eine der wichtigsten Verlustgründe gilt, wurden hypokalzämische Zustände in Verbindung mit schweren Krankheitszuständen ebenfalls beobachtet (HURCOMBE et al., 2009).

In einer weiteren Studie untersuchte MITCHELL (2006) anhand eines für Ratten- $\alpha$ -CGRP entwickelten ELISAs, die Konzentrationen des mit Procalcitonin verwandten Peptids im Serum von Fohlen und adulten Pferden mit SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*)-Symptomen. Dabei waren die CGRP-Konzentrationen bei schwer kranken Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren deutlich erhöht. Auch bei experimenteller Sepsisinduktion mittels Endotoxininfusion narkotisierter Pferde konnte die Autorin einen steigenden Trend für CGRP nachweisen. Zur Beurteilung von schwerer Entzündung und Sepsis wurden außerdem für Fohlen (BREWER und KOTERBA, 1988) sowie adulte Pferde (BREUER und SCHUSSER, 2012) spezielle Scoring-Systeme entwickelt.

Die Rolle des Procalcitonins als Marker infektiöser Erkrankungen des Pferdes wurde bis heute allerdings nur wenig untersucht, hauptsächlich aufgrund der in der Tiermedizin fehlenden Nachweismethoden. Mittels eines für die Humanmedizin entwickelten Immunoassays konnte TORIBIO (nicht publizierte Daten, 2007) keine Unterschiede in den PCT-Blut-Konzentrationen septischer bzw. endotoxämischer und gesunder Pferde aufdecken (TORIBIO, 2011a). PUSTERLA et al. (2006) untersuchten das Vorhandensein verschiedener Entzündungsmarker-Transkripte im Blut neugeborener Fohlen (< 5 Tage alt). Hierbei konnten sie keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Bildung für IL-1 $\beta$ , IL-6 und PCT zwischen schwer kranken und gesunden Tieren nachweisen. Allerdings war die im Schnitt beobachtete PCT-Expression aufgrund der breiten Spannweite der Werte bei septischen Fohlen höher als bei solchen, die als nicht-septisch oder gesund klassifiziert wurden. PUSTERLA (2006) rechtfertigt die Ergebnisse seiner Studie mit der Tatsache, dass Procalcitonin auch beim Menschen von Leukozyten nicht in hohem Ausmaß exprimiert wird, während TORIBIO (2011a) den komplexen Aufbau des CALC-I-Gens hervorhebt und somit die korrekte Herstellung der Primer-Sequenzen für die angewandte PCR-Methode in Frage stellt. Studien zur Untersuchung von Procalcitonin bei Pferden mit Atemwegserkrankungen wurden, soweit der Autorin bekannt, noch nicht durchgeführt.

#### 2.3.6.1.2 Entwicklung eines Sandwich-ELISAs zum Nachweis equinen PCTs

Ausgehend von der Annahme, dass Procalcitonin durch passende Nachweismethoden auch beim Pferd als Marker bestimmter Krankheitszustände Anwendung finden kann, stellten RIEGER und Kollegen (2014) unter Mitwirkung der Arbeitsgruppe von Prof. GEHLEN (Klinik für Pferde, Freie Universität Berlin) einen Sandwich-ELISA zum Nachweis equinen PCTs her. Das Prozedere wird im Folgenden zusammengefasst. Eine detailliertere Auffassung dazu ist in den Publikationen von KOCHLEUS (2014), RASCHER (2014) und RIEGER et al. (2014) zu finden. Durch die hohe Übereinstimmung in bestimmten Sequenzabschnitten des Procalcitonins bei Mensch und Pferd konnte eine Anpassung des für die Humanmedizin von RASCHER (2014) entwickelten ELISAs erfolgen. Equines rekombinantes PCT und die bereits von RASCHER (2014) angewandten monoklonalen Ratten-Antikörper (mAK) wurden in verschiedenen Abteilungen des Helmholtz Zentrums München hergestellt. Dabei lieferte das mAK-Paar CALCA 3C5 (gegen humanes Calcitonin) und CALCA 4F6-B (gegen humanes N-PCT) auch für die Erkennung der jeweiligen equinen PCT-Abschnitte gute Ergebnisse. Als Standardlösung für den ELISA wurde Blutplasma eines klinisch gesunden Pferdes genutzt und als „0-Plasma“ definiert. Um mögliche Hintergrundsignale zu reduzieren,

wurden außerdem verschiedene Zusätze getestet. Die Zugabe von 50 µg/ml des Ratten-Antikörpers CAD8-7H1 (derselben Subklasse wie die bereits angewandten mAK) war dabei die beste Alternative, da hiermit eine Senkung des Rauschens von 80 % auf etwa 2,3 % des maximalen Signals beobachtet wurde. Des Weiteren zeigte CAD8-7H1 durch die hohe Konzentrierung die niedrigsten Verdünnungseffekte. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte mit einer 3,3-prozentigen BSA (bovines Serum-Albumin)-Lösung. Nach Festlegung der einzelnen Komponenten wurde der Assay in Anlehnung an die Richtlinien der amerikanischen FDA (2013) charakterisiert. Im festgelegten Arbeitsbereich von 25 bis 1.000 ng/ml zeigte der Assay die niedrigsten Variationskoeffizienten (< 15 %) und erfüllte somit die Anforderungen der FDA. Die Wiederfindungsrate (*recovery*) in diesem Arbeitsbereich zeigte, dass im Vergleich zur Soll-PCT-Konzentration etwas niedrigere Konzentrationen gemessen wurden. Dies führen die Autoren auf Verdünnungseffekte zurück. Abschließend wurden Standardkurven für hrPCT und erPCT verglichen und die Kreuzreaktivität (CR, *cross reactivity*) bestimmt. Der CR-Wert betrug 490, sprich 1 ng/ml erPCT erzeugt nur 1/409 des Signals von hrPCT. Da jedoch die Messungen equiner Plasmaproben zeigten, dass Pferde über deutlich höhere PCT-Konzentrationen verfügen als Menschen, hatte der gemessene CR-Wert kaum negative Auswirkung auf die Detektion.

Mit dem fertigen equinen ELISA wurden anschließend erste Messungen durchgeführt. Plasma-Proben von insgesamt 29 Pferden wurden durch die Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin bereitgestellt. In Anlehnung an den Sepsis-Score von BREUER und SCHUSSER (2012) wurden die Tiere als septisch (Gruppe A, 5 Pferde,  $\geq 7$  Punkte), gesund bzw. fraglich septisch (Gruppe B, 4 Pferde, 4-6 Punkte) und sicher gesund (Gruppe C, 20 Pferde,  $\leq 3$  Punkte) definiert. Da das angewandte 0-Plasma von einem gesunden Pferd stammte, jedoch nicht purifiziert wurde, stellen die gemessenen Konzentrationen nur relative Werte dar, welche im Bezug auf das PCT-Grundlevel des 0-Plasmas betrachtet werden müssen. Trotzdem zeigten im Schnitt septische Pferde (8450 ng/ml) im Vergleich zu den restlichen Probanden (47 ng/ml) signifikant höhere PCT-Plasma-Konzentrationen. Durch den von RIEGER et al. (2014) entwickelten ELISA-Test wurden weiterhin hohe PCT-Konzentrationen im Blutplasma endotoxämischer Pferde nachgewiesen (TESCHNER et al., 2015).

Mit diesem Assay besteht also erstmals die Möglichkeit, Procalcitonin beim Pferd zu messen und dabei kranke Individuen von gesunden zu unterscheiden.

### **2.3.6.2 PCT als Marker bei anderen Tierarten**

Erste Messungen von Procalcitonin bei Tieren erfolgten im Rahmen verschiedener experimenteller Modelle an Ratten, Hamstern, Schweinen und Pavianen (siehe dazu Abschnitt 2.3.4). In den meisten Studien wurde ein septischer Zustand der Tiere erzeugt und anschließend die Induktion und Kinetik des Markers bzw. die Auswirkungen von dessen Immunneutralisierung untersucht. Zur Messung kamen dabei oft Geräte aus der Humanmedizin zur Anwendung (BRAHMS GmbH) und es wurde davon ausgegangen, dass diese tierisches sowie humanes PCT gleichermaßen erkennen (MEISNER et al., 2003). In anderen Versuchen wurden Kaninchen gegen Bruchstücke des zu untersuchenden PCTs (z. B. porcines PCT) immunisiert. Anschließend wurden die entstehenden Antikörper

gewonnen und in einem Radioimmuno-Assay zur PCT-Bestimmung eingesetzt (MARTINEZ et al., 2001; WAGNER K. E. et al., 2002).

Laut KOCHLEUS (2013) sind diese Methoden allerdings nicht ausreichend an die zu bestimmenden Proteine angepasst und besitzen somit geringe Genauigkeit. Tierarten differenzieren sich untereinander auch bezüglich der PCT-Sequenzen, sodass die Notwendigkeit besteht, speziesspezifische bzw. ausreichend adaptierte Assays zu entwickeln, wie es bei der Herstellung des equinen ELISAs der Fall ist (siehe Abschnitt 2.3.6.1.2).

Beim Hund wurde Procalcitonin erstmals im Jahre 1991 durch die Arbeitsgruppe von MOL charakterisiert (MOL et al., 1991). Daraufhin führten KUZU und Kollegen (2008) erste Untersuchungen zur Expression caniner PCT-mRNA in Vollblut gesunder und erkrankter Tiere durch. Dabei beobachteten sie bei gesunden Hunden signifikant niedrigere Werte als bei der kranken Gesamtheit. Eine Differenzierung der einzelnen Krankheitsgruppen anhand der PCT-Expression war allerdings nicht möglich. Bei fünf Hunden, bei denen die PCT-mRNA zwei Mal bestimmt wurde, zeigten die Werte gute Korrelationen mit dem Krankheitsverlauf. Somit könnte auch bei dieser Tierart wie beim Mensch der Marker prognostische Bedeutung haben. In einer späteren Studie von GIUNTI et al. (2010) wurde die Expression des CALC-I-Gens in verschiedenen Geweben von Hunden mit diagnostizierter SIRS und in gleichen Proben fünf gesunder Kontrollen untersucht. Die RT-PCR zeigte bei kranken Hunden eine erhöhte Transkription des Gens in verschiedenen Organen (Milz, Lunge, Leber), während die CALC-I-Expression bei gesunden Individuen nur in der Schilddrüse nachgewiesen wurde. Aufgrund eines zurzeit fehlenden Goldstandards zur Detektion von caninem Procalcitonin versuchten FLORAS und Kollegen (2014) einen für den Hund bereits auf dem Markt vorhandenen ELISA-Test (EIAab Science Co. Ltd., Wuhan, China) zu validieren. Dieser ausschließlich für die Forschung bestimmter Assay war allerdings in dieser Studie nicht in der Lage, rekombinantes canines PCT zu erkennen, und war durch große Variationskoeffizienten charakterisiert. Des Weiteren konnte durch Massenspektrometrie kein PCT in der mit dem Kit gelieferten Standardlösung nachgewiesen werden. Die Autoren raten davon ab, diesen ELISA zur Bestimmung von Procalcitonin beim Hund weiterhin einzusetzen.

## **2.4 Glukokortikoid-Therapie**

### **2.4.1 Die inhalative Glukokortikoid-Therapie bei Mensch und Pferd**

Zur Therapie von humanem Asthma und COPD werden oft synthetische Kortikosteroide in Kombination mit lang wirkenden  $\beta$ -Agonisten inhalativ verabreicht. Eine regelmäßige bzw. langfristige Anwendung der potenten Entzündungshemmer kann allerdings mit Kollateraleffekten wie Osteoporose, Gewichtszunahme und erhöhtem Infektionsrisiko verbunden sein (ABRAMSON et al., 2014). Auch wenn die meisten Asthma-Patienten sehr gut auf eine solche Behandlung ansprechen, wird in einigen Fällen infolge von Kortikosteroid-Therapie keine Besserung der klinischen Symptomatik beobachtet

(„Glukokortikoid-Resistenz“) (BARNES, 2010). Stabile COPD-Patienten reagieren allgemein viel weniger empfindlich auf Steroide als Asthmatiker (BARNES, 2000). Im Falle von akuten Asthma- oder COPD-Exazerbationen werden Glukokortikoide auch systemisch verabreicht (BAUER et al., 2012; ABRAMSON et al., 2014).

Für die inhalative Therapie chronisch obstruktiver Erkrankungen des Pferdes gibt es verschiedene Präparate, welche aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zu Glukokortikoidrezeptoren, der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit und dem schnellen Abbau in der Leber auch für eine langfristige Behandlung geeignet sind. Allerdings sind diese in Deutschland, aufgrund der bereits beschriebenen Probleme mit dem Arzneimittelgesetz, zur Therapie von Pferden nur begrenzt erhältlich (NIEDERMEIER und GEHLEN, 2009). Das bei Asthmapatienten weitgehend eingesetzte Beclometason führt auch bei COB-Pferden zu einer Besserung der klinischen Symptomatik, der mechanischen Lungenfunktion und zum Teil zu einer Reduzierung der Lungenentzündung (AMMANN et al., 1998; RUSH et al., 1998a; RUSH et al., 1998b; RUSH et al., 2000; COUËTIL et al., 2006). Andere Studien belegen die positiven Effekte einer inhalativen Therapie mit dem potenten Wirkstoff Fluticason. In einer Untersuchung von GIGUÈRE und Kollegen (2002) führte eine 21-tägige Behandlung mit dem oben genannten Medikament bei exazerbierten COB-Patienten zu einem vollständigen Rückgang der klinischen Symptomatik und der BALF-Neutrophilie sowie zu einer Optimierung der Lungenfunktionsparameter. Ähnliche Ergebnisse wurden auch einige Jahre später durch die Arbeitsgruppe von LAAN (2006b) erzielt. Des Weiteren zeigten ROBINSON et al. (2009), dass hoch dosiertes Fluticason (6 mg alle 12 Stunden) auch zur Prophylaxe von COB-Exazerbationen bei Patienten in Remissionsphase geeignet ist. KAMPMANN und Kollegen (2001) untersuchten die Effekte einer inhalativen Budesonid-Behandlung bei Pferden mit chronisch obstruktiver Atemwegserkrankung. Dabei zeigten Tiere mit geringgradiger bis mittelgradiger COB eine deutliche Besserung des klinischen Scores und der gemessenen Lungenfunktionswerte (außer Resistance), während hochgradig erkrankte bzw. mit Placebo behandelte Pferde keine signifikanten Unterschiede erwiesen. Die mangelnde Wirkung des Budesonids bei Patienten mit hochgradiger COB ist laut der Autoren auf eine relativ kurze Behandlungsdauer (5 statt 10-14 Tage) und eine aufgrund der starken Obstruktion reduzierte Diffusion des Medikaments in den kleinen Atemwegen zurückzuführen.

Trotz der allgemein guten Verträglichkeit inhalativ verabreichter Kortikosteroide ist die Gefahr einer adrenokortikalen Suppression beim Pferd um einiges größer als beim Menschen (RUSH et al., 2000). Diese spiegelt die systemische Auswirkung des inhalierten Stoffes wieder und ist proportional zur angewandten Dosierung, sodass das Risiko der Entwicklung eines Hypoadrenokortizismus bei der Erstellung des Therapieplans immer berücksichtigt werden sollte (RUSH et al., 2000).

#### **2.4.2 Molekulare Mechanismen der Glukokortikoid-Wirkung**

Die molekularen Mechanismen der Glukokortikoid-Wirkung sind weitgehend bekannt und können wie folgt zusammengefasst werden (EBERHARDT und KILZ, 2003; BARNES, 2010):

- Induktion der Expression bestimmter Gene (Transaktivierung)
- Ausschaltung proinflammatorischer Gene (Transrepression)
- Alternative Mechanismen (nicht genomische Effekte)

Natürliche und synthetische Glukokortikoide können als lipophile Stoffe die Zellmembran passieren und im Zytosol an den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) binden (EBERHARDT und KILZ, 2003). Dabei handelt es sich um eine spezielle GR-Form namens „GR $\alpha$ “, welche vom GR $\beta$ -Typ abgegrenzt werden muss. Letzterer ist nicht in der Lage, Glukokortikoide zu binden und fungiert als kompetitiver Inhibitor (BARNES, 2010).

Beim Prozess der Transaktivierung erfolgt zunächst eine Dimerisierung des  $\alpha$ -Rezeptors, welcher dann in seiner aktiven Form zum Zellkern transportiert wird. Der ligandgebundene GR $\alpha$  interagiert schließlich mit hormonrezeptiven Abschnitten der DNA (*glucocorticoid response elements*, GRE) und stimuliert somit die Transkription des entsprechenden Gens (EBERHARDT und KILZ, 2003; BARNES, 2010). Über Transaktivierung entfalten Glukokortikoide hauptsächlich ihre hormonellen Wirkungen (EBERHARDT und KILZ, 2003), allerdings kann auch die Bildung antiinflammatorischer Mediatoren über diesen Weg stimuliert werden (BARNES, 2010). Weniger als 1 % der GR-regulierten Gene besitzen „*negative glucocorticoid response elements*“ (nGRE), welche zu einer Hemmung der Transkription der jeweiligen Zielgene führen (EBERHARDT und KILZ, 2003). Dieser Mechanismus scheint für einige Nebenwirkungen der Glukokortikoide wie zum Beispiel die Osteokalzinhemmung zuständig zu sein (BARNES, 2010).

Trotz der oben beschriebenen Ausnahme werden die meisten Gene über den indirekten Weg der Transrepression inhibiert. Dieser besteht in der Hemmung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 und Mitglieder der STAT-Familie, was zur Blockierung der Produktion proinflammatorischer Mediatoren (u. a. Zytokine und Chemokine) führt. Dazu binden Glukokortikoide wie bereits beschrieben an ihren Rezeptor und anschließend an die jeweiligen aktivierten Transkriptionsfaktoren. Somit können Glukokortikoide den Kontakt zwischen Transkriptionsfaktor und DNA verhindern (NF- $\kappa$ B) oder den Prozess im Zellkern nach erfolgter DNA-Transkriptionsfaktor-Verknüpfung unterdrücken (AP-1). Diese Regulationsmechanismen sind für die wichtigsten immunmodulatorischen und entzündungshemmenden Effekte der Glukokortikoide zuständig (EBERHARDT und KILZ, 2003).

Außerdem können Glukokortikoide auf posttranskriptioneller Ebene den Proteingehalt von Zellen steuern. Eine destabilisierende Wirkung auf die mRNA bestimmter Entzündungsfaktoren (z. B. TNF- $\alpha$ ) ist bereits bekannt (BARNES, 2010).

Zusätzlich zu genomischen Glukokortikoidwirkungen, welche erst innerhalb von Stunden bis Tagen auftreten, werden auch sehr rasch einsetzende Effekte beobachtet, die nicht über die langwierigen transkriptionellen Prozesse erklärt werden können. Aus diesem Grund wird die Existenz alternativer bzw. nicht genomischer Mechanismen diskutiert. Diesbezüglich ist bekannt, dass Glukokortikoide sich auch in der Zellmembran integrieren und dort membranstabilisierende Effekte ausüben (unspezifische nicht genomische Wirkung). Diese positive Glukokortikoideigenschaft wird im Falle akuter Notfälle bzw. Schockzustände ausgenutzt. Des Weiteren wird vermutet, dass auch membranständige GRs solche schnellen

Wirkungen vermitteln können (spezifische nicht genomische Wirkung) (EBERHARDT und KILZ, 2003).

Wie bereits erwähnt, sprechen einige Patienten kaum auf eine Glukokortikoidbehandlung an, sodass man in solchen Fällen von einer tatsächlichen Therapieresistenz ausgeht. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind komplex und verschiedene Ursachen werden diskutiert. Genetische Prädispositionen, gestörte Bindung an den GR-Rezeptor, vermehrte Expression des kompetitiven Inhibitors GR $\beta$  und ein exzessives Vorhandensein proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren stellen mögliche Faktoren dar (BARNES, 2013). Außerdem scheinen Th17-Zellen in diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen: Vermehrte Mengen dieses Zelltyps wurden bereits bei Patienten mit COPD und schwerem Asthma gefunden (BARNES, 2013). Im murinen Modell wurde eine Th17-vermittelte und Steroid-resistente Form der Atemwegsentzündung nachgewiesen (MCKINLEY et al., 2008). Ferner zeigten *In-vitro*-Versuche, dass IL-17 eine Steigerung der GR $\beta$ -Expression in peripheren mononukleären Blutzellen verursacht und dieser Mechanismus auch nicht durch Glukokortikoide beeinflusst wird (VAZQUEZ-TELLO et al., 2013).

### **2.4.3 Einfluss von Glukokortikoiden auf Immunmechanismen und Biomarker der Entzündung**

#### **2.4.3.1 Effekte auf Zellen der Atemwege und des Immunsystems**

In den Atemwegen wirkt die Kortikosteroidtherapie der Becherzellen-Hyperplasie und der exzessiven Mukus-Produktion entgegen (BOARDMAN et al., 2014). Außerdem wird die im Rahmen entzündlicher Prozesse stattfindende Leukozytenmigration stark von Glukokortikoiden beeinflusst (FRANCHIMONT, 2004). Trotz unterstützender Wirkung dieser Stoffe auf das Überleben und die Proliferation von neutrophilen Granulozyten inhibieren Glukokortikoide bestimmte Adhäsionsmoleküle (z. B. L-Selectin) und Chemokine (z. B. IL-8, CXC-Chemokine) und verhindern somit die Wanderung dieser Zellen zum Ort der Entzündung. Durch diese Mechanismen entsteht eine Neutrophilenansammlung im Blut, welche bei Patienten nach Kortikosteroidgabe typischerweise beobachtet wird (FRANCHIMONT, 2004). Eosinophile und basophile Granulozyten werden durch Glukokortikoide eher zur Apoptose geführt, während Monozyten einer strikten Glukokortikoidregulierung unterliegen, da auch hier die Transmigrationsprozesse über die oben genannten Wege unterdrückt werden (FRANCHIMONT, 2004). Des Weiteren unterstützen Glukokortikoide durch Steigerung der Fähigkeit zur Antigenaufnahme und der Phagozytosekapazität die Funktion von dendritischen Zellen und Makrophagen (FRANCHIMONT, 2004). Im Rahmen der adaptiven Immunität ist die Glukokortikoidwirkung stark vom Zeitpunkt der Verabreichung und vom herrschenden Immunmilieu abhängig. Allgemein favorisieren Kortikosteroide die Ausbildung einer Th2-polarisierten Immunantwort, während der Th1-Typ über die Hemmung der IL-12-Sezernierung indirekt inhibiert wird (FRANCHIMONT, 2004; BOARDMAN et al., 2014). Außerdem wurde eine Stimulierung der Antikörperbildung (v. a. IgE) nachgewiesen. Auf der anderen Seite kontrastieren Glukokortikoide jedoch die Ausbildung einer allergischen Typ-I-Reaktion, in dem sie die

Aktion der Mastzellen unterdrücken. Somit werden die positiven Effekte dieser Wirkstoffe trotz Th2- und IgE-Stimulierung bei Patienten mit Asthma oder Atopien erklärt (FRANCHIMONT, 2004).

#### **2.4.3.2 Effekte auf die Freisetzung bestimmter Zytokine**

Ein großer Teil proinflammatorischer Zytokine (u. a. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) wird von Glukokortikoiden inhibiert. Gleichzeitig wird die Wirkung regulatorischer bzw. antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10 und TGF- $\beta$  unterstützt (FRANCHIMONT, 2004). In einer *Ex-vivo*-Studie isolierten BEWIG und BARTH (1993) Makrophagen aus der BALF von Patienten mit Atemwegsobstruktion. Unter inhalativer Flunisolid-Behandlung zeigten diese Zellen eine deutlich verringerte IL-1- und TNF-Produktion. In einer weiteren *In-vitro*-Arbeit wurden pulmonale Epithelzellen und Alveolarmakrophagen mittels Staub und LPS stimuliert und anschließend mit Glukokortikoiden inkubiert. Dabei waren sowohl Fluticason als auch Budesonid in der Lage, die Zytokinfreisetzung aus Epithelzellen (IL-6, IL-8) und Alveolarmakrophagen (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) zu reduzieren (EK et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in jüngeren Studien erzielt, in denen Budesonid die *In-vitro*-Zytokinproduktion LPS-stimulierter Blutmakrophagen bzw. -lymphozyten unterdrückte (DONNELLY et al., 2010; RÜDIGER et al., 2013). Allerdings zeigen weitere Untersuchungen, dass Glukokortikoide auch antiinflammatorische Faktoren unterdrücken bzw. die proinflammatorische Aktion neutrophiler Granulozyten unterstützen können. So demonstrierten LANGEREIS und Kollegen (2011), dass diese Zellen unter TNF- $\alpha$ -Stimulierung *in vitro* vermehrte Mengen an IL-1 $\beta$  und IL-1Ra produzieren. Anschließend wurde gezeigt, dass Dexamethason IL-1Ra deutlich effektiver inhibiert, sodass das Gleichgewicht zu Gunsten des proinflammatorischen Zytokins (IL-1 $\beta$ ) verschoben wird. Außerdem fand diese Arbeitsgruppe bei COPD-Patienten, die täglich einer inhalativen Glukokortikoidbehandlung ausgesetzt waren, deutlich niedrigere IL-1Ra-Plasma-Konzentrationen als bei asymptomatischen Rauchern bzw. gesunden Kontrollpatienten, welche keiner Therapie folgten. Zur Wirkung von Glukokortikoiden auf das proinflammatorische Interleukin-17 gibt es kontrastierende Berichte: Während LU et al. (2013) zeigten, dass die Erhöhung von IL-17 und IL-6 in der BALF von asthmatischen Mäusen durch eine intraperitoneale Dexamethason-Behandlung reduziert wird, besteht andererseits die Hypothese, dass IL-17 an der Steroidresistenz bestimmter Patienten beteiligt ist (siehe Abschnitt 2.4.2). SPEARS und Kollegen (2013) demonstrierten außerdem, dass die Inhalation von Zigarettenrauch bei Asthmapatienten ebenfalls zu einer Resistenz der Zytokine bzw. im Falle von IL-17 sogar zu einer Erhöhung der Sputumkonzentrationen infolge von oraler Dexamethason-Behandlung führt.

In der Pferdemedizin gibt es nur wenige Daten zum Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression bzw. Sezernierung proinflammatorischer Zytokine und diese widersprechen sich zum Teil. In einer Studie von COUËTIL et al. (2006) hatte eine zehntägige inhalative Therapie mit niedrig dosiertem Beclometason keinen Einfluss auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1, welche in Bronchialepithelzellen von an COB erkrankten Pferden bestimmt wurde. Die Autoren vermuten, dass die angewandte Dosis zwar für eine Besserung der Lungenfunktion, jedoch nicht für eine Verminderung der Lungenentzündung ausreichend war. GIGUÈRE und Kollegen (2002) zeigten, dass eine



inhalative Therapie mit Fluticason die IL-1 $\beta$ -Expression in der BALF von exazerbierten COB-Pferden nicht beeinflusst. Allerdings wurde in dieser Studie infolge der Behandlung eine Senkung der IL-4-mRNA bzw. eine Steigerung der IFN- $\gamma$ /IL-4-Ratio beobachtet. Dies spricht für eine Abschwächung der Th2-Immunantwort zugunsten einer Th1-Polarisierung infolge der Glukokortikoid-Verabreichung. Im Gegensatz dazu fanden PIETRA et al. (2008), dass die Transkription verschiedener Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) in der BALF von Pferden mit COB in Exazerbation infolge einer zweitägigen intramuskulären Dexamethason-Behandlung deutlich abnimmt. Im Einklang dazu beobachtete auch die Arbeitsgruppe von LAAN (2006b) nach Isolierung von Alveolarmakrophagen aus der BALF exazerbierter COB-Pferde, dass diese infolge einer inhalativen Fluticason-Behandlung verminderte Mengen an IL-1 $\beta$ - und IL-8-mRNA produzieren. Anders wurde die Transkription des Interleukin-6 in dieser Studie weder durch die Antigenstimulation noch durch die inhalative Behandlung beeinflusst. Des Weiteren untersuchten DELUCA et al. (2008) die Auswirkung einer Futterumstellung (Pellets statt Heu) mit und ohne assoziierter oraler Dexamethason-Verabreichung auf Pferde mit chronischer Atemwegsobstruktion. Dabei fanden die Autoren, dass beide Therapie-Varianten in der BALF zu einer deutlichen Abnahme der Transkription proinflammatorischer Mediatoren führten. Allerdings waren die Effekte auf einige Zytokine (u. a. IL-1 $\beta$ , IL-8) im Falle einer assoziierten Steroidtherapie stärker ausgeprägt. Eine Veränderung der IL-6-Transkription infolge der Behandlungen wurde in dieser Studie nicht beobachtet. In Bronchialepithelzellen zeigten die beiden Therapien gleiche Auswirkungen auf die bestimmten Chemokine (u. a. IL-8), allerdings konnte keine Beeinflussung pro- (TLR4) sowie antiinflammatorisch (IL-1R2) fungierender Rezeptoren nachgewiesen werden. Abschließend untersuchten BEEKMAN und Kollegen (2011) die Auswirkungen von Glukokortikoiden auf die Expression von u. a. IL-1 $\beta$  und IL-17 in der BALF von an IAD erkrankten Pferden. Dazu wurden die Patienten entweder einer systemischen Behandlung mit Dexamethason oder einer Inhalation von Fluticason für eine Dauer von 15 Tagen ausgesetzt. Dabei konnten die Autoren ausschließlich für IL-17 eine signifikante Senkung der Transkription nach Therapie darstellen.

#### **2.4.3.3 Effekte auf Procalcitonin**

Aus den meisten humanmedizinischen Studien geht hervor, dass Procalcitonin von Glukokortikoiden nicht beeinflusst wird. In einer Untersuchung an Patienten mit schwerer Sepsis wurde festgestellt, dass infolge einer sechstägigen kontinuierlichen Infusion mit Hydrokortison nur CRP signifikant niedrigere Serumkonzentrationen aufwies. Im Gegensatz dazu waren die PCT-Serum-Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt der Studie im Vergleich zur Standardtherapiegruppe und zu den Werten vor der Behandlung signifikant verändert (RINALDI et al., 2006). DE KRUIF et al. (2008) untersuchten die Konzentrationen verschiedener Biomarker im Blut gesunder Patienten, welche mittels endovenöser Applizierung von LPS stimuliert wurden. Nach Verabreichung von LPS wurde eine Steigerung aller Biomarker im Blut der untersuchten Probanden beobachtet. PCT erreichte dabei nach 24 Stunden die maximale Konzentration. Durch eine Prämedikation mit oral verabreichtem Prednisolon und regelmäßigen Blutentnahmen (alle zwei Stunden über eine Gesamtdauer von 24 Stunden nach Behandlung) konnte eine dosisabhängige Beeinflussung

aller Biomarker außer PCT festgestellt werden. Letzteres blieb über die gesamte Zeitspanne der Messungen unverändert.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Patienten mit Atemwegserkrankungen erzielt. In einer Studie über akutes Lungenversagen (ARDS) wurden einige Probanden zusätzlich zur Standardtherapie einer kontinuierlichen, niedrig dosierten Methylprednisolon-Infusion über 14 Tage ausgesetzt. Diese Kortikosteroidtherapie führte zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik und zur Reduzierung der IL-6-Plasmakonzentrationen, während PCT-Plasmawerte unverändert blieben (SEAM et al., 2012). Des Weiteren verglichen PERREN und Kollegen (2008) den zeitlichen Verlauf der PCT- bzw. CRP-Senkung bei Patienten mit COPD und ambulant erworbener Pneumonie (Therapie: Antibiotika und Steroide) und solchen mit alleiniger Pneumonie (Therapie: nur Antibiotika). Dabei fiel den Autoren auf, dass die gemessenen Marker innerhalb der sieben Untersuchungstage einem ähnlichen Verlauf folgten und somit nicht von der zusätzlichen Steroid-Behandlung beeinflusst wurden. Mit dem progressiven Verschwinden der proinflammatorischen Stimuli (i. e. bakterielle Toxine) nahm also auch die Konzentration der Entzündungsmarker im Blut der Patienten ab.

Untersuchungen zur Auswirkung von Glukokortikoiden auf Procalcitonin beim Pferd wurden bis heute, soweit der Autorin bekannt, nicht durchgeführt.

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Patientengut

68 Pferde wurden als Probanden in diese Studie eingeschlossen. Bei 53 dieser Patienten, die an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin zwischen Juni 2012 und Februar 2014 vorgestellt wurden, konnte eine Erkrankung der tiefen Atemwege festgestellt werden. Weiterhin dienten insgesamt 15 lungengesunde Pferde (davon 14 klinikeigene und ein Pferd, welches sich nach Untersuchung in der Klinik ebenfalls als lungengesund erwiesen hatte) als Kontrollgruppe. Es handelte sich dabei um 28 Stuten und 40 Wallache mit einem durchschnittlichen Alter von  $12,5 \pm 5,2$  Jahren. Durchschnittliche Größe und Gewicht lagen jeweils bei  $154,6 \pm 12,1$  cm und  $472,8 \pm 95,3$  kg. In Tabelle 39 des Anhangs sind alle untersuchten Patienten, inklusive Rasse, Geschlecht, Alter, Stockmaß, Gewicht und Vorstellungsgrund tabellarisch aufgeführt.

### 3.2 Studiendesign

Der erste, klinische Teil der Studie fand an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin statt. Dort wurden die Patienten standardisiert untersucht und nachfolgend, je nach erstellter Diagnose, in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt.

Zwölf ausgewählte Patienten wurden anschließend einer zehntägigen, inhalativen Therapie mit einem Glukokortikoid unterzogen, welche unter staubarmen Haltungsbedingungen erfolgte. Nach abgeschlossener Behandlung wurden die Patienten erneut untersucht. Dabei wurde dasselbe Untersuchungsprotokoll angewendet, wie bei Anlieferung in die Klinik, bis auf Blutbild und Thorax-Röntgen, welche nicht wiederholt wurden. Eine Belastungsuntersuchung nach Therapie wurde nur ausgeführt, wenn auffällige Werte aus der Eingangsuntersuchung vorlagen.

In Tabelle 3 ist der Ablauf der standardisierten Untersuchung schematisch dargestellt, welche an drei aufeinanderfolgenden Tagen stattfand. Die aus dem Vorbericht bekannten Haltungsbedingungen der Pferde wurden bis zum Zeitpunkt der Tracheobronchoskopie nicht verändert, um eine daraus entstehende Beeinflussung des Krankheitsbildes zu vermeiden.

Der zweite, labordiagnostische Teil der Studie wurde im Helmholtz-Zentrum München durchgeführt. Hier konnten die im klinischen Teil gesammelten Blut- und BALF-Proben mittels spezies-spezifischer ELISA-Tests auf die Konzentrationen des Entzündungsmarkers Procalcitonin und der Interleukine 1 $\beta$ , 6 und 17 untersucht werden. Vorlagen der angewandten Untersuchungsprotokolle (1-6) sowie eine Liste mit detaillierten Angaben zu den benutzten Materialien (Abschnitt 9.3) finden sich im Anhang.

Tab. 3: Schematische Darstellung des dreitägigen Untersuchungsprotokolls.

Tag	Durchgeführte Untersuchungen
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Klinische Allgemeinuntersuchung und I. klinische Untersuchung der Atemwege</li> <li>– Blutuntersuchung und Entnahme von venösen Blutproben</li> <li>– I. arterielle Blutgasanalyse</li> <li>– Belastungstest mit Messung des Laktats vor und nach Belastung</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>– II. klinische Untersuchung der Atemwege</li> <li>– II. arterielle Blutgasanalyse</li> <li>– Röntgen der Lunge</li> <li>– Intrapleuraldruckmessung</li> <li>– Endoskopische Untersuchung der tiefen Atemwege und Entnahme von TBS- und BALF-Proben</li> <li>– Zytologische Untersuchung von TBS und BALF</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>– III. klinische Untersuchung der Lunge</li> <li>– III. arterielle Blutgasanalyse</li> </ul>

### 3.3 Klinische Untersuchungen

#### 3.3.1 Allgemeine Untersuchungen

##### 3.3.1.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Zu Beginn der allgemeinen Untersuchung wurden die Kennzeichen des Pferdes aufgenommen sowie Angaben zum Vorbericht und eventuell stattgefundenen Vorbehandlungen erfragt.

Bei der allgemeinen Untersuchung wurde besonders auf Körperhaltung, Verhalten, Entwicklungs-, Ernährungs- und Pflegezustand geachtet. Das Herz wurde auskultiert und Atemfrequenz sowie innere Körpertemperatur ermittelt. Die Kopfschleimhäute wurden beurteilt und die kapilläre Rückfüllungszeit gemessen. Körperoberflächentemperatur und Hautturgor wurden überprüft und die Zeichnung der Episkleralgefäße kontrolliert. Abschließend wurden die Kehlganglymphknoten hinsichtlich Größe, Konsistenz, Verschieblichkeit und Schmerzhaftigkeit palpiert.

### 3.3.1.2 Blutuntersuchung und venöse Blutproben

Im Rahmen der allgemeinen Untersuchung wurden venöse Blutproben aus der Jugularvene entnommen. Dafür wurde im oberen Halsdrittel die Vene gestaut und oberhalb davon die Kanüle (Sterican®, 1,2 x 40 mm) in einem 45° Winkel eingeführt.

Um infektiöse Krankheitsgeschehen auszuschließen, wurde ein Blutbild erstellt (Automated Haematology Analyzer pochH-100iVDiff, Sysmex Europe GmbH, Bornbach, Deutschland). Dabei wurde vor allem auf Abweichungen in der Leukozytenzahl geachtet. Hämatokrit und Gesamteiweiß wurden manuell bestimmt. Dafür wurde ein Teil der Blutprobe auf zwei Glaskapillaren verteilt und diese zentrifugiert (Haemofuge, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde der Hämatokritwert mittels Auswertscheibe abgelesen und das Gesamteiweiß mit einem Handrefraktometer (HRM 18, Eickemeyer – Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen, Deutschland) gemessen.

Bei 18 Pferden erfolgte außerdem eine Messung der Procalcitonin-Konzentrationen im venösen Blut. Diese Proben wurden zusätzlich zehn Minuten bei einer Geschwindigkeit von 25.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Rotofix 32, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), jeweils 1 ml Plasma abpipettiert (Einweg Plasma-Pipetten Pasteur, 3 ml), in Kryo-Rörchen (neoLab®, 1,5 ml, 44 x 11 mm) umgefüllt und diese in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur von -20° C gelagert.

### 3.3.2 Spezielle Untersuchung der Atemwege

#### 3.3.2.1 Klinische Untersuchung der Atemwege

Durch die Adspektion wurde eventuell bestehender Nasenausfluss hinsichtlich Lokalisation, Menge und Charakter beurteilt. Weiterhin wurde auf den Atemtyp (abdominal, kostal, kostoabdominal) und auf das Vorhandensein einer Dyspnoe geachtet. Typische Anzeichen, die für das Beurteilen einer Dyspnoe herangezogen wurden, waren ein deutliches Aufblähen der Nüstern, Einziehung der Interkostalräume und Afteratmung (inspiratorische Dyspnoe) oder Doppelschlägigkeit, Dampf Rinne und Afteratmung (expiratorische Dyspnoe). Auf das Vorkommen auffälliger Geräusche (*Stridores*) bei der Atmung wurde ebenfalls geachtet. Sowohl das Auftreten von spontanem Husten als auch ein Hustenreiz, durch manuellen Druck auf die erste Trachealspange provoziert, wurden protokolliert. Die Lungenauskultation erfolgte Seiten vergleichend und es wurde besonders auf verschärfte oder abnorme Atemgeräusche geachtet. Larynx und Trachea wurden ebenfalls auskultiert. Des Weiteren wurde das Lungenfeld perkutiert, um eine mögliche Erweiterung der kaudoventralen Lungengrenzen zu erfassen. Abschließend wurde eine CO<sub>2</sub>-Rückatmungsprobe durchgeführt. Dazu wurden Maul und Nüstern für eine Minute mit einem Nylon-Beutel umschlossen und unmittelbar nach Befreiung die Lunge auskultiert. Bei vertiefter Atmung konnten somit eventuell vorhandene und sonst schwer erkennbare, abnorme Atemgeräusche erfasst werden.

### 3.3.2.2 Arterielle Blutgasanalyse

Zur Gewinnung von arteriellem Blut wurde die *Arteria carotis communis* auf der rechten Halsseite eine gute Handbreit oberhalb des Übergangs von Hals in Brust über der Stelle des sichtbaren Karotispulses punktiert. Dabei wurde die Kanüle (Sterican®, 0,7 x 30 mm) in Richtung des gegenüberliegenden Hüfthöckers eingeführt und das Blut in drei Glaskapillarröhrchen möglichst blasenfrei gesammelt.

Unmittelbar nach Entnahme erfolgte die Auswertung der arteriellen Blutproben durch ein Analysegerät (Cobas b 123, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland), welches Sauerstoff- ( $\text{PaO}_2$ ) und Kohlendioxid-Partialdruck ( $\text{PaCO}_2$ ) in mmHg ermittelte. Außerdem wurde durch das Gerät auch die alveolo-arterielle Sauerstoff-Druckdifferenz ( $\text{AaDO}_2$ ), ebenfalls in mm Hg, berechnet, welche wegen der höheren Aussagekraft auch im angewandten Score-System zur Schweregradeinteilung der Atemwegserkrankung einbezogen wurde. Die arteriellen Werte für pH und Bikarbonat wurden untersucht, um mögliche Störungen des Säure-Basen-Haushalts bei den Patienten zu identifizieren.

Um bekannte Schwankungen der arteriellen Blutwerte zu berücksichtigen, wurde immer der Mittelwert aus den einzelnen Messungen berechnet.

### 3.3.2.3 Belastungstest

Wenn möglich, wurde im Rahmen der Untersuchungen ein Belastungstest durchgeführt. Dabei wurden zunächst Puls- und Atemfrequenz in Ruhe aufgenommen und anschließend das Pferd nach einem standardisierten Protokoll (kurze Aufwärmphase im Schritt, zehn Minuten Trab, fünf Minuten Galopp) an der Longe belastet. Anschließend wurden Puls- und Atemfrequenz unmittelbar nach Belastung und dann alle fünf Minuten folgend über den Zeitraum einer halben Stunde erfasst. Der Belastungstest wurde als auffällig gewertet, wenn nach 20 Minuten die physiologischen Ruhewerte nicht wieder erreicht waren.

Außerdem wurde sowohl vor als auch unmittelbar nach der Belastung der Laktatwert aus venösen Blutproben ermittelt, um eventuelle Veränderungen infolge muskulärer Erkrankungen aufzudecken. Die für die Laktat-Bestimmung entnommenen Blutproben wurden ebenfalls im klinikeigenen Labor analysiert (Cobas b 123, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland). Bei erhöhten Laktatwerten nach Belastung ( $\geq 4$  mmol/l) wurden außerdem die muskelspezifischen Enzyme Creatinkinase (CK) und Aspartat-Aminotransferase (AST) vier und 24 Stunden nach Belastung, ebenfalls in venösen Blutproben, gemessen (Reflotron®, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland).

### 3.3.2.4 Röntgenologische Untersuchung der Lunge

Mit einer digitalen Röntgenanlage (Gierth HF 400 ML, Gierth X-Ray International GmbH, Riesa) wurden zwei Thorax-Aufnahmen (kaudodorsale und kaudoventrale Projektion) angefertigt, um die Lunge darzustellen. Die Geräteeinstellung lag bei 90 kV, 0,3 mAs und der Film-Fokus-Abstand bei circa 1,5 m. Bei der Beurteilung der Röntgenbilder wurde besonders

auf das Vorhandensein interstitieller Verschattungen und auf Verdickungen der Bronchialwand geachtet (GEHLEN et al., 2009). Für eine bessere Beurteilung der Röntgenbilder wurde eine numerische Graduierung erstellt, wie in Tabelle 4 erläutert. Somit wurde jedem Pferd sowohl für Veränderungen im Lungeninterstitium als auch Verdickungen der Bronchialwände, je nach Stärke der vorliegenden Befundausrprägung, eine Zahl von 0 bis 3 vergeben. Des Weiteren wurden die Röntgenbilder zweimal beurteilt: Zum einen direkt nach der Erstellung und anschließend ein zweites Mal in verblindeter Form, um jegliche Beeinflussung der Befundungen zu vermeiden. Die Ergebnisse der verblindeten Auswertung fanden schließlich Eingang in die statistischen Berechnungen.

Tab. 4: Numerische Graduierung zur Beurteilung der Ausprägung der Röntgenbefunde.

Ausprägung der Befunde	Ausdruck in Zahlen
ohne besonderen Befund	0
geringgradig	1
mittelgradig	2
hochgradig	3

### 3.3.2.5 Intrapleuraldruck-Messung

Zur Untersuchung der Lungenfunktion wurden die bisher noch unsedierten Patienten in einem Untersuchungsstand fixiert. Mittels Ösophagussonde und angeschlossenen Pneumotachograph („Venti-Graph“, Modell PG100/REC, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) konnten Druckdifferenzen in cm H<sub>2</sub>O gemessen werden.

Die auf Höhe der Herzbasis erfassten Druckdifferenzen korrelieren mit der thorakalen Druckdifferenz ( $\Delta p_{PI_{max}}$ ), welche zwischen Inspiration und Expiration entsteht. Anhand der gemessenen Werte sind Aussagen bezüglich des Schweregrads der vorliegenden Lungenerkrankung möglich. Intrapleuraldruckdifferenz (IPD)-Werte über 4 cm H<sub>2</sub>O wurden als pathologisch angesehen. Werte über 15 cm H<sub>2</sub>O gelten als charakteristisch für COB in Exazerbation.

### 3.3.2.6 Endoskopie und bronchoalveoläre Lavage

Nach erfolgter Lungenfunktionsuntersuchung wurden die Pferde mit einer Kombination aus Detomidin (Cepesedan®RP, 0,02 mg/kg, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) und Levomethadon (L-Polamivet®, 0,05-0,075 mg/ 100 kg, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) intravenös sediert, um den Hustenreiz für die im Anschluss an die Endoskopie erfolgende bronchoalveoläre Lavage zu reduzieren.

Ein flexibles Endoskop (Länge 2,7 m, Durchmesser 0,9 cm, Videomed GmbH, München, Deutschland) wurde durch den ventralen Nasengang bis zur Aufzweigung der Trachea vorsichtig vorgeschoben. Dabei wurde vor allem auf Farbe und Beschaffenheit der tracheobronchialen Schleimhaut, auf die Breite der *Carina tracheae* und auf Menge, Viskosität und Lokalisation des tracheobronchialen Sekrets geachtet.

Zur besseren Interpretation der erhobenen Befunde wurde das von DIECKMANN (1987) entwickelte Score-System herangezogen. Dieser, in einer Studie von GERBER et al. (2004) nochmals validierte Score, berücksichtigt sowohl die Sekretmenge als auch die laut GERBER und Kollegen (2004) weniger aussagekräftige Sekretviskosität und ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die anhand des DIECKMANN-Scores (1987) vergebenen Punktzahlen wurden dann auch in das Score-System zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung mit einbezogen. Dabei wurde das Schema in Tabelle 8 verfolgt.

Im Rahmen der Endoskopie erfolgte weiterhin die Entnahme einer Tracheobronchialsekretprobe. Zur Vorbereitung auf die folgende Durchführung einer bronchoalveolären Lavage wurde die Schleimhaut abschließend im Bereich der Aufzweigung in die Hauptbronchien durch lokale Applikation von 20 ml Lidocain (Lidocain 2 % N Belapharm, ReboPharm Arzneimittelvertriebsgesellschaft mbH, Bocholt, Deutschland) mittels eines Katheters im Arbeitskanal des Endoskops anästhesiert.

Mit einem sterilen Ballonkatheter aus Silikon (SurgiVet®, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland) erfolgte die Durchführung der bronchoalveolären Lavage. Dieser Katheter, durch den ventralen Nasengang so tief wie möglich in den Bronchialbaum vorgeschoben, wurde anschließend dort mittels eines aufblasbaren Ballons fixiert. Folgend wurden 500 ml steriler, körperwarmer, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, BioWhittaker®, Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) fraktioniert eingegeben und unmittelbar mittels steriler 100 ml Spritzen wieder aspiriert. Die Menge der zurückgewonnenen Spülprobe wurde notiert und die BAL-Flüssigkeit im klinikeigenen Labor untersucht. Die Pferde erhielten nach Durchführung der Lavage mindestens einen Tag Boxenruhe und es erfolgten regelmäßige Kontrollen der inneren Körpertemperatur.

### 3.3.2.7 TBS- und BALF-Analyse

Die TBS- und BALF-Proben wurden unmittelbar nach Entnahme im klinikeigenen Labor verarbeitet.

Die BALF diente neben der zytologischen Untersuchung zur Erstellung von *aliquots* für die Bestimmung von Entzündungsmarkern. Dazu wurde zunächst ein Teil der gewonnenen Spülprobe auf 15 ml-Tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verteilt und mittels Kältezentrifuge (Z326K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehlingen, Deutschland) für zehn



Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1.500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Somit wurde die BALF auf eine Temperatur von 4° C gebracht. Jeweils 1 ml des zellfreien Überstands wurde dann in Kryo-Röhrchen (neoLab® Reaktionsgefäße, 1,5 ml, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Um die Erhaltung der zu bestimmenden Parameter in den Proben bis zum Zeitpunkt der Durchführung der ELISA-Tests zu gewährleisten, wurden diese anschließend bei einer Temperatur von -80° C gelagert. Der restliche Teil der BALF wurde zur Herstellung von Austrichpräparaten für die zytologische Untersuchung angewandt. Dafür wurden weitere, mit BALF gefüllte 15 ml-*Tubes* zunächst zehn Minuten bei einer Geschwindigkeit von 25.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Rotofix 32, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Nachdem der flüssige Überstand verworfen wurde, konnte das zellreiche Sediment, bei Bedarf nach vorsichtiger Resuspension, auf Objektträger ausgestrichen werden.

Außerdem wurden für jedes Pferd aus den entnommenen TBS-Proben Ausstriche hergestellt.

Nach Lufttrocknung der angefertigten BALF- und TBS-Ausstriche wurden diese nach May-Grünwald-Giemsa angefärbt und anschließend hinsichtlich Zellmenge und -muster mikroskopisch untersucht (Mikroskop Olympus BX41TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Dabei wurde zunächst mittels 100-facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl geschätzt. Durch das Zählen von insgesamt 400 Zellen pro Präparat (Zell-Counter AC-8, Karl-Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland) bei 1.000-facher Vergrößerung und Ölimmersion erfolgte abschließend die Erstellung eines prozentualen Differentialzellbildes.

### 3.3.3 Score-System

Anhand der Tag für Tag erhobenen klinischen Befunde wurden alle Patienten zunächst mittels einer modifizierten Version des Untersuchungs-Scores nach OHNESORGE et al. (1998) (Tabelle 6) beurteilt. Für jeden Untersuchungstag wurden Punktzahlen, je nach Ausprägung verschiedener, klinischer Befunde verteilt. Die Endpunktzahl für jedes Pferd ergab sich dann aus dem Mittelwert der für die einzelnen Untersuchungstage errechneten Gesamtpunktzahlen. Anhand der Score-Punkte, konnten die Pferde nach Schweregrad der Erkrankung eingeteilt werden (Tabelle 7).

Tab. 5: Beurteilung der endoskopischen Befunde nach DIECKMANN (1987).

<b>Sekretmenge</b>	<b>Punkte</b>	<b>Sekretviskosität</b>
keine Sekretansammlungen, keine Sekretflocken	<b>0</b>	Schleimhaut feucht, nur geringe Mengen wässrigen Sekretes aspirierbar
keine Sekretansammlungen, einzelne Sekretflocken	<b>1</b>	Schleimhaut feucht, einzelne feine Sekretflocken in wässrigem Sekret, leicht aspirierbar
flache ventrale Sekretansammlung, einzelne größere Sekretflocken	<b>2</b>	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret, ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar
deutliche ventrale Sekretansammlung, reichlich Sekretflocken	<b>3</b>	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret mit einzelnen konsistenteren Sekretflocken, ventral gelegen, leicht aspirierbar
durchgehende ventrale Sekretstraße, Sekretseebildung	<b>4</b>	Schleimhaut feucht / pappig, muköses bis mukopurulenten Sekret, einige dorsale Schleimflocken, deutlich erschwerte Aspiration
mehr als ein Viertel des Tracheallumens füllende(r) Sekretstraße/- see	<b>5</b>	Schleimhaut pappig / trocken, muköses bis purulenten Sekret, reichlich dorsale Schleimflocken, z. T. spinnwebartige Schleimformationen, erschwerte Aspiration (kaum noch möglich)

Tab. 6: Modifiziertes Score-System nach OHNESORGE et al. (1998).

Untersuchung	Befund	Punktzahl	Score		
			Tag 1	Tag 2	Tag 3
Hustenauslösung (max. 1 Punkt)	nicht auslösbar	0			
	mehrfach auslösbar	1			
	Auswurf	1			
	spontaner Husten	1			
Ruhedyspnoe (max. 3 Punkte)	abdominale Atmung	1			
	verlängerte Expiration	1			
	einsinkende ICR	3			
	Nüsternblähen	3			
	Dampfrinne	3			
	Afteratmung	3			
Lungenperkussion (max. 2 Punkte)	Erweiterung 3 Finger	0			
	Erweiterung handbreit	1			
	Dämpfung	2			
Lungenauskultation (max. 2 Punkte)	Rasseln	2			
	Knistern	2			
	Giemen	2			
Tracheobronchoskopie (max. 2 Punkte)	Sekret deutlich vermehrt u./o. mäßig viskös	1			
	Sekret hgr. vermehrt u./o. zähviskös	2			
	<i>Carina tracheae</i> deutlich verdickt	1			
BAL (max. 3 Punkte)	Neutrophile < 10 %	0			
	Neutrophile 10 - 15 %	1			
	Neutrophile 15 - 25%	2			
	Neutrophile > 25%	3			
Blutgasanalyse (max. 2 Punkte)	AaDO <sub>2</sub> 7 - 14 mmHg	1			
	AaDO <sub>2</sub> > 14 mmHg	2			

Tab. 7: Einteilung der Patienten nach unterschiedlichen Krankheitsgraden anhand von Score-Punkten, modifiziert nach OHNESORGE et al. (1998).

Score	Grad der Erkrankung
0 - 1	gesund
2 - 3	geringgradig
4 - 6	mittelgradig
7 - 14	hochgradig

Tab. 8: Übertragung der Punktzahlen aus dem DIECKMANN-Score (1987) in das modifizierte Score-System nach OHNESORGE et al. (1998).

Punktzahl Score nach DIECKMANN	Punktzahl mod. Score nach OHNESORGE
0 - 1	0
2 - 3	1
4 - 5	2

### 3.3.4 Diagnosestellung und Einteilung in Gruppen

Abschließend wurden die Patienten anhand der Befunde der klinischen und zytologischen Untersuchungen in fünf verschiedene Diagnose-Gruppen eingeteilt. Dabei wurden Pferde mit verändertem Säure-Basen-Haushalt oder Patienten mit deutlichen Anzeichen für eine systemische Erkrankung grundsätzlich ausgeschlossen (mit Ausnahme von Gruppe 5).

Nach welchen Kriterien die Einteilung in die einzelnen Gruppen erfolgte, soll folgend dargestellt werden.

#### 3.3.4.1 Gruppe 1: „Lungengesund“

Als lungengesund galten Pferde, die weder in der klinischen noch in der endoskopischen Untersuchung auffällige Befunde zeigten. Weiterhin ergab sich bei diesen Patienten ein nach ROBINSON (2001) definiertes normales zytologisches Bild der BALF-Abstriche (geringer Zellgehalt und geringe Viskosität bei < 5 - 10 % neutrophile Granulozyten, ca. 35 % Lymphozyten und ca. 60 % Makrophagen).

### 3.3.4.2 Gruppe 2: „RAO oder COB in Exazerbation“

Zur Einteilung in diese Gruppe wurde darauf geachtet, dass die ebenfalls von ROBINSON (2001) beschriebenen „*criteria for defining the heaves phenotype*“ erfüllt waren. Dazu zählten zum einen sichtbare Anzeichen einer Atemwegsobstruktion in Ruhe, im Sinne von deutlich erkennbarer Dyspnoe und/oder  $\Delta pP_{i_{max}}$ -Werte  $\geq 15$  mm H<sub>2</sub>O. Weitere Kriterien für eine RAO bzw. COB in Exazerbation waren außerdem veränderte arterielle Blut-Parameter und eine ausgeprägte Neutrophilie in der bronchoalveolären Lavage ( $> 25$  % neutrophile Granulozyten).

### 3.3.4.3 Gruppe 3: „IAD oder COB in Remission“

Wenn bei den Patienten geringgradige Befunde festgestellt wurden, jedoch keine Kriterien für eine COB in Exazerbation erfüllt waren, wurden diese Gruppe 3 zugeteilt. Dabei wurden die von COUËTIL et al. (2007) im *consensus statement* des *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) beschriebenen Leitlinien zur *inflammatory airway disease* beachtet. Demnach waren wichtige Kriterien zum Einschluss in diese Gruppe: Leistungsinsuffizienz und/oder Husten, nur geringgradige bis mittelgradige Befunde bei der klinischen Untersuchung der Atemwege, eine arterielle Hypo- oder Normoxie und ein typisches Zellmuster in der BAL-Zytologie ( $> 8$  und  $< 20$  % neutrophile Granulozyten und/oder  $> 2$  % Mastzellen und/oder  $> 0,1$  % eosinophile Granulozyten).

### 3.3.4.4 Gruppe 4: „Chronisch interstitielle Pneumopathie“

Zur Charakterisierung der chronisch interstitiellen Pneumopathie (CIP) wurden folgende Einschlusskriterien beachtet: Vorberichtliche Leistungsinsuffizienz, ein unauffälliges klinisches Bild, keine oder leichte Veränderungen der arteriellen Blutgase, eine röntgenologisch sichtbare interstitielle Lungenzeichnung (Röntgen-Score  $\geq 2$ ) und ein erhöhter Anteil an Makrophagen in der BALF (DIECKMANN et al., 1990; WILKINS und LASCOLA, 2015).

### 3.3.4.5 Gruppe 5: „Akute oder subakute Pneumonie“

In diese Gruppe wurden Pferde aufgenommen, deren klinische Befunde für eine (sub)-akute Infektion der Lunge sprachen, wie z.B. Mattigkeit, und purulenter Nasenausfluss bzw. dickflüssiges und flockenreiches Sekret in der Trachea. Außerdem erfolgte bei diesen Pferden ein mikrobiologischer Nachweis pathogener Keime in der bronchoalveolären Lavage.

## 3.3.5 Inhalative Therapie

Zwölf ausgewählte Patienten, davon acht Pferde mit diagnostizierter COB in Exazerbation und vier Pferde aus der Gruppe „IAD oder COB in Remission“, wurden zusätzlich einer inhalativen Therapie mit dem Glukokortikoid Budesonid (Pulmicort®, 1 mg/2 ml Suspension, 3  $\mu$ g/kg KGW, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) unterzogen. Diese Pferde wurden mittels Inhalationsmaske (SaHoMa®-II, Typ HM-210, NEBU-TEC International med. Produkte Eike Kern GmbH, Eisenfeld, Deutschland) zweimal täglich über zehn Tage inhaliert und gleichzeitig unter optimierten Haltungsbedingungen aufgestellt. Um einen Vergleich zwischen dem Krankheitszustand vor und nach Therapie darzustellen, wurde am letzten Tag der Inhalation mit

einer klinischen Untersuchung der Pferde begonnen. Diese wurde gemäß aufgeführtem Untersuchungsprotokoll (Tabelle 3), wie bei erstmaliger Anlieferung in die Klinik, durchgeführt und idealerweise über drei Tage fortgesetzt. Blutuntersuchung und Lungenröntgen wurden dabei nicht wiederholt. Eine Belastungsuntersuchung wurde nur erneut durchgeführt, wenn sie bei der Erstuntersuchung auffällig gewesen war.

### **3.4 Labordiagnostik**

#### **3.4.1 Sandwich-ELISA**

Die gesammelten Blut- und BALF-Proben wurden im Helmholtz-Zentrum München mittels spezieller *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISAs) auf die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker untersucht. Diese antikörperbasierten Nachweisverfahren beruhen alle auf demselben Prinzip: Das Antigen (in diesem Fall der zu bestimmende Entzündungsmarker) wird zwischen einem an der Platte gebundenen Antikörper (Fängerantikörper) und einem weiteren, erst später dazugegebenen Antikörper (Detektionsantikörper) gefangen. Der Detektionsantikörper ist biotinyliert und in einem weiteren Schritt bindet daran ein Enzym, welches ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Dieser Farbumschlag kann abschließend photometrisch erfasst werden und ermöglicht indirekt, anhand einer Kalibrierungskurve, eine Quantifizierung der Konzentration des zu bestimmenden Antigens.

#### **3.4.2 ELISA zur Quantifizierung von equinem Procalcitonin**

Die Bestimmung der Procalcitonin-Konzentrationen aus den gesammelten Proben erfolgte mittels des von RIEGER et al. (2014) entwickelten Sandwich-ELISAs. Dieser Test, der zur Bestimmung von Procalcitonin-Konzentrationen in Plasmaproben von septischen Pferden entwickelt und validiert wurde, konnte in dieser Studie erstmals auch für Messungen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit lungenkranker Patienten angewendet werden. Eine statistische Charakterisierung des Verfahrens für die Anwendung mit BALF-Proben fand im Rahmen der durchgeführten Messungen ebenfalls statt.

Im Folgenden werden beide Prozeduren für die Quantifizierung von PCT, sowohl in Plasmaproben als auch in BALF, näher beschrieben.

##### **3.4.2.1 Protokoll für die Messung von Procalcitonin in Blutplasma**

Der ELISA wurde auf einer 96-well *high binding* Mikrotiterplatte (F96 MaxiSorp Nunc Immunoplate, Nunc A/S, Dänemark) durchgeführt.

Als erster Schritt wurde der Fängerantikörper CALCA-3C5 zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml in einem Carbonat-Puffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,7) verdünnt, davon 100 µl/well auf die Platte verteilt, diese abgedeckt und bei einer Temperatur von 4° C über Nacht inkubiert.

Am Morgen wurde die Platte zunächst mit einer automatisierten Maschine (ELx405 Auto Plate Washer, BIO-TEK Instruments GmbH, Deutschland) einem Waschgang unterzogen. Dieser erfolgte mit jeweils drei Mal 200 µl/well einer Waschlösung, bestehend aus 4 mM

phosphatgepufferter Salzlösung (PBST; 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM NaCl; pH 7,6) und 0,05% (v/v) Tween®20.

Nach kräftigem Abklopfen, um mögliche Residuen der Waschlösung zu entfernen, wurde die Platte mit einem *Blocking*-Reagenz (300 µl/well) für eine Stunde bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln (450 rpm) inkubiert, um eventuell freigebliebene, unspezifische Bindungsstellen zu eliminieren. Dafür wurde Bovines Serum-Albumin (BSA, 3,3 %ige Verdünnung) in 40 mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7,6) gelöst.

Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und 100 µl/well der Standardreihe und der verdünnten Proben, jeweils im dreifachen Satz zügig aufgetragen. Die Standardreihen wurden in *low binding* Tubes hergestellt. Dazu wurde das equine rekombinante PCT (erPCT) mit Plasma eines gesunden Pferdes (0-Plasma) vermischt und Verdünnungsreihen von 0, 1, 10, 50, 100, 250, 500, 1.000, 5.000, 10.000 und 50.000 ng/ml erstellt. Die zu untersuchenden Plasmaproben wurden ebenfalls mit 0-Plasma in verschiedenen Stufen (100%, 10% und 1%) verdünnt. Sowohl der Standard als auch die Plasmaproben wurden zu Beginn des Verdünnungsprozesses mit dem Ratten-Antikörper CAD8-7H1 in einer Konzentration von 50 µg/ml versetzt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur, konstantem Schütteln und schließlich Waschen der Platte konnten 100 µl/well des biotinylierten Detektionsantikörpers CALCA-4F6-B (1:2000 Verdünnung in 40 mM PBS) aufgetragen und erneut inkubiert werden (eine Stunde, Raumtemperatur, 450 rpm). Anschließend fand ein weiterer Waschvorgang statt, nach dem 100 µl/well Avidin-*horseradish peroxidase* (HRP)-Lösung (50 ng/ml Avidin-HRP auf 40 mM PBS) auf die Platte pipettiert wurden und diese wieder bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln (450 rpm) für eine Stunde inkubiert.

Abschließend wurde die Platte ein letztes Mal gewaschen und mit 100 µl/well 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung beschichtet. Die Substratlösung stellte sich her aus 25 ml 0,1 M Natrium-Azetat-Puffer (pH 5,5), 100 µl 1%iges Wasserstoffperoxid und 400 µl TMB-Stammlösung (in DMSO aufgelöst, in einem Verhältnis von 6 mg TMB pro ml DMSO).

Mit aufgetragenem Substrat und folgender Blaufärbung wurde die Platte unter Lichtabschluss inkubiert und nach 5 Minuten der Farbumschlag mittels 50 µl/well 2 M Schwefelsäure gestoppt.

Die Farbabsorption des nun gelben Produktes konnte mit einem Photospektrometer (SpectraMax M5<sup>e</sup> Microplate Reader, Molecular Devices Analytical Technologies GmbH, Deutschland) bei 450 nm gemessen werden und die Ergebnisse mittels spezieller Software (SoftMax® Pro v5.2, Molecular Devices, USA) ausgewertet werden.

#### **3.4.2.2 Protokoll für die Messung von Procalcitonin in der BALF**

Zur Bestimmung von Procalcitonin-Konzentrationen in BALF-Proben wurde dasselbe Protokoll benutzt wie oben beschrieben. Der einzige Unterschied bestand in der Herstellung der Standardreihen (0 bis 50.000 ng/ml) und der Verdünnungen der BALF-Proben (100%, 10% und 1%). In diesem Fall wurde als Matrix bzw. Verdüner ausschließlich phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7,6) angewandt und es erfolgte keine Zugabe des Ratten-Antikörpers CAD8-7H1. Außerdem wurde, im Vergleich zu den

Plasmaproben, nach Applikation der Substrat-Lösung ein etwas später einsetzender Farbumschlag beobachtet. Daher wurde die Reaktion erst nach etwa 7 Minuten gestoppt.

### **3.4.2.3 Charakterisierung des ELISAs für die Anwendung mit BALF**

Um die Präzision und Reproduzierbarkeit des ELISAs bei der erstmaligen Anwendung mit BALF-Proben zu überprüfen, wurden durch einen separaten Versuch die wichtigen Variationskoeffizienten  $IaA-CV$  (Intra-Assay Variationskoeffizient) und  $IeA-CV$  (Inter-Assay Variationskoeffizient) ermittelt.

Dafür wurden drei 96-well *high binding* Mikrotiterplatten (F96 MAxisorp Nunc Immunoplate, Nunc A/S, Dänemark) angewandt, auf die jeweils 100  $\mu\text{l}$ /well desselben Probensatzes, in den jeweiligen Konzentrationen 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ng/ml aufgetragen wurden. Die drei Standardreihen wurden dagegen einzeln erstellt (0 bis 50.000 ng/ml) und ebenfalls auf die Platten verteilt (100  $\mu\text{l}$ /well). Als Matrix bzw. Verdünner für die Proben wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 35 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7,6) angewandt und das Protokoll wie oben beschrieben verfolgt. Dadurch konnte festgestellt werden, wie hoch die prozentualen Standardabweichungen von Messwerten einzelner Konzentrationen innerhalb einer Platte waren ( $IaA-CV$ ). Des Weiteren konnte die Präzision von Einzelmessungen identischer Proben auf verschiedenen Platten verglichen werden ( $IeA-CV$ ).

### **3.4.3 ELISA zur Quantifizierung verschiedener Interleukine**

Zur Messung der Konzentrationen der Interleukine 1 $\beta$ , 6 und 17 in den bronchoalveolären Spülproben wurden drei kommerzielle, für das Pferd spezifische Kits der Marke USCN (Uscn Life Science Inc., Hubei, PRC) angewandt. Die drei Tests wurden gemäß Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Da die Protokolle der drei ELISAs sich kaum voneinander unterscheiden, soll hier nur eine kurze Darstellung des allgemeinen Vorgehens exemplarisch aufgeführt werden.

#### **3.4.3.1 Protokoll für die Messung von Interleukinen in der BALF**

Zunächst wurden die benötigten Reagenzien sowie die Standardreihe gemäß Anleitung hergestellt.

Auf die schon mit einem Fängerantikörper beschichtete und geblockte Platte wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$ /well der Standardreihe und der Proben aufgetragen und für zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Dabei wurden die Proben in unverdünnter Form eingesetzt.

Danach wurde die Flüssigkeit von der Platte durch Abpipettieren und Ausklopfen gründlich entfernt, ohne diese jedoch zu waschen und 100  $\mu\text{l}$ /well eines an Biotin gebundenen Detektionsantikörpers hinzugefügt.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37° C wurde die Platte drei Mal per Hand gewaschen, ausgeklopft und mit 100  $\mu\text{l}$ /well eines Avidin-HRP-Konjugats beschichtet. Damit wurde die Platte, diesmal nur für 30 Minuten, erneut bei 37° C inkubiert und anschließend fünf Waschgängen unterzogen.

Nun wurden 90  $\mu\text{l}$ /well Substratlösung auf die Platte verteilt und diese bei 37° C und unter Lichtabschluss bewahrt, bis eine blaue Verfärbung beobachtet wurde.



Abschließend wurde der Farbumschlag mit 50 µl/well einer Stopplösung unterbrochen und die Farbabsorption der jetzt gelb gefärbten Platte, wie oben beschrieben, mittels Photospektrometer (SpectraMax M5<sup>e</sup> Microplate Reader, Molecular Devices Analytical Technologies GmbH, Deutschland) bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden, auch in diesem Fall, unter Anwendung einer speziellen Software (SoftMax<sup>®</sup> Pro v5.2, Molecular Devices, USA) dargestellt.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Statistik-Programm IBM SPSS Statistics 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Zu Beginn der Auswertung wurden alle intervallskalierten Daten auf Normalverteilung geprüft. Dazu wurde zum einen beurteilt, ob die für die verschiedenen Stichproben erstellten Histogramme einer Gauß'schen Glockenkurve folgten, was für eine Normalverteilung der Daten charakteristisch ist. Eventuelle Abweichungen zwischen Mittelwert und Median, Standardabweichung und Symmetrie des Datensatzes wurden ebenfalls berücksichtigt. Abschließend wurde mittels Kolmogorov-Smirnov- bzw. Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob eine Normalverteilung der Daten vorlag ( $p > 0,05$ ) oder nicht ( $p \leq 0,05$ ). Dabei wurde wegen der eher kleinen Stichproben ( $n < 40$ ) meist der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Daraufhin wurden normalverteilte Daten mit Mittelwert und Standardabweichung, nicht normalverteilte Daten mit Median sowie Minimum und Maximum dargestellt.

Für die schließende Statistik wurde ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen, d. h. die Null-Hypothese (kein Unterschied zwischen den Gruppen) wurde bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  abgelehnt und davon ausgegangen, dass die Alternativhypothese gültig ist. Dabei wurde zwischen statistisch signifikanten ( $p \leq 0,05$ ), hochsignifikanten ( $p \leq 0,01$ ) bzw. höchstsignifikanten ( $p \leq 0,001$ ) Unterschieden differenziert.

Bei Annahme von Normalverteilung wurde für den Vergleich von zwei Gruppen der Student's t-Test verwendet, bei nicht normalverteilten oder ordinalskalierten Daten der Mann-Whitney-U-Test. Beim Vergleich mehrerer Gruppen und nicht normalverteilten oder ordinalskalierten Daten wurde der Kruskal-Wallis-H-Test angewandt. Hier erfolgte anschließend eine *Post-hoc*-Analyse mittels Dunnett-Tests, um eventuelle Signifikanzen in den paarweisen Vergleichen darzustellen. Bei Vorliegen einer Normalverteilung intervallskalierter Daten wurde hierzu die einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) mit anschließender *Post-hoc*-Analyse (Tukey-Tests) gewählt. Im Falle nominalskalierter Daten wurden Gruppenunterschiede allgemein mittels Chi-Quadrat bzw. Fisher-Exakt-Test geprüft. Letzter kam zum Einsatz, wenn mindestens 25% der Zellen erwartete Frequenzen unter 5 zeigten.

Unterschiede vor und nach inhalativer Therapie wurden aufgrund der kleinen Stichprobenzahlen mittels nichtparametrischen Verfahrens (Wilcoxon-Rang-Test) untersucht.

Korrelationen zwischen bestimmten Variablen wurden wegen überwiegend fehlender Normalverteilung der Daten mittels Korrelations-Koeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) beurteilt. Gleichzeitig wurde die Signifikanz (p-Wert) der jeweiligen Korrelationen betrachtet. Es wurde zwischen irrelevanten ( $r_s = 0-0,25$ ), schwachen ( $r_s = 0,25-0,5$ ), bestehenden ( $r_s = 0,5-0,75$ ) und starken ( $r_s > 0,75$ ) Korrelationen unterschieden.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Patientengut und Gruppeneinteilung**

Insgesamt wurden 68 Pferde in diese Studie aufgenommen. Anhand der klinischen Untersuchungen wurden die Patienten verschiedenen Diagnose-Gruppen zugeordnet, wie in Tabelle 10 schematisch dargestellt. Bezüglich des Alters bestand ein höchstsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Pferden aus der lungengesunden Kontrollgruppe (Gruppe 1) und der Gesamtheit chronisch lungenkranker Patienten (Gruppen 2, 3 und 4). Die vier Pferde aus Gruppe 5 zeigten Anzeichen akuter Lungenerkrankungen. Aufgrund der sehr kleinen Stichprobenzahl und des eher akuten bzw. subakuten Charakters der Erkrankung wurde Gruppe 5 deskriptiv mit aufgeführt, bei den statistischen Berechnungen von Gruppenunterschieden jedoch ausgeschlossen.

### **4.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen**

Jedes Pferd wurde über drei aufeinander folgende Tage klinisch untersucht. Somit lagen die meisten klinischen Daten im dreifachen Satz vor. Aus diesen wurde zunächst der jeweilige Mittelwert berechnet, welcher Eingang in die statistische Auswertung fand.

#### **4.2.1 Ergebnisse zu allgemeinen, klinischen Parametern**

Bei keinem der untersuchten Pferde konnte eine hochgradige Störung des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Die Patienten hatten eine durchschnittliche Herzfrequenz von  $38,1 \pm 3,7$  Schläge pro Minute und eine innere Körpertemperatur von  $37,5 \pm 0,3$  °C. Die venösen Blutparameter lagen ebenfalls in der Norm (Leukozytenzahl  $8,1 \pm 2,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Hämatokrit  $35 \pm 5,1$  %, Gesamteiweiß  $6,7 \pm 0,5$  g/dl). Durch die arteriellen Bikarbonat- und pH-Werte, welche im Mittel jeweils bei  $27,2 \pm 1,8$  mmol/l und  $7,41 \pm 0,02$  lagen, konnte ein azidotischer Zustand ausgeschlossen werden. Die am ersten Untersuchungstag gemessenen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium im arteriellen Blut betrugen im Schnitt  $1,64 \pm 0,1$  mmol/l. Sowohl bei den chronisch lungenkranken ( $1,65 \pm 0,09$  mmol/l) als auch bei den akut erkrankten Pferden ( $1,68 \pm 0,12$  mmol/l) wurden im Vergleich zu den lungengesunden Patienten ( $1,58 \pm 0,11$  mmol/l) etwas höhere Werte beobachtet. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,069$ ).

#### **4.2.2 Ergebnisse zu lungenspezifischen, klinischen Parametern**

##### **4.2.2.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Atemwege**

Ein höchstsignifikanter Unterschied in der Atemfrequenz zeigte sich sowohl allgemein zwischen lungengesunden und chronisch lungenkranken Pferden als auch bei den Vergleichen zwischen

den einzelnen Gruppen (in beiden Fällen  $p = 0,001$ ). Die höchsten Werte waren mit 20,7 (13-33) Atemzügen pro Minute bei Gruppe 2 (RAO bzw. COB in Exazerbation) anzutreffen, während die niedrigsten Werte (14 (12-17) Atemzüge pro Minute) bei den lungengesunden Pferden vorlagen. Bei Gruppe 5 (subakute oder akute Pneumonie) waren die Atemfrequenzen im Normbereich (zwischen 11 und 13 Atemzüge pro Minute).

Die Parameter Husten und Dyspnoe (Tabelle 9) wurden beide im klinischen Score berücksichtigt. Husten konnte bei insgesamt 17 chronisch lungenkranken Pferden festgestellt werden (davon zehn Pferde aus Gruppe 2) und bei der Hälfte der akut bzw. subakut erkrankten Tiere (signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe:  $p = 0,048$ ). Bei keinem lungengesunden Patienten wurde eine Dyspnoe beobachtet. Eine Dyspnoe unterschiedlichen Schweregrades zeigten hingegen 16 Pferde mit RAO bzw. COB in Exazerbation, ein Pferd mit IAD oder COB in Remission und zwei Pferde mit interstitieller Pneumopathie ( $p = 0,007$ ).

Bei der Auskultation der Lunge waren nur drei chronisch lungenkranke Pferde (alle aus Gruppe 2) auffällig ( $p = 1$ ), während bei der Lungenperkussion nur sechs der chronisch lungenkranken Pferde ein erweitertes Lungenfeld zeigten ( $p = 0,322$ ). Sowohl Auskultation als auch Perkussion (Tabelle 9) wurden im klinischen Score berücksichtigt.

Tab. 9: Ergebnisse zu einigen Parametern der klinischen Untersuchung der Atemwege, welche Eingang in den klinischen Score fanden.

	<b>Gesund (n)</b>	<b>COB in Ex. (n)</b>	<b>IAD/COB in Rem. (n)</b>	<b>CIP (n)</b>	<b>(Sub)-Akut (n)</b>
<b>Husten</b>					
- ja	1	10	5	2	2
- nein	14	11	11	10	2
<b>Dyspnoe</b>					
- keine	15	5	15	10	4
- mäßige	0	8	1	1	0
- starke	0	8	0	1	0
<b>Auskultation</b>					
- o. b. B.	15	18	16	12	4
- auffällig	0	3	0	0	0
<b>Perkussion</b>					
- o. b. B.	15	18	15	10	4
- auffällig	0	3	1	2	0

Tab. 10: Übersicht zur Einteilung der Pferde in verschiedene Diagnose-Gruppen.

	Diagnose-Gruppen	n	Geschlecht		Alter * (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
			Stute	Wallach			
1	Lungengesund	15	7	8	8,1 ± 3,5	150,1 ± 14,3	425,3 ± 111,9
2	COB in Exazerbation	21	8	13	16,6 ± 4,5	152,6 ± 11,3	451,7 ± 73,7
3	IAD/COB in Remission	16	5	11	12,9 ± 4	158,9 ± 6,9	518,6 ± 53,3
4	Interstitielle Pneumopathie	12	5	7	11,5 ± 3,9	157,8 ± 15,6	509,2 ± 125,2
5	(Sub)Akute Pneumonie	4	3	1	8,5 ± 7	156 ± 8,3	470 ± 77

\* Ein höchstsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) bestand im Alter zwischen lungengesunden Pferden (Gruppe 1) und der Gesamtheit chronisch lungenkranker Pferde (Gruppen 2-4).

#### 4.2.2.2 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse

Bei der arteriellen Blutgasanalyse wurden die Parameter PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> und AaDO<sub>2</sub> ausgewertet (Tabelle 11). Außerdem wurden im klinischen Score anhand der Werte der alveolo-arteriellen Sauerstoff-Druckdifferenz bestimmte Punktzahlen vergeben (Tabelle 12). Zwischen den einzelnen Gruppen lagen für den PaO<sub>2</sub> hochsignifikante Unterschiede vor ( $p = 0,008$ ). Dabei grenzte sich die Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ in den *Post-hoc*-Tests am meisten ab, mit signifikanten bzw. hochsignifikanten Unterschieden sowohl zur Kontrollgruppe ( $p = 0,039$ ) als auch zur Gruppe „IAD/COB in Remission“ ( $p = 0,009$ ). Hingegen zeigten sich für den PaCO<sub>2</sub> keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,998$ ). Die AaDO<sub>2</sub>-Werte erwiesen sich im Gruppenvergleich als hochsignifikant unterschiedlich ( $p = 0,005$ ), in den Paarvergleichen allerdings nur zwischen den Gruppen „RAO bzw. COB in Exazerbation“ und „IAD/RAO in Remission“ ( $p = 0,004$ ).

Tab. 11: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen bzw. Medianwerte (Minimum-Maximum) der arteriellen Blutgase [mm Hg] bei den verschiedenen Gruppen.

Parameter	Gesund	COB in Ex.	IAD/COB in Rem.	CIP	(Sub)-Akut
PaO <sub>2</sub>	98,2 $\pm$ 5,8 <sup>A</sup>	90,4 $\pm$ 11,1 <sup>B</sup>	99,5 $\pm$ 4,5 <sup>A</sup>	95,6 $\pm$ 9,6	97,8 $\pm$ 9,5
PaCO <sub>2</sub>	44,1 $\pm$ 2,2	44 $\pm$ 4,1	43,9 $\pm$ 2,4	43,9 $\pm$ 2,6	41,4 $\pm$ 2,3
AaDO <sub>2</sub>	3 (0 - 9,3)	7 <sup>B</sup> (0 - 27,9)	0,4 <sup>A</sup> (0 - 6)	0,6 (0 - 24,5)	5,9 (2,1 - 10,1)

Unterschiedliche Indizes (A, B) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an ( $p \leq 0,05$ ).

Tab. 12: AaDO<sub>2</sub>-Werte [mmHg] bei den verschiedenen Gruppen mit jeweilig zugeteilter Score-Punktzahl.

AaDO <sub>2</sub> [mmHg]	Score- Punkte	Gesund (n)	COB in Ex. (n)	IAD/COB in Rem. (n)	CIP (n)	(Sub)-Akut (n)
AaDO <sub>2</sub> < 7	0	11	9	14	10	2
AaDO <sub>2</sub> = 7 - 14	1	4	9	2	0	2
AaDO <sub>2</sub> > 14	2	0	3	0	2	0

#### 4.2.2.3 Ergebnisse des Belastungstests

Ein Belastungstest wurde bei insgesamt 38 Pferden (15 Kontrollen und 23 chronisch lungenkranke Pferde) durchgeführt. Bei den restlichen Patienten war eine Durchführung dieses Tests aus verschiedenen Gründen nicht möglich (z. B. bestehende Lahmheit oder sonstige Erkrankungen). Wie in Tabelle 13 aufgeführt, fiel der Belastungstest bei allen 15 lungengesunden Pferden „ohne besonderen Befund“ aus, während bei insgesamt 18 chronisch lungenkranken Pferden der Test als „auffällig“ beurteilt wurde ( $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) ergaben sich außerdem im Paarvergleich zwischen dem lungengesunden Kollektiv und jeder einzelnen chronisch kranken Gruppe. Die immer vor und unmittelbar nach Belastung gemessenen Laktatwerte waren bei keinem Pferd zu keinem Messzeitpunkt pathologisch verändert.

Tab. 13: Ergebnisse der Belastungstests gruppenvergleichend dargestellt.

Befund	Gesund *	COB in Ex.	IAD/COB in Rem.	CIP	(Sub)-Akut
o.b.B.	15	1	2	2	0
auffällig	0	5	5	8	0
nicht durchgeführt	0	15	9	2	4

\* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) bestanden im Paarvergleich zwischen lungengesundem Kollektiv (grau) und den einzelnen chronisch lungenkranken Gruppen.

#### 4.2.2.4 Ergebnisse der röntgenologischen Untersuchung der Lunge

Die Ausprägungen bronchialer und interstitieller Befunde der Lunge wurden separat beurteilt und sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst. In beiden Fällen ergaben sich höchstsignifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p < 0,001$ ).

Die bronchialen Zeichnungen wiesen die stärksten Ausprägungen in der Gruppe mit chronischer Bronchitis in Exazerbation auf. Diese Einheit unterschied sich im Rahmen der *Post-hoc*-Analyse hochsignifikant von der gesunden Kontrollgruppe ( $p = 0,002$ ) und von der Gruppe „IAD/COB in Remission“ ( $p = 0,008$ ) sowie signifikant von dem Kollektiv „interstitielle Pneumopathie“ ( $p = 0,019$ ).

Wiederum zeigten die an interstitieller Pneumopathie erkrankten Pferde die schwerwiegendsten, röntgenologisch erkennbaren, interstitiellen Befunde. In diesem Fall bestanden hoch- bis höchstsignifikante Unterschiede zu den restlichen Gruppen „Lungengesund“ ( $p < 0,001$ ), „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ( $p = 0,002$ ) und „IAD/COB in Remission“ ( $p = 0,001$ ).

Tab. 14: Ergebnisse bronchialer Verdickungen bei der Röntgenuntersuchung der Lunge.

Befund	Gesund <sup>B</sup>	COB in Ex. <sup>A</sup>	IAD/COB in Rem. <sup>B</sup>	CIP <sup>B</sup>	(Sub)-Akut
o.b.B.	4	0	2	1	1
geringgradig	5	2	7	6	1
mittelgradig	6	14	7	5	2
hochgradig	0	5	0	0	0

Unterschiedliche Indizes (A, B) geben signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an ( $p \leq 0,05$ ).

Tab. 15: Ergebnisse interstitieller Verschattungen bei der Röntgenuntersuchung der Lunge.

Befund	Gesund <sup>B</sup>	COB in Ex. <sup>B</sup>	IAD/COB in Rem. <sup>B</sup>	CIP <sup>A</sup>	(Sub)-Akut
o.b.B.	3	3	2	0	1
geringgradig	10	11	10	0	2
mittelgradig	2	7	4	11	1
hochgradig	0	0	0	1	0

Unterschiedliche Indizes (A, B) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2.5 Ergebnisse der Intrapleuraldruck-Messung

Die Messung des Intrapleuraldrucks konnte aufgrund von starker Widersetzlichkeit nicht bei allen Pferden durchgeführt werden. Bei den 37 Patienten (sieben lungengesund und 30 lungenkrank), wo die Messung möglich war, ergaben sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen gesunden und chronisch kranken Tieren ( $p = 0,004$ ) sowie signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,029$ ). Aus den paarweisen Vergleichen resultierte allerdings nur zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Pferden mit exazerbierter, chronischer Bronchitis ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,017$ ). Die durchschnittlich gemessenen Werte sowie die Anzahl der

Pferde pro Gruppe (n), bei denen eine Messung des Intrapleuraldrucks stattfand, sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Ergebnisse der IPD-Messungen [cm H<sub>2</sub>O].

	Gesund	COB in Ex.	IAD/COB in Rem.	CIP	(Sub)-Akut
<b>IPD</b>	2,1 ± 1 <sup>A</sup>	5,2 ± 3,1 <sup>B</sup>	3,6 ± 1,5	3,6 ± 1,1	3 ± 1,4
<b>n</b>	7	13	9	6	2

Unterschiedliche Indizes (A, B) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2.6 Ergebnisse der Tracheobronchoskopie

Zur Beurteilung der endoskopischen Befunde wurde ein validiertes Score-System (DIECKMANN et al., 1987; GERBER et al., 2004) herangezogen, mithilfe dessen bestimmte Punktzahlen im klinischen Score vergeben wurden. Dabei wurden sowohl die Menge als auch die Viskosität des tracheobronchialen Sekrets beurteilt und es ergaben sich im Gruppenvergleich, für beide Parameter, höchstsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ). Eine Übersicht zu den Paarvergleichen mit jeweiligen Signifikanzniveaus ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Außerdem wurden die Patienten, anhand der endoskopischen Befunde (z. B. Schleimhautfarbe und -beschaffenheit, Dicke der *Carina tracheae*, Charakter des TBS), in drei verschiedene Kategorien eingeteilt. Diese unterschieden sich hinsichtlich Ausprägungsgrad der verschiedenen Befunde (siehe Tabelle 18). Auch hier konnten sehr hohe Signifikanzen bei den Gruppenvergleichen beobachtet werden ( $p < 0,001$ ). Die gesunden Kontrollpferde zeigten in der Endoskopie keine pathologischen Befunde. Somit unterschieden sie sich höchstsignifikant von der chronisch kranken Gesamtheit ( $p < 0,001$ ) sowie auch in höchstsignifikantem, hochsignifikantem bzw. signifikantem Ausmaß von den einzelnen Gruppen chronisch kranker Pferde (Gruppe 2:  $p < 0,001$ , Gruppe 3:  $p = 0,002$ , Gruppe 4:  $p = 0,027$ ). Ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung endoskopischer Befunde zeigte sich außerdem zwischen den Gruppen „RAO bzw. COB in Exazerbation“ und „interstitielle Pneumopathie“ ( $p = 0,027$ ).



Tab. 17: Signifikanzen (p) von Gruppenunterschieden hinsichtlich Menge und Viskosität des tracheobronchialen Sekrets. P-Werte  $\leq 0,05$  sind in grau markiert.

Paarvergleich	Sekret-Menge	Sekret-Viskosität
Gesund – COB in Ex.	p < 0,001	p < 0,001
Gesund – IAD/COB in Rem.	p = 0,034	p = 0,022
Gesund – CIP	p = 0,113	p = 0,313
COB in Ex. – IAD/COB in Rem.	p = 0,009	p = 0,015
COB in Ex. – CIP	p = 0,10	p = 0,002
IAD/COB in Rem. – CIP	p = 1	p = 1

Tab. 18: Gruppenvergleichende Übersicht zum Ausprägungsgrad der endoskopischen Befunde.

Befund-Ausprägung	Gesund * (n)	COB in Ex. ** (n)	IAD/COB in Rem. (n)	CIP ** (n)	(Sub)-Akut (n)
o.b.B.	15	0	3	3	0
ggr.-mgr.	0	5	9	7	0
hgr.	0	16	4	2	4

Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bestanden im Paarvergleich zwischen lungengesundem Kollektiv (\*) und jeder chronisch lungenkranke Gruppe sowie zwischen den Gruppen „RAO bzw. COB in Exazerbation“ und „chronisch interstitielle Pneumopathie“ (\*\*).

#### 4.2.2.7 Ergebnisse von bronchoalveolärer Lavage und zytologischer Diagnostik

Bei allen Patienten wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt und zunächst die Menge der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit aufgenommen. Die durchschnittlichen Mengen lagen bei  $244 \pm 91,5$  ml bei der lungengesunden Gruppe und  $235,2 \pm 87$  ml bei den chronisch erkrankten Tieren. Bei Gegenüberstellung der gesunden und chronisch erkrankten Tiere ( $p = 0,702$ ) sowie auch beim Vergleich der einzelnen Diagnose-Gruppen ( $p = 0,443$ ) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Rückgewinnungsmenge aufgezeigt werden.

In einem zweiten Schritt wurden BALF-Abstriche angefertigt und diese auf den Zellgehalt untersucht (siehe dazu Paragraph 3.3.2.7). Dabei wurden verschiedene Zelltypen ausgezählt (Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile bzw. eosinophile Granulozyten und Mastzellen) und anschließend deren prozentualer Anteil in der BALF berechnet. Eine Übersicht zu den durchschnittlichen Zellgehalten der Lavagen ist in Tabelle 19 gruppenvergleichend aufgeführt. Bei den lungengesunden Pferden lagen die relativen Zellmengen im Normbereich. Anders zeigte die Gruppe mit exazerbierter RAO bzw. COB einen sehr hohen prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten und niedrige prozentuale Mengen an Lymphozyten und Makrophagen in der BALF und unterschied sich somit, bezüglich dieser drei Zelltypen, in nahezu allen Fällen signifikant von den restlichen Gruppen (siehe Tabelle 20). Auch bei den Tieren mit diagnostizierter IAD oder COB in Remission waren höhere Zahlen an neutrophilen Granulozyten bemerkbar. Außerdem zeigten die Lavagen dieser Pferde zum Teil mehr als 2 % Mastzellen. Dies war auch bei einigen Patienten der Gruppen 4 und 5 der Fall. Das Zellbild der an interstitieller Pneumopathie erkrankten Gruppe wies keine signifikanten Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe auf, allerdings wurden hier die höchsten Prozentsätze an Makrophagen in der BALF festgestellt (Tabelle 19). Bezüglich der eosinophilen Granulozyten konnten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p = 0,109$ ).

Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BALF wurde auch im klinischen Gesamtscore berücksichtigt (Tabelle 21). Bei allen Pferden der lungengesunden Gruppe lagen die Prozentzahlen der neutrophilen Granulozyten  $< 10$  %, während sich die Prozentzahlen innerhalb der Gruppe mit exazerbierter, chronischer Bronchitis durchgehend  $> 25$  % erstreckten. Die meisten Tiere der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ zeigten ebenfalls hohe Prozentsätze an neutrophilen Granulozyten, während bei Pferden mit interstitieller Pneumopathie überwiegend Zellzahlen  $< 10\%$  vorlagen.

Tab. 19: Medianwerte (Minimum-Maximum) des prozentualen Zellgehalts der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen.

Zelltyp	Gesund	COB in Ex.	IAD/COB in Rem.	CIP	(Sub)-Akut
Lymphozyten	37,4 (27,8 - 50)	14,5 (1,7 - 35,5)	27,4 (4,5 - 66)	33,7 (22,2 - 60)	27,4 (8,8 - 30,4)
Makrophagen	58 (46,5 - 64)	16 (5,6 - 47)	48,8 (22 - 66)	55,4 (15 - 67)	53,3 (22 - 61,7)
Neutrophile Granulozyten	2 (0,5 - 7,6)	58,7 (27 - 90,4)	19,4 (3 - 59,7)	7,1 (0 - 24,1)	11,4 (7,1 - 68,6)
Eosinophile Granulozyten	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0 (0 - 15,5)	0,7 (0 - 2,5)	0,2 (0 - 2,2)
Mastzellen	1,6 (0 - 8)	1 (0 - 4,6)	2,6 (0 - 10)	3,2 (0 - 15)	1,6 (0,4 - 10,8)

Tab. 20: Signifikanzen (p) der Gruppenunterschiede hinsichtlich Zellgehalt der bronchoalveolären Lavagen. Die grau markierten Felder zeigen p-Werte  $\leq 0,05$  an.

Paarvergleich	LY	MP	NG	EG	MZ
Gesund - COB in Ex.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 1	p = 0,252
Gesund - IAD/COB in Rem.	p = 0,208	p = 0,171	p = 0,002	p = 1	p = 1
Gesund - CIP	p = 1	p = 1	p = 1	p = 1	p = 1
COB in Ex. - IAD/COB in Rem.	p = 0,082	p = 0,006	p = 0,025	p = 1	p = 0,056
COB in Ex. - CIP	p = 0,006	p < 0,001	p < 0,001	p = 1	p = 0,006
IAD/COB in Rem. - CIP	p = 1	p = 1	p = 0,205	p = 1	p = 1

LY = Lymphozyten, MP = Makrophagen, NG = neutrophile Granulozyten, EG = eosinophile Granulozyten, MZ = Mastzellen

Tab. 21: Übersicht zu denen anhand prozentualer Zahlen an neutrophilen Granulozyten in der BALF vergebenen Score-Punkten bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen.

Neutrophile Granulozyten	Score-Punkte	Gesund (n)	COB in Ex. (n)	IAD/COB in Rem. (n)	CIP (n)	(Sub)-Akut (n)
< 10 %	0	15	0	2	8	1
10 - 15 %	1	0	0	5	3	2
15 - 25 %	2	0	0	4	1	0
> 25 %	3	0	21	5	0	1

#### 4.2.2.8 Ergebnisse des klinischen Scores

Zusammenfassend dienten die klinischen Parameter Husten, Ruhedyspnoe, Lungenauskultation sowie -perkussion, Blutgasanalyse, Tracheobronchoskopie und Neutrophilie in der BALF der Zusammenstellung des Gesamtscores. Bei den einzelnen Patienten wurden Punktzahlen zwischen 0 und 15 erreicht, welche Auskunft über den Schweregrad der Erkrankung geben sollten (Tabelle 22).

Nach den klinischen Untersuchungen zeigten alle gesunden Kontrollpferde eine Punktzahl zwischen 0 und 1. Auch die meisten, an interstitieller Pneumopathie erkrankten Pferde wiesen im Score geringe Punktzahlen auf, sodass hier kaum Unterschiede zur Kontrollgruppe bestanden ( $p = 0,933$ ). Acht der insgesamt zwölf Patienten mit IAD oder COB in Remission resultierten als mittelgradig erkrankt und somit grenzte sich diese Einheit in hochsignifikantem Ausmaß von der lungengesunden Gruppe ab ( $p = 0,005$ ). Im Gegensatz dazu konnten zwischen den Einheiten „IAD/COB in Remission“ und „chronisch interstitielle Pneumopathie“ keine signifikanten Differenzen festgestellt werden ( $p = 0,551$ ). Alle Pferde mit RAO bzw. COB in Exazerbation zeigten hohe Punktzahlen und unterschieden sich somit höchst- bzw. signifikant von den restlichen Kollektiven (zu Gruppen 1 und 4:  $p < 0,001$ ; zu Gruppe 3:  $p = 0,015$ ).

Tab. 22: Ergebnisse des klinischen Scores bei den verschiedenen Gruppen mit jeweiligem Schweregrad der bestehenden Lungenerkrankung.

Score-Punkte	Schweregrad	Gesund** (n)	COB in Ex.* (n)	IAD/COB in Rem.** (n)	CIP (n)	(Sub)-Akut (n)
0 - 1	gesund	15	0	1	8	0
2 - 3	geringgradig	0	0	7	1	2
4 - 6	mittelgradig	0	7	8	2	1
≥ 7	hochgradig	0	14	0	1	1

Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bestanden im Paarvergleich zwischen dem Kollektiv „RAO bzw. COB in Exazerbation“ (\*) und den restlichen Gruppen sowie zwischen den Einheiten „Lungengesund“ und „IAD oder COB in Remission“ (\*\*).

## 4.3 Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen

Die Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker in BALF- und Plasma-Proben erfolgte mittels spezieller Enzym-Immuno-Assays (siehe Abschnitt 3.4). Die Ergebnisse sind folgend für jeden Parameter einzeln beschrieben.

### 4.3.1 Ergebnisse von Procalcitonin

Für die Messung von equinem Procalcitonin in Blut- und BALF-Proben wurde in dieser Studie der von RIEGER et al. (2014) entwickelte Sandwich-ELISA angewandt. Zur Messung in Blutplasma konnte der bereits charakterisierte und beschriebene Test eingesetzt werden. Für die Messung von PCT in der bronchoalveolären Lavage erfolgte zunächst eine statistische Charakterisierung des Verfahrens, wie in Paragraph 3.4.2.3 ausführlich beschrieben, um Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des ELISAs, auch bei Anwendung mit einer anderen Matrix, zu gewährleisten. Diese Prozedur wird zunächst beschrieben und anschließend die Ergebnisse der Probenmessungen präsentiert.

#### 4.3.1.1 Ergebnisse der Charakterisierung des ELISAs für die Anwendung mit BALF

Um den Arbeitsbereich des ELISAs unter Anwendung von BALF festzulegen, wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten bestimmt, welche in Tabelle 15 aufgeführt sind. In Anlehnung an die Richtlinien der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zur Validierung bioanalytischer Methoden (2013), dürfen die oben genannten Variationskoeffizienten, bei zu medizinischen Zwecken verwendeten ELISAs, im Arbeitsbereich nur Werte unter 15 % annehmen. Somit konnte in diesem Fall eine Arbeitsspanne („*working range*“) von 25 bis 250 ng/ml festgelegt werden (Tabelle 23).

#### 4.3.1.2 Ergebnisse zur Bestimmung der LODs

Im Rahmen der Messungen zeigten die unverdünnten Proben (sowohl Blutplasma als auch BALF) von insgesamt 13 Pferden sehr niedrige Werte, welche unterhalb der unteren Asymptote der Standardkurve lagen und somit von dem Messgerät nicht erfasst werden konnten. In diesen Fällen wurde zunächst für jeden ELISA die unterste Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) berechnet. Diese erhält man durch Aufsummierung des Mittelwertes der Nullwerte mit der dreifachen Standardabweichung der Nullwerte. Der errechnete Wert bezieht sich jedoch auf die Absorption ( $LOD_{Abs}$ ) und muss zur Berechnung der LOD-Konzentrationswerte ( $LOD_{Konz}$ ) anschließend als „y“ in die Logistikkfunktion (1) des jeweiligen ELISAs eingesetzt werden. Eine Auflösung der Gleichung nach „x“ (2) führt dann zu den eigentlichen Werten für  $LOD_{Konz}$ . Da die von dem Messgerät nicht erfassten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden sie als „LOD-1“ definiert. Die Ergebnisse der zur Bestimmung der LODs durchgeführten Berechnungen sind in Tabelle 40 des Anhangs aufgeführt. Die somit errechneten PCT-Konzentrationen lagen zwischen 0,6 und 2,3 ng/ml.

$$(1) \quad y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

$$(2) \quad x = C * \left(\frac{A - D}{y - D} - 1\right)^{\left(\frac{1}{B}\right)}$$

Tab. 23: Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten (IaA-CV, IeA-CV) sowie Wiederfindungsrate (recovery) für den „BALF-ELISA“.

Probe	C <sub>soll</sub> [ng/ml]	C <sub>ist</sub> [ng/ml]	IaA-CV (%)	IeA-CV (%)	Recovery (%)
1	10	15,6 ± 4,7	30,4	10,9	156
2	<b>25</b>	24,9 ± 0,7	<b>2,7</b>	<b>8,4</b>	<b>99,2</b>
3	<b>50</b>	43,2 ± 2	<b>4,7</b>	<b>3,1</b>	<b>86,2</b>
4	<b>100</b>	102,6 ± 13,9	<b>13,6</b>	<b>11,4</b>	<b>102,5</b>
5	<b>250</b>	377 ± 22,3	<b>5,9</b>	<b>7</b>	<b>150,8</b>
6	500	658,5 ± 248	37,7	16,1	131,6
7	1.000	*	*	*	*
8	5.000	*	*	*	*
9	10.000	*	*	*	*

\* Signale waren außerhalb der Standardkurve und daher nicht auswertbar, C<sub>ist</sub> = Istwerte der gemessenen Proben-Konzentrationen (Mittelwert ± Standardabweichung), C<sub>soll</sub> = Sollwerte für die gemessenen Proben-Konzentrationen

#### 4.3.1.3 Ergebnisse zu Procalcitonin in der BALF

In der bronchoalveolären Lavage der untersuchten Pferde wurden Procalcitonin-Konzentrationen zwischen 1,3 und 1.761,9 ng/ml beobachtet. Für den angewandten Sandwich-ELISA wurde, wie oben bereits beschrieben, ein Arbeitsbereich von 25 bis 250 ng/ml bestimmt. Eine gruppenvergleichende Aufführung der gemessenen Werte findet sich in Tabelle 26. Wie in Abbildung 4 ersichtlich, zeigten die gesunden Patienten im Durchschnitt die niedrigsten Konzentrationen an Procalcitonin in der bronchoalveolären Lavage (unter 24 ng/ml). Lungengesunde (5,5 (1,5-23,3) ng/ml) und chronisch lungenkranke Pferde (13,8 (1,3-1.761,9)

ng/ml) zeigten hochsignifikante Unterschiede in den Procalcitonin-Konzentrationen ( $p = 0,006$ ). Dabei hatten die PCT-Werte innerhalb der chronisch kranken Gruppen (2, 3 und 4) sehr hohe Spannweiten (siehe Tabelle 26). Als die verschiedenen Diagnose-Gruppen untereinander verglichen wurden (Kruskall-H-Wallis-Test) waren zwar Unterschiede zu erkennen, allerdings lagen diese nicht im statistisch signifikanten Bereich ( $p = 0,052$ ). Da die Medianwerte der Gruppen 2 und 3 außerhalb des Interquartilbereichs von Gruppe 1 lagen (siehe Abbildung 4), wurden die besagten Kollektive ausnahmsweise mittels exakten Mann-Whitney-U-Tests paarweise gegeneinandergestellt und somit einige Signifikanzen aufgedeckt. Dabei unterschied sich die gesunde Kontrollgruppe signifikant von der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ( $p = 0,033$ ) und sogar höchstsignifikant von der Einheit „IAD/COB in Remission“ ( $p = 0,006$ ).

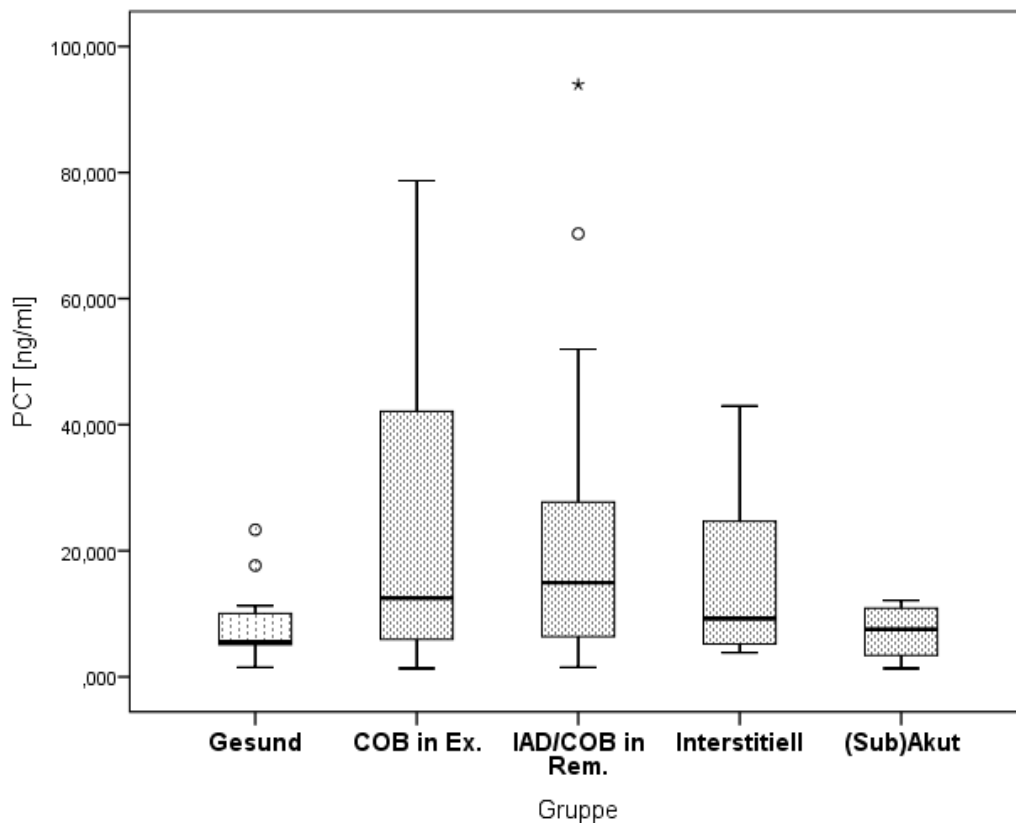


Abb. 4: PCT-Konzentrationen (0 bis 250 ng/ml) in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen ( $n = 63$ ). Mit Kreisen bzw. Sternen sind jeweils milde und extreme Ausreißer markiert. Fünf Pferde zeigten höhere PCT-Werte als 250 ng/ml und sind somit, trotz Einbeziehung in die statistische Auswertung, in dieser Grafik nicht enthalten. Hochsignifikante Unterschiede bestanden zwischen lungengesunden (weißer Boxplot) und chronisch lungenkranken (graue Boxplots) Pferden ( $p = 0,006$ ). Eine Differenzierung der Gruppen chronisch lungenkranker Pferde war anhand der gemessenen PCT-Konzentrationen nicht möglich ( $p = 0,052$ ).



#### 4.3.1.4 Ergebnisse zu Procalcitonin in Blutplasma

Bei insgesamt 18 Pferden (Tabelle 24) wurden zusätzlich venöse Blutproben gesammelt und ebenfalls auf die Konzentrationen von Procalcitonin untersucht. Davon gehörten zehn Pferde zur lungengesunden Gruppe, während die restlichen acht Pferde randomisiert aus den anderen Gruppen stammten. Der Arbeitsbereich des verwendeten ELISAs liegt zwischen 25 und 1.000 ng/ml (RIEGER et al., 2014) und es wurden PCT-Konzentrationen zwischen 1 und 4.853,7 ng/ml ermittelt. Statistisch signifikante Gruppenunterschiede konnten aufgrund der sehr kleinen Stichproben nur allgemein zwischen den lungengesunden und chronisch lungenkranken Tieren dargestellt werden ( $p = 0,05$ ). Eine Übersicht mit den bei allen 18 Pferden gemessenen Konzentrationen folgt in Tabelle 25. Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe wurde in einem einzigen Fall ein sehr hoher Wert gemessen (1.741,5 ng/ml), ansonsten lagen hier die Konzentrationen für Procalcitonin im Blutplasma zwischen 1 und 65,7 ng/ml. Ähnlich wurde auch bei dem akut bzw. subakut erkrankten Pferd, im Vergleich zu den restlichen Gruppen, ein niedriger Wert ermittelt (11,7 ng/ml). Die höchsten PCT-Konzentrationen wurden innerhalb der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ beobachtet, allerdings ist an dieser Stelle die hohe Spannweite der gemessenen Werte innerhalb dieser Einheit zu erwähnen. Das an interstitieller Pneumopathie erkrankte Pferd zeigte einen PCT-Wert von 1.506,4 ng/ml, während innerhalb der Gruppe „IAD bzw. COB in Remission“ die gemessenen Konzentrationen, im Schnitt, bei 98,6 (22,7-174,5) ng/ml lagen.

Tab. 24: Übersicht zu den Patienten, die einer Plasma-Untersuchung auf Procalcitonin unterzogen wurden.

Diagnose	n	Geschlecht		Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
		Stute	Wallach			
Lungengesund	10	4	6	8,8 ± 3,6	141,8 ± 8	365 ± 61,7
COB in Exazerbation	4	1	3	15,3 ± 5	151,5 ± 20,8	450 ± 122,5
IAD/COB in Remission	2	1	1	13,5 ± 7,8	161 ± 7,1	525 ± 35,3
Interstitielle Pneumopathie	1		Wallach	8	161	500
(Sub)-Akute Pneumonie	1		Wallach	7	168	580

Tab. 25: Medianwerte (Minimum-Maximum) der PCT-Konzentrationen [ng/ml] in Blutplasma.

Gruppe	Diagnose	n	PCT [ng/ml]
1	Lungengesund *	10	13,9 (1 - 1.741,5)
2	COB in Exazerbation	4	482,2 (1,6 - 4.853,7)
3	IAD/COB in Remission	2	98,6 (22,7 - 174,5)
4	Interstitielle Pneumopathie	1	1.506,4
5	(Sub)-Akute Pneumonie	1	11,7

\* Ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,05$ ) bestand zwischen lungengesundem Kollektiv (Gruppe 1, in grau markiert) und der Gesamtheit chronisch lungenkranker Pferde (Gruppen 2-4).

### 4.3.2 Ergebnisse der Interleukine

Die Konzentrationen verschiedener Interleukine in der bronchoalveolären Lavage wurden ebenfalls bei den untersuchten Pferden bestimmt. Dies erfolgte mittels bereits validierter und kommerziell erhältlicher ELISA-Kits der Marke USCN (Uscn Life Science Inc., Hubei, PRC). Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Tests einzeln dargestellt.

#### 4.3.2.1 Ergebnisse zu Interleukin-1 $\beta$ in der BALF

Der ELISA für die Messung von Interleukin-1 $\beta$  zeigte einen *detection range* von 15,6 bis 1.000 pg/ml. Da die unterste Nachweisgrenze bei 5,8 pg/ml lag, wurde im Falle einer von dem Messgerät nicht erfassten Konzentration ein fiktiver Wert von 5,7 pg/ml angegeben. Die für IL-1 $\beta$  ermittelten Konzentrationen lagen bei den untersuchten Patienten zwischen 5,7 und 122 pg/ml. Eine gruppenvergleichende Darstellung der durchschnittlich gemessenen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen ist in Tabelle 26 sowie Abbildung 5 aufgeführt. Lungengesunde Pferde zeigten allgemein niedrigere Werte (5,7 (5,7-104) pg/ml) als die restlichen, chronisch erkrankten Patienten (25 (5,7-122) pg/ml), allerdings konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weder allgemein unter gesunden und kranken Tieren ( $p = 0,122$ ), noch zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,365$ ). Die im Schnitt höchsten, gemessenen Konzentrationen für IL-1 $\beta$  lagen mit 33,5 (5,7-121) pg/ml in der Gruppe „chronisch interstitielle Pneumopathie“ vor.

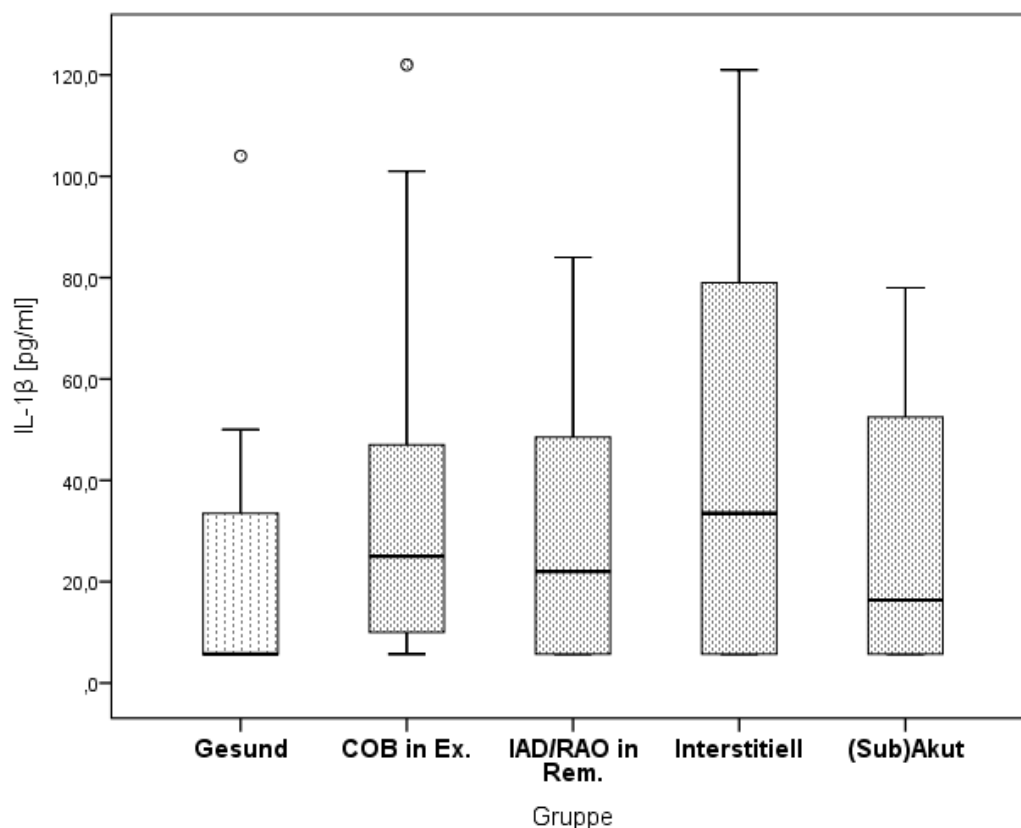


Abb. 5: IL-1 $\beta$ -Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n = 68). Mit Kreisen sind milde Ausreißer markiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden weder allgemein zwischen gesunden und kranken Pferden ( $p = 0,122$ ), noch zwischen den einzelnen Diagnose-Gruppen festgestellt ( $p = 0,365$ ).

#### 4.3.2.2 Ergebnisse zu Interleukin-6 in der BALF

Der für die Messung von Interleukin-6 bestimmte Arbeitsbereich des angewandten Enzym-Immuno-Assays war zwischen 7,8 und 500 pg/ml festgelegt. Messungen unterhalb der Nachweißgrenze (2,6 pg/ml) erhielten hier einen Wert von 2,5 pg/ml. Die gemessenen IL-6-Konzentrationen lagen bei der gesamten Stichprobe zwischen 2,5 und 63 pg/ml. Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, dass innerhalb der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ im Vergleich zu den lungengesunden Patienten und zu den restlichen, chronisch kranken Gruppen im Schnitt die höchsten Werte gemessen wurden (11 (2,5-53) pg/ml). Eine Übersicht diesbezüglich findet sich auch in Tabelle 26. Bei den lungengesunden sowie bei den an IAD oder COB in Remission und an interstitieller Pneumopathie erkrankten Tieren, wurden allgemein niedrigere IL-6-Werte beobachtet (Tabelle 26). Allerdings fielen, sowohl in Gruppe 3 als auch in Gruppe 4 einzelne Pferde mit sehr hohen Werten auf (jeweils 41 und 63 pg/ml), welche außerhalb der *Boxplot-Whisker* lagen (Abbildung 6). Die Gruppe der subakuten bzw. akuten Pneumonien wies insgesamt nur niedrige IL-6-Konzentrationen in der BALF auf (2,5 bis 23 pg/ml). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten mittels Kruskal-H-Wallis-Test nicht aufgezeigt werden ( $p=0,279$ ) sowie

auch nicht im allgemeinen Vergleich der gesunden und chronisch lungenkranken Patienten ( $p = 0,264$ ).

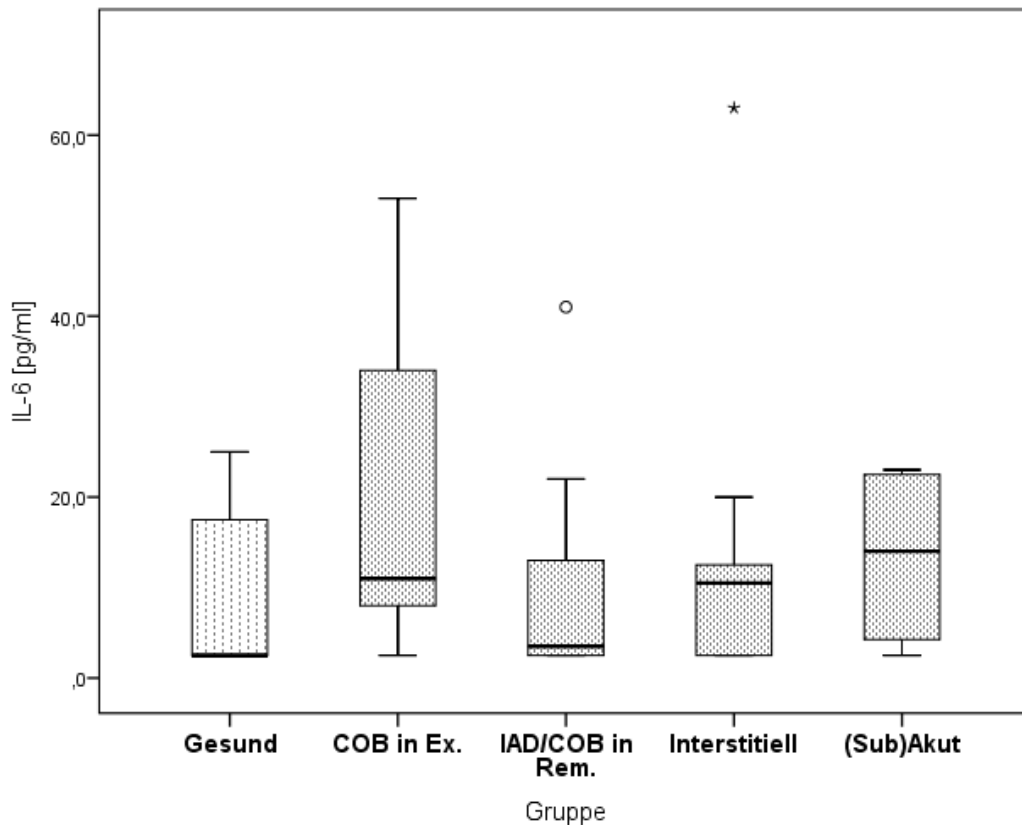


Abb. 6: IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen (n=68). Mit Kreisen bzw. Sternen sind jeweils milde und extreme Ausreißer markiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden weder allgemein zwischen gesunden und kranken Pferden ( $p = 0,264$ ), noch zwischen den einzelnen Diagnose-Gruppen ( $p = 0,279$ ) festgestellt.

#### 4.3.2.3 Ergebnisse zu Interleukin-17 in der BALF

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-17 in der bronchoalveolären Lavage wurde ebenfalls ein kommerzielles Kit der Marke USCN verwendet, welches einen Arbeitsbereich von 15,6 bis 1.000 pg/ml und eine *minimum detectable dose* von 6,3 pg/ml zeigte. Niedrigere Konzentrationen wurden somit mit dem Wert 6,2 pg/ml definiert. Nach Durchführung dieses ELISA-Tests fielen allerdings einige Probleme in der Standardreihe auf. Durch die hohen Nullwerte ( $0,49 \pm 0,07$  OD) und die Abweichungen zwischen den zwei angesetzten Standards (ca. 30 %), waren die Ergebnisse nur mit Vorsicht zu bewerten. Es konnten also keine quantitativen Aussagen über die effektiven Konzentrationen von IL-17 in der BALF getroffen werden. Aus diesem Grund wurden in diesem Falle auch die Extinktionswerte (OD) für jede gemessene Probe aufgeführt (Tabelle 26),

da diese immerhin eine qualitative Aussage erlauben und einen allgemeinen Trend bezüglich des IL-17-Gehalts der verschiedenen BALF-Proben anzeigen. Die höchsten Werte wurden bei den lungengesunden Patienten festgestellt (0,34 (0,07-0,93) OD). Die Gesamtheit chronisch lungenkranker Pferde zeigte niedrigere OD-Werte, welche im Schnitt bei 0,19 (0,06-0,85) lagen. Allerdings ergaben sich, bezüglich der gemessenen Werte, bei allen Gruppen hohe Spannweiten (Abbildung 7) und es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden, weder zwischen kranker und gesunder Einheit ( $p = 0,17$ ), noch zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,224$ ).

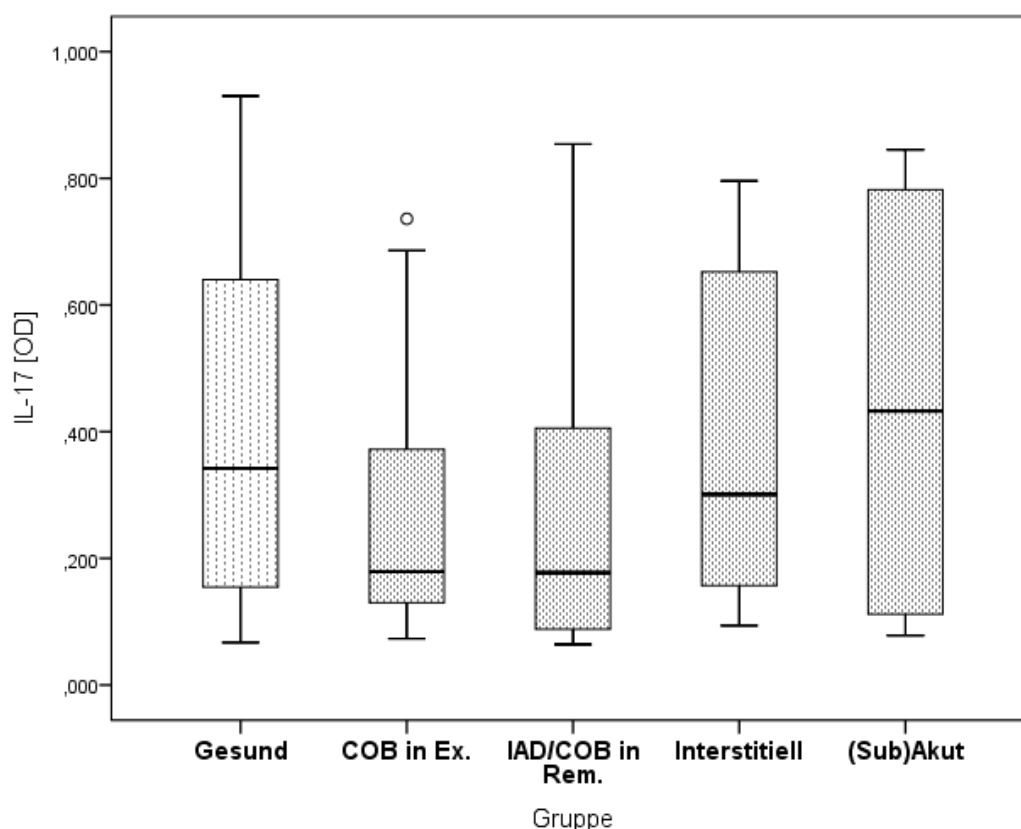


Abb. 7: IL-17 [OD-Werte] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen ( $n = 68$ ). Mit Kreisen sind milde Ausreißer markiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden weder allgemein zwischen kranken und gesunden Pferden ( $p = 0,17$ ), noch zwischen den einzelnen Diagnose-Gruppen ( $p = 0,224$ ) festgestellt.

Tab. 26: Medianwerte (Minimum-Maximum) der gemessenen Entzündungsmarker-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage. Für IL-17 sind die Extinktionswerte (OD) zusätzlich aufgeführt.

Gruppe	Diagnose	PCT [ng/ml]	IL-1 $\beta$ [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]	IL-17 [pg/ml]	IL-17 [OD]
1	Lungengesund	5,5 (1,5 - 23,3)	5,7 (5,7 - 104)	2,5 (2,5 - 25)	6,2 (6,2 - 378)	0,34 (0,07 - 0,93)
2	COB in Exazerbation	13,4 (1,3 - 681,7)	25 (5,7 - 122)	11 (2,5 - 53)	6,2 (6,2 - 117)	0,18 (0,07 - 0,74)
3	IAD/COB in Remission	16,9 (1,5 - 493,7)	22 (5,7 - 84)	3,5 (2,5 - 41)	6,2 (6,2 - 241)	0,17 (0,06 - 0,85)
4	Interstitielle Pneumopathie	12 (3,8 - 1.761,9)	33,5 (5,7 - 121)	10,5 (2,5 - 63)	6,2 (6,2 - 171)	0,30 (0,09 - 0,80)
5	(Sub)-Akute Pneumonie	7,6 (1,3 - 12,1)	16,3 (5,7 - 78)	14 (2,5 - 23)	55,1 (6,2 - 229)	0,43 (0,08 - 0,84)

## 4.4 Ergebnisse der Therapiegruppe

### 4.4.1 Patienten

Zwölf der untersuchten Pferde wurden über zehn Tage einer inhalativen Therapie mit dem Glukokortikoid Budesonid unterzogen (Tabelle 27). Dabei stammten acht Pferde aus der Diagnose-Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ (Gruppe 2) und vier aus der Einheit „IAD oder COB in Remission“ (Gruppe 3). Das Alter lag bei den Tieren aus Gruppe 2 und 3 durchschnittlich bei jeweils  $18,5 \pm 3,8$  und  $14,2 \pm 4,8$  Jahren. Größe und Gewicht betragen bei den Pferden mit chronischer Bronchitis in Exazerbation jeweils  $152,7 \pm 8,1$  cm und  $447,5 \pm 63,6$  kg, während bei denjenigen mit IAD oder COB in Remission  $161,7 \pm 9,1$  cm und  $533,7 \pm 62,4$  kg.

Tab. 27: Therapie-Gruppe. Die nach Diagnose gebildeten Untergruppen sind in weiß (RAO bzw. COB in Exazerbation = 2) bzw. grau (IAD oder COB in Remission = 3) markiert.

Gruppe	Fall	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
2	31	Araber-Mix	Stute	19	149	400
2	37	AQH	Stute	14	152	480
2	38	Traber	Wallach	21	159	450
2	42	Araber	Stute	23	150	450
2	43	Pony	Wallach	19	139	400
2	45	Pony	Wallach	12	148	350
2	54	Warmblut	Stute	22	162	550
2	57	Warmblut	Stute	18	163	500
3	28	Warmblut	Stute	12	170	550
3	32	Traber	Wallach	10	162	535
3	47	Warmblut	Wallach	14	166	600
3	55	Haflinger-Mix	Wallach	21	149	450

AQH = American Quarter Horse

#### 4.4.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen nach Therapie

Die klinischen Untersuchungen erfolgten sowohl vor als auch nach Therapie anhand desselben dreitägigen Protokolls (siehe Paragraph 3.2.2). Folgend sind die Ergebnisse mit besonderem Augenmerk auf die Unterschiede vor und nach Therapie aufgeführt.

##### 4.4.2.1 Ergebnisse zu allgemeinen, klinischen Parametern nach Therapie

Eine Übersicht zu den erhobenen, allgemeinen klinischen Parametern vor und nach Therapie findet sich in Tabelle 28. Diese befanden sich alle im Normbereich, mit Ausnahme von den im arteriellen Blut gemessenen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium, welche sowohl vor als auch nach Therapie mit jeweils  $1,63 \pm 0,07$  mmol/l und  $1,67 \pm 0,08$  mmol/l erhöht waren. Ein venöses Blutbild wurde nach Therapie nicht erneut erstellt. Die meisten Parameter verhielten sich relativ konstant. Im Falle der Herzfrequenz zeigten die Pferde nach Therapie im Schnitt ( $35,7 \pm 2,7$  Schläge/min) numerisch niedrigere Werte als zuvor ( $38,1 \pm 3,1$  Schläge/min).

Tab. 28: Allgemeine, klinische Parameter im Vergleich vor und nach Therapie.

Parameter	Einheit	vor Therapie	nach Therapie
Herzfrequenz	Schläge/min	$38,1 \pm 3,1$	$35,7 \pm 2,7$
IKT	°C	$37,3 \pm 0,3$	$37,4 \pm 0,2$
Leukozyten	$\cdot 10^3/\mu\text{l}$	$9,3 \pm 1,9$	-
Hämatokrit	%	$35,2 \pm 3,6$	-
Gesamteiweiß	g/l	$6,9 \pm 0,4$	-
pH-Wert	-	$7,4 \pm 0,02$	$7,4 \pm 0,02$
Bikarbonat	mmol/l	$27,2 \pm 1,7$	$27,4 \pm 2,2$
Ionisiertes Kalzium	mmol/l	$1,63 \pm 0,07$	$1,67 \pm 0,08$

##### 4.4.2.2 Ergebnisse zu lungenspezifischen, klinischen Parametern nach Therapie

###### 4.4.2.2.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Atemwege nach Therapie

Die Atemfrequenz zeigte allgemein keine signifikanten Unterschiede vor und nach Therapie ( $p = 0,243$ ). Die Werte lagen durchschnittlich bei jeweils  $17,4 \pm 3,5$  und  $16 \pm 4,9$  Atemzüge/min. Auch innerhalb der Gruppen ergaben sich keine nennenswerten Differenzen. Die Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ zeigte nahezu konstant bleibende Werte ( $p = 0,671$ ), während bei der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ leichte Unterschiede vor und



nach Therapie vorlagen ( $p = 0,109$ ). Die vor und nach Therapie erhobenen Atemzüge/min betrug jeweils  $18,1 \pm 3,1$  und  $17,5 \pm 5,4$  bei Gruppe 2 sowie  $16 \pm 4,2$  und  $13 \pm 1,4$  bei Gruppe 3. Fünf Pferde (davon vier Tiere aus Gruppe 2 und eins aus Gruppe 3) zeigten vor Therapie spontan auftretenden bzw. leicht auslösbaren Husten, während nach Inhalation dies nur noch bei drei Patienten (Gruppe 2) der Fall war (Unterschied statistisch nicht signifikant). Bei keinem der Patienten mit IAD oder COB in Remission konnte eine abnorme Atmung beobachtet werden. Von den Patienten mit chronischer, exazerbierter Bronchitis zeigten allerdings sechs eine mäßige und zwei sogar eine starke Dyspnoe. Obwohl nach Haltungsoptimierung bzw. inhalativer Therapie nur noch die Hälfte dieser Pferde ( $n = 4$ ) eine mäßig erschwerte Atmung aufwiesen, war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Auskultatorisch konnten bei keinem Pferd, zu keinem Zeitpunkt abnorme Atemgeräusche festgestellt werden. Ebenso wurden bei der Lungenperkussion innerhalb der Therapie-Gruppe keine Auffälligkeiten registriert.

#### 4.4.2.2 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse nach Therapie

Allgemein wurden nur für den arteriellen Sauerstoff-Partialdruck signifikante Unterschiede vor und nach Therapie aufgedeckt ( $p = 0,041$ ), wobei nach Therapie ( $103,2 \pm 5,1$  mmHg) durchschnittlich höhere Werte als bei der Eingangsuntersuchung ( $96,6 \pm 8,3$  mmHg) gemessen wurden. Der arterielle Kohlendioxid-Partialdruck verhielt sich nahezu konstant (vor Inhalation:  $43,4 \pm 2,9$  mm Hg, nach Inhalation:  $44 \pm 2,8$  mmHg,  $p = 0,347$ ) und bei der alveolo-arteriellen Sauerstoff-Druckdifferenz konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Differenzen beobachtet werden ( $p = 0,155$ ). Allerdings wurden für die  $AaDO_2$  nach Therapie insgesamt niedrigere Werte erhoben als zuvor, welche jeweils bei 0 (0-2,5) und 0,5 (0-18,7) mmHg lagen. Eine gruppenvergleichende Darstellung der gemessenen Blutgase findet sich in Tabelle 29. Daran ist zu erkennen, dass die  $PaO_2$ -Werte nach Therapie nur bei den Pferden mit chronischer Bronchitis in Exazerbation statistisch signifikant erhöht waren ( $p = 0,017$ ), während innerhalb von Gruppe 3 keine relevanten Unterschiede bestanden. Die  $PaCO_2$ -Werte verhielten sich innerhalb der einzelnen Gruppen konstant, während bei der  $AaDO_2$  nur innerhalb von Gruppe 2 ( $p = 0,028$ ) eine signifikante Senkung des Parameters nach Inhalation beobachtet wurde. Bei den Patienten mit IAD oder COB in Remission wurde nach Therapie eher ein steigender Trend der  $AaDO_2$  festgestellt, dabei verblieben die Werte jedoch immer im Normbereich. Eine Übersicht der anhand der  $AaDO_2$  vergebenen Score-Punktzahlen ist in Tabelle 30 schematisch dargestellt.

Tab. 29: Gruppenvergleichende Darstellung der Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse vor und nach Therapie. Für jeden Parameter sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung bzw. Medianwert (Minimum-Maximum) aufgeführt. Signifikanzen (p-Werte) bezüglich der Unterschiede vor und nach Therapie sind ebenfalls dargestellt.

Gruppe	vor Therapie [mmHg]	nach Therapie [mmHg]	Signifikanz (p-Wert)
<b>PaO<sub>2</sub></b>			
2	95,4 $\pm$ 9,8	105,6 $\pm$ 3,9	0,017
3	99,1 $\pm$ 3,9	98,3 $\pm$ 3,9	0,715
<b>PaCO<sub>2</sub></b>			
2	42,5 $\pm$ 3,1	42,6 $\pm$ 2,3	0,889
3	45,3 $\pm$ 1,2	46,8 $\pm$ 1	0,144
<b>AaDO<sub>2</sub></b>			
2	1,5 (0 - 18,7)	0 (0 - 1,3)	0,028
3	0 (0 - 1,2)	0 (0 - 2,5)	0,109

Tab. 30: AaDO<sub>2</sub>-Werte [mmHg] bei den verschiedenen Gruppen vor und nach Therapie mit jeweilig zugeteilter Score-Punktzahl.

AaDO <sub>2</sub> [mmHg]	Score	COB Ex. vor Therapie (n)	COB Ex. nach Therapie (n)	IAD/COB Rem. vor Therapie (n)	IAD/COB Rem. nach Therapie (n)
AaDO <sub>2</sub> < 7	0	5	8	4	4
AaDO <sub>2</sub> = 7-14	1	2	0	0	0
AaDO <sub>2</sub> > 14	2	1	0	0	0

#### 4.4.2.2.3 Ergebnisse des Belastungstests nach Therapie

Ein Belastungstest konnte nur mit drei Pferden aus der Therapie-Gruppe bei der Eingangsuntersuchung durchgeführt werden. Bei einem Patienten (Gruppe 2) fiel der Test beim ersten Mal bereits ohne besondere Auffälligkeiten aus und wurde somit nach Inhalation nicht wiederholt. Ein weiteres Pferd aus der Einheit „RAO bzw. COB in Exazerbation“ zeigte sowohl vor als auch nach Therapie eine verlängerte Beruhigungszeit, welche in beiden Fällen etwa 25 Minuten betrug. Das einzige Pferd aus der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ zeigte bei der ersten Untersuchung ebenfalls einen auffälligen Belastungstest. Allerdings wurde in diesem Fall nach Therapie eine deutliche Verbesserung beobachtet.

#### 4.4.2.2.4 Ergebnisse der röntgenologischen Untersuchung der Lunge nach Therapie

Eine röntgenologische Untersuchung der Lunge wurde bei den Patienten nur einmal, im Rahmen der Eingangsuntersuchung durchgeführt. Die Ergebnisse der Therapie-Gruppe sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tab. 31: Gruppenvergleichende Übersicht zu den Röntgenbefunden der Therapie-Einheit.

<b>Grad der Befundausprägung</b>	<b>COB in Exazerbation (n)</b>	<b>IAD/COB in Remission (n)</b>
<b>Bronchiale Verdickungen</b>		
o.b.B.	1	0
geringgradig	5	3
mittelgradig	2	1
hochgradig	0	0
<b>Interstitielle Verschattungen</b>		
o.b.B.	1	1
geringgradig	1	0
mittelgradig	6	3
hochgradig	0	0

#### 4.4.2.2.5 Ergebnisse der Intrapleuraldruck-Messung nach Therapie

Eine Messung des Intrapleuraldrucks erfolgte vor Therapie bei insgesamt acht Pferden. Davon gehörten sechs Patienten zur Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ( $4,2 \pm 2,2$  cm H<sub>2</sub>O) und zwei zur Einheit „IAD oder COB in Remission“ ( $3 \pm 1,4$  cm H<sub>2</sub>O). Eine Wiederholung der Lungenfunktionsuntersuchung nach inhalativer Therapie konnte nur bei vier Pferden aus Gruppe 2 durchgeführt werden. Es wurden beim zweiten Messdurchgang, bei Pferden mit chronischer Bronchitis in Exazerbation numerisch niedrigere IPD-Werte beobachtet als zuvor ( $p = 0,066$ ). Diese lagen bei den vier Patienten, vor und nach Inhalation, durchschnittlich bei jeweils  $5,1 \pm 2,2$  und  $3,7 \pm 1,7$  cm H<sub>2</sub>O.

#### 4.4.2.2.6 Ergebnisse der Tracheobronchoskopie nach Therapie

Die Befunde der Endoskopien ergaben insgesamt hochsignifikante Unterschiede zwischen den zwei Untersuchungszeitpunkten ( $p = 0,007$ ). Bei den nach DIECKMANN et al. (1987) und GERBER et al. (2004) beurteilten Mengen ( $p = 0,023$ ) bzw. Viskositäten ( $p = 0,007$ ) der tracheobronchialen Sekrete wurden ebenfalls signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede festgestellt. Bei Betrachtung der einzelnen Diagnose-Gruppen (Tabelle 32) fiel auf, dass bei den Pferden mit exazerbierter, chronischer Bronchitis die Ausprägung der endoskopischen Befunde (Schleimhautfarbe und -beschaffenheit, Dicke der *Carina tracheae*, Charakter des TBS) nach Therapie signifikant schwächer war als bei Erstuntersuchung ( $p = 0,034$ ). Innerhalb derselben Gruppe wurden bezüglich der Beschaffenheit des tracheobronchialen Sekrets ebenfalls signifikante Veränderungen nach Therapie beobachtet, mit einer deutlichen Abnahme sowohl der Sekretmenge ( $p = 0,041$ ) als auch der -viskosität ( $p = 0,027$ ). Drei der insgesamt vier Pferde mit IAD oder COB in Remission, welche vor Inhalation gering- bis mittelgradige endoskopische Befunde aufwiesen, zeigten nach Therapie keine Auffälligkeiten mehr ( $p = 0,083$ ). In diesem Fall konnten allerdings keine signifikanten Abnahmen von Menge ( $p = 0,414$ ) und Viskosität ( $p = 0,102$ ) des TBS festgestellt werden.

Tab. 32: Gruppenvergleichende Übersicht zum Ausprägungsgrad endoskopischer Befunde vor und nach Therapie. Signifikanzen (p-Werte) bezüglich der Unterschiede vor und nach Therapie sind ebenfalls aufgeführt und in grau markiert.

Endoskopische Befunde	COB Ex. vor Therapie (n)	COB Ex. nach Therapie (n)	IAD/COB Rem. vor Therapie (n)	IAD/COB Rem. nach Therapie (n)
o.b.B.	0	1	0	3
ggr. - mgr.	2	6	4	1
hgr.	6	1	0	0
<b>p-Werte</b>	<b>p = 0,034</b>		<b>p = 0,083</b>	

#### 4.4.2.2.7 Ergebnisse von bronchoalveolärer Lavage und zytologischen Diagnostik nach Therapie

Nach Therapie wurden sowohl allgemein ( $p = 0,119$ ), als auch innerhalb der einzelnen Gruppen (Gruppe 2:  $p = 0,309$ , Gruppe 3:  $p = 0,273$ ) kleinere Mengen an Spülflüssigkeit zurückgewonnen als bei erster Durchführung der BAL.

Bei der zytologischen Untersuchung der BALF-Abstriche ergaben sich zwar Unterschiede bezüglich des prozentualen Differenzialzellbildes vor und nach Therapie, allerdings waren diese meist nicht auf statistisch signifikantem Niveau (Tabelle 33). Die Anzahl an Makrophagen lag bei der ersten Untersuchung in beiden Gruppen unter 60 %, wobei innerhalb der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ niedrigere Prozentzahlen beobachtet wurden als bei der Einheit „IAD oder COB in Remission“. Nach inhalativer Therapie wurde ein steigender Trend in der durchschnittlichen Anzahl an Makrophagen sowohl allgemein ( $p = 0,068$ ) als auch bei separater Betrachtung der Diagnose-Gruppen (Gruppe 2:  $p = 0,161$ , Gruppe 3:  $p = 0,273$ ) festgestellt. Somit wurden in Gruppe 3 bei fast allen Pferden nach Behandlung normale Werte erreicht. Nur ein Pferd aus diesem Kollektiv zeigte nach Inhalation (16,8 %) eine niedrigere, relative Anzahl an Makrophagen in der BALF als zuvor (27,4 %). Innerhalb von Gruppe 2 konnte auch, zum Teil ein steigender Trend der Makrophagen beobachtet werden, allerdings lagen diese nach Therapie immer noch unterhalb des Referenzbereiches (Tabelle 33). Bei den meisten Pferden mit exazerbierter, chronischer Bronchitis betrug die Anzahl an Lymphozyten in der BALF nach Erstuntersuchung weit unter 35 %. Im Gegensatz dazu waren die prozentualen Zahlen der Lymphozyten bei den meisten Pferden mit „IAD oder COB in Remission“ vor Therapie nur leicht erniedrigt. Nach inhalativer Behandlung waren einige tendenzielle Veränderungen vorhanden, welche allerdings keine statistische Signifikanz aufwiesen ( $p = 0,433$ ). Bei sechs von insgesamt acht Pferden aus Gruppe 2 bestand nach Therapie eine numerisch höhere Anzahl an Lymphozyten ( $p = 0,123$ ) als zuvor, während innerhalb von Gruppe 3 nach Therapie eher eine sinkende Tendenz registriert wurde ( $p = 0,273$ ). Für den Zelltyp „neutrophile Granulozyten“ wurde allgemein ein sinkender Trend nach Therapie festgestellt ( $p = 0,136$ ). Die Prozentsätze für neutrophile Granulozyten waren bei allen Pferden mit RAO bzw. COB in Exazerbation zu Beginn deutlich erhöht. Eine numerische Senkung dieser Werte nach Behandlung wurde bei 6 von insgesamt 8 Pferden festgestellt ( $p = 0,093$ ). Bei den restlichen beiden Patienten wurde stattdessen eine leichte Erhöhung der Werte beobachtet. Ein ähnliches Bild ergab sich bei nahezu allen an IAD oder COB in Remission erkrankten Pferden ( $p = 0,715$ ), allerdings bewegten sich hier die prozentualen Zahlen, im Vergleich zu Gruppe 2, in einem etwas niedrigeren Bereich (Tabelle 33). Nur bei einem Pferd aus Gruppe 3 wurde ein numerischer Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BALF nach Therapie beobachtet (von 27,8 % auf 69,4 %). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF wurde auch im klinischen Gesamtscore berücksichtigt. Eine Übersicht zu den für diesen Parameter vergebenen Punktzahlen findet sich in Tabelle 34. Die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BALF war insgesamt sehr niedrig und lag somit sowohl vor als auch nach Inhalation bei allen Patienten im Referenzbereich. Innerhalb von Gruppe 3 konnten nach Therapie sogar keine Zellen dieser Art mehr nachgewiesen

werden. Die numerisch höchsten Prozentsätze an Mastzellen vor Therapie wurden in der BALF von an IAD oder COB in Remission leidenden Pferden registriert (Tabelle 33). Sowohl allgemein ( $p = 0,016$ ) als auch innerhalb der einzelnen Gruppen (Gruppe 2:  $p = 0,093$ , Gruppe 3:  $p = 0,068$ ) wurde eine sinkender Trend in der Anzahl an Mastzellen nach inhalativer Therapie nachgewiesen.

Tab. 33: Medianwerte (Minimum-Maximum) des Zellgehalts (%) der BALF vor und nach Therapie bei den verschiedenen Gruppen. Signifikanzen (p-Werte) bezüglich der Unterschiede vor und nach Therapie sind für die einzelnen Zellarten ebenfalls dargestellt und in grau markiert.

Zelltyp	RAO/COB in Exazerbation		IAD/COB in Remission	
	vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
Makrophagen	21,2 (8,2 - 47)	36,2 (8,6 - 49,4)	51,3 (27,4 - 59,8)	62,2 (16,8 - 73,2)
<b>p-Wert</b>	p = 0,161		p = 0,273	
Lymphozyten	21,9 (3,8 - 34,8)	27,7 (15,6 - 48,2)	30,5 (27 - 40,2)	24,4 (12,2 - 35,5)
<b>p-Wert</b>	p = 0,123		p = 0,273	
Neutrophile Granulozyten	49,7 (27 - 87,8)	36,2 (14,4 - 67,8)	15,3 (9,8 - 27,8)	5,2 (1,7 - 69,4)
<b>p-Wert</b>	p = 0,093		p = 0,715	
Eosinophile Granulozyten	0 (0 - 0,6)	0 (0 - 0,2)	0 (0 - 0,7)	0 (0 - 0)
<b>p-Wert</b>	p = 1		p = 0,317	
Mastzellen	1,2 (0 - 4,6)	0,5 (0 - 1)	3,6 (0,6 - 4,6)	1,9 (0,5 - 3)
<b>p-Wert</b>	p = 0,093		p = 0,068	

Tab. 34: Übersicht zu den anhand prozentualer Zahlen an neutrophilen Granulozyten in der BALF vergebenen Score-Punkten vor und nach Therapie.

Neutrophile Granulozyten	Score-Punkte	RAO/COB in Exazerbation (n)		IAD/COB in Remission (n)	
		vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
< 10 %	0	0	0	1	2
10 - 15 %	1	0	0	1	1
15 - 25 %	2	0	2	1	0
> 25 %	3	8	6	1	1

#### 4.4.2.2.8 Ergebnisse des klinischen Scores nach Therapie

Wie schon einmal erwähnt, dienten die klinischen Parameter Husten, Ruhedyspnoe, Lungenauskultation sowie -perkussion, Blutgasanalyse, Tracheobronchoskopie und Neutrophilie der BALF der Zusammenstellung des Gesamtscores. Patienten nach Behandlung zeigten allgemein hochsignifikant niedrigere Score-Punktzahlen als bei Erstuntersuchung ( $p = 0,005$ ). Eine Übersicht dazu folgt in Tabelle 35. Daran ist zu erkennen, dass die meisten an RAO bzw. COB in Exazerbation leidenden Tiere vor Therapie als hochgradig bzw. mittelgradig erkrankt eingestuft wurden. Nach inhalativer Behandlung ergab sich für dieses Kollektiv eine signifikante Besserung des Krankheitszustandes ( $p = 0,011$ ), da sieben Pferde eine mittelgradige und eins sogar nur noch eine geringgradige Ausprägung der Lungenkrankheit aufwiesen. Die IAD bzw. COB in Remission war schon zu Beginn der Studie durch einen niedrigeren Schweregrad charakterisiert. Nach Therapie wurde auch hier eine tendenzielle Besserung im Sinne von Erniedrigung des klinischen Gesamtscores beobachtet ( $p = 0,108$ ). In diesem Fall resultierten die meisten Patienten nach Behandlung sogar als „gesund“ (Tabelle 35).

Tab. 35: Gesamtscore-Punktzahlen bei den verschiedenen Gruppen vor und nach Therapie. Signifikanzen (p-Werte) bezüglich der Unterschiede vor und nach Therapie sind in grau dargestellt.

Score-Punkte	Schweregrad	COB in Exazerbation (n)		IAD/COB in Remission (n)	
		vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
0 - 1	gesund	0	0	1	3
2 - 3	geringgradig	0	1	1	0
4 - 6	mittelgradig	2	7	2	1
≥ 7	hochgradig	6	0	0	0
<b>p-Wert</b>		p = 0,011		p = 0,108	

#### 4.4.3 Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen nach Therapie

##### 4.4.3.1 Ergebnisse zu Procalcitonin in der BALF nach Therapie

Mittels bereits beschriebenem Sandwich-ELISA (Arbeitsbereich: 25-250 ng/ml) wurden im Rahmen erster Untersuchungen durchschnittliche PCT-Konzentrationen von 13,8 (3,8-493,7) ng/ml in der BALF gemessen. Nach inhalativer Therapie und erneuter Messung der Werte wurden im Schnitt numerisch höhere Konzentrationen gemessen als zuvor, welche bei 16,5 (0,6-847,8) ng/ml lagen ( $p = 0,158$ ). Eine gruppenvergleichende Darstellung der Ergebnisse für Procalcitonin-Bestimmungen vor und nach Behandlung ist in Tabelle 37 aufgeführt. Aus Abbildung 8 ist ersichtlich, dass auch innerhalb der zwei Kollektive die PCT-Werte nach Therapie einem steigenden Trend folgten. Dabei zeigten sowohl die Hälfte der Pferde aus der Einheit „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ( $p = 0,263$ ) als auch die Hälfte der Patienten mit IAD oder COB in Remission ( $p = 0,465$ ) nach Inhalation numerisch höhere PCT-Konzentrationen als zuvor. In den restlichen Fällen wurden im Vergleich zur Eingangsuntersuchung niedrigere Werte gemessen. In Tabelle 36 sind die bei den einzelnen Pferden gemessenen PCT-Konzentrationen in Verbindung mit prozentualer Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BALF und klinischer Score-Punktzahl dargestellt.



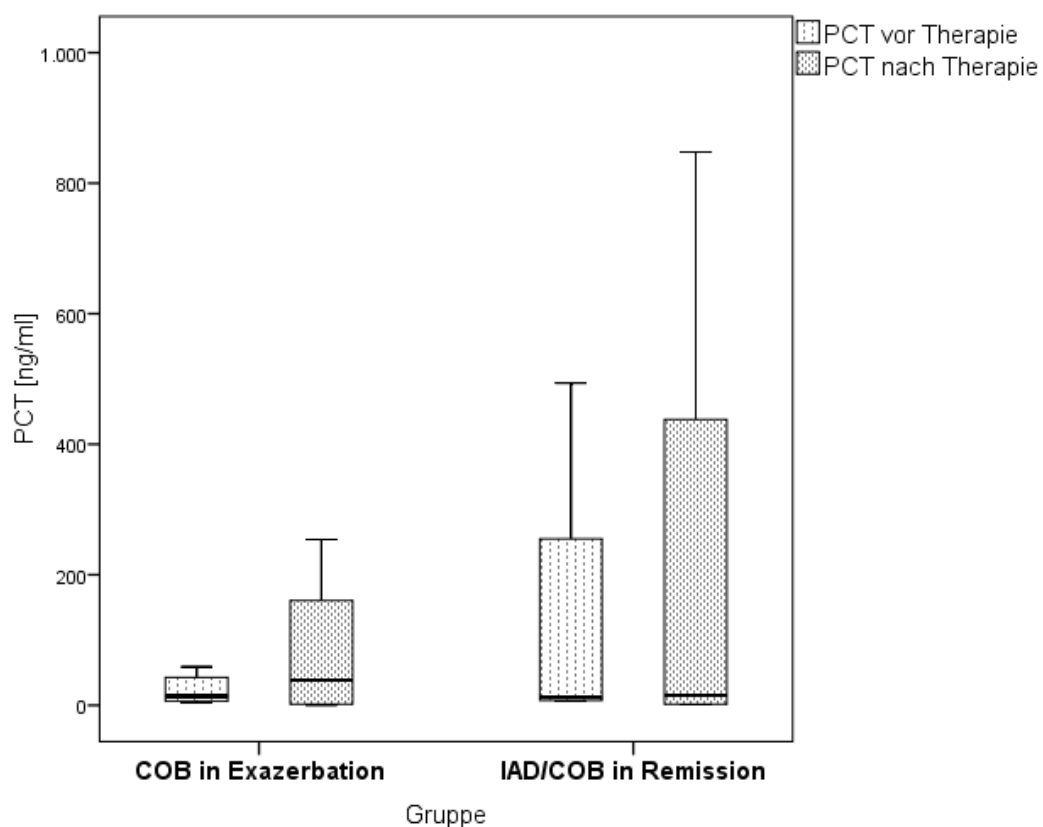


Abb. 8: PCT-Konzentrationen [ng/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12). Sowohl allgemein ( $p = 0,158$ ) als auch innerhalb der einzelnen Kollektive (Gruppe 2:  $p = 0,263$ ; Gruppe 3:  $p = 0,465$ ) wurde für den besagten Parameter ein steigender Trend nach Therapie festgestellt.

Tab. 36: Darstellung von klinischem Gesamtscore (Punktzahl), neutrophilen Granulozyten (NG, %) und PCT-Konzentrationen (PCT, ng/ml) in der BALF vor und nach Therapie. Die grauen Felder markieren Fälle, bei denen nach Therapie erhöhte Werte der jeweiligen Parameter festgestellt wurden.

Gruppe	Score VT	Score NT	NG (%) VT	NG (%) NT	PCT [ng/ml] VT	PCT [ng/ml] NT
2	6	4	47,4	14,4	11,6	2,3
2	9	3	45,8	38,2	41,4	141,6
2	8	6	52	67,8	44,3	254,1
2	7	5	27	34,2	5,1	4,8
2	7	4	43	18,8	58,9	179,3
2	8	5	87,8	34,2	3,8	0,6
2	6	5	84,2	56	6,9	1,3
2	8	4	53,6	49,2	16,2	71,9
3	4	0	18,7	2,5	493,7	847,8
3	2	0	11,8	1,7	16,1	2,2
3	1	1	9,8	8	8,7	28,1
3	4	4	27,8	69,4	6,3	1,3

VT = vor Therapie, NT = nach Therapie

#### 4.4.3.2 Ergebnisse zu Interleukin-1 $\beta$ in der BALF nach Therapie

Zur Bestimmung der Konzentrationen des Interleukins-1 $\beta$  in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit wurde ein kommerzielles Kit der Marke USCN verwendet (*detection range*: 15,6-1.000 pg/ml). Bei Betrachtung der gesamten Therapie-Gruppe wurde zwischen den zwei Messungen ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen beobachtet ( $p = 0,016$ ). Diese lagen vor und nach Behandlung durchschnittlich bei jeweils 18,5 (5,7-69) und 55 (18-85) pg/ml. Soeben wurden steigende Tendenzen der Werte innerhalb der einzelnen Diagnose-Gruppen festgestellt (Abbildung 9, RAO bzw. COB in Exazerbation:  $p = 0,093$ , IAD oder COB in Remission:  $p = 0,109$ ). Bei an RAO oder COB in Exazerbation erkrankten Pferden wurden bei sechs von insgesamt acht Individuen nach Inhalation höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der BALF gemessen als zuvor. Bei den restlichen zwei Tieren wurden im Gegensatz dazu geringere Konzentrationen bestimmt. Ebenso zeigten drei von vier Patienten aus der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentrationen nach Therapie, während bei

einem Pferd die Konzentration konstant blieb. Eine Übersicht zu den gemessenen Werten findet sich in Tabelle 37.

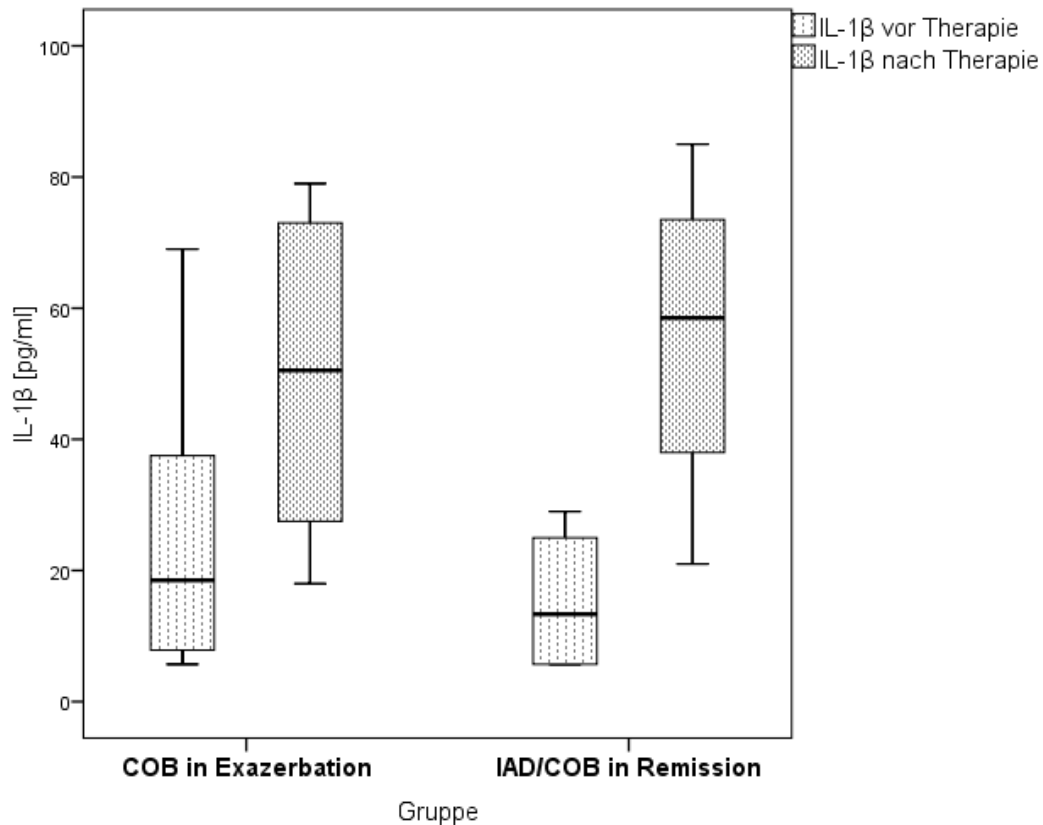


Abb. 9: IL-1 $\beta$ -Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid (n = 12). Während allgemein für den besagten Parameter ein statistisch signifikanter Anstieg der Werte nach Therapie beobachtet wurde ( $p = 0,016$ ), wurden innerhalb der einzelnen Gruppen ausschließlich steigende Tendenzen festgestellt (Gruppe 2:  $p = 0,093$ ; Gruppe 3:  $p = 0,109$ ).

#### 4.4.3.3 Ergebnisse zu Interleukin-6 in der BALF nach Therapie

Die Konzentrationen an Interleukin-6, welche mittels kommerziellen Kits von USCN (*working range*: 7,8-500 pg/ml) in der BALF gemessen wurden, waren innerhalb der Therapie-Gruppe nach Behandlung insgesamt numerisch niedriger als zuvor ( $p = 0,182$ ). Dabei sanken die Werte von 6,5 (2,5-44) auf 2,5 (2,5-33) pg/ml. Bei nahezu allen Pferden aus der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ wurden signifikante Erniedrigungen der IL-6-Konzentrationen beobachtet ( $p=0,036$ ). Nur ein Patient dieser Einheit zeigte nach

Behandlung eine Erhöhung der IL-6-Konzentration in der Spülflüssigkeit (von 2,5 auf 6 pg/ml). Anders verliefen die Messungen innerhalb des Kollektivs „IAD oder COB in Remission“ ( $p = 0,285$ ). Hier wurde nach Therapie bei zwei Pferden eine Erhöhung des Interleukins festgestellt, während sich bei den restlichen beiden Patienten jeweils eine Erniedrigung bzw. eine Konstanz des Parameters ergab. Die für IL-6 durchschnittlich gemessenen Werte sind in Tabelle 37 gruppenvergleichend zusammengefasst sowie in Abbildung 10 grafisch dargestellt.

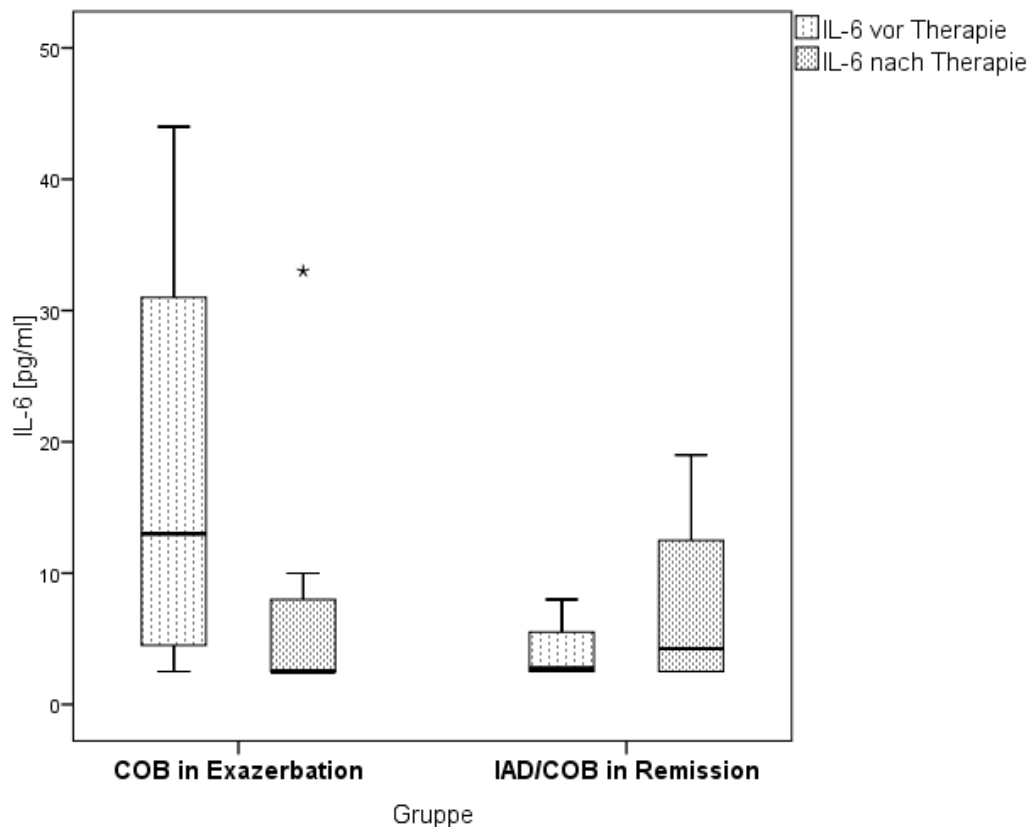


Abb. 10: IL-6-Konzentrationen [pg/ml] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid ( $n = 12$ ). Allgemein wurde für den besagten Parameter ein sinkender Trend nach Therapie festgestellt ( $p = 0,182$ ). Innerhalb der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ wurde nach Therapie eine statistisch signifikante Senkung der Werte gemessen ( $p = 0,036$ ). Diese lagen zwischen 2,5 und 10 pg/ml, wobei nur ein Ausreißer (Stern) einen höheren Wert von 33 pg/ml zeigte. Innerhalb der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ war hingegen eine steigende Tendenz der Werte nach Therapie zu beobachten ( $p = 0,285$ ).

#### 4.4.3.4 Ergebnisse zu Interleukin-17 in der BALF nach Therapie

Quantitative Aussagen bezüglich der effektiven Konzentrationen an Interleukin-17 in der BALF waren auch in diesem Falle, wegen der bereits beschriebenen Probleme (siehe Paragraph 4.3.2.3 dieses Kapitels), nicht möglich. Daher wurden hier, zur qualitativen Beurteilung von Gruppenunterschieden, nur die Werte für optische Dichte herangezogen (Tabelle 37). Die mittels Sandwich-ELISA (USCN, Arbeitsbereich: 15,6-1.000 pg/ml) gemessenen Konzentrationen für IL-17 sind der Vollständigkeit halber auch in Tabelle 37 aufgeführt. Bei Betrachtung der gesamten Therapie-Einheit wurde ein sehr deutlicher Anstieg der gemessenen OD-Werte beobachtet ( $p = 0,002$ ). Die Zahlen für optische Dichte stiegen dabei nach Inhalation von 0,18 (0,07-0,56) auf 0,84 (0,51-0,98) an. Dies konnte auch innerhalb der einzelnen Gruppen bestätigt werden (Abbildung 11), da sowohl innerhalb des Kollektivs „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ( $p = 0,012$ ), als auch innerhalb der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ ( $p = 0,068$ ) bei allen Patienten eine Steigerung der OD-Werte nach Therapie beobachtet wurde (Tabelle 37).

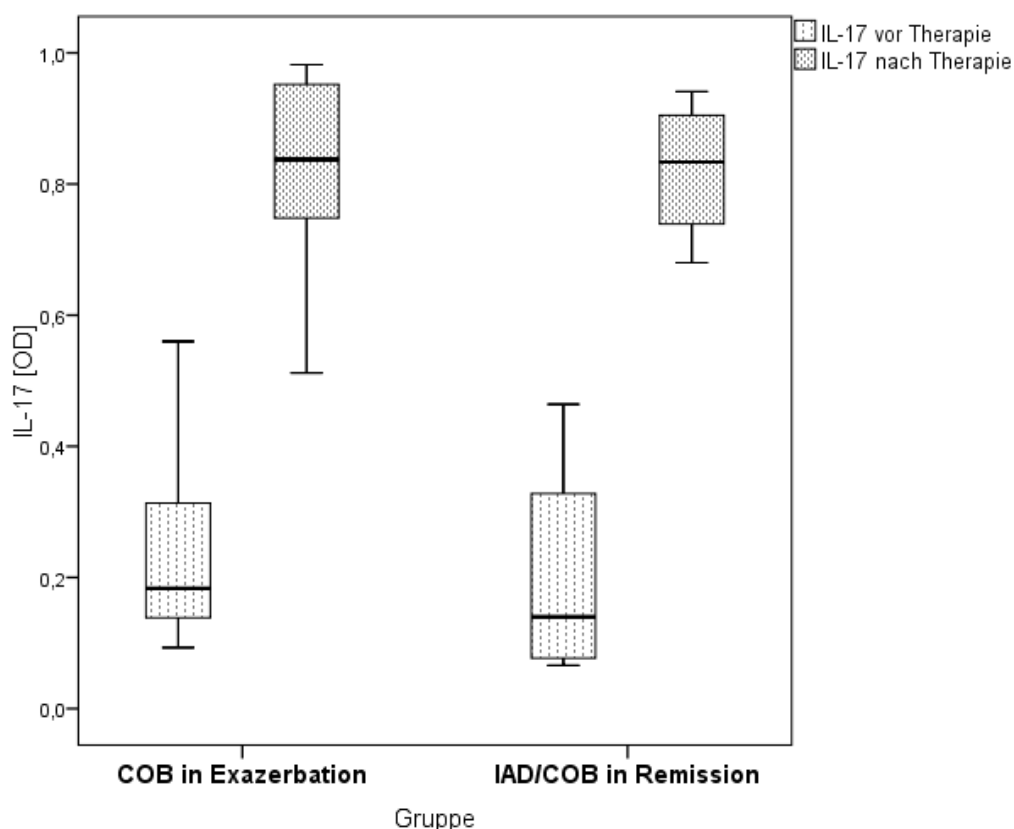


Abb. 11: IL-17 [OD-Werte] in der BALF bei den verschiedenen Diagnose-Gruppen vor und nach inhalativer Therapie mit einem Glukokortikoid ( $n = 12$ ). Sowohl allgemein ( $p = 0,002$ ) als auch innerhalb von Gruppe 2 ( $p = 0,012$ ) wurde ein signifikanter Anstieg der OD-Werte nach Therapie festgestellt. Innerhalb von Gruppe 3 zeigte sich ein steigender Trend ( $p = 0,068$ ).

Tab. 37: Medianwerte (Minimum-Maximum) der Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker in der BALF vor und nach Therapie im Gruppenvergleich.

Marker	COB in Exazerbation		IAD/COB in Remission	
	vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
PCT [ng/ml]	13,9 (3,8 - 58,8)	38,4 (0,6 - 254,1)	12,4 (6,4 - 493,7)	15,2 (1,3 - 847,8)
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	18,5 (5,7 - 69)	50,5 (18 - 79)	13,3 (5,7 - 29)	58,5 (21 - 85)
IL-6 [pg/ml]	13 (2,5 - 44)	2,5 (2,5 - 33)	2,7 (2,5 - 8)	4,2 (2,5 - 19)
IL-17 [pg/ml]	6,2 (6,2 - 21)	222 (6,2 - 521)	6,2*	218,5 (78 - 403)
IL-17 [OD]	0,18 (0,09 - 0,56)	0,84 (0,51 - 0,98)	0,14 (0,07 - 0,46)	0,83 (0,68 - 0,94)

\* Wert innerhalb der Gruppe konstant

## 4.5 Korrelationen

Zum Abschluss der statistischen Auswertung wurden eventuelle Zusammenhänge zwischen den gemessenen Entzündungsmarkern und den erhobenen lungenspezifischen, klinischen Parametern untersucht. Wegen den bekannten Schwankungen der Entzündungsmarker mit dem Alter der Individuen wurde dieser Zusammenhang bei den Patienten ebenfalls geprüft. Außerdem wurde bestimmt, ob die einzelnen Entzündungsmarker untereinander korrelieren. Die Beurteilung der aufgestellten Korrelationen erfolgte immer anhand gleichzeitiger Betrachtung des Korrelations-Koeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) und der jeweiligen Signifikanz (p-Wert).

### 4.5.1 Korrelationen von Procalcitonin

Die in BALF und Blutplasma nachgewiesenen PCT-Konzentrationen korrelierten mit verschiedenen Parametern. Allerdings handelte es sich in den meisten Fällen um schwache Zusammenhänge, da die Korrelations-Koeffizienten nahezu alle unter 0,5 lagen (Tabelle 38). Für das Procalcitonin wurde zusätzlich ein Zusammenhang mit den Konzentrationen an ionisiertem Kalzium in arteriellem Blut überprüft. Dabei konnte eine schwache Korrelation mit den in Blutplasma gemessenen PCT-Werten nachgewiesen werden ( $r_s = 0,48$ ;  $p = 0,060$ ). Ein schwacher, jedoch signifikanter Zusammenhang zwischen PCT-Werten in BALF und Blutplasma konnte mit einem Koeffizienten von 0,49 ( $p = 0,039$ ) ebenfalls festgestellt werden. Am stärksten korrelierten PCT in Blutplasma und Atemfrequenz mit einem Koeffizienten von 0,53 und einem p-Wert von 0,025. Ein negativer Zusammenhang wurde zwischen den PCT-Konzentrationen in Blutplasma und dem arteriellen Sauerstoff-Partialdruck ( $r_s = -0,60$ ;  $p = 0,009$ ) beobachtet. Sowohl in der bronchoalveolären Flüssigkeit ( $r_s = 0,32$ ;  $p = 0,007$ ) als auch im Blutplasma ( $r_s = 0,49$ ;  $p = 0,038$ ) gemessene PCT-Konzentrationen korrelierten außerdem, in schwachem Ausmaß mit dem klinischen Score. Weitere leichte Zusammenhänge bestanden zwischen PCT in BALF und jeweils Alter, Schweregrad der endoskopischen Befunde (inklusive Menge des tracheobronchialen Sekrets) und Intrapleuraldruck sowie zwischen PCT in Blutplasma und bronchialen Röntgenbefunden (siehe Tabelle 38).

### 4.5.2 Korrelationen der Interleukine

Für die verschiedenen, in der BALF gemessenen Interleukine konnten nur schwache Zusammenhänge beobachtet werden (Tabelle 38). Eine leichte aber höchstsignifikante Korrelation zwischen IL-1 $\beta$  und -6 wurde festgestellt ( $r_s=0,41$ ;  $p < 0,001$ ). Außerdem konnten für das Interleukin-1 $\beta$  schwache Beziehungen zu Intrapleuraldruck sowie Viskosität des tracheobronchialen Sekrets aufgedeckt werden. Das Interleukin-6 zeigte die meisten Korrelationen. Von besonderer Wichtigkeit ist an dieser Stelle ein signifikanter Zusammenhang zum prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten in der BALF zu nennen ( $r_s = 0,28$ ;  $p = 0,021$ ) und eine gleichzeitige, negative Korrelation zur Makrophagen-Menge ( $r_s$

= - 0,34;  $p = 0,005$ ). Die endoskopischen Befunde (inklusive Menge und Viskosität des TBS) zeigten ebenfalls schwache Beziehungen zu den IL-6-Konzentrationen (Tabelle 38). Als einziges Interleukin korrelierte außerdem IL-6 mit dem klinischen Score ( $r_s = 0,32$ ;  $p = 0,007$ ). Abschließend ergab sich ein negativer Zusammenhang zwischen den für IL-17 gemessenen optischen Dichten und der Anzahl an Mastzellen in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit ( $r_s = - 0,26$ ;  $p = 0,031$ ).



Tab. 38: Übersicht zu Korrelationen ( $r_s$ ) zwischen den in BALF und Blutplasma gemessenen Entzündungsmarkern und ausgewählten lungenspezifischen klinischen Parametern. Relevante Zusammenhänge (grau) wurden angenommen, wenn gleichzeitig ein Korrelationskoeffizient nach Spearman  $> 25$  und ein p-Wert  $\leq 0,05$  vorlagen.

	PCT BAL	PCT Blut	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-17 OD	Alter	Ca <sup>2+</sup>	AF	PaO <sub>2</sub>	IPD	Rö. Br.	EU	TBS-M.	TBS-V.	MP	NG	MZ	KS
PCT BAL	-	<b>0,49</b>	0,03	0,10	-0,22	<b>0,30</b>	0,21	0,23	-0,09	<b>0,42</b>	0,20	<b>0,29</b>	<b>0,28</b>	0,24	-0,12	0,17	0,08	<b>0,32</b>
PCT Blut	<b>0,49</b>	-	0,07	-0,33	0,03	0,31	0,48	<b>0,53</b>	<b>-0,60</b>	0,26	<b>0,49</b>	0,32	0,35	0,32	-0,12	0,37	-0,32	<b>0,49</b>
IL-1 $\beta$	0,03	0,07	-	<b>0,41</b>	-0,04	-0,08	0,19	0,10	-0,12	<b>0,34</b>	-0,11	0,23	0,25	<b>0,26</b>	-0,16	0,11	-0,02	0,16
IL-6	0,10	-0,33	<b>0,41</b>	-	-0,11	-0,06	0,15	0,07	-0,12	0,15	-0,04	<b>0,30</b>	<b>0,29</b>	<b>0,27</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,28</b>	-0,01	<b>0,32</b>
IL-17 OD	-0,22	0,03	-0,04	-0,11	-	-0,12	-0,22	-0,20	-0,13	-0,24	-0,19	-0,2	-0,13	-0,09	0,05	-0,07	<b>-0,26</b>	-0,14

PCT BAL = PCT-Konzentrationen in BALF (ng/ml); PCT Blut = PCT-Konzentrationen in Blutplasma (ng/ml); IL-1 $\beta$  = IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in BALF (pg/ml); IL-6 = IL-6-Konzentrationen in BALF (pg/ml); IL-17 OD = IL-17-Werte für optische Dichte in BALF; Alter = Alter der Pferde (Jahre); Ca<sup>2+</sup> = Konzentration an ionisiertem Kalzium in arteriellem Blut (mmol/l); AF = Atemfrequenz (Atemzüge/min); PaO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoff-Partialdruck (mmHg); IPD = Intrapleuraldruck (cm H<sub>2</sub>O); Rö. Br. = bronchiale Röntgenbefunde; EU = Befunde der endoskopischen Untersuchung; TBS-M. und TBS-V. = Menge und Viskosität des tracheobronchialen Sekrets, Score-System nach DIECKMANN et al. (1987) bzw. GERBER et al. (2004); MP = Makrophagen in BALF (%); NG = neutrophile Granulozyten in BALF (%); MZ = Mastzellen in BALF (%); KS = Klinischer Score, Score-System modifiziert nach OHNESORGE et al. (1998)

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Studiendesign: Ziele, Vor- und Nachteile

Ziel dieser Studie war es, die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker (Procalcitonin, Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -17) in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit chronisch lungenkranker Pferde zu untersuchen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den diagnostischen Wert und die Korrelation dieser Parameter mit dem klinischen Status der Probanden gelegt.

In dem ersten Abschnitt der Studie wurden also Patienten, welche an der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin zur Lungendiagnostik vorgestellt wurden, mittels eines standardisierten Protokolls über drei Tage untersucht. Durch die zahlreichen erhobenen klinischen Daten konnten die Pferde anschließend mit hoher Sicherheit einer bestimmten Diagnosegruppe zugeteilt werden. Weiterhin wurde zum Vergleich eine Kontrollgruppe lungengesunder Pferde ausgewählt und nach demselben Protokoll untersucht.

In einer folgenden Phase wurden insgesamt zwölf Patienten aus den Gruppen „RAO bzw. COB in Exazerbation“ und „IAD bzw. COB in Remission“ einer zehntägigen inhalativen Glukokortikoidtherapie (Budesonid) unter optimiertem Haltungszustand unterzogen und anschließend erneut nach dem bereits angewandten, standardisierten Schema untersucht. Dabei sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen erfolgreicher Behandlung und veränderter Markerkonzentrationen in der BALF nachgewiesen werden.

Die Analyse der gesammelten Proben erfolgte als letzter Schritt im Helmholtz-Zentrum München unter Anleitung von Spezialisten auf dem Gebiet immunchemischer Methoden. Während bis heute die Zytokinuntersuchungen beim Pferd vornehmlich auf transkriptioneller Ebene erfolgten (siehe Abschnitt 2.2.1.3.2), wurde in dieser Studie anhand kommerzieller ELISA-Kits der Marke USCN (Uscn Life Science Inc., Hubei, PRC) eine direkte Messung der Interleukinkonzentrationen in der BALF durchgeführt. Procalcitonin, ein in der Humanmedizin bereits etablierter Marker (MEISNER, 2010), wurde außerdem mittels eines von RIEGER und Kollegen (2014) neuerlich entwickelten equinen ELISA-Tests erstmals bei lungenkranken Pferden in BALF- und Plasma-Proben bestimmt.

Als erster positiver Aspekt der vorliegenden Arbeit ist sicherlich die relative Größe der Stichprobe zu nennen. Aufgrund der beim Pferd zum Teil aufwendigen Diagnostikmethoden ist es oft schwer, die Besitzer zu motivieren, ihre erkrankten Tiere einem solchen Untersuchungsprotokoll auszusetzen. Durch die zahlreichen Patienten waren also in diesem Fall, zumindest im ersten Teil der Studie, gute Voraussetzungen für eine aussagekräftige statistische Evaluierung gegeben.

Durch die spontane Vorstellung der Patienten an der Pferdeklinik ergab sich natürlich auch eine hohe Variabilität bezüglich der Krankheitsgeschichte und dem Schweregrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der Vorstellung bzw. Probenahme. In den meisten aktuellen Studien wurden innerhalb sehr kleiner Patientenkollektive alle Probanden gleichzeitig einer Staubbelastung bzw. einem bestimmten Antigen ausgesetzt. Sowohl vor als auch nach der

Entwicklung klinischer Symptome und somit der Bestätigung des Vorliegens einer Exazerbation wurden bestimmte Proben (u. a. Blut, BALF, Bronchialepithel) entnommen und spezielle Parameter daraus gemessen (siehe Paragraph 2.2.1.3.2). In der vorliegenden Untersuchung ist eine solche Homogenität im Patientenkollektiv nicht vorzufinden. Allerdings wurden dadurch verschiedene Ausprägungsgrade der jeweiligen Atemwegserkrankungen erfasst und dadurch wichtige Informationen bezüglich des Trends bestimmter Entzündungsmarker innerhalb der verschiedenen Gruppen dargestellt.

Um die Vergleichbarkeit und Validität der Resultate zu gewährleisten, wurde außerdem ein einheitliches System für die Untersuchungen angewandt: Diese wurden immer von denselben vier Personen anhand standardisierter Protokolle (siehe Anhang) durchgeführt. Durch die Messung bestimmter Parameter (z. B. Atemfrequenz, Temperatur, arterielle Blutgase) über drei Tage und die folgende Mittelung konnten der Verlauf bzw. eventuelle Schwankungen dieser Werte besser erfasst werden.

Die Ergebnisse der inhalativen Budesonidbehandlung sind hingegen mit Vorsicht zu bewerten. Große Mängel an diesem Studienabschnitt sind sicherlich die sehr kleinen Stichproben und das Fehlen einer Placebo-Gruppe (WILLIAMSON und DAVIS, 2007). Letztere wäre sehr hilfreich gewesen, um sicher zu gehen, dass die beobachteten Änderungen auf die Wirkungen des verabreichten Medikamentes zurückzuführen sind und nicht zufällig bzw. durch andere Faktoren bedingt sind. Die Umsetzung dieses Studienprotokolls gestaltete sich allerdings aus den bereits genannten Problemen bezüglich der Probandenrekrutierung als sehr schwierig. Zusätzlich zur Durchführung einer erneuten bronchoalveolären Lavage hätten die Besitzer einer eventuellen Placebo-Gruppe in Kauf nehmen müssen, dass ihr erkranktes Tier über zehn Tage keine wirksame Behandlung erhalten hätte.

Obwohl auch viele andere bereits publizierte Studien auf diesem Gebiet sehr niedrige Probandenzahlen aufweisen (siehe Paragraph 2.4.3.2), ist dies als großer Nachteil zu nennen, da die Aussagekraft der statistischen Ergebnisse dadurch deutlich herabgesetzt wird.

Schließlich ist zu erwähnen, dass die inhalative Therapie parallel mit einer staubarmen Haltung erfolgte. Dies führte dazu, dass die erzielten Ergebnisse nicht sicher bzw. ausschließlich mit einer Wirkung des Glukokortikoids zu erklären sind bzw. eine getrennte Beurteilung der beiden Effekte nicht möglich war. Die meisten Probanden waren jedoch bereits vor der Studie im Heimatstall staubarm aufgestellt. Die Aufstallung in der Klinik diente somit dazu, allen Probanden die gleichen Bedingungen zu gewähren und die Inhalation einheitlich durch geschulte Mitarbeiter durchzuführen.

## **5.2 Patientengut: Auswahlkriterien und allgemeine Merkmale**

Von den insgesamt 68 Probanden wurden 53 Pferde aufgrund von Atemwegsproblemen an der Pferdeklunik der Freien Universität Berlin vorgestellt. Bei den restlichen 15 Patienten handelte es sich um klinikeigene, lungengesunde Kontrolltiere.

Da bei den erkrankten Pferden keine Vorauswahl stattfand, sondern diese zufällig in die Studie aufgenommen wurden, war die Gruppe bezüglich allgemeiner Merkmale (Rasse,

Größe, Gewicht) sehr heterogen. Dies sollte allerdings keine Bedeutung für die Studienergebnisse haben, da in anderen Arbeiten bereits belegt wurde, dass die Morphologie der Pferde die Lungenfunktionsparameter und das zytologische Bild von BALF-Ausstrichen nicht beeinflusst (FEY, 2005). In der vorliegenden Studie wurde also davon ausgegangen, dass der Pferdetyt auch keinen Einfluss auf die gemessenen Biomarker hatte. Aufgrund mangelnder Untersuchungen auf diesem Gebiet kann dies allerdings nicht *a priori* ausgeschlossen werden, sodass es bei der Betrachtung der Ergebnisse grundsätzlich bedacht werden sollte.

Die COB ist eine Erkrankung, welche vornehmlich ältere Pferde betrifft (COUËTIL und WARD, 2003) und dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden, da die Patienten der Gruppe „RAO bzw. COB in Exazerbation“ das höchste Alter ( $16,6 \pm 4,5$  Jahre) aufwiesen. Das niedrigere durchschnittliche Alter innerhalb von Gruppe 3 ( $12,9 \pm 4$  Jahre) ist dadurch zu erklären, dass hier zusätzlich zu Patienten mit COB in Remission auch solche mit IAD aufgenommen wurden und diese Krankheit bekannterweise ebenfalls jüngere Pferde betreffen kann (COUËTIL et al., 2007; HUGHES et al., 2011).

Für die Kontrolltiere erfolgte eine Auswahl nach bestimmten Kriterien. Dabei wurden möglichst junge Tiere ( $8,1 \pm 3,5$  Jahre) selektiert, welche im Vorbericht und anhand einer ersten klinischen Untersuchung als lungengesund resultierten. Wegen der recht aufwendigen Untersuchungsverfahren war es nur umsetzbar, klinikeigene Pferde als Kontrollen einzusetzen. Bezüglich des Alters ergab sich allgemein zwischen gesunden und erkrankten Tieren ein höchstsignifikanter Unterschied, welcher allerdings aufgrund der besagten Auswahl möglichst junger Kontrolliere nicht ausschlaggebend war.

### **5.3 Gruppeneinteilung und Score-System**

Anhand der gesammelten klinischen Daten wurden die Pferde einer der folgenden Diagnosegruppen zugeordnet: „gesund“ (Gruppe 1), „RAO bzw. COB in Exazerbation“ (Gruppe 2), „IAD oder COB in Remission“ (Gruppe 3), „chronische interstitielle Pneumopathie“ (Gruppe 4), „subakute bis akute Pneumonie“ (Gruppe 5). Die Einschlusskriterien wurden dabei in Anlehnung an anerkannte Literaturquellen definiert (DIECKMANN et al., 1990; ROBINSON, 2001; COUËTIL et al., 2007; WILKINS und LASCOLA, 2015) (siehe Paragraph 3.3.4).

Gesunde Tiere durften weder in den allgemeinen noch in den weiterführenden klinischen Untersuchungen Auffälligkeiten zeigen. Eventuelle Abweichungen werden in den Abschnitten über die Ergebnisse der jeweiligen diagnostischen Schritte besprochen.

An dieser Stelle soll nur noch einmal die Zusammensetzung von Gruppe 3 erläutert werden: Da das Krankheitsbild der IAD nur schwer von dem der COB in Remissionsphase zu trennen ist (eventuell mittels Exposition zu schimmeligem Heu) bzw. in einigen Fällen sogar ein Übergehen von der ersteren zur zweitgenannten Krankheit möglich ist (COUËTIL et al., 2007; LECLERE und LAVOIE, 2014), wurden hier die zwei Erkrankungen in derselben Einheit erfasst. Dadurch sollte eine falsche Zuordnung bzw. Interpretation krankheitsspezifischer Ergebnisse vermieden werden.

Zur Bestimmung des Schweregrades der vorliegenden Erkrankung kam der von OHNESORGE und Kollegen (1998) entwickelte klinische Score zur Anwendung (siehe Paragraph 3.3.3). Diese standardisierte und international anerkannte Methode (ROBINSON, 2001) wurde gezielt für die Beurteilung der COB des Pferdes entwickelt und ermöglicht es, verschiedene Ausprägungsgrade dieser Erkrankung einfach und sicher zu erfassen. Aufgrund dieser starken Spezifität war eine korrekte Beurteilung anderer Krankheitsbilder jedoch nicht möglich. Dies erklärt beispielsweise, warum die meisten Pferde mit deutlich ausgeprägter chronischer interstitieller Pneumopathie anhand dieses Score-Systems als gesund beurteilt wurden. Wichtige Merkmale dieser Atemwegserkrankung (i. e. Leistungsinsuffizienz, interstitielle Zeichnungen im Röntgenbild) werden in dem Score-System nach OHNESORGE et al. (1998) gar nicht berücksichtigt. Da zu Beginn der Untersuchungen allerdings nie bekannt war, um was für eine Erkrankung es sich handelte, und da in einigen Fällen die klinischen Äußerungen der COB denen der interstitiellen Pneumopathie stark ähneln können (DIECKMANN et al., 1990; WILKINS und LASCOLA, 2015), wurde das Score-System zunächst bei allen Patienten angewandt.

## **5.4 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchungen**

### **5.4.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung**

Die durchschnittlichen Werte der klinischen Allgemeinuntersuchung (außer Atemfrequenz) zeigten bei der Gesamtheit der Probanden nahezu keine Anomalien. Selbst in der kleinen Gruppe der Pferde mit (sub)-akuter Pneumonie wurden im Schnitt normale Körpertemperaturen gemessen ( $37,5 \pm 0,3$  °C). Obwohl respiratorische Infekte mit Fieber einhergehen können, ist dies kein zwingender Befund (REUSS und GIGUÈRE, 2015), was mit dem subfebrilen Zustand mancher Patienten der vorliegenden Studie im Konsensus steht. Des Weiteren konnten in einigen Fällen leicht erhöhte Körpertemperaturen durch die Mittelung der an drei verschiedenen Tagen erfassten Werte nicht dargestellt werden.

Die venösen Blutparameter (Leukozytenzahl, Hämatokrit, Gesamteiweiß) lagen ebenfalls im normalen Bereich. Der in der Literatur beschriebene Anstieg des Hämatokrits bei Pferden mit COB in Exazerbation (LECLERE et al., 2011) konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die im arteriellen Blut gemessenen pH- ( $7,41 \pm 0,02$ ) und Bikarbonatwerte ( $27,2 \pm 1,8$  mmol/l) waren ebenfalls nicht verändert, sodass das Vorliegen einer metabolischen Azidose bei den Patienten sicher ausgeschlossen werden konnte.

Bezüglich der arteriellen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium lagen die beim vorliegenden Patientenpool gemessenen Werte ( $1,64 \pm 0,1$  mmol/l) durchschnittlich in einem höheren Bereich als die von dem Analysegerät (Cobas b 123 Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) angegebenen Referenzwerte (1,12-1,32 mmol/l). Des Weiteren wurden im Schnitt sowohl bei chronisch ( $1,65 \pm 0,1$  mmol/l) als auch bei akut ( $1,68 \pm 0,1$  mmol/l) lungenkranken Pferden im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ( $1,58 \pm 1,3$  mmol/l) leicht höhere Werte des Mineralstoffes beobachtet. Die Konzentration an Kalzium im Blut ist von verschiedenen Faktoren abhängig (u. a. pH-Wert,

Albuminbindung, Fütterung, Saison) (TORIBIO, 2011b; VRANKOVIĆ et al., 2015). Dabei verfügt nur die freie ionisierte Form ( $\text{Ca}^{2+}$ ) über biologische Aktivität. Bei Vorliegen einer Azidose ist die Bindungsaffinität zwischen Kalzium und Albumin herabgesetzt, was in höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Blutwerte resultiert (TORIBIO, 2011b). Außerdem wurden in einer Studie von BERLIN und AROCH (2009) im Vollblut gesunder adulter Pferde ähnliche pH- ( $7,43 \pm 0,02$ ) und Kalzium-Werte ( $1,69 \pm 0,07$  mmol/l) wie diejenigen lungenkranker Patienten in der vorliegenden Arbeit gemessen.

## **5.4.2 Diskussion der Ergebnisse der speziellen Untersuchungen der Atemwege**

### **5.4.2.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Atemwege**

Die lungengesunden Pferde zeigten in der klinischen Untersuchung der Atemwege keinerlei Auffälligkeiten. Einzige Ausnahme stellte dabei ein Proband dar, bei dem es möglich war, einen leichten Hustenreiz auszulösen. Da das Pferd bei den restlichen Untersuchungen unauffällig war, wurde dieser Befund vernachlässigt.

Anders wiesen die lungenkranken Patienten in unterschiedlichem Maße veränderte klinische Parameter auf. Die meisten zeigten eine erhöhte Atemfrequenz und leicht auslösbaren bzw. spontanen Husten sowie eine mäßige bis starke Dyspnoe, welche bei Pferden mit RAO bzw. COB in Exazerbation typischerweise beobachtet wird (ROBINSON, 2001). Schwerwiegende auskultatorische Befunde (Rasseln, Knistern oder Giemen) wurden ebenfalls nur bei drei Patienten mit starker Atemwegsobstruktion festgestellt. Eine Erweiterung des Lungenfeldes aufgrund von Emphysembildung ist ein weitaus seltenerer Befund (LECLERE et al., 2011) und wurde auch in unserer Studie nur bei sechs der chronisch erkrankten Pferde beobachtet.

### **5.4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse**

Mittels arterieller Blutgasanalyse wird die Effektivität des Gasaustausches in der Lunge erfasst. Dazu wurden die Partialdrücke von Sauerstoff ( $\text{PaO}_2$ ) und Kohlendioxid ( $\text{PaCO}_2$ ) sowie die alveolo-arterielle Sauerstoff-Druckdifferenz ( $\text{AaDO}_2$ ) bestimmt. Letztere gilt als genauere bzw. verlässlichere Einheit, da sie als einziger Parameter von der Körpertemperatur und der Höhenlage unabhängig ist (FEY und VERTER, 2006). Die Referenzwerte eines gesunden Pferdes liegen bei  $100 \pm 5$  mmHg für  $\text{PaO}_2$ ,  $40 \pm 5$  mmHg für  $\text{PaCO}_2$  und zwischen 0 und 7 mmHg für  $\text{AaDO}_2$  (FEY und VERTER, 2006).

In Bezug auf diese Werte zeigten die gesunden Kontrolltiere der vorliegenden Studie zum Teil leicht erniedrigte Sauerstoffpartialdrücke (im Schnitt  $98,2 \pm 5,8$  mmHg). Allerdings wurden, aufgrund der weitgehend normalen alveolo-arteriellen Sauerstoffdruckdifferenzen innerhalb dieser Gruppe die geringfügigen Abweichungen der Sauerstoffwerte nicht berücksichtigt. In einem einzigen Fall wurde bei einem gesunden Tier ein  $\text{AaDO}_2$ -Wert von 9,3 mmHg festgestellt. Da dies der einzige abweichende Befund war, wurde das Pferd anhand des klinischen Scores trotzdem als gesund eingestuft.

Unter den lungenkranken Patienten zeigten die Tiere mit der stärksten Atemwegsobstruktion (Exazerbation) im Schnitt die niedrigsten  $\text{PaO}_2$ - ( $90,4 \pm 11,1$  mmHg) und die höchsten  $\text{AaDO}_2$ -Werte (0 bis 27,9 mmHg) und differenzierten sich somit signifikant von den restlichen

Kollektiven. Anders lagen die gemessenen Kohlendioxid-Partialdrücke durchschnittlich bei allen Gruppen in der Norm. Erhöhte PaCO<sub>2</sub>-Werte wurden nur in Einzelfällen bei chronisch erkrankten Pferden festgestellt. Diese Ergebnisse sind damit zu erklären, dass eine Störung des alveolären Gasaustausches sich zunächst mit einer Senkung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (Hypoxämie) äußert. Da das Kohlendioxid eine etwa zwanzigfach bessere Diffusibilität als Sauerstoff besitzt, steigt der arterielle Kohlendioxid-Partialdruck erst bei schwerwiegenderen Funktionsstörungen an (Hyperkapnie). Bei gleichzeitigem Vorliegen von Hypoxämie und Hyperkapnie wird dies auch als „respiratorische Globalinsuffizienz“ bezeichnet (FEY und VERTER, 2006).

Die arterielle Blutgasanalyse stellt insgesamt eine einfache Methode dar, welche in kurzer Zeit Auskunft über den Zustand der Lungenfunktion gibt. Allerdings ist diese auch durch geringe Sensitivität gekennzeichnet, was das Erkennen geringgradiger bzw. mittelgradiger Lungenfunktionsbeeinträchtigungen nicht immer ermöglicht (PIRIE, 2014b).

#### **5.4.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Belastungstests**

Durch das äußerst heterogene Patientenkollektiv waren auch die jeweiligen Nutzungsarten und daraus resultierenden Trainingszustände der Probanden recht unterschiedlich. Dies führte zu einer verminderten Vergleichbarkeit der Belastungstests, welche für einige noch bis zum Zeitpunkt der Untersuchung gerittenen Pferde trotz vorberichtlicher Leistungsinsuffizienz wahrscheinlich nicht ausreichend waren (siehe Fallnummern 3, 36, 40, 41, 45). Insgesamt ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und chronisch erkrankten Pferden: Erstere zeigten keinerlei Auffälligkeiten bei der Durchführung dieser Untersuchung, während die Mehrheit lungenkranker Tiere verlängerte Beruhigungszeiten (> 20 min) für Herz- und Atemfrequenz nach Belastung aufwies.

#### **5.4.2.4 Diskussion der Ergebnisse der röntgenologischen Untersuchung der Lunge**

Eine vermehrte bronchiale Zeichnung war vornehmlich bei Pferden mit schwerwiegender RAO bzw. COB anzutreffen. Alle Pferde mit interstitieller Pneumopathie zeigten eine mittelgradige bzw. hochgradige interstitielle Zeichnung. Dies steht mit den Beschreibungen von GEHLEN und Kollegen (2009) im Einklang. Die teilweise bei den gesunden Kontrollpferden ebenfalls festgestellten bronchialen bzw. interstitiellen Veränderungen können verschiedene Gründe haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass technische Faktoren die Qualität der Röntgenaufnahmen beeinflusst haben. Beispielweise kann eine Überbelichtung zur Vortäuschung interstitieller Zeichnungen führen (GEHLEN et al., 2009). Des Weiteren spielen patientenspezifische Merkmale (Alter, Gewicht, Thoraxumfang) eine wichtige Rolle (VENNER et al., 1995; GEHLEN et al., 2009; TILLEY et al., 2012). Da es sich bei einigen Kontrollpferden um Kleinpferde bzw. Ponys mit sehr gutem Ernährungszustand handelte, könnte die erhöhte Fettmasse bei diesen Probanden für die vermehrten interstitiellen Zeichnungen verantwortlich gewesen sein. Abschließend können der Atemtyp und vorausgegangene Lungenkrankheiten ebenfalls die Lungenbefunde beeinflussen (VENNER et al., 1995; GEHLEN et al., 2009). So ist es möglich, dass bestimmte

Veränderungen infolge gestörter Atemtätigkeit aufgrund von starker Aufregung oder tiefer Sedierung entstanden sind.

#### **5.4.2.5 Diskussion der Ergebnisse der Intrapleuraldruck-Messung**

Die mit Atemwegserkrankungen einhergehende Obstruktion der Atemwege kann durch Mukusansammlung, entzündliche Schwellung der Atemwegsschleimhaut bis hin zu Gewebeumbau infolge chronischer Geschehen entstehen. Diese ist allerdings nicht immer mit einer deutlichen klinischen Symptomatik assoziiert, sodass diagnostische Verfahren zur Lungenfunktionsprüfung an dieser Stelle hilfreich sein können (PIRIE, 2014b).

Die mittels Ösophagussonde und angeschlossenen Pneumotachographen gemessenen Intrapleuraldruckwerte ermöglichten in der vorgenommenen Studie eine deutliche Differenzierung zwischen gesunden und chronisch lungenkranken Tieren ( $p = 0,004$ ). Allerdings ergab sich aus den paarweisen Vergleichen nur zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der Einheit „RAO bzw. COB in Exazerbation“ ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,017$ ). Dies ist zum einen sicherlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass diese Methode eine geringe Sensitivität aufweist und somit ein Erkennen schwächerer Obstruktionszustände in einigen Fällen unterbleibt (LECLERE et al., 2011; PIRIE, 2014b). Wie in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet, werden also an IAD oder COB in Remissionsphase erkrankte Pferde aufgrund der schwächeren Lungenfunktionsbeeinträchtigung oft als lungengesund beurteilt. Solche schwächer ausgeprägte Störungen können nur mittels genauerer Verfahren wie zum Beispiel Impulsoszillometrie oder Kapnographie erfasst werden (LECLERE et al., 2011; PIRIE, 2014b).

Zusätzlich ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass eine Intrapleuraldruckmessung aufgrund von starker Widersetzlichkeit einiger Probanden nur an einem relativ kleinen Patientenpool durchgeführt werden konnte (insgesamt 37 Pferde), was die statistische Aussagekraft der Ergebnisse deutlich herabgesetzt hat.

Obwohl die Tiere mit RAO bzw. COB in Exazerbation im Schnitt die höchsten IPD-Werte zeigten, lagen diese lediglich zwischen 1 und 11 cm H<sub>2</sub>O, was nicht mit dem von ROBINSON (2001) beschriebenen Referenzwert erkrankter Tiere ( $\geq 15$  cm H<sub>2</sub>O) im Konsensus steht. Dies ist sicherlich ebenfalls auf die geringe Sensitivität der Methode und auf die kleine Stichprobe zurückzuführen.

#### **5.4.2.6 Diskussion der Ergebnisse der Tracheobronchoskopie**

Mittels Tracheobronchoskopie wurden in der vorliegenden Studie die Ausprägung der Atemwegsentzündung (Schleimhautfarbe und -beschaffenheit, Dicke der *Carina tracheae*) und der Charakter des tracheobronchialen Sekrets beurteilt.

Dabei ist bekannt, dass die Sekretmenge im Tracheallumen mit dem Grad der tiefen Atemwegsentzündung korreliert (PIRIE, 2014b). Allerdings ist dies kein krankheitsspezifischer Befund, da vermehrte TBS-Mengen sowohl bei COB als auch bei IAD und interstitiellen Pneumopathien bzw. akuten Pneumonien vorkommen können (DIECKMANN et al., 1990; PIRIE, 2014b; GILKERSON et al., 2015).



Anders als die TBS-Menge scheint die in der vorliegenden Studie beurteilte Dicke der Trachealbifurkation laut verschiedener Autoren nicht zwangsläufig mit dem Krankheitszustand des Pferdes zu korrelieren (KOCH et al., 2007; KOBLINGER et al., 2011). Die in unserer Studie beobachteten endoskopischen Bilder stehen also mit den oben genannten Angaben aus der Literatur weitgehend im Einklang. Pferde mit einer RAO bzw. COB in Exazerbation zeigten insgesamt die schwerwiegendsten endoskopischen Befunde. Die meisten Patienten mit IAD oder COB in Remissionsphase und solche mit chronisch interstitiellen Geschehen zeigten ebenfalls veränderte endoskopische Bilder, allerdings war innerhalb dieser Gruppen eine größere Variabilität bezüglich der Befundausprägung vorhanden. Bei allen vier Pferden mit akuten Lungenentzündungen wurden ebenfalls hochgradig veränderte Befunde (u. a. gelblich visköses TBS) festgestellt. Die gesunden Kontrollpferde zeigten im Gegensatz dazu keinerlei Abweichungen in dieser Untersuchung und differenzierten sich somit signifikant von den verschiedenen Gruppen lungenkranker Pferde.

#### **5.4.2.7 Diskussion der Ergebnisse der BAL und der zytologischen Diagnostik**

In der vorliegenden Studie wurde die bronchoalveoläre Lavage mittels blinder Methode durchgeführt, welche erstmals im Jahre 1990 von FOGARTY beschrieben wurde. Diese schnelle und einfache Technik ist bei ausreichender Ruhigstellung der Patienten genauso effektiv wie die transendoskopische Methode und kann somit auch in weniger ausgestatteten Kliniken bzw. im Feld durchgeführt werden (HOFFMAN, 1999; HEWSON und ARROYO, 2015). Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit nur Pferde mit auf das gesamte Lungengewebe übergreifenden Krankheiten untersucht, sodass eine endoskopische Kontrolle zur genauen Lokalisation der Probenahme nicht nötig war (MCGORUM et al., 1993).

In Anlehnung an international etablierte Richtlinien wurden bei jeder Durchführung der BAL dasselbe Volumen (500 ml) an steriler phosphatgepufferter Salzlösung instilliert (ROBINSON, 2001). Bei gesunden Pferden wird üblicherweise circa 40-60 % der instillierten Flüssigkeit zurückgewonnen, während diese Mengen bei Pferden mit chronischer Atemwegsobstruktion deutlich niedriger sein können (ROBINSON, 2001). Die in der vorliegenden Studie zum Teil auch bei gesunden Pferden sehr niedrigen zurückgewonnenen BALF-Mengen sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass einige Pferde trotz Sedierung Unruhe bzw. einen starken Hustenreiz aufwiesen. Dies führte in einigen Fällen zu einer Verlegung des Ballonkatheters und folgend zu einem vorzeitigen Verlust des Unterdrucks. Laut einiger Autoren ist dies allerdings nicht als nachteilig zu beurteilen, da kleinere Spülflüssigkeitsmengen keine negativen Auswirkungen auf das zytologische Bild und somit auf die schlussendliche Diagnose haben (PICKLES et al., 2002).

Die zytologische Untersuchung von BALF-Ausstrichen hat sich als eine sichere Methode erwiesen, um das Vorliegen von Atemwegsentzündungen jeglicher Ausprägungen zu erfassen. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen BAL-Differenzialzellbildern und Grad der Atemwegsobstruktion bzw. -hyperreagibilität festgestellt (HOFFMAN, 2008). Da die in tracheobronchialen Sekret bestimmten Zellprozentsätze nur schlecht mit denjenigen aus der BAL korrelieren (DERKSEN et al., 1989), wurde in dieser Studie ausschließlich die

Beurteilung der BALF-Ausstriche in die statistische Auswertung eingeschlossen. Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen decken sich weitgehend mit Referenzwerten aus der Literatur (ROBINSON, 2001; COUËTIL et al., 2007). Dies hängt in erster Linie damit zusammen, dass die BALF-Zytologie ein wesentlicher Aspekt der zur Gruppenbildung angewandten Kriterien darstellte. Bei Betrachtung der gesunden Kontrollen fiel auf, dass in diesem Kollektiv in fünf Fällen erhöhte Prozentsätze an Mastzellen vorlagen (zwischen 2,2 und 8 %). Da bei diesen Patienten keine weiteren Auffälligkeiten festgestellt wurden, erfolgte hier kein Ausschluss aus Gruppe 1. Außerdem wurden von anderen Autoren ebenfalls erhöhte Anteile an Mastzellen in der BALF gesunder Pferde gefunden (NAYLOR et al., 1992; HUGHES et al., 2011). Des Weiteren resultierte aus einer Untersuchung, dass der Mastzellenanteil als einzige Zellart von der zurückgewonnenen Spülflüssigkeitsmenge und der beprobten Lungenhälfte beeinflusst werden kann (SWEENEY et al., 1992). Diese Faktoren können in der vorliegenden Arbeit durch die blinde Durchführung der BAL sicherlich eine Rolle gespielt haben.

Abschließend soll an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Durchführung einer bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit Verdacht auf infektiöse Pneumonie grundsätzlich kontraindiziert ist. Durch das Spülen der Lunge besteht die Gefahr, eventuell vorhandene Keime in tiefere Lungenregionen zu transportieren. Außerdem korrelieren zytologische Befunde bei akut lungenkranken Patienten viel schlechter mit dem Krankheitszustand (REUSS und GIGUÈRE, 2015). Da bei den akut erkrankten Patienten der vorliegenden Studie zunächst keine typische Pneumoniesymptomatik vorlag (z. B. Fieber, Abgeschlagenheit) wurde auch bei diesen Individuen eine BAL durchgeführt. Erst durch das Vorfinden intrazellulärer Keime in den BALF-Ausstrichen und dem folgenden mikrobiologischen Nachweis konnte eine bakterielle Infektion diagnostiziert und ein chronischer Krankheitsprozess sicher ausgeschlossen werden. Durch diese zufälligen Ereignisse ist auch die sehr kleine Fallzahl in Gruppe 5 zu erklären.

## **5.5 Diskussion der Ergebnisse der Laboruntersuchungen**

### **5.5.1 Diskussion der Bestimmung von Procalcitonin**

#### **5.5.1.1 PCT: Auswahl von Proben und geeigneter Nachweismethodik**

In der vorliegenden Studie wurde Procalcitonin zum ersten Mal in Blutplasma und BALF lungenkranker Pferde mittels ELISA-Test bestimmt. Aufgrund der bestehenden Notwendigkeit, tierartspezifische Nachweismethoden für eine korrekte PCT-Messung zu verwenden (TORIBIO, 2011a; KOCHLEUS, 2013), kam in diesem Falle der von RIEGER et al. (2014) entwickelte equine Assay zum Einsatz, welcher im Rahmen unserer Arbeit zusätzlich zur Anwendung mit BALF-Proben charakterisiert wurde (siehe dazu Paragraphen 3.4.2.3 und 4.3.1.1).

In der Humanmedizin stellt Procalcitonin einen hilfreichen Biomarker dar, welcher zur Differenzierung verschiedener Atemwegserkrankungen bereits eingesetzt wird (siehe Abschnitt 2.3.5.3). Dabei erfolgt die PCT-Bestimmung hier vornehmlich aus dem Blut

erkrankter Patienten. Studien zur Messung von PCT aus BALF-Proben lungenkranker Menschen lieferten hingegen widersprüchliche Ergebnisse. In einigen Fällen wurden nur sehr niedrige PCT-Konzentrationen im Alveolarraum vorgefunden bzw. war eine Differenzierung verschiedener Krankheitsbilder anhand von PCT-Werten in der BALF nicht möglich (STILETTO et al., 2001; DUFLO et al., 2002; LINSSEN et al., 2008; JUNG et al., 2010; LEDERER et al., 2013). Dies ist möglicherweise auf eine nicht ausreichende Sensitivität der angewandten Nachweismethoden bzw. auf die durch die Lavage bedingte starke Verdünnung der Alveolarflüssigkeit zurückzuführen (LINSSEN et al., 2008; JUNG et al., 2010).

Beim Pferd stellt die bronchoalveoläre Lavage eine einfache und sichere Methode dar, um die Entzündungsmechanismen chronischer Atemwegserkrankungen zu charakterisieren. Neben der zytologischen Auswertung wurde in zahlreichen Studien das Vorkommen verschiedener Biomarker in der BALF bereits untersucht (HOFFMAN, 2008). Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass eine systemische Komponente chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd noch nicht sicher nachgewiesen wurde und man somit davon ausgeht, dass die wesentlichen entzündlichen Veränderungen lokal begrenzt sind (LAVOIE-LAMOUREUX et al., 2012b). Da aus der Humanmedizin außerdem bekannt ist, dass Procalcitonin im Blut nur infolge systemischer krankhafter Prozesse signifikant ansteigt (MEISNER, 2010, 2014), lag die Vermutung nahe, dass ein eventueller PCT-Anstieg bei chronischen Atemwegserkrankungen des Pferdes am ehesten in den Alveolarräumen detektierbar ist. Des Weiteren ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass beim Menschen eine gute Korrelation zwischen PCT-Mengen in Serum und BALF beschrieben wurde (STILETTO et al., 2001; LINSSEN et al., 2008). Wenn man nun die Tatsache berücksichtigt, dass das Pferd im Vergleich zum Menschen über deutlich höhere PCT-Mengen im Blutplasma verfügt (RIEGER et al., 2014), ist es denkbar, dass diese Tiere in den Atemwegen ebenfalls höhere PCT-Konzentrationen als humane Patienten zeigen. Die von LINSSEN et al. (2008) beschriebene Problematik bezüglich Sensitivität der Analysemethoden bzw. Verdünnungseffekte der BAL sollte also beim Pferd eine eher untergeordnete Rolle spielen. Aus all diesen Gründen wurde also trotz der oben beschriebenen Ergebnisse aus der Humanmedizin in der vorliegenden Studie equines Procalcitonin in der BALF aller Probanden bestimmt. Zusätzlich wurden Plasmaproben eines kleineren Patientenpools ebenfalls auf den PCT-Gehalt untersucht.

#### **5.5.1.2 Procalcitonin in der BALF**

Die in der BALF der untersuchten Pferde gemessenen PCT-Werte ermöglichten in der vorliegenden Studie eine sehr gute Differenzierung zwischen gesunden und chronisch lungenkranken Individuen ( $p = 0,006$ ).

Dabei waren die höchsten PCT-Konzentrationen im Schnitt bei Pferden mit RAO bzw. COB in Exazerbation (Median: 13,4 ng/ml; Minimum-Maximum: 1,3-681,7 ng/ml) und solchen mit IAD oder COB in Remission (Median: 16,9 ng/ml; Minimum-Maximum: 1,5-493,7 ng/ml) vorzufinden. Diese Gruppen unterschieden sich außerdem beide signifikant von der gesunden Kontrollgruppe (Median: 5,5 ng/ml, Minimum-Maximum: 1,5-23,3 ng/ml). Zwischen

den einzelnen Kollektiven chronisch lungenkranker Pferde konnte allerdings anhand der PCT-Konzentrationen in der BALF keine Differenzierung vorgenommen werden.

Die gemessenen Werte zeigten ähnlich wie in einigen humanmedizinischen Studien (LINSSEN et al., 2008; LEDERER et al., 2013) vor allem innerhalb der verschiedenen Gruppen erkrankter Tiere sehr hohe Spannweiten. Dies könnte zum einen auf die blinde BAL-Technik zurückzuführen sein. Obwohl bekannt ist, dass beim Pferd die Lokalisation der Probenahme bei der BAL keinen Einfluss auf das zytologische Bild der Ausstriche hat (MCGORUM et al., 1993), wurde dies bis heute für Procalcitonin weder beim Menschen noch beim Pferd nachgewiesen. Es ist also durchaus denkbar, dass dieser Marker selbst bei diffusen Lungenerkrankungen des Pferdes in verschiedenen Lungenabschnitten in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommt.

Des Weiteren wurde eine schwache Korrelation zwischen Procalcitonin in der BALF und Grad der Atemwegsobstruktion ( $r_s = 0,42$ ) bzw. klinischem Score ( $r_s = 0,32$ ) festgestellt. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen aus der Humanmedizin, da auch hier beispielsweise eine Korrelation zwischen PCT-Werten und Grad der Asthmaprägnanz nachgewiesen wurde (TANG et al., 2013). Der nur schwache Charakter dieser Zusammenhänge ist zum einen sicherlich auf die Größe der Stichproben zurückzuführen und zum anderen von der bereits besprochenen Problematik des Score-Systems abhängig, welcher speziell auf Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis zugeschnitten ist und eine Erfassung anderer Krankheitszustände (z. B. interstitielle Pneumopathie) kaum ermöglicht. Aufgrund des in der vorliegenden Studie sehr heterogenen Patientenpools ist also anzunehmen, dass die selbst innerhalb der einzelnen Krankheitsgruppen leicht unterschiedlichen Ausprägungsgrade der Erkrankungen einen Einfluss auf die gemessenen PCT-Konzentrationen gehabt haben könnten. Anders wurde der mit dem Alter der Patienten ebenfalls vorhandene leichte Zusammenhang ( $r_s = 0,30$ ) auf die bereits besprochene und zum Teil nicht zufällige Altersaufteilung der Patienten zurückgeführt und somit als nicht repräsentativ beurteilt.

Die Tatsache, dass die genauen Mechanismen der PCT-Synthese noch nicht aufgedeckt wurden, erschwert außerdem die Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse. Zum einen ist bekannt, dass Procalcitonin im Rahmen krankhafter Zustände in verschiedenen Geweben (u. a. in der Lunge) produziert wird (RUSSWURM et al., 2001; GIUNTI et al., 2010). Allerdings ist nicht klar, welche Zellen in der Lage sind, das Prohormon zu sezernieren. Einige Autoren aus der Humanmedizin erklären die fehlende Korrelation mit bestimmten Zelltypen aus der bronchoalveolären Lavage (z.B. neutrophile Granulozyten oder Makrophagen) damit, dass der primäre Syntheseort für Procalcitonin wahrscheinlich außerhalb der Lunge lokalisiert ist. Das in der BAL nachgewiesene Protein würde also aus dem Blut stammen und im Rahmen von Atemwegserkrankungen bei erhöhter Permeabilität der Gefäße in den Alveolarraum diffundieren (LINSSEN et al., 2008). Dieser Mechanismus könnte auch die Resultate unserer Studie erläutern, zumal sehr hohe PCT-Werte bei Pferden in exazerbiertem Zustand gemessen wurden und bei diesen eine veränderte Gefäßpermeabilität infolge der schweren Atemwegsentszündung durchaus denkbar ist (THACKER, 2006). Dass die Probanden mit interstitieller Pneumopathie im Schnitt eher niedrige jedoch insgesamt sehr variable Werte (Median: 12 ng/ml; Minimum-Maximum: 3,8-1.761,9 ng/ml) aufwiesen, kann damit zusammenhängen, dass interstitielle Erkrankungen

verschiedene Phasen durchlaufen und starke Permeabilitätsveränderungen hier vornehmlich im akuten Stadium (exsudative Phase) stattfinden (SCHMIDBAUER et al., 2004; WILKINS und LASCOLA, 2015). Wenn man nun davon ausgeht, dass bei den meisten Probanden diese exsudative Phase bereits abgeschlossen war und vornehmlich proliferative bzw. fibrosierende Umbauprozesse für das Krankheitsbild sorgten, sind dadurch die im Schnitt relativ niedrigen PCT-Werte zu erklären. Eine sichere Aussage über den aktuellen Zustand der Erkrankung wäre allerdings nur mittels einer Lungenbiopsie möglich gewesen.

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass das Procalcitonin direkt von den Gewebezellen produziert wird, nachdem diese mit adhärennten Monozyten in Kontakt getreten sind. Die genauen Vorgänge dieses Synthesewegs, der an Patienten mit Sepsis untersucht wurde, sind allerdings noch nicht geklärt und lassen somit wenig Spielraum für Interpretationen (LINSCHIED et al., 2004; JUNG et al., 2010).

Eine Mitbeteiligung proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-1 $\beta$  und IL-6) an der Förderung der PCT-Synthese im Blut wurde weiterhin bei humanen Patienten beschrieben (OBERHOFFER et al., 1999; NIJSTEN et al., 2000). Da solche Mediatoren auch im Rahmen akuter und chronischer Lungenentzündungen eine wichtige Rolle spielen (THACKER, 2006), wäre ein Triggern der Procalcitoninbildung durch die oben genannten Interleukine in den Atemwegen der beprobten Patienten also denkbar gewesen. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie keine Korrelationen zwischen PCT und IL-1 $\beta$  bzw. IL-6 in der BALF vorgefunden, was wiederum gegen diese Mutmaßung (zumindest beim Pferd) spricht.

Bei Pferden mit subakuter bzw. akuter Pneumonie wurden in der BALF insgesamt sehr niedrige PCT-Konzentrationen (Median: 7,6 ng/ml; Minimum-Maximum: 1,3-12,1 ng/ml) vorgefunden, welche sich nicht signifikant von denen lungengesunder Probanden unterschieden. Obwohl viele Studien aus der Humanmedizin belegen, dass PCT ein durchaus geeigneter Marker für die Diagnose bzw. Differenzierung verschiedener Pneumonieformen darstellt (HEDLUND und HANSSON, 2000; DUFLO et al., 2002; POLZIN et al., 2003; PRAT et al., 2003; PRAT et al., 2006; RAMIREZ et al., 2008; PIACENTINI et al., 2011; NIU et al., 2013), wurden in einigen Untersuchungen an Patienten mit beatmungsassoziiertes Pneumonie ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der PCT-Werte in BALF oder Serum zwischen bakteriell bedingten (mikrobiologischer Nachweis positiv) und nicht bakteriell bedingten (mikrobiologischer Nachweis negativ) Lungenentzündungen nachgewiesen (LINSSEN et al., 2008; JUNG et al., 2010). Die in der vorliegenden Studie nur zufällig rekrutierten Patienten mit akuter Pneumonie, welche ebenfalls einen positiven Keimnachweis in der BALF aufwiesen, stellen allerdings ein sehr limitiertes Kollektiv dar und erlauben somit aufgrund der geringen Repräsentativität der Stichprobe keine definitive Aussage über diese Fragestellung. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind sicherlich erforderlich.

### **5.5.1.3 Procalcitonin in Blutplasma**

Bei insgesamt 18 Pferden (zehn gesunde Kontrollpferde und acht lungenkranke Pferde) wurden venöse Blutproben gesammelt und diese ebenfalls auf den Procalcitoniningehalt untersucht. Dabei wurden die erkrankten Patienten zufällig gewählt.

Zunächst ist zu erwähnen, dass bei den Probanden eine Korrelation ( $r_s = 0,49$ ) zwischen PCT-Konzentrationen in BALF und Blutplasma bestand. Dies steht mit den oben bereits genannten Erkenntnissen aus der Humanmedizin im Einklang (STILETTO et al., 2001; LINSSEN et al., 2008). Außerdem war auch anhand der PCT-Plasmawerte eine klare Differenzierung zwischen gesunden und chronisch lungenkranken Pferden möglich ( $p = 0,05$ ).

Lungengesunde Tiere zeigten, wie auch in der BALF, im Schnitt die niedrigsten Werte (Median: 13,9 ng/ml, Minimum-Maximum: 1-1.741,5 ng/ml). Ein einziges Kontrolltier wurde als statistischer Ausreißer identifiziert und wies einen sehr hohen PCT-Wert im Blutplasma auf (1.741,5 ng/ml). Die Gründe dafür bleiben unbekannt, da das Tier bezüglich der klinischen Parameter keinerlei Auffälligkeiten zeigte. Ähnliche Ergebnisse wurden außerdem auch von RIEGER und Kollegen (2014) beschrieben: Im Rahmen der Validierung des equinen ELISAs wurden die PCT-Konzentrationen im Blutplasma von gesunden und septischen Pferden verglichen. Dabei zeigten zwei gesunde Kontrolltiere sogar nach Wiederholung der klinischen Untersuchungen und erneuter Messung der Proben im Abstand von drei Wochen ebenfalls stark erhöhte PCT-Werte. Aus der Humanmedizin sind einige Ausnahmesituationen bekannt, in denen Procalcitonin ohne das Vorhandensein einer bakteriellen Infektion im Blut ebenfalls erhöht ist. Dies geschieht beispielsweise infolge von Traumata, Leber- oder Niereninsuffizienz und Neoplasien (MEISNER, 2010). Dass die besagten PCT-Abweichungen bei den lungengesunden Pferden auf die genannten Gründe zurückzuführen sind, erscheint zwar als unwahrscheinlich, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Pferde mit RAO bzw. COB in Exazerbation zeigten die höchsten Konzentrationen an Procalcitonin im Blutplasma (Median: 482,2 ng/ml; Minimum-Maximum: 1,6-4.853,7 ng/ml), gefolgt von Probanden mit IAD oder COB in Remission, welche ähnliche Ergebnisse lieferten (Median: 98,6 ng/ml; Minimum-Maximum: 22,7-174,5 ng/ml). Die auch hier extrem hohen gemessenen Werte sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Verdünnung von Plasmaproben mit hohem PCT-Gehalt zum Teil zu starken Abweichungen führte. Mögliche Ursachen dafür könnten laut den Herstellern einerseits eine Agglutination bzw. Dimerisierung des Procalcitonins bei Vorkommen in hohen Konzentrationen sein, oder andererseits der aus der Humanmedizin bereits bekannte Sachverhalt, dass das Protein in verschiedenen Bruchteilen vorkommen kann, welche der Kalibrierungskurve des angewandten ELISAs nicht folgen (RIEGER et al., 2014).

Im Vergleich zu den in der BALF gemessenen PCT-Mengen, zeigte das PCT im Blutplasma eine deutlich bessere Korrelation mit dem klinischen Gesamtscore ( $r_s = 0,49$ ) und einzelnen klinischen Parametern. Darunter sind die positiven Verbindungen zu Kalziumkonzentration im Blut ( $r_s = 0,48$ ), Atemfrequenz ( $r_s = 0,53$ ) und im Röntgenbild sichtbare bronchiale Verdickungen ( $r_s = 0,49$ ) zu nennen. Anders lag zu den im arteriellen Blut gemessenen Sauerstoffpartialdrücken eine negative Beziehung vor ( $r_s = - 0,60$ ).

Der Zusammenhang zwischen Blut-Kalzium-Spiegel und Procalcitonin wurde in einigen humanmedizinischen Studien bereits untersucht. Obwohl einige Autoren von einem inversen Verhältnis zwischen den zwei Parametern bei septischen Menschen berichten (MÜLLER et al., 2000), geht aus anderen Studien an Patienten mit lokalisierten krankhaften Geschehen

(z. B. Pankreatitis, Meningitis) oder Malaria hervor, dass die vorgefundene Hypokalzämie zwar mit dem Schweregrad der Erkrankung, jedoch nicht mit den erhöhten PCT-Konzentrationen korreliert (AMMORI, 2003). Auch in der vorliegenden Studie war ein inverses Verhältnis zwischen ionisiertem Kalzium und Procalcitonin im Blut nicht nachweisbar, was vermutlich damit zu erklären ist, dass hier keine Probanden mit schwerwiegenden systemischen Erkrankungen beprobt wurden. Allerdings bleiben die Ursachen des schwachen positiven Zusammenhangs der zwei Werte unbekannt.

Die vorgefundene Verbindung zwischen Procalcitonin und Gesamtscore-Punktzahl, erhöhter Atemfrequenz, verminderter  $\text{PaO}_2$ -Werte sowie veränderter Röntgenbefunde steht im Konsensus mit humanmedizinischen Erkenntnissen. In einer Studie von PRAT et al. (2006) wurden beispielsweise Patienten mit höheren PCT-Werten auch in höhere Risikoklassen anhand des PSI-Scores (*pneumonia severity index*) eingeteilt. Dieses System dient zur Ermittlung des Schweregrads der vorliegenden Pneumonie und berücksichtigt u. a. ebenfalls die Atemfrequenz und den arteriellen Sauerstoff-Partialdruck. Ähnlich dazu zeigten LEDERER und Kollegen (2013) an Patienten mit akutem Lungenversagen, dass Serum-PCT-Werte negativ mit dem Oxygenierungsindex korrelieren, welcher aus dem Verhältnis zwischen arteriellem Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ ) besteht. Abschließend demonstrierte die Arbeitsgruppe von WALSH (2013) in einer neuerlich durchgeführten Studie, dass Procalcitonin einen moderaten Vorhersagewert bei der Interpretation fraglicher Pneumonie-Röntgenbilder besitzt. Auch beim Pferd gestaltet sich die korrekte Beurteilung von röntgenologischen Lungenbefunden oftmals als eine Herausforderung für den Tierarzt (GEHLEN et al., 2009). Die in der vorliegenden Studie vorgefundene leichte Korrelation zwischen Blutplasma-PCT-Konzentrationen und röntgenologisch erkennbaren bronchialen Veränderungen lässt also darauf schließen, dass dieser Marker eventuell auch beim Pferd in diesem Bereich eingesetzt werden könnte.

Die einzige vergleichbare Studie aus der Pferdemedizin wurde von PUSTERLA et al. im Jahre 2006 veröffentlicht. Hier wurden schwerkranke neugeborene Fohlen auf den PCT-Gehalt im Blut untersucht. Dabei konnten die Autoren allerdings anhand von PCT-Transkripten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und septischen Tieren darstellen. Da PCT auch in der humanen Neonatologie als Infektionsmarker erfolgreich eingesetzt wird (MEISNER, 2010), sind die Ergebnisse der Studie von PUSTERLA et al. (2006) vermutlich auf die nicht ausreichende Anpassung der angewandten Nachweismethodik zurückzuführen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich PCT im Blutplasma sind aufgrund der insgesamt sehr kleinen Stichprobe und der extrem niedrigen Fallzahl pro Krankheitsgruppe nur mit Vorsicht zu bewerten. Nichtsdestotrotz konnte hier erstmals ein deutlicher Unterschied zwischen lungengesunden und chronisch lungenkranken Patienten anhand der PCT-Plasmawerte festgestellt werden. Durch die gute Korrelation zwischen Markerkonzentrationen in Blutplasma und BALF sowie die deutliche Verbindung von PCT-Plasmakonzentrationen und dem klinischen Status der Patienten, erscheint auch beim Pferd die Messung des Proteins auf systemischer Ebene als durchaus sinnvoll. Weitere Untersuchungen an größeren Stichproben unter Einschluss einer größeren Zahl von

Patienten pro Krankheitsgruppe wären also sicherlich interessant, um diese mit den hier entdeckten Trends zu vergleichen. Eine Bestätigung der vorgefundenen Ergebnisse würde zu einer deutlichen Erleichterung der Lungendiagnostik führen, da die momentan noch unerlässliche endoskopische Untersuchung bzw. zytologische Beurteilung der bronchoalveolären Lavage durch die weniger aufwendige Blutentnahme ersetzt werden könnte.

## **5.5.2 Diskussion der Bestimmung der Interleukine**

### **5.5.2.1 Interleukine: Auswahl von Proben und geeigneter Nachweismethodik**

Die mittels bronchoalveolärer Lavage zurückgewonnene Flüssigkeit stellt in der Pferdemedizin ein durchaus geeignetes Nachweismedium dar, um lokale entzündliche Prozesse im Kontext von chronischen Atemwegserkrankungen zu charakterisieren (HOFFMAN, 2008).

In dieser Studie kamen für die Interleukinmessungen kommerziell erhältliche Kits der Marke USCN (Uscn Life Science Inc., Hubei, PRC) zur Anwendung, welche für die Bestimmung der jeweiligen Parameter in Blut bzw. biologischen Flüssigkeiten von Pferden validiert sind. Somit unterscheidet sich die vorliegende Arbeit von den meisten bis heute durchgeführten Untersuchungen auf diesem Gebiet, wo die Autoren oft eine Bestimmung der Entzündungsmarker auf transkriptioneller Ebene (z. B. mittels PCR) vornahmen. Dies führt zu einer geringen Vergleichbarkeit der hier ermittelten Resultate mit denjenigen der oben genannten Studien, da bei Messung der mRNA-Bildung bestimmter Proteine stattfindende co- und posttranskriptionale Prozesse vernachlässigt werden und somit Rückschlüsse auf die effektive Konzentration des bestimmten Parameters anhand der jeweiligen mRNA-Mengen nicht möglich sind (YOU und YIN, 2000).

Unter Berücksichtigung einer möglichen minimalen Abweichung der Werte von den im Folgenden aufgeführten Zahlen (laut Hersteller betragen die Variationskoeffizienten des Assays < 10 %) ermöglichte die vorliegende Arbeit also erstmals eine quantitative Bestimmung von proinflammatorischen Interleukinen in der BALF chronisch lungenkranker Pferde.

### **5.5.2.2 Interleukin-1 $\beta$ in der BALF**

Für das Interleukin- $\beta$  konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede, weder allgemein zwischen gesunder und chronisch kranker Einheit ( $p = 0,122$ ), noch zwischen den einzelnen Diagnosegruppen ( $p = 0,365$ ) festgestellt werden. Allerdings sind bei Betrachtung der *boxplots* (Paragraph 4.3.2, Abbildung 5) einige Tendenzen erkennbar, welche im Folgenden diskutiert werden.

Die gesunden Kontrolltiere zeigten im Schnitt die niedrigsten IL-1 $\beta$ -Werte (Median: 5,7 pg/ml). Ein einziges Pferd zeigte einen sehr hohen Wert (104 pg/ml) und wurde somit als statistischer Ausreißer klassifiziert. Wenn man diesen nicht betrachtet, bewegten sich die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei lungengesunden Probanden zwischen 5,7 und 50 pg/ml. Eine Erklärung für diese Abweichung ist außerdem schwer zu finden, da das Pferd anhand der



klinischen Untersuchungen als sicher gesund resultierte und auch für die weiteren in der BALF bestimmten Parameter bei diesem Proband eher niedrige Werte gemessen wurden (PCT: 5,3 ng/ml, IL-6: 2,5 pg/ml, IL-17: 0,33 OD). Möglicherweise wurde die erhöhte IL-1 $\beta$  Konzentration durch eine Erkrankung eines anderen Organsystems verursacht, welches im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde.

Pferde mit einer chronisch obstruktiven Bronchitis in Exazerbation (Median: 25 pg/ml, Minimum-Maximum: 5,7-122 pg/ml) bzw. COB in Remission oder IAD (Median: 22 pg/ml, Minimum-Maximum: 5,7-84 pg/ml) zeigten im Schnitt ähnliche Werte, welche in beiden Fällen in einem höheren Bereich als diejenigen der lungengesunden Probanden lagen. Diese beobachteten Trends stehen im Einklang mit verschiedenen Studien, welche die Beteiligung dieses Interleukins an der Pathogenese allergischer Atemwegserkrankungen bestätigen. Beim Pferd wurden sowohl auf transkriptioneller Ebene (GIGUÈRE et al., 2002; PIETRA et al., 2007; PADOAN et al., 2013) als auch bezüglich der Proteinkonzentrationen (SARLI et al., 2011) signifikante Erhöhungen des Interleukins-1 $\beta$  in der BALF von Patienten mit klinisch manifester COB bereits gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden außerdem auch an Pferden mit diagnostizierter entzündlicher Atemwegserkrankung erzielt (HUGHES et al., 2011; BEEKMAN et al., 2012).

In der Humanmedizin wurde auch festgestellt, dass IL-1 $\beta$  bei Menschen mit schwerem Asthma oder COPD in der BALF erhöht ist (CHUNG, 2001; AREND, 2002).

Eine schwache Korrelation zwischen IL-1 $\beta$  und der Intrapleuraldruckdifferenz ( $r_s = 0,34$ ) wurde in unserer Studie ebenfalls festgestellt, sodass das Vorkommen höherer Zytokinkonzentrationen in der BALF mit dem Grad der Lungenfunktionsstörung in Verbindung zu stehen scheint. Des Weiteren wurde ein leichter Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  und der Viskosität des tracheobronchialen Sekrets ( $r_s = 0,26$ ) aufgedeckt. Dies steht im Konsensus mit Angaben aus der Literatur, da bereits bekannt ist, dass das Interleukin-1 $\beta$  wie auch andere proinflammatorische Mediatoren die Expression des Muzins MUC5AC stimulieren, welches eine essenzielle Komponente des tracheobronchialen Schleims darstellt und bei chronischer Atemwegsentzündung deutlich erhöht ist (CHEN et al., 2014).

Eine Korrelation zwischen dem Interleukin und der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BALF konnte in der vorliegenden Studie trotz bekannter indirekter chemotaktischer Aktivität des Zytokins (FRANCHINI et al., 2000) nicht nachgewiesen werden. Diesbezüglich sind auch in der Literatur kontrastierende Ergebnisse zu finden: Während einige Autoren sowohl bei Pferden mit COB (GIGUÈRE et al., 2002; SARLI et al., 2011) als auch bei solchen mit IAD (LAVOIE et al., 2011) von diesem Zusammenhang berichten, fanden JOUBERT et al. (2011), dass diese Wechselwirkung nicht zwangsläufig gegeben ist. In der letztgenannten Studie wurden die Patienten über zwei Jahre jeweils 24 Stunden und neun Tage nach Beginn der Exazerbationsphase beprobt. Dabei war die gemessene IL-1 $\beta$ -Transkriptionsrate zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht und eine Korrelation mit der BALF-Neutrophilie wurde nur in unregelmäßigen Intervallen festgestellt, sodass die Autoren davon ausgehen, dass andere chemotaktische Faktoren eine wichtigere Rolle als IL-1 $\beta$  in diesem Prozess spielen.

Die höchsten durchschnittlichen Werte für IL-1 $\beta$  wurden innerhalb der Gruppe mit interstitiellen Lungenkrankheiten beobachtet (Median: 33,5 pg/ml, 5,7-121 pg/ml). Dies ist auf

die Tatsache zurückzuführen, dass dieses Zytokin eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Krankheitsbilder spielt. Durch die Aktivierung von Fibroblasten und die Anregung der Fibronektin- und Kollagensynthese ist dieser Mediator direkt an fibrosierenden Umbauprozessen der Lunge beteiligt (CHUNG, 2001; THACKER, 2006). Erhöhte Mengen an Interleukin-1 $\beta$  wurden bei Menschen mit chronischen Lungenerkrankungen (u. a. Sarkoidose und idiopathische pulmonale Fibrose) bereits nachgewiesen (AREND, 2002). Des Weiteren ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass dieses Interleukin in erster Linie durch aktivierte Makrophagen produziert wird (THACKER, 2006). Diese waren innerhalb der Gruppe „chronisch interstitielle Pneumopathie“ im Vergleich zu den restlichen Krankheitsbildern mit den größten Prozentsätzen in der BALF vertreten (Medianwert: 55,4 %, Minimum-Maximum: 15-67 %), sodass ein Zusammenhang zwischen diesem Zelltyp und der Menge an nachgewiesenem IL-1 $\beta$  als wahrscheinlich erscheint.

Bei den vier Pferden mit akuter Lungenentzündung wurden sehr variable Werte gemessen (5,7-78 pg/ml). Aufgrund der sehr kleinen und nicht repräsentativen Stichprobe können hier kaum Aussagen getroffen werden. Sicher ist, dass Interleukin-1 $\beta$  bei verschiedenen Tierarten an der Entstehung akuter Atemwegsentzündungen (z. B. enzootische Bronchopneumonie des Rindes und Rhodokokkose des Fohlens) beteiligt ist (THACKER, 2006) und somit höchstwahrscheinlich auch beim adulten Pferd als Trigger der Entzündungsreaktion infolge bakterieller Infektionen fungiert.

### **5.5.2.3 Interleukin-6 in der BALF**

Eine klare Unterscheidung zwischen gesunden und chronisch lungenkranken Pferden ( $p = 0,264$ ) sowie zwischen den einzelnen Diagnosegruppen ( $p = 0,279$ ) war anhand der IL-6-Konzentrationen in der BALF nicht möglich. Allerdings lassen sich auch hier bei genauer Betrachtung der Graphiken (Paragraph 4.3.2, Abbildung 6) Tendenzen erkennen. Die höchsten Werte wurden im Schnitt bei Patienten mit exazerbierter RAO bzw. COB gemessen (Median: 11 pg/ml, Minimum-Maximum: 2,5-53 pg/ml), während die niedrigsten durchschnittlichen IL-6-Konzentrationen in der BALF gesunder Pferde vorlagen (Median: 2,5 pg/ml, Minimum-Maximum: 2,5-25 pg/ml). In der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ waren die IL-6-Mengen auch insgesamt eher niedrig: Wenn man den einzigen statistischen Ausreißer (41 pg/ml) vernachlässigt, schwankten die hier gemessenen Werte lediglich zwischen 2,5 und 22 pg/ml (Median: 3,5 pg/ml).

Bisherige Studien auf diesem Gebiet lieferten widersprüchliche Ergebnisse und sind, wie oben bereits erwähnt, aufgrund der angewandten Analysemethoden (z. B. PCR) nur schwer mit den Resultaten dieser Studie zu vergleichen. Die meisten Autoren, die eine Messung von IL-6-Transkripten bzw. von dem Protein selbst in der BALF durchgeführt haben, konnten keine signifikanten Erhöhungen bei exazerbiertem Zustand der Pferde darstellen (RIIHIMÄKI et al., 2008a; RIIHIMÄKI et al., 2008b; PADOAN et al., 2013). LAAN und Kollegen (2006a) gelang es zwar, eine gesteigerte Produktion von IL-6 durch Alveolarmakrophagen zu beweisen, allerdings fand diese vornehmlich bei gesunden Individuen statt, sodass die Autoren hier von einer eher antientzündlichen Rolle des Proteins ausgehen. Ein deutlicher Anstieg der IL-6-Transkriptionsrate bei COB und IAD wurde bis heute nur in zwei

Veröffentlichungen beschrieben und trat im Falle der COB etwa drei Tage nach Staubexposition auf (PIETRA et al., 2007; BEEKMAN et al., 2012).

Anders als beim Pferd wurde die wichtige Rolle des Interleukin-6 an der Entstehung chronisch obstruktiver Atemwegserkrankungen des Menschen durch zahlreiche Untersuchungen bereits belegt. Erhöhte IL-6-Mengen wurden in BALF- und Sputumproben von Patienten mit Asthma oder COPD nachgewiesen. Bei COPD ist IL-6 außerdem indirekt proportional zur Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ , forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde) und korreliert somit mit der Beeinträchtigung der Lungenfunktion (RINCON und IRVIN, 2012).

Bei den untersuchten Pferden zeigten sich ebenfalls einige Korrelationen zu klinischen Parametern, welche Auskunft über den Schweregrad der vorliegenden Erkrankungen geben. Schwache Zusammenhänge wurden sowohl zu endoskopischen Befunden ( $r_s = 0,30$ ) als auch zum klinischen Gesamtscore ( $r_s = 0,32$ ) ermittelt. Des Weiteren wurde ein tendenziell positiver Zusammenhang zwischen IL-6 und Menge bzw. Viskosität des tracheobronchialen Sekrets aufgedeckt. Letztere Erkenntnis ist dadurch zu erklären, dass das Interleukin-6 über verschiedene Wege die Mukushypersekretion im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen favorisiert. Zum einen werden CD4-T-Zellen über IL-6 zur vermehrten Sezernierung von IL-13 angeregt, welches wiederum eine gesteigerte Schleimproduktion durch Epithelzellen des Respirationstraktes bewirkt. Zusätzlich wird eine direkte Stimulierung von Becherzellen durch IL-6 vermutet (RINCON und IRVIN, 2012).

Bei Patienten mit interstitieller Pneumopathie wurde in dieser Studie im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe im Schnitt eine milde Erhöhung der IL-6 Konzentrationen festgestellt (Median: 10 pg/ml). Auch in dieser Gruppe wurde außerdem ein einziger statistischer Ausreißer bemerkt (63 pg/ml), während die restlichen gemessenen Werte zwischen 2,5 und 20 pg/ml lagen. Interleukin-6 ist, wie auch IL-1 $\beta$ , an der Entstehung von Lungenfibrosierungen im Rahmen interstitieller Geschehen beteiligt. So wurden erhöhte IL-6-Mengen sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit pulmonaler Fibrose nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Hemmung löslicher IL-6-Rezeptoren (*trans-signaling pathway*) zur Reduzierung dieser fibrosierenden Prozesse in der Lunge führt (LE et al., 2014). Dies könnte die partielle Erhöhung der IL-6-Konzentrationen innerhalb der besagten Gruppe erklären. Allerdings lagen im Vergleich die bei diesen Patienten gemessenen Interleukin-1 $\beta$ -Konzentrationen in einem deutlich höheren Bereich, was eine stärkere Beteiligung dieses Zytokins an der Pathogenese interstitieller Lungenerkrankungen des Pferdes vermuten lässt.

Eine positive Korrelation ( $r_s = 0,41$ ) zwischen IL-1 $\beta$  und -6 wurde in dieser Studie ebenfalls festgestellt, was sich mit der Tatsache deckt, dass das erstgenannte Zytokin die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren (u.a. IL-6) steigert und somit eine Amplifizierung der entzündlichen Reaktion bewirkt (THACKER, 2006).

Innerhalb der Gruppe „(sub)-akute Pneumonie“ wurden für IL-6 recht variable Werte nachgewiesen (2,5-23 pg/ml). Aufgrund der kleinen Fallzahl sind Aussagen nach wie vor nur schwer zu treffen. Wie bereits für IL-1 $\beta$  besprochen, ist zu vermuten, dass auch IL-6 als proinflammatorischer Mediator zur Entstehung von Lungenentzündungen infolge infektiöser Stimuli beiträgt. Beispielsweise zeigten NERREN und Kollegen (2009), dass aus dem Blut

adulter Pferde isolierte, neutrophile Granulozyten bei Stimulierung mit *Rhodococcus equi* eine erhöhte Transkriptionsrate für Interleukin-6 aufweisen.

Abschließend soll hier noch erwähnt werden, dass in unserer Studie keine bestimmten Zelltypen aus der BALF isoliert wurden und somit auch keine genauen Aussagen bezüglich zelltypspezifischer Zytokinsekretionen möglich waren. Nichtsdestotrotz zeigte sich für Interleukin-6 eine schwache Korrelation zur Anzahl an neutrophilen Granulozyten ( $r_s = 0,28$ ) bzw. ein inverses Verhältnis zum prozentualen Anteil an Makrophagen ( $r_s = -0,34$ ) in der BALF der untersuchten Probanden. Natürlich spiegelt dies auf der einen Seite das zytologische Bild der Pferde mit chronisch obstruktiver Bronchitis im Exazerbationsstadium wieder, da hier ein hoher Anteil an neutrophilen Granulozyten in der BALF (> 25 %) als Einschlusskriterium galt und ebenfalls hohe Mengen an IL-6 gemessen wurden. Auf der anderen Seite ist jedoch eine vermehrte Produktion des Zytokins durch diese Zellen, wie von NERREN et al. (2009) bereits beschrieben, denkbar. Dafür spricht auch die Tatsache, dass eine erhebliche Transkription des Proteins in Bronchialepithelzellen bzw. Makrophagen bei Pferden in exazerbiertem Zustand von verschiedenen Autoren nicht nachgewiesen werden konnte (LAAN et al., 2006a; RIIHIMÄKI et al., 2008a; RIIHIMÄKI et al., 2008b; PADOAN et al., 2013).

#### **5.5.2.4 Interleukin-17 in der BALF**

Aufgrund der bereits beschriebenen Probleme bei der Durchführung dieses ELISA-Tests (siehe Paragraph 4.3.2.3) können in der vorliegenden Studie keine Aussagen über die effektiven IL-17-Konzentrationen in der Lavageflüssigkeit der untersuchten Pferde gemacht werden. Anhand der bestimmten Extinktionswerte (OD-Werte) sind Rückschlüsse auf den allgemeinen Trend des IL-17-Gehalts der BALF-Proben zu erkennen (Paragraph 4.3.2, Abbildung 7). Wie auch die anderen Interleukine ermöglichte IL-17 weder eine Differenzierung zwischen kranker und gesunder Gruppe ( $p = 0,170$ ) noch eine klare Unterscheidung der verschiedenen Krankheitsbilder ( $p = 0,224$ ). Die gemessenen OD-Werte zeigten allgemein hohe Spannweiten und gesunde Kontrolltiere verfügten erstaunlicherweise über einen höheren Medianwert als die restlichen Gruppen mit chronischen Lungenerkrankungen. Die vier Pferde mit subakuter bzw. akuter Pneumonie wiesen ebenfalls im Vergleich zu den restlichen chronisch lungenkranken Patienten im Schnitt höhere IL-17-OD-Werte auf.

Zahlreiche Studien befürworten die zentrale Rolle des Interleukins-17 bei der Verbindung angeborener und adaptiver Immunprozesse im Rahmen der Lungenentzündung (LINDEN et al., 2005). Über die Steigerung der Freisetzung verschiedener chemotaktischer (u. a. IL-8) und anti-apoptotischer (G-CSF, GM-CSF) Faktoren seitens bronchialer Epithelzellen scheint IL-17 die Akkumulation an neutrophilen Granulozyten in der entzündeten Lunge indirekt zu fördern (LINDEN et al., 2005).

Eine Beteiligung von IL-17 an der Pathogenese verschiedener chronischer Atemwegserkrankungen des Menschen, wie zum Beispiel schweren Formen des Asthmas bronchiale, welche mit einer deutlichen Neutrophilie in der BALF einhergehen, wurde durch einige Arbeiten belegt (COSMI et al., 2011). Andere Autoren konnten diese Hypothese allerdings nicht bestätigen: Bei der Messung der IL-17-Konzentrationen (ELISA-Test) im

Sputum von Menschen mit verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen (Asthma, chronische Bronchitis, COPD) wurden keine signifikanten Differenzen zwischen lungengesundem Kollektiv und den einzelnen Diagnosegruppen ermittelt. In dieser Studie lagen die niedrigsten IL-17-Mengen sogar bei Patienten mit stabiler COPD vor, welche bekannterweise mit einer ausgeprägten Neutrophilie einhergeht (BARCZYK et al., 2003).

Beim Pferd zeigten sich ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. EL ABBAS et al. (2012) fanden, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, sowohl im Blut als auch in der BALF gesunder bzw. exazerbierter Pferde eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T, welcher die IL-17-Synthese reguliert. Erhöhte Mengen des Interleukins wurden allerdings nur im Blut gesunder Patienten nachgewiesen. Andere Autoren berichten von einer Steigerung der IL-17-Transkriptionsrate in der BALF exazerbierter Probanden (DEBRUE et al., 2005; AINSWORTH et al., 2006; PADOAN et al., 2013). Dies trat allerdings erst nach längerer Staubexposition auf (ca. 15-35 Tage), während bei früherer Beprobung der Patienten keine signifikante Steigerung der IL-17 Transkription detektiert werden konnte (RIIHIMÄKI et al., 2008a; REYNER et al., 2009). Bei den Patienten der vorliegenden Arbeit war eine Aussage bezüglich der Dauer des exazerbierten Zustands nicht immer möglich bzw. wurden die Pferde aufgrund der akuten Symptomatik oftmals schnellstmöglich in die Klinik gebracht. Der eventuell zu frühe Zeitpunkt der Probenahme könnte also eine Erklärung für die bei Patienten mit RAO bzw. COB in Exazerbation relativ niedrigen gemessenen IL-17-Werten darstellen. Bei Pferden mit IAD oder COB in Remission scheinen laut der vorliegenden Ergebnisse im Schnitt auch nur niedrige IL-17-Mengen vorzukommen. Während die Arbeitsgruppe von HUGHES (2011) auch keine erhöhte Expression für IL-17 in der BALF von IAD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen konnte, beschreiben BEEKMAN und Kollegen (2012) eine Erhöhung der Interleukin-mRNA bei Probanden mit neutrophiler IAD.

Eine Korrelation zur Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BALF konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, was wiederum mit den Angaben von DEBRUE et al. (2005) im Einklang steht. Allerdings ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass eine leichte inverse Korrelation ( $r = -0,26$ ) zwischen IL-17-Menge und prozentualem Anteil an Mastzellen in der BALF gefunden wurde. Da dieser Zelltyp vornehmlich bei IAD-Patienten in hohen Mengen ( $> 2\%$ ) vorgefunden wurde und diese Krankheit anhand bestimmter Zellmuster in verschiedene Phänotypen klassifiziert werden kann (PIRIE, 2014a), ist es wahrscheinlich, dass IL-17 eher im Zusammenhang mit anderen Zellarten steht (z. B. neutrophile oder eosinophile Granulozyten), wie von BEEKMAN et al. (2012) bereits postuliert.

Innerhalb der Gruppe mit chronischer interstitieller Pneumopathie wurden bei einigen Pferden ebenfalls relativ hohe OD-Werte für IL-17 gemessen. Der Median dieser Gruppe überragte die bei Probanden mit COB bzw. IAD durchschnittlich gemessenen Werte. Dies lässt darauf schließen, dass das Interleukin wohlmöglich auch in dieser Lungenpathologie eine Rolle spielt. Im Einklang dazu wurden beispielsweise sowohl im murinen als auch im humanen Modell erhöhte IL-17-Mengen bei Individuen mit pulmonaler Fibrose vorgefunden. Beim Menschen war dabei das Interleukin vornehmlich in regenerierenden Lungenepithelzellen zu finden (NUOVO et al., 2012). Die Autoren vermuten, dass IL-17 auch im Rahmen weiterer interstitieller Geschehen agiert, allerdings sind die genauen

Mechanismen dieser Wirkungen noch nicht vollständig geklärt und weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind sowohl beim Menschen als auch beim Pferd erforderlich.

Die bei Patienten mit (sub)-akuter Lungenentzündung zum Teil erhöhten Extinktionswerte lassen vermuten, dass IL-17 auch an schützenden Mechanismen im Rahmen der bakteriellen Abwehr aktiv beteiligt ist. Einige Studien zeigten diesbezüglich eine erhöhte IL-17-Transkriptionsrate in Verbindung mit *Rhodococcus*-Infektionen des Fohlens (MENSIKOVA et al., 2013).

Abschließend wurde in unserer Studie keine Korrelation zwischen IL-17 und den anderen proinflammatorischen Mediatoren (z. B. IL-6) vorgefunden, obwohl bekannt ist, dass diese die Differenzierung des Th17-Zelltyps fördern bzw. eine gegenseitige Stimulierung dieser Mediatoren im Rahmen verschiedener Prozesse (z. B. gesteigerte Mukussekretion) erfolgt (LINDEN et al., 2005; COSMI et al., 2011).

#### **5.5.2.5 Einfluss verschiedener Faktoren auf das Zytokinmuster**

Die Tatsache, dass unsere Ergebnisse und die Resultate aus den zahlreichen Studien, die zur Bestimmung des Zytokingehalts bei chronischen Atemwegserkrankungen des Pferdes bereits durchgeführt wurden, sehr schwer zu interpretieren sind bzw. teils divergierende Ergebnisse zeigen, ist neben der bereits erwähnten geringen Vergleichbarkeit der Nachweismethoden wahrscheinlich auf die äußerst komplexen Mechanismen der Interleukinbalance zurückzuführen. Somit sollen verschiedene Faktoren, welche die Zytokinfreisetzung beeinflussen können, im Folgenden kurz dargestellt werden.

Zum einen spielt das Studiendesign eine wichtige Rolle: Der Zeitpunkt der Probenahme korreliert zum Beispiel, wie für IL-17 bereits besprochen, nicht immer mit der maximalen Ausprägung des untersuchten Parameters, sodass schnell falsch negative Ergebnisse entstehen können. Dies könnte eine Erklärung für die selbst innerhalb derselben Diagnosegruppen oftmals festgestellten hohen Spannweiten der Werte sein. Im Vergleich zu der vorliegenden Studie wurde in den meisten bereits publizierten Arbeiten ein homogener Probandenpool verwendet, welcher über längere Zeit unter identischen Bedingungen gehalten wurde. Im Falle von Untersuchungen an Pferden mit COB wurde außerdem ein Exazerbationszustand meist durch kontrollierte Exposition zu bestimmten Antigenen induziert. Zum Zeitpunkt der Probenahme hatten also alle Patienten den gleichen Ausgangszustand (siehe Paragraph 2.2.1.3.2). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Studie die Pferde in randomisierter Form gewählt und zeigten somit bezüglich Krankheitszustand, -länge, Vorbericht etc. individuelle Ausgangssituationen. In diesem Sinne war hier auf der einen Seite ein genaues „*timing*“ der Probenahme, wie oben beschrieben, nicht möglich und dies könnte die gemessenen IL-Konzentrationen durchaus beeinflusst haben. Auf der anderen Seite ist jedoch zu betonen, dass die Stichproben dieser Studie vor allem aus klinischer Sicht sicherlich repräsentativer sind, da sie die Variabilität der vorkommenden Krankheitsausprägungen erfassen und somit die reelle Kondition der Gesamtpopulation besser widerspiegeln (WILLIAMSON und DAVIS, 2007).

Spezielle Umweltfaktoren wie die Art der eingeatmeten Antigene können ebenfalls eine Auswirkung auf das Zytokinmuster haben. So zeigten einige Untersuchungen beispielsweise, dass die Inhalation von *Aspergillus fumigatus* zu einer Th2-polarisierten Immunantwort führt,

während bakterielles Endotoxin eher den Th1-Zelltyp stimuliert (KLEIBER et al., 2005). Es ist also anzunehmen, dass auch in dieser Studie Patienten aus derselben Diagnosegruppe, welche jedoch aus unterschiedlichen Haltungsformen stammten, ebenfalls variable Zytokinmuster präsentierten.

Ein weiterer Faktor, der die Interleukinbalance verändern kann, ist der Trainingszustand der Pferde. So zeigten DAVIS und Kollegen (2007), dass gesunde Pferde bis zu 24 Stunden nach dem Training in einem kalten Milieu (5 °C) eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-1 $\beta$ , IL-6) in der BALF aufweisen. Da in dieser Studie ein Teil der Untersuchungen im Winter stattfand und die Pferde für verschiedene Nutzungszwecke (u. a. Sport) eingesetzt wurden, kann ein Einfluss dieser Faktoren grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden.

Abschließend soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass einige Autoren bei Pferden mit chronischer Atemwegsobstruktion eine Korrelation zwischen Alter und Zytokinsekretion festgestellt haben. Während eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Mediatoren im Blut alternder Menschen und Pferde bereits beschrieben wurde („*inflamm-aging*“), zeigten neuerlich HANSEN et al. (2014), dass in der BALF von an COB erkrankten Probanden das voranschreitende Alter mit einer signifikanten Senkung an proinflammatorischen Interleukinen (u. a. IL-1 $\beta$ ) einhergeht. Dieses Ereignis entsteht wohlmöglich dadurch, dass die Lunge sich an die kontinuierliche Antigenbelastung anpasst und mit einer Downregulierung bestimmter Zytokine reagiert. Des Weiteren konnten die Autoren keine Korrelation zwischen IL-Mengen in Blut und BALF nachweisen, was also auch dafür spricht, dass die Lunge, wie bereits erwähnt, ein einzigartiges Milieu darstellt, welches kaum durch systemische Veränderungen repräsentiert werden kann. Wenn nun all diese Beobachtungen auf die vorliegende Studie übertragen werden, ist in diesem Fall eine altersbedingte Verminderung der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen ebenfalls denkbar. Dadurch wäre beispielsweise auch der unterschiedliche Interleukingehalt zwischen den im Schnitt älteren Pferden mit RAO bzw. COB in Exazerbation (16,6  $\pm$  4,5 Jahre) und den jüngeren Tieren mit chronisch interstitieller Pneumopathie (11,5  $\pm$  3,9 Jahre) erklärbar.

#### **5.5.2.6 Zusammenhang zwischen PCT und den gemessenen Interleukinen**

Da die Interleukine 1 $\beta$  und 6 erwiesenermaßen die Procalcitonin-Synthese anregen können (OBERHOFFER et al., 1999; NIJSTEN et al., 2000), wurde dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit ebenfalls berücksichtigt. In der BALF der untersuchten Pferde konnten allerdings keinerlei Korrelationen zwischen diesen Markern aufgedeckt werden, was also gegen eine PCT-Induktion durch die besagten Zytokine spricht.

Obwohl die Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und PCT in der BALF in ähnlicher Weise mit klinischen Parametern korrelierten (u. a. Endoskopiebefunde, Intrapleuraldruck), handelte es sich dabei vorwiegend um schwache Wechselwirkungen und keins der genannten Proteine ermöglichte eine klare Differenzierung zwischen den verschiedenen Krankheitsbildern. Außerdem zeigte nur das Interleukin-6 eine schwache Relation ( $r_s = 0,28$ ) zum Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten in der BALF, welcher momentan als wichtigster Indikator bestimmter equiner Lungenerkrankungen gilt (ROBINSON, 2001; COUËTIL et al., 2007).

Im Gegensatz dazu wies PCT im Blutplasma, trotz der sehr kleinen Stichprobe, relativ hohe Korrelationskoeffizienten zu einigen klinischen Parametern (z. B. Atemfrequenz, PaO<sub>2</sub>, Röntgenbefunde, klinischer Gesamtscore) auf. Wie bereits erwähnt sollte dieser Ansatz weiterhin verfolgt werden, da die Bestimmung von PCT aus Blutproben ein einfaches Mittel darstellt, welches die Diagnostik auf diesem Gebiet erheblich erleichtern könnte.

## **5.6 Diskussion der Ergebnisse der inhalativen Therapie**

Insgesamt wurden zwölf Patienten (acht Pferde mit RAO bzw. COB in Exazerbation und vier Pferde mit IAD oder COB in Remission) zusätzlich zu den oben genannten Untersuchungen einer zehntägigen inhalativen Behandlung mit dem Glukokortikoid „Budesonid“ unterzogen. Die Hauptprobleme bezüglich des Studiendesigns (geringe Stichproben, keine Placebo-Gruppe und Verabreichung des Glukokortikoids bei gleichzeitiger Haltungsoptimierung) wurden in Paragraph 5.1 bereits diskutiert. Die positiven Effekte des Budesonids auf Patienten mit chronischer Atemwegobstruktion wurden von KAMPMANN und Kollegen (2001) beschrieben. Hauptziel dieses Studienabschnitts war es also, die Auswirkungen dieses Medikamentes auf die hier bestimmten Biomarker der Entzündung zu ermitteln.

### **5.6.1 Auswirkungen der Therapie auf den klinischen Status**

Nach Therapie wurde im Einklang mit den Untersuchungen von KAMPMANN et al. (2001) insgesamt eine Besserung der Lungenfunktion beobachtet. Eine verbesserte Gasaustauschfähigkeit nach Behandlung kam vornehmlich bei Patienten mit akutem Krankheitsschub, durch die deutlich erhöhten PaO<sub>2</sub>-Werte ( $p = 0,017$ ) und den erniedrigten AaDO<sub>2</sub>-Werte ( $p = 0,028$ ) zum Ausdruck. Eine Senkung des gemessenen Intrapleuraldrucks wurde, wenn auch nicht in statistisch signifikantem Ausmaß ( $p = 0,066$ ), ebenfalls beobachtet. Dies ist sicherlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen, da eine Wiederholung dieser Untersuchung im Anschluss an eine Glukokortikoidverabreichung nur bei vier Patienten möglich war.

Eine hochsignifikante Besserung des endoskopischen Bildes der Atemwege ( $p = 0,007$ ) und eine starke Reduzierung von Menge ( $p = 0,023$ ) und Viskosität ( $p = 0,007$ ) des tracheobronchialen Sekrets wurden bei den therapierten Patienten ebenfalls beobachtet. Letztere Ergebnisse können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Wirkungen des Budesonids zurückgeführt werden, da Glukokortikoide die Becherzellenhyperplasie und die exzessive Mukusproduktion in den Atemwegen unterdrücken (BOARDMAN et al., 2014).

Bei der zytologischen Untersuchung der BALF-Ausstriche zeigte sich nach inhalativer Behandlung eine allgemeine Senkung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten, allerdings lag diese nicht im statistisch signifikanten Bereich ( $p = 0,135$ ). Dies ist zum einen sicherlich auf die kleine Stichprobe zurückzuführen und zum anderen von der Tatsache abhängig, dass drei Pferde nach Therapie deutlich erhöhte prozentuale Zahlen an Neutrophilen aufwiesen. In anderen Studien wurde bereits bemerkt, dass weder eine inhalative Glukokortikoidtherapie noch eine mehrwöchige Weidehaltung zwangsläufig mit einer Abnahme der Neutrophilie in



der BALF einhergehen (JACKSON et al., 2000; FEY, 2005; COUËTIL et al., 2006). Dies ist wahrscheinlich zum einen damit zu erklären, dass Glukokortikoide als unerwünschten Effekt die Apoptose dieser Zellen verzögern können (FRANCHIMONT, 2004). So waren in der BALF der drei Patienten vornehmlich überalterte neutrophile Granulozyten mit hypersegmentierten oder pyknotischen Kernen zu finden. Eine zweite bzw. spätere Nachkontrolle des zytologischen Bildes wäre also in diesen Fällen angebracht gewesen, um den Erfolg der Therapie sicher bestätigen zu können. Beispielsweise berichten GIGUÈRE et al. (2002) von einem Rückgang der BALF-Neutrophile nach dreiwöchiger inhalativer Fluticasontherapie. Außerdem vermutet FEY (2005), dass individuelle Reaktionen der Pferde auf die in der Klinik angewandten Optimierungsmaßnahmen (Einstreu, Fütterung) einen weiteren Grund für die persistierende Erhöhung der besagten Zellzahlen darstellen können. Abschließend wurde bei den behandelten Patienten eine signifikante Abnahme der Mastzellzahlen in der BALF festgestellt ( $p = 0,016$ ). Dies könnte ein weiterer Effekt des inhalierten Medikaments darstellen, da Glukokortikoide erwiesenermaßen die Aktion von Mastzellen unterdrücken (FRANCHIMONT, 2004).

Durch die Veränderungen all dieser Parameter zeigten die Patienten nach Behandlung hochsignifikant niedrigere Punktzahlen im klinischen Gesamtscore ( $p = 0,005$ ), was die deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik infolge der inhalativen Glukokortikoidverabreichung unter optimierten Haltungsbedingungen reflektiert.

## **5.6.2 Auswirkungen der Therapie auf die bestimmten Entzündungsmarker**

### **5.6.2.1 Auswirkungen von Budesonid auf Procalcitonin in der BALF**

Die PCT-Messungen nach inhalativer Therapie ergaben schwer zu interpretierende Ergebnisse: Während bei einer Hälfte der Patienten eine Reduzierung der Procalcitoninkonzentrationen beobachtet wurde, zeigten die restlichen Pferde zum Teil deutlich höhere Proteinmengen in der BALF, sodass insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Messzeitpunkten dargestellt werden konnten ( $p = 0,158$ ).

Wenn man, wie bereits beschrieben, davon ausgeht, dass Procalcitonin im Rahmen von starker Atemwegsentzündung aus dem Kreislauf in den Alveolarraum diffundiert, könnte die partielle Senkung der PCT-Konzentrationen in der BALF nach Therapie auf den potenten antiinflammatorischen Effekt des Budesonids zurückgeführt werden, da Glukokortikoide erwiesenermaßen der erhöhten vaskulären Permeabilität entgegenwirken (KALINER, 1985). Allerdings bleibt dadurch die PCT-Steigerung bei den restlichen Pferden unerklärt.

Da TAVERES und Kollegen (2014) durch Neutralisierung von N-PCT im murinen Modell eine Verminderung der Lungenentzündung bzw. der Neutrophilenakkumulation erzielten, lag hier die Vermutung nahe, dass auch bei den untersuchten Probanden ein eventueller Zusammenhang zwischen den zwei Parametern nach Behandlung bestand. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden und spricht somit dafür, dass das Protein weder von diesen Zellen direkt produziert wird, noch eine chemotaktische Wirkung auf diese ausübt. Ähnlich konnte in der vorliegenden Studie auch keine Verbindung zwischen der Verbesserung des

klinischen Status (Score-Punktzahl) und den PCT-Konzentrationen in der BALF erkannt werden (siehe dazu Tabelle 36, Abschnitt 4.4.3).

In der Humanmedizin geht aus verschiedenen Untersuchungen hervor, dass Procalcitonin durch Glukokortikoide kaum beeinflusst wird (RINALDI et al., 2006; DE KRUIJF et al., 2008; PERREN et al., 2008; SEAM et al., 2012). Eine solche Aussage, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse für das Pferd nicht sicher getroffen werden. Weitere Studien unter Einschluss einer Placebo-Gruppe und größeren Fallzahlen sind an dieser Stelle erfragt, um die festgestellten Trends zu verdeutlichen.

### **5.6.2.2 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-1 $\beta$ in der BALF**

Für das Interleukin-1 $\beta$  zeigte sich nach Therapie eine hochsignifikante Steigerung der in der BALF gemessenen Konzentrationen ( $p = 0,016$ ).

Auch in diesem Falle ist eine Interpretation der vorliegenden Ergebnisse schwer, da sowohl in der Humanmedizin als auch in der Pferdemedizin unterschiedliche Meinungen herrschen. BEWIG und BARTH (1993) demonstrierten erstmals in einer *ex vivo* Studie, dass bei Menschen mit Atemwegsobstruktion unter inhalativer Flunisolidbehandlung die IL-1-Produktion durch BALF-Makrophagen deutlich reduziert wird. Allerdings konnte der angewandte Bioassay nicht zwischen IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  differenzieren und die Therapiedauer betrug mindestens einen Monat, was zu einer geringen Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Resultaten führt. Des Weiteren zeigte eine rezentere Untersuchung von LANGEREIS und Kollegen (2011) an neutrophilen Granulozyten *in vitro*, dass Dexamethason den kompetitiven Antagonisten IL-1Ra deutlich effektiver inhibiert als das Zytokin selbst (IL-1 $\beta$ ), sodass die Balance zu Gunsten des proinflammatorischen Mediators verschoben wird. Ein ähnlicher Mechanismus könnte also auch bei den untersuchten Pferden eine Rolle gespielt haben, zumal in der vorliegenden Arbeit keine Informationen bezüglich des IL-1 $\beta$ -Antagonisten vorliegen.

Beim Pferd liefern die bis heute durchgeführten Untersuchungen zur Auswirkung einer inhalativen Glukokortikoidbehandlung auf das Zytokinmuster der BALF ebenfalls recht variable Ergebnisse. Nach 21-tägiger Fluticasongabe konnten GIGUÈRE et al. (2002) eine Abnahme der IL-1 $\beta$ -Transkription nachweisen. Allerdings konnte dies nicht auf den Effekt des Medikaments zurückgeführt werden, da ein gleicher Trend auch bei unbehandelten Patienten festgestellt wurde. Dies spricht also für einen spontanen Rückgang der IL-1 $\beta$ -Konzentration nach einem längeren Zeitraum als zehn Tage, was die fehlende Senkung bei den Pferden der vorliegenden Studie erklären könnte. Im Einklang dazu stehen auch die Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls nach zehn- bzw. 15-tägiger inhalativer Glukokortikoidtherapie keine Veränderungen für die Aktivität proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren bzw. für die Menge an IL-1 $\beta$ -mRNA darstellen konnten (COUËTIL et al., 2006; BEEKMAN et al., 2011). Anders entdeckten weitere Autoren eine Reduzierung der IL-1 $\beta$ -Transkription in BALF-Proben von Pferden mit exazerbierter COB, allerdings handelte es sich dabei ausschließlich um Untersuchungen an Makrophagen (LAAN et al., 2006b) bzw. wurden die angewandten Medikamente in systemischer Form verabreicht (PIETRA et al., 2007; DELUCA et al., 2008).

Obwohl in den oben genannten Studien zum Teil auch keine signifikante Abnahme der IL-1 $\beta$ -Mengen nach inhalativer Therapie dargestellt werden konnte, bleibt diese die einzige Arbeit, in der eine signifikante Erhöhung der Interleukinkonzentration detektiert wurde. Da IL-1 $\beta$  erwiesenermaßen die PCT-Synthese steigern kann (OBERHOFFER et al., 1999), wäre ein Zusammenhang dieser zwei Parameter, welche beide in erhöhten Konzentrationen nach Behandlung vorlagen, denkbar. Allerdings widerspricht sich dies mit der bereits erwähnten fehlenden Korrelation der zwei Biomarker innerhalb der nicht therapierten Kollektive. Das Fehlen von Daten bezüglich des Verhaltens dieser Proteine in einer Placebo-Gruppe erschwert außerdem die Interpretation, sodass weitere Untersuchungen in diesem Bereich sicherlich erforderlich sind.

### 5.6.2.3 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-6 in der BALF

Das Interleukin-6 war der einzige Entzündungsmarker der vorliegenden Studie, bei dem infolge von inhalativer Behandlung bzw. Haltungsoptimierung eine Erniedrigung der gemessenen Konzentrationen festgestellt wurde. Vor allem bei Pferden mit schwerwiegender Atemwegsobstruktion, bei denen auch vor Therapie die höchsten IL-6-Werte nachgewiesen wurden, führten die therapeutischen Maßnahmen zu einer signifikanten Senkung des Proteins in der BALF ( $p = 0,036$ ). Anders war innerhalb der Gruppe „IAD oder COB in Remission“ insgesamt ein steigender, jedoch statistisch nicht signifikanter Trend zu beobachten ( $p = 0,285$ ). Diese Ergebnisse, die mit einer bei nahezu allen Probanden beobachteten klinischen Besserung einhergingen, sprechen also deutlich für eine Beteiligung dieses Zytokins an der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes.

Das Ausmaß der Wirkung des angewandten Glukokortikoids ist in der vorliegenden Arbeit, wie bereits erwähnt, durch die gleichzeitig durchgesetzte Haltungsoptimierung nur schwer zu beurteilen. Allerdings zeigten EK und Kollegen (1999), dass Budesonid in der Lage ist, die IL-6-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen *in vitro* zu hemmen, was wiederum auf eine aktive Beteiligung des Medikaments an den beschriebenen Ereignissen schließen lässt.

Im Konsensus mit den vorliegenden Resultaten zeigten PIETRA und Kollegen (2007) ebenfalls eine signifikante Senkung der IL-6-Transkriptionsrate in der BALF exazerbierter Pferde. Allerdings fand hier keine inhalative Behandlung statt, sondern es wurde Dexamethason an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mittels intramuskulärer Injektion verabreicht.

Im Gegensatz dazu fanden andere Arbeitsgruppen heraus, dass das Interleukin-6 nach Antigenstimulierung vor allem bei gesunden, nicht COB-anfälligen Patienten in erhöhtem Maße exprimiert und auch nicht von einer medikamentösen Therapie beeinflusst wird. Diese Autoren befürworten also die Hypothese, dass IL-6 eher als antientzündlicher Mediator fungiert und der Entzündungsreaktion entgegenwirkt (LAAN et al., 2006a; LAAN et al., 2006b). Hinweise diesbezüglich konnten in dieser Studie nicht gefunden werden, allerdings sollte diese Tatsache im Falle weiterführender Untersuchungen auf diesem Gebiet berücksichtigt werden.

#### 5.6.2.4 Auswirkungen von Budesonid auf Interleukin-17 in der BALF

Im Gegensatz zu BEEKMAN et al. (2011), welche nach 15-tägiger inhalativer Fluticason-Behandlung eine signifikante Reduzierung der IL-17-Transkription in der BALF von Pferden mit IAD nachweisen konnten, wurde bei den therapierten Probanden der vorliegenden Studie eine deutliche Steigerung der IL-17-OD-Werte beobachtet ( $p = 0,002$ ).

Allerdings geht aus humanmedizinischen Untersuchungen hervor, dass Patienten mit schweren Asthmaformen oder COPD, welche üblicherweise schlecht auf eine Kortikosteroidtherapie ansprechen, ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen aufweisen (BARNES, 2013). Dieses Zytokin scheint also durch Glukokortikoide nicht beeinflusst zu werden (MCKINLEY et al., 2008; VAZQUEZ-TELLO et al., 2013) und in Sputumproben von Asthmatikern wurden sogar ebenfalls erhöhte IL-17-Konzentrationen infolge von oraler Dexamethasongabe beobachtet. Dabei war IL-17 insbesondere bei rauchenden Patienten nach Therapie stark erhöht. Die genauen Mechanismen dieser Zigarettenrauch- und IL-17-abhängigen Glukokortikoidresistenz bleiben noch zu klären (SPEARS et al., 2013). Schwere Verläufe von Asthma sind außerdem durch eine ausgeprägte Neutrophilie statt der typischen Eosinophilie in der BALF charakterisiert und ähneln somit dem klinischen Bild der COB des Pferdes (BULLONE und LAVOIE, 2015). Es ist also denkbar, dass aufgrund von ähnlichen pathogenetischen Prozessen auch bei dieser Tierart die besagten Medikamente eine ähnliche Auswirkung auf die IL-17-Konzentrationen haben.

Weitere Forschung ist allerdings erfragt, insbesondere weil infolge der nicht auswertbaren Ergebnisse des ELISA-Tests in dieser Studie nur qualitative Aussagen über den IL-17-Gehalt getroffen werden konnten.

### 5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dem ersten Abschnitt der vorliegenden Studie wurde erstmals gezeigt, dass Procalcitonin mittels speziellen ELISA-Tests in Blut und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit lungenkranker Pferde bestimmt werden kann. Zusätzlich wurden in der BALF der Patienten die Konzentrationen dreier proinflammatorischer Zytokine (Interleukine 1 $\beta$ , 6 und 17), ebenfalls mittels equiner ELISAs ermittelt.

Die Patienten wurden an der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin vorgestellt und konnten durch umfangreiche klinische Untersuchungen mit hoher Sicherheit folgenden Diagnosegruppen zugeordnet werden: Lungengesund, RAO bzw. COB in Exazerbation, IAD oder COB in Remission und (sub)-akute Pneumonie.

Procalcitonin, welches in der Humanmedizin vornehmlich als Marker bakterieller Infektionen eingesetzt wird, ermöglichte in dieser Studie eine gute Differenzierung zwischen gesunden und erkrankten Patienten. Allerdings war eine genaue Unterscheidung verschiedener chronischer Atemwegserkrankungen anhand der gemessenen Werte nicht möglich.

Die gute Korrelation zwischen Procalcitonin und einigen klinischen Parametern der Pferde und der positive Zusammenhang zwischen PCT-Mengen in BALF und Blutplasma lassen allerdings Spielraum für weitere Untersuchungen. Beispielsweise wäre unter Optimierung der bei dem equinen ELISA zum Teil aufgetretenen Verdünnungsproblematik eine Bestimmung

der PCT-Plasma-Konzentrationen an einem größeren Patientenpool durchaus interessant. Durch die geringe Fallzahl konnten in der vorliegenden Arbeit nur schwache Tendenzen bei der Analyse der Blutproben festgestellt werden, sodass eine Überprüfung dieser in jedem Fall sinnvoll wäre. Zusätzlich sollte eine größere Gruppe an Patienten mit bakteriell bedingter Pneumonie untersucht werden, zumal dies eines der Haupteinsatzgebiete für die PCT-Diagnostik darstellt. In der vorliegenden Studie war ein Einschluss dieser Patienten zunächst nicht geplant und ergab sich nur zufällig aufgrund der vorgefundenen Befunde. Dadurch ist auch die äußerst geringe Fallzahl zu erklären. Die korrekte Diagnose von Lungenerkrankungen stellt beim Pferd wie auch beim Menschen vor allem in der ambulanten Praxis oftmals eine Herausforderung für den behandelnden (Tier)-Arzt dar. Wenn sich die Procalcitoninbestimmung im Blut von Pferden also als nützlich erweisen würde, beispielsweise zur Bestätigung des Vorliegens einer bakteriellen Infektion, wäre dies sicherlich ein hilfreiches und einfaches diagnostisches Mittel, wodurch man die Durchführung aufwendigerer Untersuchungen (z. B. Endoskopie, BAL) und den überflüssigen Einsatz von Antibiotika bzw. die Dauer ihrer Anwendung reduzieren könnte. Wie aus der Humanmedizin bereits bekannt, kann dieses Protein außerdem in zahlreichen Bereichen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden (z. B. Sepsis, Trauma, Pankreatitis), sodass mit dem hier angewandten equinen ELISA eine PCT-Bestimmung auch bei Pferden mit anderen Krankheitsbildern erfolgen könnte.

Aus der erstmaligen direkten Bestimmung proinflammatorischer Zytokine in der BALF der untersuchten Patienten resultierte eine tendenzielle bzw. deutliche Erhöhung von IL-1 $\beta$  und IL-6 bei chronisch erkrankten Pferden. In beiden Fällen wurde außerdem eine Korrelation zu bestimmten klinischen Parametern festgestellt (z. B. Intrapleuraldruck, endoskopische Befunde, Menge und Zusammensetzung des tracheobronchialen Sekrets), was die Beteiligung dieser Interleukine an pathogenetischen Entzündungsmechanismen bestätigt. Insbesondere war für IL-6 eine signifikante Erhöhung bei Patienten mit akutem RAO bzw. COB-Schub zu beobachten. Durch die schlechte Funktionalität des eingesetzten ELISA-Kits war eine Quantifizierung der IL-17-Mengen im Gegensatz nicht möglich. Aus den für die jeweiligen Proben gemessenen Extinktionswerte ist zu schließen, dass das Interleukin-17 kein geeigneter Entzündungsmarker in der BALF darstellt.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denjenigen anderer Veröffentlichungen gestaltete sich aufgrund des Studiendesigns als auch der angewandten Analysemethoden als schwierig. Obwohl im Vergleich zu anderen Arbeiten aus der Pferdemedizin die hier untersuchte Stichprobe als umfangreich erscheint, kann dies aus statistischer Sicht nicht bestätigt werden. Also wären weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven auch in diesem Falle hilfreich, um die hier aufgedeckten Tendenzen zu überprüfen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Effekte einer zehntägigen inhalativen Budesonidbehandlung auf die Ausprägung der besagten Entzündungsmarker in der BALF untersucht. Die extrem kleinen Stichproben, das Fehlen einer Placebo-Gruppe und die gleichzeitig durchgesetzte Haltungsoptimierung wurden als Schwachpunkte dieser Untersuchungen bereits diskutiert und führen zu einer herabgesetzten Interpretierbarkeit der Resultate. Da keine Placebo-Kontrollgruppe eingeschlossen wurde, kann nicht sicher gesagt werden, ob die beobachteten Tendenzen auf die Therapie oder auf den normalen Verlauf

des Entzündungsmarkers zurückzuführen sind. Außerdem ist in der vorliegenden Studie nur eine Aussage über die Konzentration des Markers unmittelbar nach Beendigung der Therapie möglich. Durch das Fehlen wiederholter Messungen bestehen keine Informationen zur klinischen Halbwertszeit und eventuell später stattgefundenen Konzentrationsveränderungen bleiben unbekannt.

Nichtsdestotrotz wurden zusätzlich zur allgemeinen klinischen Besserung der Probanden einige Trends beobachtet, welche zum Teil im Einklang mit aktuellen Literaturangaben stehen. Während PCT und IL-1 $\beta$  kaum verändert wurden bzw. eine Erhöhung nach Therapie zeigten, war bei Pferden im Exazerbationsstadium eine signifikante IL-6-Senkung nach Glukokortikoidverabreichung detektierbar, was die wichtige Rolle dieses Interleukins an der Pathogenese der equinen COB weiterhin bestätigt. Für IL-17 besteht im Gegensatz dazu die Vermutung, dass es wie aus der Humanmedizin bekannt, auch beim Pferd durch Glukokortikoide nicht zu beeinflussen ist. Diese Ansätze sollten also unter Vorbehalt obiger Anmerkungen weiter verfolgt werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Anna Cristina Pelli (2016)

### **Procalcitonin und proinflammatorische Zytokine in der bronchoalveolären Lavage beim lungenkranken Pferd unter inhalativer Glukokortikoidtherapie**

Procalcitonin (PCT) ist das Vorläuferhormon des Hormons Calcitonin und wird in der Humanmedizin als Entzündungsmarker erfolgreich eingesetzt. Neben dem Hauptanwendungsgebiet der Sepsisdiagnostik dient PCT in der Humanmedizin auch der Diagnose bzw. Verlaufskontrolle verschiedener Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD.

Proinflammatorische Interleukine sind an der Entstehung verschiedener Atemwegserkrankungen von Mensch und Pferd beteiligt und scheinen außerdem zu einer vermehrten Bildung von Procalcitonin im Rahmen infektiöser Geschehen beizutragen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Procalcitonin erstmals mittels spezieller ELISA-Tests (RIEGER et al., 2014) in Blutplasma (n = 18) und bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) (n = 68) von Pferden mit verschiedenen Lungenerkrankungen zu bestimmen. Diese Ergebnisse sollten zum einen in Bezug auf übliche klinische Parameter der Lungendiagnostik betrachtet und zum anderen mit den Konzentrationen einiger proinflammatorischer Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17) in der BALF (n = 68) verglichen werden. Letztere wurden anhand kommerzieller ELISA-Kits der Marke USCN bestimmt.

Einige chronisch lungenkranke Patienten (n = 12) wurden zusätzlich einer zehntägigen inhalativen Therapie mit dem Glukokortikoid Budesonid (1.500  $\mu$ g BID) unter staubarmen Haltungsbedingungen unterzogen. Im Anschluss an die Behandlung wurde der klinische Status der Patienten sowie die Ausprägung der verschiedenen Biomarker in der BALF erneut evaluiert.

Insgesamt wurden 68 Probanden in die vorliegende Studie aufgenommen. Davon wurden 53 Patienten zur Abklärung tiefer Atemwegserkrankungen an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin vorgestellt. Die restlichen 15 Pferde waren vorberichtlich und klinisch lungengesund und dienten somit als Kontrollgruppe. Nach standardisierter Untersuchung (Vorberichterhebung, klinische Untersuchung der Atemwege, arterielle Blutgasanalyse, Lungenfunktionsuntersuchung, Thorax-Röntgen, Tracheobrochoskopie, zytologische Untersuchung der BALF) wurden die Probanden folgenden Diagnosegruppen zugeordnet: Lungengesund (n = 15), *recurrent airway obstruction* (RAO) oder chronisch obstruktive Bronchitis (COB) in Exazerbation (n = 21), chronisch obstruktive Bronchitis (COB) in Remission oder *inflammatory airway disease* (IAD) (n = 16), chronisch interstitielle Pneumopathie (CIP) (n = 12) und (sub)-akute Pneumonie (n = 4). Anhand eines modifizierten Score-Systems nach OHNESORGE et al. (1998) konnten die Patienten außerdem hinsichtlich des Schweregrads der vorliegenden Erkrankung beurteilt werden.

Lungenkranke Pferde zeigten sowohl in der BALF (p = 0,006) als auch in Blutplasma (p = 0,05) signifikant höhere PCT-Konzentrationen als die gesunden Kontrolltiere. Obwohl Pferde

mit RAO bzw. COB in Exazerbation und solche mit COB in Remission oder IAD die höchsten durchschnittlichen PCT-Mengen in BALF (Kontrollgruppe: 5,5 ng/ml; RAO/COB in Exazerbation: 13,4 ng/ml; COB in Remission/IAD: 16,9 ng/ml) und Blutplasma (Kontrollgruppe: 13,9 ng/ml; RAO/COB in Exazerbation: 482,2 ng/ml; COB in Remission/IAD: 98,6 ng/ml) aufwiesen, war eine genaue Differenzierung einzelner Gruppen mittels dieses Markers nicht möglich. Nichtsdestotrotz wurde eine gute Korrelation zwischen PCT-Mengen in BALF und Blutplasma gezeigt. Außerdem wurden insbesondere für PCT in Blutplasma positive Zusammenhänge mit klinischen Parametern (kinischer Score, Kalziumkonzentration im Blut, Atemfrequenz, PaO<sub>2</sub> und bronchiale Röntgenbefunde) vorgefunden. Für die Interleukine wurden einige Tendenzen beobachtet, allerdings lagen diese nicht im statistisch signifikanten Bereich. Gute Korrelationen zeigten sich zwischen IL-1 $\beta$  und -6 sowie zwischen den Zytokinen und einigen klinischen Befunden. Das Interleukin-6, das bei Pferden mit RAO bzw. COB in Exazerbation den höchsten Medianwert aufwies (Kontrollgruppe: 2,5 pg/ml; RAO/COB in Exazerbation: 11 pg/ml), zeigte als einziger Marker schwache Korrelationen zur BALF-Neutrophilie und als einziges Interleukin einen Zusammenhang zum klinischen Score. Durch die bei der Durchführung des ELISA-Tests aufgetretenen Probleme erfolgte für IL-17 ausschließlich eine qualitative Beurteilung der Zytokinmengen. Des Weiteren konnten in der vorliegenden Studie keine Wechselwirkungen zwischen den proinflammatorischen Interleukinen und Procalcitonin nachgewiesen werden.

Nach inhalativer Behandlung wurde allgemein eine deutliche Verbesserung des klinischen Status beobachtet, welche in einer erheblichen Senkung des klinischen Scores Ausdruck fand ( $p = 0,005$ ). Nach Inhalation wurden insgesamt leicht höhere PCT-Werte (Median: 16,5 ng/ml) als zuvor (Median: 13,8 ng/ml) gemessen, allerdings war dieser Unterschied aus statistischer Sicht nicht relevant. Bei Betrachtung der einzelnen Patienten zeigten außerdem die eine Hälfte erniedrigte Procalcitoninkonzentrationen, während bei der anderen Hälfte diese deutlich erhöht waren. Für die Interleukine 1 $\beta$  ( $p = 0,016$ ) und 17 ( $p = 0,002$ ) wurde nach Therapie ein signifikanter Anstieg der gemessenen Werte in der BALF festgestellt. Anders zeigten Pferde mit akutem RAO bzw. COB-Schub eine deutliche Senkung der IL-6-Konzentrationen in der BALF nach Therapie ( $p = 0,036$ ).

Die vorliegende Studie ermöglichte erstmals eine direkte Quantifizierung der Konzentrationen von Procalcitonin in Blut und BALF lungenkranker Pferde. Des Weiteren wurden wichtige Informationen bezüglich der tatsächlichen Mengen bestimmter proinflammatorischer Interleukine in der BALF gewonnen, dessen Bestimmung bis heute fast ausschließlich auf transkriptioneller Ebene durchgeführt wurde. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse scheint PCT in der BALF bereits etablierten Markern nicht überlegen zu sein. PCT in Blutplasma, welches die lokale Lungenentzündung gut widerspiegelt, scheint dagegen ein versprechendes Mittel zur Diagnose tiefer Atemwegserkrankungen des Pferdes darzustellen und sollte durch weitere Untersuchungen an größeren Stichproben weiterführend evaluiert werden. Für die Interleukine konnten weder relevante Gruppenunterschiede noch eine Korrelation zu PCT aufgedeckt werden. PCT scheint auch beim Pferd, wie beim Menschen bereits bekannt, durch Steroide kaum beeinflusst zu werden. Während für IL-1 $\beta$  und 17 nach Glukokortikoidinhalation eine deutliche Steigerung in der BALF festgestellt wurde, zeigte IL-6 als einziges Interleukin eine partielle dennoch



deutliche Senkung nach Therapie. Um die vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen, sind allerdings weitere Untersuchungen an größeren Fallzahlen und unter Einschluss einer Placebo-Kontrollgruppe nötig.

## 7. SUMMARY

Anna Cristina Pelli (2016)

### **Evaluation of procalcitonin and proinflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with different pneumopathies under the course of inhaled glucocorticoid therapy**

Procalcitonin (PCT), the precursor protein of the hormone calcitonin, is a sensitive inflammatory marker in human medicine. Besides the investigation of human sepsis, which remains the main field of application for PCT diagnostic, this protein is also used to diagnose and monitor different respiratory diseases like asthma and COPD.

Proinflammatory cytokines are known to play an essential role in airway inflammation of both horses and men. Furthermore they also seem to trigger hyperprocalcitonemia in case of infection.

The first aim of the present study was to determine procalcitonin concentrations in blood plasma (n = 18) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (n = 68) of horses with different pneumopathies. Therefore a specific ELISA test (RIEGER et al., 2014) was used. Furthermore PCT concentrations were compared with conventional clinical findings and with the amount of proinflammatory interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17) in the BALF (n = 68). The concentrations of these cytokines were also measured by ELISA, using commercially available kits of the brand USCN.

Subsequently some horses with chronic pulmonary disease (n = 12) were submitted to inhalation therapy with the glucocorticoid budesonide (1,500  $\mu$ g BID) under low dust environment. After ten days of inhalation the clinical status of the patients as well as the concentration of the biomarkers in BALF was evaluated again.

A total of 68 patients were included into this study: 53 horses were presented at the equine clinic of Freie Universität Berlin due to respiratory problems. The remaining 15 horses, which had no history of lung disease and resulted as sound according to clinical investigations, were used as the healthy control group. After an extensive pre-participation examination (anamnesis documentation, clinical examination, exercise test, blood gas analysis, bronchoscopy, BALF cytology and thoracic radiography) the patients were assigned to one of the following groups: healthy (n = 15), recurrent airway obstruction (RAO) in exacerbation (n = 21), recurrent airway obstruction (RAO) in remission or inflammatory airway disease (IAD) (n = 16), chronic interstitial pneumopathy (CIP) (n = 12) and (sub)acute pneumonia (n = 4). Finally using a modified score system (OHNESORGE et al., 1998) horses were evaluated according to the severity of the diagnosed disease.

Overall, horses affected by respiratory disease showed increased PCT concentrations in both BALF (P = 0.006) and blood plasma (P = 0.05) compared to controls. Patients with RAO in exacerbation and those with RAO in remission or IAD showed the highest median values for PCT in BALF (controls: 5.5 ng/ml; RAO in exacerbation: 13.4 ng/ml; RAO in remission/IAD: 16.9 ng/ml) and blood plasma (controls: 13.9 ng/ml; RAO in exacerbation:

482.2 ng/ml; RAO in remission/IAD: 98.6 ng/ml), but this marker did not allow a differentiation between the single disease groups. However, a moderate correlation between PCT in BALF and blood plasma was detected and the concentration of PCT in plasma had stronger coefficients of correlation to clinical findings (clinical score, calcium concentration in blood, respiratory rate, PaO<sub>2</sub> and bronchial radiological findings). For interleukins no significant differences could be found. Correlations were found between IL-1 $\beta$  und IL-6 as well as between the cytokines and some clinical parameters. Interleukin-6 showed the highest median value within the group of horses with RAO in exacerbation (controls: 2.5 pg/ml; RAO in exacerbation: 11 pg/ml). Moreover it was the only biomarker which had a weak association to BALF neutrophilia and the only interleukin correlating with the clinical score. Due to some problems encountered during the performance of the IL-17 ELISA, only qualitative assessment was possible in this case. No correlations were found between PCT and any of the proinflammatory cytokines examined in this study.

After inhalative therapy horses showed a clear improvement in clinical status which was pointed up by the general decrease in score points achieved by all patients ( $P = 0.005$ ). After inhalation a slight increase, albeit not significant, was found for median PCT concentrations (before therapy: 13.8 ng/ml; after therapy: 16.5 ng/ml). However, a closer look to the single patients showed that about one half of them had reduced PCT concentrations, while the other half displayed clear increases. The interleukins 1 $\beta$  ( $P = 0.016$ ) and 17 ( $P = 0.002$ ) presented significantly elevated concentrations in the alveolar space after therapy, whereas a clear decrease of IL-6 values ( $P = 0.036$ ) was detected in the BALF of horses with RAO in exacerbation.

This study represents the first attempt to quantify the concentrations of procalcitonin both in blood and in the alveolar space of horses afflicted by respiratory diseases. Moreover, new insights concerning the effective concentrations of some proinflammatory interleukins in the BALF of the same horses were given, since up to date these markers have mainly been characterised on transcriptional level. Regarding the present results PCT in BALF seems not to be a superior marker compared to established clinical markers in low-grade inflammation. Nevertheless PCT in blood plasma represented local lung inflammation well and showed a better correlation to the clinical condition of the examined horses. So PCT in blood seems to be a more promising marker to characterize airway diseases and it should be evaluated in further studies including larger patient groups. Interleukins in BALF showed neither significant differences between disease groups nor a correlation to the measured procalcitonin values. Equine PCT seems not to be influenced by steroids, as for human PCT already proven. Interleukin 1 $\beta$  and 17 were higher after therapy, whereas interleukin-6 was the only marker which showed a partial but significant decrease subsequently to glucocorticoid inhalation. To confirm this results further studies are needed, where larger numbers of patients are examined and a placebo group is included.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

**Abraham G., Brodde O. E. und Ungemach F. R. (2002)**

"Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone."

Equine Veterinary Journal, 34, 587-593

**Abramson M. J., Perret J. L., Dharmage S. C., McDonald V. M. und McDonald C. F. (2014)**

"Distinguishing adult-onset asthma from COPD: a review and a new approach."

International Journal of COPD, 9, 945-962

**Aggarwal N. und Holmes M. A. (1999)**

"Characterisation of equine T helper cells: demonstration of Th1- and Th2-like cells in long-term equine T-cell cultures."

Research in Veterinary Science, 66, 277-279

**Ainsworth D. M., Grünig G., Matychak M. B., Young J., Wagner B., Erb H. N. und Antczak D. F. (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

**Ainsworth D. M., Wagner B., Franchini M., Grünig G., Erb H. N. und Tan J.-Y. (2006)**

"Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction."

American Journal of Veterinary Research, 67, 669-677

**Ainsworth D. M., Wagner B., Erb H. N., Young J. C. und Retallick D. E. (2007)**

"Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1 $\beta$  and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease."

American Journal of Veterinary Research, 68, 1361-1369

**Ammann V. J., Vrins A. A. und Lavoie J.-P. (1998)**

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

Equine Veterinary Journal, 30, 152-157

**Ammori B. (2003)**

"Hypocalcaemia and calcitonin precursors in critically ill patients."

Archives of Disease in Childhood, 88, 179

**Arend W. P. (2002)**

"The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease."  
Cytokine & Growth Factor Reviews, 13, 323-340

**Assicot M., Gendrel D., Carsin H., Raymond J., Guilbaud J. und Bohuon C. (1993)**

"High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection."  
The Lancet, 341, 515-518

**Balog A., Ocsovszky I. und Mandi Y. (2002)**

"Flow cytometric analysis of procalcitonin expression in human monocytes and granulocytes."  
Immunology Letters, 84, 199-203

**Barati M., Alinejad F., Bahar M. A., Tabrisi M. S., Shamshiri A. R., Bodouhi N. O. und Karimi H. (2008)**

"Comparison of WBC, ESR, CRP and PCT serum levels in septic and non-septic burn cases."  
Burns, 34, 770-774

**Barczyk A., Pierzchala W. und Sozańska E. (2003)**

"Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine."  
Respiratory Medicine, 97, 726-733

**Barnes P. J. (2000)**

"Mechanisms in COPD - Differences from Asthma."  
Chest, 117 (2 Supplement), 10S-14S

**Barnes P. J. (2010)**

"Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation."  
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 120, 76-85

**Barnes P. J. (2013)**

"Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease."  
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131, 636-645

**Barton A. K., Shety T., Pelli A., Bondzio A., Rieger M., Einspanier R. und Gehlen H. (2014a)**

"Evaluation of inflammatory markers and treatment success in inflammatory airway disease under the course of inhalation therapy and environmental dust reduction."  
Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, Cabourg (France), 13-14 October 2014, 63

**Barton A. K., Shety T., Wirth C. und Gehlen H. (2014b)**

"Diagnostic value of inflammatory markers in chronic respiratory disease of the horse - a review."

Pferdeheilkunde, 30, 432-443

**Bauer T. T., Nilius G., Grüning W. und Rasche K. (2012)**

"Diagnose und Therapie der COPD-Exazerbation."

Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 107, 172-178

**Becker K. L., Nash D., Silva O. L., Snider R. H. und Moore C. F. (1981)**

"Increased serum and urinary calcitonin levels in patients with pulmonary disease."

Chest, 79, 211-216

**Becker K. L., Snider R. und Nysten E. S. (2010)**

"Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target."

British Journal of Pharmacology, 159, 253-264

**Beekman L., Tohver T., Dardari R. und Léguillette R. (2011)**

"Corticosteroids treatment suppresses the expression of IL-17 in the lungs of horses with inflammatory airway disease (IAD)."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 25, 666-667

**Beekman L., Tohver T. und Léguillette R. (2012)**

"Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 26, 153-161

**Befadhel M., Clark T. W., Reid C., Medina M., Batham S., Barer M. R., Nicholson K. G. und Brightling C. E. (2011)**

"Procalcitonin and C-reactive protein in hospitalized adult patients with community-acquired pneumonia or exacerbation of asthma or COPD."

Chest, 139, 1410-1418

**Bewig B. und Barth J. (1993)**

"Inhibitory effects of inhaled flunisolide on inflammatory functions of alveolar macrophages."

European Journal of Clinical Pharmacology, 44, 541-544

**Boardman C., Chachi L., Gavrila A., Keenan C. R., Perry M. M., Xia Y. C., Meurs H. und Sharma P. (2014)**

"Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease."

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 29, 129-143

**Breuer J. und Schusser G. F. (2012)**

"Erstellung eines Septikämie-Scores für adulte Pferde."  
Pferdeheilkunde, 28, 421-428

**Brewer B. D. und Koterba A. M. (1988)**

"Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis."  
Equine Veterinary Journal, 20, 18-22

**Briel M., Schuetz P., Müller B., Young J., Schild U., Nusbaumer C., Périat P., Bucher H. C. und Christ-Crain M. (2008)**

"Procalcitonin-guided antibiotic use vs. a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care."  
Archives of Internal Medicine, 168, 2000-2007

**Brightling C. E. (2013)**

"Biomarkers that predict and guide therapy for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease."  
Annals of the American Thoracic Society, 10, S214-S219

**Brunkhorst F. M. und Reinhart K. (2009)**

"Diagnose und kausale Therapie der Sepsis."  
Internist, 50, 810-816

**Bullone M. und Lavoie J.-P. (2015)**

"Asthma "of horses and men" - How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences?"  
Molecular Immunology, 66, 97-105

**Burkhardt O., Ewig S., Haagen U., Giersdorf S., Hartmann O., Wegscheider K., Hummers-Pradier E. und Welte T. (2010)**

"Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection."  
European Respiratory Journal, 36, 601-607

**Castelli G. P., Pognani C., Meisner M., Stuani A., Bellomi D. und Sgarbi L. (2004)**

"Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction."  
Critical Care, 8, R234-R242

**Chen Y., Garvin L. M., Nickola T. J., Watson A. M., Colberg-Poley A. M. und Rose M. C. (2014)**

"IL-1 $\beta$  induction of MUC5AC gene expression is mediated by CREB and NF- $\kappa$ B and repressed by dexamethasone."  
American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 306, L797-L807

**Christ-Crain M., Jaccard-Stolz D., Bingisser R., Gencay M. M., Huber P. R., Tamm M. und Müller B. (2004)**

"Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial."

The Lancet, 363, 600-607

**Christ-Crain M., Stolz D., Bingisser R., Müller C., Miedinger D., Huber P. R., Zimmerli W., Harbarth S., Tamm M. und Müller B. (2006)**

"Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia. A randomized trial."

Critical Care Medicine, 174, 84-93

**Chung K. F. (2001)**

"Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease."

European Respiratory Journal, 18, 50s-59s

**Cordeau M.-E., Joubert P., Dewachi O., Hamid Q. und Lavoie J.-P. (2004)**

"IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 97, 87-96

**Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. und Annunziato F. (2011)**

"Th 17 cells: new players in asthma pathogenesis."

Allergy, 66, 989-998

**Couëtil L. L. und Ward M. P. (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

**Couëtil L. L., Art T., de Moffarts B., Becker M., Mélotte D., Jaspas F., Bureau F. und Lekeux P. (2006)**

"Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 20, 399-406

**Couëtil L. L., Hoffman A. M., Hodgson J., Buechner-Maxwell V., Viel L., Wood J. L. und Lavoie J.-P. (2007)**

"Inflammatory airway disease of horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, 356-361



**Couëttil L. L. (2014)**

"Therapeutic options available to the practitioner."

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, Cabourg (France), 13-14 October 2014, 95

**Dandona P., Nix D., Wilson M. F., Aljada A., Love J., Assicot M. und Bohuon C. (1994)**

"Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects."

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 79, 1605-1608

**Davis M. S., Williams C. C., Meinkoth J. H., Malayer J. R., Royer C. M., Williamson K. K. und McKenzie E. C. (2007)**

"Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in airways of horses after performing exercise while breathing cold air."

American Journal of Veterinary Research, 68, 185-189

**De Kruif M. D., Lemaire L. C., Giebelen I. A., Struck J., Morgenthaler N. G., Papassotiriou J., Elliott P. J. und van der Poll T. (2008)**

"The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia."

Intensive Care Medicine, 34, 518-522

**De Mestre A., Noronha L., Wagner B. und Antczak D. F. (2010)**

"Split immunological tolerance to trophoblast."

International Journal of Development Biology, 54, 445-455

**Debrue M., Hamilton E., Joubert P., Lajoie-Kadoch S. und Lavoie J.-P. (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

**DeLuca L., Erb H. N., Young J. C., Perkins G. A. und Ainsworth D. M. (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, 427-435

**Derksen F. J., Brown C. M., Sonea I., Darien B. J. und Robinson N. E. (1989)**

"Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease."

Equine Veterinary Journal, 21, 23-26

**Desjardins I., Theoret C., Joubert P., Wagner B. und Lavoie J.-P. (2004)**

"Comparison of TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 101, 133-141

**Dieckmann M. (1987)**

"Zur Wirksamkeit von Ambroxolhydrochlorid (Mukovent) bei lungenkranken Pferden - Klinische, funktionelle und zytologische Untersuchungen."

Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation, 1-220

**Dieckmann M., Klein H.-J. und Deegen E. (1990)**

"Chronisch interstitielle Lungenerkrankungen beim Pferd - Blutgasanalytische, sekretzytologische und röntgenologische Befunde."

Pferdeheilkunde, 6, 155-160

**Dinarello C. A. (1997)**

"Interleukin-I."

Cytokine & Growth Factor Reviews, 8, 253-256

**Donaldson M. T., Beech J., Ennulat D. und Hamir A. N. (1998)**

"Interstitial pneumonia and pulmonary fibrosis in a horse."

Equine Veterinary Journal, 30, 173-175

**Donnelly L. E., Tudhope S. J., Fenwick P. S. und Barnes P. J. (2010)**

"Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages."

European Respiratory Journal, 36, 178-186

**Duflo F., Debon R., Monneret G., Bienvenu J., Chassard D. und Allaouchiche B. (2002)**

"Alveolar and serum procalcitonin: diagnostic and prognostic value in ventilator-associated pneumonia."

Anesthesiology, 96, 74-79

**Duvivier D. H., Votion D., Roberts C. A., Art T. und Lekeux P. (1999)**

"Inhalation therapy of equine respiratory disorders."

Equine Veterinary Education, 11, 124-130

**Eberhardt W. und Kilz T. (2003)**

"Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung: Von genomischen und nichtgenomischen Effekten."

Pharmazie in unserer Zeit, 32, 288-294

**Ek A., Larsson K., Siljerud S. und Palmberg L. (1999)**

"Fluticasone and budesonide inhibit cytokine release in human lung epithelial cells and alveolar macrophages."

Allergy, 54, 691-699

**El Abbas S., Frelstedt L., Art T., Pirottin D., Tosi I., Dupuis M. C., Lekeux P., Bureau F. und Desmet C. J. (2012)**

"Characterization of T-helper lymphocytes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage of healthy horses and in horses with recurrent airway obstruction."

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Scientific Meeting of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium, 19. Oktober 2012, Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège, ISBN 978-2-87543-027-4, 1-80

**Emporiadou M., Hatzistilianou M., Haidopoulou K., Aggouridaki C., Reklity A., Magnisali C. und Karamperis S. T. (2005)**

"Procalcitonin and inflammatory cytokines in children with asthma."

European Journal of Inflammation, 3, 75-81

**FDA, CDER und CVM (2013)**

"Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation (Revision 1)."

U.S. Department of Health and Human Services, [www.fda.gov](http://www.fda.gov), 27.05.2015

**Fey K. (2005)**

"Der klinische Nutzen zytologischer Untersuchungen von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit bei der Differenzierung chronischer Bronchitiden des Pferdes."

Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, DVG Service GmbH, Habilitationsschrift, 1-352

**Fey K. (2006a)**

"Pneumonie."

Handbuch Pferdepraxis (3. Auflage), Dietz O. und Huskamp B., Stuttgart, Enke Verlag, 341-349.

**Fey K. (2006b)**

"Nichtinfektiöse Krankheiten der tiefen Atemwege und der Lunge."

Handbuch Pferdepraxis (3. Auflage), Dietz O. und Huskamp B., Stuttgart, Enke Verlag, 327-337.

**Fey K. und Verter W. (2006)**

"Untersuchungsmethoden."

Handbuch Pferdepraxis (3. Auflage), Dietz O. und Huskamp B., Stuttgart, Enke Verlag, 296-307.

**Fink L. (2014)**

"Interstitielle Lungenerkrankungen."

Der Pathologe, 35, 597-605

**Floras A. N. K., Holowaychuk M. K., Hodgins D. C., Marr H. S., Birkenheuer A., Sharif S., Bersenas A. M. E. und Bienzle D. (2014)**

"Investigation of a commercial ELISA for the detection of canine procalcitonin."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 28, 599-602

**Fogarty U. (1990)**

"Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique."

Equine Veterinary Journal, 22, 174-176

**Franchimont D. (2004)**

"Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies."

Annals of the New York Academy of Sciences, 1024, 124-137

**Franchini M., Gill U., von Fellenberg R. und Bracher V. D. (2000)**

"Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay."

American Journal of Veterinary Research, 61, 1369-1374

**Garcia-Lopez J. M., Provost P. J., Rush J. E., Zicker S. C., Burmaster H. und Freeman L. M. (2001)**

"Prevalence and prognostic importance of hypomagnesemia and hypocalcemia in horses that have colic surgery."

American Journal of Veterinary Research, 62, 7-12

**Gehlen H., Niedermeier G. und May A. (2009)**

"Was bringt die Röntgen- und Ultraschalluntersuchung bei Lungenerkrankungen des Pferdes?"

Pferdeheilkunde, 25, 288-301

**Gerber V., Straub R., Marti E., Hauptman J., Herholz C., King M., Imhof A., Tahon L. und Robinson N. E. (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

**Giguère S., Viel L., Lee E., MacKay R. J., Hernandez J. und Franchini M. (2002)**

"Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 85, 147-158

**Gilger B. C., Malok E., Cutter K. V., Stewart T., Horohov D. W. und Allen J. B. (1999)**  
"Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 71, 17-28

**Gilkerson J. R., Bailey K. E., Diaz-Méndez A. und Hartley C. A. (2015)**

"Update on viral diseases of the equine respiratory tract."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 31, 91-104

**Giunti M., Peli A., Battilani M., Zacchini S., Militerno G. und Otto C. M. (2010)**

"Evaluation of CALC-I gene (CALCA) expression in tissues of dogs with signs of the systemic inflammatory response syndrome."

Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio), 20, 523-527

**Hansen S., Baptiste K. E., Fjeldborg J., Betancourt A. und Horohov D. W. (2014)**

"A comparison of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in equine bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 158, 238-243

**Harbarth S., Holeckova K., Froidevaux C., Pittet D., Ricou B., Grau G. E., Vadas L., Pugin J. und Network G. S. (2001)**

"Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis."

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 164, 396-402

**Hawrylowicz C. M. und O'Garra A. (2005)**

"Potential role of Interleukin-10 secreting regulatory T-cells in allergy and asthma "

Nature Reviews Immunology, 5, 271-283

**Hedlund J. und Hansson L.-O. (2000)**

"Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis."

Infection, 28, 68-73

**Hewson J. und Arroyo L. G. (2015)**

"Respiratory disease: diagnostic approaches in the horse."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 31, 307-336

**Hoffman A. M. (1999)**

"Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease."

Equine Veterinary Education, 11, 330-336

**Hoffman A. M. (2008)**

"Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 24, 423-435

**Hoffmann G., Totzke G., Seibel M., Smolny M., Wiedermann F. J. und Schobersberger W. (2001)**

"In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin."

Critical Care Medicine, 29, 112-116

**Hoffmann G., Czechowski M., Schloesser M. und Schobersberger W. (2002)**

"Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells."

Critical Care Medicine, 30, 2091-2095

**Horohov D. W., Beadle R. E., Mouch, S., Pourciau S. S. (2005)**

"Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 108, 237-245

**Horohov D. W., Mills W. R. und Gluck M. (2009)**

"Specific and innate immunity in the lung as it relates to equine RAO"

Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Equine Airways Symposium, Berne (Switzerland), 5-7 August 2009, IVIS website ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), 106-108

**Horohov D. W. (2015)**

"The equine immune responses to infectious and allergic disease: a model for humans?"

Molecular Immunology, 66, 89-96

**Hotchkiss J. W., Reid S. W. J. und Christley R. M. (2007)**

"A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction."

Equine Veterinary Journal, 39, 301-308

**Huang D. T., Weissfeld L. A., Kellum J. A., Yealy D. M., Kong L., Martino M., Angus D. C. und GenIMS investigators (2008)**

"Risk prediction with procalcitonin and clinical rules in community acquired pneumonia."

Annals of Emergency Medicine, 52, 48-58

**Hurcombe S. D. A., Toribio R. E., Slovis N. M., Saville W. J., Mudge M. C., MacGillivray K. und Frazer M. L. (2009)**

"Calcium regulating hormones and serum calcium and magnesium concentrations in septic and critically ill foals and their association with survival."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 23, 335-343

**Ivanov S. und Linden A. (2008)**

"Interleukin-17 as a drug target in human disease."

Trends in Pharmacological Sciences, 30, 95-103

**Jackson C. A., Berney C., Jefcoat A. M. und Robinson N. E. (2000)**

"Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves)."

Equine Veterinary Journal, 32, 432-438

**Jacobs J. W., Lund P. K., Potts J. T. J., Bell N. H. und Habener J. F. (1981)**

"Procalcitonin is a glycoprotein."

The Journal of Biological Chemistry, 256, 2803-2807

**Joubert P., Cordeau M.-E., Boyer A., Silversides D. W. und Lavoie J.-P. (2008)**

"Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge."

The Veterinary Journal, 178, 227-232

**Joubert P., Cordeau M.-E. und Lavoie J.-P. (2011)**

"Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 142, 236-242

**Jung B., Embriaco N., Roux F., Forel J.-M., Demory D., Allardet-Servent J., Jaber S., La Scola B. und Papazian L. (2010)**

"Microbiological data, but not procalcitonin improve the accuracy of the clinical pulmonary infection score."

Intensive Care Medicine, 36, 790-798

**Kaliner M. (1985)**

"Mechanisms of glucocorticosteroid action in bronchial asthma."

The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 76, 321-329

**Kampmann C., Ohnesorge B., Venner M. und Deegen E. (2001)**

"Budesonid-Aerosoltherapie und Lungenfunktion bei chronisch lungenkranken Pferden."

Pferdeheilkunde, 17, 155-160

**Karlsson S., Heikkinen M., Pettilä V., Alila S., Väisänen S., Pulkki K., Kolho E., Ruokonen E. und Group F. S. (2010)**

"Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study."

Critical Care, 14, R205

**Kato H., Ohashi T., Nakamura N., Nishimura Y., Watari T., Goitsuka R., Tsujimoto H. und Hasegawa A. (1995)**

"Molecular cloning of equine interleukin-1 $\alpha$  and - $\beta$  cDNAs."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 48, 221-231

**Kaur K., Mahajan R. und Tanwar A. (2013)**

"A novel marker procalcitonin may help stem the antibiotic overuse in emergency setting."

International Journal of Applied and Basic Medical Research, 3, 77-83

**Kleiber C., McGorum B. C., Horohov D. W., Pirie R. S., Zurbriggen A. und 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

**Klier J., Fuchs S., May A., Schillinger U., Plank C., Winter G., Gehlen H. und Coester C. (2012)**

"A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses."

Pharmaceutical Research, 29, 1650-1657

**Koblinger K., Nicol J., McDonald K., Wasko A., Logie N., Weiss M. und Léguillette R. (2011)**

"Endoscopic assessment of airway inflammation in horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 25, 1118-1126

**Koch C., Straub R., Ramseyer A., Widmer A., Robinson N. E. und 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

**Kochleus C. (2013)**

"Entwicklung eines serologischen ELISA-basierten Testsystems zur Quantifizierung equinen Procalcitonins als potentiellen Entzündungsmarker für Pferde."

München, Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Fakultät Biotechnologie und Bioinformatik, Bachelorarbeit, 1-47



**Kolls J. K. (2013)**

"CD4+ T-cell subsets and host defense in the lung."  
Immunological Reviews, 252, 156-163

**Krause K., Metz M., Makris M., Zuberbier T. und Maurer M. (2012)**

"The role of interleukin-1 in allergy-related disorders."  
Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 12, 477-484

**Kuzi S., Aroch I., Peleg K., Karnieli O., Klement E. und Dank G. (2008)**

"Canine procalcitonin messenger RNA expression."  
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20, 629-633

**Laan T. T. J. M., Bull S., Pirie R. S. und Fink-Gremmels J. (2006a)**

"The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses."  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 20, 167–174

**Laan T. T. J. M., Bull S., van Nieuwstadt R. A. und Fink-Gremmels J. (2006b)**

"The effect of aerosolized and intravenously administered clenbuterol and aerosolized fluticasone propionate on horses challenged with aspergillus fumigatus antigen."  
Veterinary Research Communications, 30, 623-635

**Lakritz J., Wilson W. D., Berry C. R., Schrenzel M. D., Carlson G. P. und Madigan J. E. (1993)**

"Bronchointerstitial pneumonia and respiratory distress in young horses: clinical, clinicopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989)."  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 7, 277-288

**Langereis J. D., Oudijk E.-J. D., Schweizer R. C., Lammers J.-W. J., Koenderman L. und Ulfman L. H. (2011)**

"Steroids induce a disequilibrium of secreted interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 $\beta$  synthesis by human neutrophils."  
European Respiratory Journal, 37, 406-415

**Lavoie-Lamoureux A., Beauchamp G., Quessy S., Martin J. G. und Lavoie J.-P. (2012a)**

"Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves."  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 146, 35-45

**Lavoie-Lamoureux A., Leclere M., Lemos K., Wagner B. und Lavoie J.-P. (2012b)**

"Markers of systemic inflammation in horses with heaves."  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 26, 1419-1426

**Lavoie J.-P., Maghni K., Desnoyers M., Taha R., Martin J. G. und Hamid Q. A. (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

**Lavoie J.-P., Cesarini C., Lavoie-Lamoureux A., Moran K., Lutz S., Picandet V., Jean D. und Marcoux M. (2011)**

"Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 25, 322-329

**Le Moullec J. M., Jullienne A., Chenais J., Lasmoles F., Guliana J. M., Milhaud G. und Moukhtar M. S. (1984)**

"The complete sequence of human procalcitonin."

FEBS Letters, 167, 93-97

**Le T. T., Karmouty-Quintana H., Melicoff E., Le T. T., Weng T., Chen N. Y., Pedroza M., Zhou Y., Davies J., Philip K., Molina J., Luo F., George A. T., Garcia-Morales L. J., Bunge R. R., Bruckner B. A., Loebe M., Seethamraju H., Agarwal S. K. und Blackburn M. R. (2014)**

"Blockade of IL-6 trans signaling attenuates pulmonary fibrosis."

The Journal of Immunology, 193, 3755-3768

**Leclere M., Lavoie-Lamoureux A. und Lavoie J.-P. (2011)**

"Heaves, an asthma-like disease of horses."

Respirology, 16, 1027-1046

**Leclere M. und Lavoie J.-P. (2014)**

"(Dis) Similarities between IAD and RAO."

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, Cabourg (France), 13-14 October 2014, 87-89

**Leclere M., Lavoie-Lamoureux A. und Lavoie J.-P. (2015)**

"Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 29, 940-945

**Lederer W., Stichberger M., Hausdorfer J., Fuchs D., Mutz N. J. und Wiedermann F. J. (2013)**

"Alveolar neopterin, procalcitonin, and IL-6 in relation to serum levels and severity of lung injury in ARDS."

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 51, e213-e215

**Léguillette R. (2003)**

"Recurrent airway obstruction - heaves."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 19, 63-86

**Liappis A. P., Gibbs K. W., Nylén E. S., Yoon B., Snider R. H., Gao B. und Becker K. L. (2011)**

"Exogenous procalcitonin evokes a pro-inflammatory cytokine response."

Inflammation Research, 60, 203-207

**Linden A., Laan M. und Anderson G. P. (2005)**

"Neutrophils, interleukin-17A and lung disease."

European Respiratory Journal, 25, 159-172

**Linscheid P., Seboek D., Schaer D. J., Zulewski H., Keller U. und Müller B. (2004)**

"Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes."

Critical Care Medicine, 32, 1715-1721

**Linssen C. F. M., Bekers O., Drent M. und Jacobs J. A. (2008)**

"C-reactive protein and procalcitonin concentrations in bronchoalveolar lavage fluid as a predictor of ventilator-associated pneumonia."

Annals of Clinical Biochemistry, 45, 293-298

**Lu X.-x., McCoy K. S., Hu W.-k., Xu J.-l., Wang H.-q., Chen P. und Chen H.-b. (2013)**

"Dexamethasone reduces IL-17 and Tim-3 expression in BALF of asthmatic mice."

Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 33, 479-484

**Lunn D. P. und Horohov D. W. (2004a)**

"The equine immune system."

Equine Internal Medicine, Reed S., Bayly W. und Sellon D. C., St. Louis, Missouri (USA), Saunders Elsevier, 0-7216-9777-1, 1-29

**Lunn D. P. und Horohov D. W. (2004b)**

"Hypersensitivity and Autoimmunity."

Equine Internal Medicine, Reed S., Bayly W. und Sellon D. C., St. Louis, Missouri (USA), Saunders Elsevier, 0-7216-9777-1, 29-36

**Marti E., Gerber H., Essich G., Oulehla J. und Lazary S. (1991)**

"The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis."

Equine Veterinary Journal, 23, 457-460

**Marti E., Gerber V., Wilson A. D., Lavoie J.-P., Horohov D., Crameri R., Lunn D. P., Antczak D., Björnsdóttir S., Björnsdóttir T. S., Cunningham F., Dérer M., Frey R., Hamza E., Horin P., Heimann M., Kolm-Stark G., Olafsdóttir G., Ramery E., Russell C., Schaffartzik A., Svansson V., Torsteinsdóttir S. und Wagner B. (2008)**

"Report of the 3<sup>rd</sup> Havemeyer Workshop on allergic diseases of the horse, Hólar, Iceland, June 2007."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 126, 351-361

**Marti E. (2009)**

"Role of IgE and perspectives on clinical allergy testing."

Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Equine Airways Symposium, Berne (Switzerland), 5-7 August 2009, IVIS website (www.ivis.org), 109-111

**Martin J. G. (2014)**

"Classification of asthma."

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, Cabourg (France), 13-14 October 2014, 11-13

**Martinez J. M., Wagner K. E., Snider R. H., Nylan E. S., Müller B., Sarani B., Becker K. L. und White J. C. (2001)**

"Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis." Surgical Infections, 2, 193-202

**Maruna P., Nedelníková K. und Gürlich R. (2000)**

"Physiology and genetics of procalcitonin."

Physiological Research, 49, 57-61

**Matwiyoff G. N., Prah J. D., Miller R. J., Carmichael J. J., Amundson D. E., Seda G. und Daheshia M. (2012)**

"Immune regulation of procalcitonin: a biomarker and mediator of infection."

Inflammation Research, 61, 401-409

**McGorum B. C., Dixon P. M., Halliwell R. E. W. und Irving P. (1993)**

"Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung."

Research in Veterinary Science, 55, 57-59

**McKinley L., Alcorn J. F., Peterson A., DuPont R. B., Kapadia S., Logar A., Henry A., Irvin C. G., Piganelli J. D., Ray A. und Kolls J. K. (2008)**

"TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice."

The Journal of Immunology, 181, 4089-4097

**Meisner M., Müller V., Khakpour Z., Toegel E. und Redl H. (2003)**

"Induction of procalcitonin and proinflammatory cytokines in an anhepatic baboon endotoxin shock model."

Shock, 19, 187-190

**Meisner M. (2010)**

"Procalcitonin-Biochemie und klinische Diagnostik."

Bremen, UNI-MED SCIENCE, 978-3-8374-1198-0, 126

**Meisner M. (2014)**

"Update on procalcitonin measurements."

Annals of Laboratory Medicine, 34, 263-273

**Mensikova M., Stepanova H. und Faldyna M. (2013)**

"Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: a review."

Cytokine, 64, 11-17

**Mitchell E. V. (2006)**

"Serum calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentrations in the horse and their relationship to the systemic inflammatory response."

Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University, Thesis (MS in Biomedical and Veterinary Sciences), 1-69

**Modrykamien A. M. und Gupta P. (2015)**

"The acute respiratory distress syndrome."

Proceedings (Baylor University Medical Center), 28, 163-171

**Mol J. A., Kwant M. M., Arnold I. C. J. und Hazewinkel H. A. W. (1991)**

"Elucidation of the sequence of canine (pro)-calcitonin. A molecular biological and protein chemical approach."

Regulatory Peptides, 35, 189-195

**Monneret G., Laroche B. und Bienvenu J. (1999)**

"Procalcitonin is not produced by circulating blood cells."

Infection, 27, 34-35

**Moran G. und Folch H. (2011)**

"Recurrent airway obstruction in horses - an allergic inflammation: a review."

Veterinarni Medicina, 56, 1-13

**Morgenthaler N. G., Struck J., Chancerelle Y., Weglöhner W., Agay D., Bohuon C., V. S.-D., Bergmann A. und Müller B. (2003)**

"Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection."

Hormone and Metabolic Research, 35, 290-295

**Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A. und Coffman R. L. (1986)**

"Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins."

Journal of Immunology, 136, 2348-2357

**Mosmann T. R. und Sad S. (1996)**

"The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more."

Immunology Today, 17, 138-146

**Müller B., Becker K. L., Kränzlin M., Schächinger H., Huber P. R., Nylen E. S., Snider R. H., White J. C., Schmidt-Gayk H., Zimmerli W. und Ritz R. (2000)**

"Disordered calcium homeostasis of sepsis: association with calcitonin precursors."

European Journal of Clinical Investigation, 30, 823-831

**Müller B., White J. C., Nylen E. S., Snider R. H., Becker K. L. und Habener J. F. (2001)**

"Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis."

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 86, 396-404

**Murtaugh M. P., Baarsch M. J., Zhou Y., Scamurra R. W. und Lin G. (1996)**

"Inflammatory cytokines in animal health and disease."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 54, 45-55

**Nagata K., Tomii K., Otsuka K., Tachikawa R., Nakagawa A., Otsuka K., Takeshita J., Tanaka K., Matsumoto T., Monden K., Kawamura T. und Tamai K. (2013)**

"Serum procalcitonin is a valuable diagnostic marker in acute exacerbation of interstitial pneumonia."

Respirology, 18, 439-446

**Naylor J. M., Clark E. G. und Clayton H. M. (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

**Nerren J. R., Payne S., Halbert N. D., Martens R. J. und Cohen N. D. (2009)**

"Cytokine expression by neutrophils of adult horses stimulated with virulent and avirulent *Rhodococcus equi* in vitro."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 127, 135-143

**Niedermeier G. und Gehlen H. (2009)**

"Möglichkeiten der Inhalationstherapie zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes."

Pferdeheilkunde, 25, 327-332

**Nijsten M. W., Olinga P., The T. H., de Vries E. G., Koops H. S., Groothuis G. M., Limburg P. C., ten Duis H. J., Moshage H., Hoekstra H. J., Bijzet J. und Zwaveling J. H. (2000)**

"Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro."

Critical Care Medicine, 28, 458-461

**Nishikura T. (1999)**

"Procalcitonin (PCT) production in a thyroidectomized patient."

Intensive Care Medicine, 25, 1031

**Niu W.-Y., Wan Y.-G., Li M.-Y., Wu Z.-X., Zhang L.-G. und Wang J.-X. (2013)**

"The diagnostic value of serum procalcitonin, IL-10 and C-reactive protein in community acquired pneumonia and tuberculosis."

European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 17, 3329-3333

**Nout Y. S., Hinchcliff K. W., Samii V. F., Kohn C. W., Jose-Cunilleras E. und Reed S. M. (2002)**

"Chronic pulmonary disease with radiographic interstitial opacity (interstitial pneumonia) in foals."

Equine Veterinary Journal, 34, 542-548

**Nuovo G. J., Hagood J. S., Magro C. M., Chin N., Kapil R., Davis L., Marsh C. B. und Folcik V. A. (2012)**

"The distribution of immunomodulatory cells in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis."

Modern Pathology, 25, 416-433

**Nylen E. S., Whang K. T., Snider R. H., Steinwald P. M., White J. C. und Becker K. L. (1998)**

"Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis."

Critical Care Medicine, 26, 1001-1006

**Nylén E. S., Snider R. H., Thompson K. A., Rohatgi P. und Becker K. L. (1996)**

"Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia."

The American Journal of the Medical Sciences, 312, 12-18

**Oberhoffer M., Stonans I., Russwurm S., Stonane E., Vogelsang H., Junker U., Jäger L. und Reinhart K. (1999)**

"Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro."

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 134, 49-55

**Ohnesorge B., Trötschel C. und Deegen E. (1998)**

"Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd."

Pferdeheilkunde, 14, 450-455

**Okimoto N., Hayashi Y., Ishiga M., Nanba F., Kishimoto M., Yagi S., Kurihara T., Asaoka N. und Tamada S. (2009)**

"Procalcitonin and severity of community-acquired pneumonia."

Journal of Infection and Chemotherapy, 15, 426-427

**Padoan E., Ferrareso S., Pegolo S., Castagnaro M., Barnini C. und Bargelloni L. (2013)**

"Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 156, 190-196

**Pereira J. M., Teixeira-Pinto A., Basílio C., Sousa-Dias C., Mergulhão P. und Paiva J. A. (2013)**

"Can we predict pneumococcal bacteremia in patients with severe community-acquired pneumonia?"

Journal of Critical Care, 28, 970-974

**Perren A., Cerutti B., Lepori M., Senn V., Capelli B., Duchini F. und Domenighetti G. (2008)**

"Influence of steroids on procalcitonin and C-reactive protein in patients with COPD and community-acquired pneumonia."

Infection, 36, 163-166

**Piacentini E., Sánchez B., Arauzo V., Calbo E., Cuchi E. und Nava J. M. (2011)**

"Procalcitonin levels are lower in intensive care unit patients with H1N1 influenza A virus pneumonia than in those with community-acquired bacterial pneumonia. A pilot study."

Journal of Critical Care, 26, 201-205

**Pickles K., Pirie R. S., Rhind S., Dixon P. M. und McGorum B. C. (2002)**

"Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: comparison of sequential and pooled aliquots."

Equine Veterinary Journal, 34, 288-291



**Pietra M., Peli A., Bonato A., Ducci A. und Cinotti S. (2007)**

"Equine bronchoalveolar lavage cytokines in the development of recurrent airway obstruction."

Veterinary Research Communications, 31, 313-316

**Pincíková T., Bucová M. und Slobodníková L. (2005)**

"Influence of recombinant human procalcitonin on phagocytic and candidacidal ability of polymorphonuclear leukocytes and on killing mechanisms of serum and blood against bacteria Staphylococcus aureus and Escherichia coli."

Vnitřní Lékarství, 51, 1365-1370

**Pirie R. S. (2014a)**

"IAD, an allergic disease? Environment and breathable air."

Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, Cabourg (France), 13-14 October 2014, 75-77

**Pirie R. S. (2014b)**

"Recurrent airway obstruction: a review."

Equine Veterinary Journal, 46, 276-288

**Pletz M. W., Ewig S., Lange C., Welte T. und Höffken G. (2012)**

"Update Pneumonie 2012."

Deutsche Medizinische Wochenschrift, 137, 2265-2284

**Polzin A., Pletz M., Erbes R., Raffenberg M., Mauch H., Wagner S., Arndt G. und Lode H. (2003)**

"Procalcitonin as a diagnostic tool in respiratory tract infections."

European Respiratory Journal, 21, 939-943

**Porfyridis I., Georgiadis G., Vogazianos P., Mitis G. und Georgiou A. (2014)**

"C-reactive protein, procalcitonin, clinical pulmonary infection score, and pneumonia severity scores in nursing home acquired pneumonia."

Respiratory Care, 59, 574-581

**Prat C., Dominguez J., Rodrigo C., Giménez M., Azuara M., Jiménez O., Gali N. und Ausina V. (2003)**

"Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection."

The Pediatric Infectious Disease Journal, 22, 963-967

**Prat C., Dominguez J., Andreo F., Blanco S., Pallarés A., Cuchillo F., Ramil C., Ruiz-Manzano J. und Ausina V. (2006)**

"Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia."

Journal of Infection, 52, 169-177

**Pusterla N., Magdesian K. G., Mapes S. und Leutenegger C. M. (2006)**

"Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis."

American Journal of Veterinary Research, 67, 1045-1049

**Ramirez P., Garcia M. A., Ferrer M., Aznar J., Valencia M., Sahuquillo J. M., Menéndez R., Asenjo M. A. und Torres A. (2008)**

"Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia."

European Respiratory Journal, 31, 356-362

**Ramseyer A., Gaillard C., Burger D., Straub R., Jost U., Boog C., Marti E. und Gerber V. (2007)**

"Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, 149-156

**Rascher D. (2014)**

"Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines optischen Immunosensors zur Bestimmung von Procalcitonin in humanem Plasma und Vollblut."

München, Technische Universität, Fakultät für Chemie, Dissertation, 1-171

**Rascher D., Geerlof A., Kremmer E., Krämer P., Schmid M., Hartmann A. und Rieger M. (2014)**

"Total internal reflection (TIRF)-based quantification of procalcitonin for sepsis diagnosis - A point-of-care testing application."

Biosensors and Bioelectronics, 59, 251-258

**Reuss S. M. und Giguère S. (2015)**

"Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 31, 105-120

**Reyner C. L., Wagner B., Young J. C. und Ainsworth D. M. (2009)**

"Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-23, -17, -8, and -1 $\beta$  and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells from horses susceptible to recurrent airway obstruction."

American Journal of Veterinary Research, 70, 1277-1283

**Richard E. A., Depecker M., Defontis M., Leleu C., Fortier G., Pitel P.-H. und Courouce-Malblanc A. (2014)**

"Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 28, 1838-1844

**Rieger M., Kochleus C., Teschner D., Rascher D., Barton A. K., Geerlof A., Kremmer E., Schmid M., Hartmann A. und Gehlen H. (2014)**

"A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses."

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 5507-5512

**Riihimäki M., Raine A., Art T., Lekeux P., Couëttil L. L. und Pringle J. (2008a)**

"Partial divergence of cytokine mRNA expression in bronchial tissues compared to bronchoalveolar lavage cells in horses with recurrent airway obstruction."

Veterinary Immunology and Immunopathology, 122, 256-264

**Riihimäki M., Raine A., Pourazar J., Sandström T., Art T., Lekeux P., Couetil L. und Pringle J. (2008b)**

"Epithelial expression of mRNA and protein for IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in endobronchial biopsies in horses with recurrent airway obstruction."

BMC Veterinary Research, 4, 8

**Rinaldi S., Adembri C., Grechi S. und De Gaudio A. R. (2006)**

"Low-dose hydrocortisone during severe sepsis: effects on microalbuminuria."

Critical Care Medicine, 34, 2334-2339

**Rincon M. und Irvin C. G. (2012)**

"Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases."

International Journal of Biological Sciences, 8, 1281-1290

**Robinson N. E. (2001)**

"International Workshop on Equine Chronic Airway Disease"

Michigan State University, 16–18 June 2000

Equine Veterinary Journal, 33, 5-19

**Robinson N. E., Berney C., Behan A. und Derksen F. J. (2009)**

"Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 23, 1247-1253

**Rüdiger J. J., Gencay M., Yang J. Q., Bihl M., Tamm M. und Roth M. (2013)**

"Fast beneficial systemic anti-inflammatory effects of inhaled budesonide and formoterol on circulating lymphocytes in asthma."

Respirology, 18, 840-847

**Rush B. R., Flaminio M. J., Matson C. J., Hakala J. E. und Shuman W. (1998a)**

"Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively."

American Journal of Veterinary Research, 59, 1033-1038

**Rush B. R., Raub E. S., Rhoads W. S., Flaminio M. J., Matson C. J., Hakala J. E. und Gillespie J. R. (1998b)**

"Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively."

American Journal of Veterinary Research, 59, 1039-1043

**Rush B. R., Raub E. S., Thomsen M. M., Davis E. G., Matson C. J. und Hakala J. E. (2000)**

"Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction."

Journal of the American Veterinary Medical Association, 217, 359-364

**Russwurm S., Stonans I., Stonane E., Wiederhold M., Luber A., Zipfel P. F., Deigner H.-P. und Reinhart K. (2001)**

"Procalcitonin and CGRP-I mRNA expression in various human tissues."

Shock, 16, 109-112

**Sarli G., Peli A., Marocco R., Zanotti L., Ducci A., Isani G., Scagliarini A., Sassi F., Benazzi C., Cinotti S. und Pietra M. (2011)**

"A comparison of IL-1 $\beta$  and IL-8 mRNA and their respective proteins in equine bronchoalveolar lavage fluid during recurrent airway obstruction."

Online Journal of Veterinary Research, 15, 215-228

**Schmidbauer S.-M., Venner M., von Samson-Himmelstjerna G., Drommer W. und Gruber A. D. (2004)**

"Compensated overexpression of procollagens  $\alpha$ 1(I) and  $\alpha$ 1(III) following perilla mint ketone-induced acute pulmonary damage in horses."

Journal of Comparative Pathology, 131, 186-198

**Schmidt-Weber C. B., Akdis M. und Akdis C. A. (2007)**

"Th17 cells in the big picture of immunology."

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 120, 247-254

**Schuetz P., Christ-Crain M., Wolbers M., Schild U., Thomann R., Falconnier C., Widmer I., Neidert S., Blum C. A., Schönenberger R., Henzen C., Bregenzer T., Hoess C., Krause M., Bucher H. C., Zimmerli W. und Müller B. (2007)**

"Procalcitonin guided antibiotic therapy and hospitalization in patients with lower respiratory tract infections: a prospective, multicenter, randomized controlled trial."

BMC Health Services Research, 7, 102

**Schuetz P., Christ-Crain M., Thomann R., Falconnier C., Wolbers M., Widmer I., Neidert S., Fricker T., Blum C., Schild U., Regez K., Schoenenberger R., Henzen C., Bregenzer T., Hoess C., Krause M., Bucher H. C., Zimmerli W. und Mueller B. (2009)**

"Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections. The ProHOSP randomized controlled trial."

The Journal of the American Medical Association, 302, 1059-1066

**Seam N., Meduri U., Wang H., Nylen E. S., Sun J., Schultz M. J., Tropea M. und Suffredini A. F. (2012)**

"Effects of methylprednisolone infusion on markers of inflammation, coagulation, and angiogenesis in early acute respiratory distress syndrome."

Critical Care Medicine, 40, 495-501

**Seligman R., Meisner M., Lisboa T. C., Hertz F. T., Filippin T. B., Fachel J. M. und Teixeira P. J. (2006)**

"Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia."

Critical Care, 10, R125

**Sexton P. M., Christopoulos G., Christopoulos A., Nylen E. S., Snider R. H. und Becker K. L. (2008)**

"Procalcitonin has bioactivity at calcitonin receptor family complexes: potential mediator implications in sepsis."

Critical Care Medicine, 36, 1637-1640

**Shabgah A. G., Fattahi E. und Shahneh F. Z. (2014)**

"Interleukin-17 in human inflammatory diseases."

Postępy Dermatologii i Alergologii (Advances in Dermatology and Allergology), 31, 256-261

**Snider R. H., Nylen E. S. und Becker K. L. (1997)**

"Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization."

Journal of Investigative Medicine, 45, 552-560

**Spears M., McSharry C., Chaudhuri R., Weir C. J., de Wet C. und Thomson N. C. (2013)**

"Smoking in asthma is associated with elevated levels of corticosteroid resistant sputum cytokines - an exploratory study."

PLOS ONE, 8, e71460

**Steinwald P. M., Whang K. T., Becker K. L., Snider R. H., Nylan E. S. und White J. C. (1999)**

"Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis."

Critical Care, 3, 11-16

**Stiletto R. J., Baacke M., Gotzen L., Lefering R. und Renz H. (2001)**

"Procalcitonin versus interleukin-6 levels in bronchoalveolar lavage fluids of trauma victims with severe lung contusion."

Critical Care Medicine, 29, 1690-1693

**Stolz D., Christ-Crain M., Bingisser R., Leuppi J., Miedinger D., Müller C., Huber P., Müller B. und Tamm M. (2007a)**

"Antibiotic treatment of exacerbations of COPD. A randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy."

Chest, 131, 9-19

**Stolz D., Christ-Crain M., Morgenthaler N. G., Leuppi J., Miedinger D., Bingisser R., Müller C., Struck J., Müller B. und Tamm M. (2007b)**

"Copeptin, C-reactive-protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD."

Chest, 131, 1058-1067

**Stolz D., Smyrniotis N., Eggimann P., Pargger H., Thakkar N., Siegemund M., Marsche S., Azzola A., Rakic J., Müller B. und Tamm M. (2009)**

"Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in ventilator-associated pneumonia: a randomised study."

European Respiratory Journal, 34, 1364-1375

**Struck J., Strebelow M., Tietz S., Alonso C., Morgenthaler N. G., van der Hoeven J. G., Pickkers P. und Bergmann A. (2009)**

"Method for the selective measurement of amino-terminal variants of procalcitonin."

Clinical Chemistry, 55, 1672-1679

**Sweeney C. R., Rossier Y., Ziemer E. L. und Lindborg S. (1992)**

"Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses."

American Journal of Veterinary Research, 53, 1376-1379

**Swiderski C. E., Sobol G., Lunn D. P. und Horohov D. W. (2000)**

"Molecular cloning, sequencing, and expression of equine interleukin-6."  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 77, 213-220

**Tang J., Long W., Yan L., Zhang Y., Xie J., Lu G. und Yang C. (2013)**

"Procalcitonin guided antibiotic therapy of acute exacerbations of asthma: a randomized controlled trial."  
BMC Infectious Diseases, 13, 596

**Tavares E. und Miñano F. J. (2010)**

"Immunoneutralization of the aminoprocaltitonin peptide of procalcitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies."  
Clinical Science, 119, 519-534

**Tavares E., Maldonado R. und Miñano F. J. (2014)**

"Immunoneutralization of endogenous aminoprocaltitonin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats "  
The American Journal of Pathology, 184, 3069-3083

**Taylor B., Sibbald W. J., Edmonds M. W., Holliday R. L. und Williams C. (1978)**

"Ionized hypocalcemia in critically ill patients with sepsis."  
Canadian Journal of Surgery, 21, 429-433

**Teschner D., Rieger M., Koopmann C. und Gehlen H. (2015)**

"Procalcitonin bei Pferden mit akuter Kolik."  
Pferdeheilkunde, 31, 317-377

**Thacker E. L. (2006)**

"Lung inflammatory responses."  
Veterinary Research, 37, 469-486

**Tilley P., Sales Luis J. P. und Branco Ferreira M. (2012)**

"Correlation and discriminant analysis between clinical, endoscopic, thoracic X-ray and bronchoalveolar lavage fluid cytology scores, for staging horses with recurrent airway obstruction (RAO)."  
Research in Veterinary Science, 93, 1006-1014

**Tompkins D., Hudgens E., Horohov D. und Baldwin C. (2010)**

"Expressed gene sequences of the equine cytokines interleukin-17 and interleukin-23."  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 133, 309-313

**Toribio R. E., Kohn C. W., Chew D. J., Sams R. A. und Rosol T. J. (2001)**

"Comparison of serum parathyroid hormone and ionized calcium and magnesium concentrations and fractional urinary clearance of calcium and phosphorus in healthy horses and horses with enterocolitis."

American Journal of Veterinary Research, 62, 938-947

**Toribio R. E., Kohn C. W., Leone G. W., Capen C. C. und Rosol T. J. (2003)**

"Molecular cloning and expression of equine calcitonin, calcitonin gene-related peptide-I, and calcitonin gene-related peptide-II."

Molecular and Cellular Endocrinology, 199, 119-128

**Toribio R. E., Kohn C. W., Hardy J. und Rosol T. J. (2005)**

"Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia."

Journal of Veterinary Internal Medicine, 19, 223-231

**Toribio R. E. (2011a)**

"Endocrine dysregulation in critically ill foals and horses."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 27, 35-47

**Toribio R. E. (2011b)**

"Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 27, 129-147

**Turk J. R., Brown C. M. und Johnson G. C. (1981)**

"Diffuse alveolar damage with fibrosing alveolitis in a horse."

Veterinary Pathology, 18, 560-562

**Vazquez-Tello A., Halwani R., Hamid Q. und Al-Muhsen S. (2013)**

"Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells."

Journal of Clinical Immunology, 33, 466-478

**Venner M., Deegen E., Stadler P. und Döpfer D. (1995)**

"Zur Optimierung der Aufnahmetechnik von Röntgenaufnahmen der Lunge beim Pferd."

Pferdeheilkunde, 11, 329-340

**Venner M. (2003)**

"Akute interstitielle Pneumopathie beim Pferd - Experimentelle Induktion mit Perilla-Keton."

Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, PhD Thesis, 1-224



- Vranković L., Aladrović J., Beer-Ljubić B., Zdelar-Tuk M. und Stojević Z. (2015)**  
"Seasonal changes in enzyme activities and mineral concentrations in Holstein stallions blood plasma."  
Veterinarski Arhiv, 85, 235-246
- Wagner B. (2006)**  
"Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse."  
Developmental and Comparative Immunology, 30, 155-164
- Wagner B., Hillegas J. M., Brinker D. M., Horohov D. W. und Antczak D. F. (2008)**  
"Characterization of monoclonal antibodies to equine interleukin-10 and detection of T regulatory 1 cells in horses."  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 122, 57-64
- Wagner B. (2009)**  
"IgE in horses: occurrence in health and disease."  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 132, 21-30
- Wagner K. E., Martinez J. M., Vath S. D., Snider R. H., Nylén E. S. und Becker K. L. (2002)**  
"Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs."  
Critical Care Medicine, 30, 2313-2321
- Walsh E. E., Swinburne A. J., Becker K. L., Nylén E. S., Snider R. H., Baran A., Peterson D. R. und Falsey A. R. (2013)**  
"Can serum procalcitonin levels help interpret indeterminate chest radiographs in patients hospitalized with acute respiratory illness?"  
Journal of Hospital Medicine, 8, 61-67
- Weglöhner W., Struck J., Fischer-Schulz C., Morgenthaler N. G., Otto A., Bohuon C. und Bergmann A. (2001)**  
"Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis."  
Peptides, 22, 2099-2103
- Wei J. X., Verity A., Garle M., Mahajan R. und Wilson V. (2008)**  
"Examination of the effect of procalcitonin on human leucocytes and the porcine isolated coronary artery."  
British Journal of Anaesthesia, 100, 612-621

**Whang K. T., Vath S. D., Becker K. L., Snider R. H., Nysten E. S., Muller B., Li Q., Tamarkin L. und White J. C. (2000)**

"Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis."

Shock, 14, 73-78

**Wiedermann F. J., Kaneider N., Egger P., Tiefenthaler W., Wiedermann C. J., Lindner K. H. und Schobersberger W. (2002)**

"Migration of human monocytes in response to procalcitonin."

Critical Care Medicine, 30, 1112-1117

**Wilkins P. A. und Lascola K. M. (2015)**

"Update on interstitial Pneumonia."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 31, 137-157

**Williamson K. K. und Davis M. S. (2007)**

"Evidence-based respiratory medicine in horses."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 23, 215-227

**Wood J. L., Newton J. R., Chanter N. und Mumford J. A. (2005)**

"Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses."

Journal of Clinical Microbiology, 43, 120-126

**Wróblewski T. und Marcisz C. (2009)**

"Procalcitonin as a biomarker of acute lower respiratory tract infections."

Expert Opinion on Medical Diagnostics, 3, 67-79

**Wu J.-Z., Ma L.-J., Zhao L.-M., Zhang X.-Y., Chen X.-L. und Kuang H.-Y. (2013)**

"Significance of fractional exhaled nitric oxide combined with serum procalcitonin and C-reactive protein in evaluation of elderly asthma."

Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 33, 185-188

**You L. und Yin J. (2000)**

"Patterns of regulation from mRNA and protein time series."

Metabolic Engineering, 2, 210-217

**Zhu J., Yamane H. und Paul W. E. (2010)**

"Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations."

Annual Review of Immunology, 28, 445-489

## 9. ANHANG

### 9.1 Patientenkollektiv

Tab. 39: Übersicht zum Patientenkollektiv dieser Studie. Fälle 1-15: Lungengesunde Kontrollgruppe, Fälle 16-36: COB in Exazerbation, Fälle 37-52: COB in Remission oder IAD, 53-64: Chronisch interstitielle Pnrumopathie, 65-68 (Sub)-Akute Pneumonie. Patienten, die einer inhalativen Budesonid-Behandlung ausgesetzt wurden, sind in grau markiert.

Fallnr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Vorstellungsgrund
1	Warmblut	Wallach	9	170	560	Lungengesund
2	Warmblut	Stute	4	172	600	Lungengesund
3	Pony	Stute	4	140	320	Lungengesund
4	Traber	Stute	8	154	420	Lungengesund
5	Warmblut	Stute	3	165	500	Lungengesund
6	Warmblut	Wallach	10	172	650	Lungengesund
7	Warmblut	Stute	8	155	450	Lungengesund
8	Pony	Stute	10	134	420	Lungengesund
9	Pony	Wallach	16	137	340	Lungengesund
10	Pony	Wallach	10	143	350	Lungengesund
11	Pony	Wallach	8	136	350	Lungengesund
12	Pony	Wallach	5	133	290	Lungengesund
13	Pony	Wallach	5	144	360	Lungengesund
14	Pony	Stute	12	140	300	Lungengesund
15	Warmblut	Wallach	10	156	470	Lungengesund
16	Haflinger	Wallach	15	138	455	Husten, Dyspnoe, NA
17	Pony	Wallach	22	142	430	Husten
18	Pony	Wallach	14	148	300	Husten
19	Warmblut	Wallach	11	155	520	Husten, NA
20	Haflinger-Mix	Wallach	20	151	500	Husten
21	Araber	Stute	22	150	450	Husten
22	Araber-Mix	Stute	19	149	400	COB bekannt
23	Warmblut	Wallach	10	161	450	Husten
24	Warmblut	Wallach	15	165	500	Dyspnoe, LI
25	AQH	Stute	14	152	480	Husten, Dyspnoe
26	Traber	Wallach	21	159	450	Dyspnoe
27	Araber	Stute	23	150	450	Husten
28	Pony	Wallach	19	139	400	Dyspnoe, NA
29	Pony	Wallach	12	148	350	Husten, Dyspnoe, LI
30	Warmblut	Stute	11	166	500	Husten
31	Warmblut	Stute	22	162	550	COB bekannt
32	Warmblut	Stute	18	163	500	COB bekannt

33	Islandpferd	Wallach	10	147	400	Husten, NA
34	Warmblut	Stute	19	165	550	Husten
35	Pony	Wallach	20	124	300	Husten, NA
36	Warmblut	Wallach	12	170	550	Husten
37	Friese	Stute	15	153	488	Husten, NA
38	Traber	Wallach	10	162	535	Husten
39	Warmblut	Wallach	12	167	600	COB bekannt
40	Warmblut	Stute	13	158	500	Husten
41	Warmblut	Wallach	17	162	590	Husten
42	Warmblut	Stute	12	170	550	Husten
43	Warmblut	Wallach	16	165	550	Husten, LI
44	Traber	Wallach	10	162	535	Husten
45	Shagya Araber	Stute	8	155	450	Husten
46	Haflinger	Wallach	12	152	450	LI
47	Pony	Wallach	7	149	450	Husten, NA, LI
48	Warmblut	Wallach	14	166	600	Husten
49	Haflinger-Mix	Wallach	21	149	450	Husten, LI
50	AQH	Wallach	12	151	500	Husten, LI
51	Warmblut	Stute	19	156	500	Husten, NA, LI
52	Warmblut	Wallach	8	166	550	Husten, Dyspnoe
53	Warmblut	Wallach	11	164	596	Husten, Dyspnoe
54	AQH	Stute	14	155	594	LI
55	Warmblut	Wallach	8	165	550	Dyspnoe, LI
56	Warmblut	Wallach	12	168	500	Husten
57	Norweger	Wallach	18	149	500	Husten
58	Pony	Stute	8	134	250	Husten, LI
59	Warmblut	Wallach	16	170	550	Husten
60	Traber	Stute	16	160	550	LI
61	Warmblut	Stute	12	170	650	Husten, LI
62	Warmblut	Stute	6	175	600	Husten, LI
63	Pony	Wallach	9	123	270	LI
64	Traber	Wallach	8	161	500	LI
65	Araber	Stute	18	150	450	Husten
66	Shagya Araber	Stute	8	155	450	Husten, NA
67	Warmblut	Stute	1	151	400	Husten
68	Warmblut	Wallach	7	168	580	Husten, NA

AQH = American Quarter Horse, NA = Nasenausfluss, LI = Leistungsinsuffizienz

## 9.2 Berechnung der LODs für die PCT-ELISAs

Tab. 40: Übersicht zu den unter den Nachweisgrenzen (LODs, *limits of detection*) der jeweiligen ELISAs (RIEGER et al., 2014) liegenden PCT-Konzentrationen. Letztere wurden anhand der aufgeführten Werte berechnet (siehe dazu Paragraph 4.3.1.2).

Fallnr.	MW NW	StAb	LOD <sub>Abs</sub> (y)	A	B	C	D	LOD <sub>Konz</sub> (x)	PCT [ng/ml]
<b>PCT in BALF</b>									
3	0,026	0,003	0,035	0,0266	1,70	524	1,66	1,6	1,5
22	0,032	0,005	0,047	0,0327	2,08	542	1,61	2,4	2,3
29	0,037	0,002	0,043	0,0367	1,70	317	1,75	0,7	0,6
31	0,035	0,004	0,047	0,0357	1,85	398	1,75	1,4	1,3
35	0,035	0,004	0,047	0,0357	1,85	398	1,75	1,4	1,3
38	0,026	0,003	0,035	0,0266	1,70	524	1,66	1,6	1,5
44	0,032	0,005	0,047	0,0327	2,08	542	1,61	2,4	2,3
49	0,035	0,004	0,047	0,0357	1,85	398	1,75	1,4	1,3
68	0,035	0,004	0,047	0,0357	1,85	398	1,75	1,4	1,3
<b>PCT in Plasma</b>									
3	0,092	0,003	0,101	0,0908	1,93	655	1,82	2	1
7	0,092	0,003	0,101	0,0908	1,93	655	1,82	2	1
8	0,092	0,003	0,101	0,0908	1,93	655	1,82	2	1
11	0,092	0,003	0,101	0,0908	1,93	655	1,82	2	1

Fallnr. = Fallnummer, MW NW = Mittelwert der Nullwerte, StAb = Standardabweichung, LOD<sub>Abs</sub> = Nachweisgrenze bezogen auf die Absorptionswerte, LOD<sub>Konz</sub> = Nachweisgrenze bezogen auf die Konzentrationswerte, A-D: Vier Parameter der sigmoidalen Logistikfunktion des ELISAs (A: Untere Asymptote, B: Steigung, C: Wendepunkt, D: Obere Asymptote), PCT [ng/ml] = definiert als „x-0,1“ (PCT in BALF) bzw. „x-1“ (PCT in Plasma)

## 9.3 Angewandte Materialien, Geräte, Pulver und Lösungen

### Materialien, Geräte und Lösungen für die klinischen Untersuchungen

Kanülen Sterican® (22G, 18 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen Injekt® (3, 20, 10 ml) Spritzen Omnifix® (100 ml, steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen BD A-Line TM (3ml)	Becton, Dickinson and Company, Plymouth, United Kingdom
Kapillarröhrchen (200 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kapillarröhrchen (75 µl)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
BAL-Katheter SurgiVet® (Silikon, 11 mm x 3 m)	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland
PBS BioWhittaker® (steril)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Plasma-Pipetten Pasteur (3 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Pipetten (100, 1.000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (200-1.000 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Röhrchen (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße neoLab® (1,5 ml)	neoLab Migge Laborbedarf - Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Objektträger Super Frost®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
May-Grünwalds-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Handrefraktometer HRM 18	Eickemeyer – Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop Olympus BX41TF	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Zell-Counter AC-8	Karl-Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
Automated Haematology Analyzer poch -100iVDiff	Sysmex Europe GmbH, Bornbach, Deutschland
Blutgassystem Cobas b 123	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Zentrifuge Haemofuge (234497)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotofix 32	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Kältezentrifuge Z326K	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehlingen, Deutschland
Röntgengerät GIERTH HF 400 ML	GIERTH X-Ray International GmbH, Riesa, Deutschland
Plattenleser DX-G	Agfa Health Care GmbH, Bonn, Deutschland
Pneumotachograph „Venti-Graph“	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Flexibles Endoskop (2,7 m x 0,9 cm)	Videomed GmbH, München, Deutschland
SaHoMa®-II Inhalationsmaske (set HM-210-1)	NEBU-TEC International med. Produkte Eike Kern GmbH, Eisenfeld, Deutschland
Lidocainhydrochlorid 2 %	Bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland

Detomidinhydrochlorid (Cepesedan®RP)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
Levomethadonhydrochlorid + Fenpipramidhydrochlorid (L-Polamivet®)	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Budesonid (Pulmicort®)	AstraZaneca GmbH, Wedel, Deutschland

### **Materialien, Geräte, Pulver und Lösungen für die Laboruntersuchungen**

Millipore-H <sub>2</sub> O /Milli-Q-Filtersystem	Merck Millipore, Eschborn, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween®-20	MERCK Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
DMSO, „Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie“ (M=78,13 g/mol)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
1-Step Ultra TMB-ELISA	Pierce/Perbio Thermo Fisher, Bonn, Deutschland
Avidin-HRP (5 mg/ml)	Vector Lab, Burlingame, USA
Equines “0-Plasma”	Klinik für Pferde, FU Berlin
BSA, Bovines-Serumalbumin (≥ 92 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland



Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antikörper CALCA 3C5, CALCA 4F6, CAD8-7H1	Institut für Molekulare Immunologie Helmholtz-Zentrum München, Deutschland
Equines rekombinantes PCT	Dr. Arie Geerlof Helmholtz-Zentrum München, Deutschland
F96 MaxiSorp Nunc Immunoplate	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
ReagiergefäÙe (1,5 ml, Low Binding)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes (5 ml, Low Binding)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Polypropylene Conical Tubes (50ml,15 ml)	FALCON®, Le Pont de Claix, Frankreich
Autosampler-Vials Braun (1,2 ml)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Reagent Reservoir (50 ml, steril Polystyrene)	Costar®, Corning, USA
Polyethylene Sealing Tape zur Plattenabdeckung	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetten 1-10 ml, 10-100 µl, 100-1.000 µl 2-20 µl, 20-200 µl, 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipetten Research Pro (20-300 µl) 8 Köpfe, 12 Köpfe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipette® XStream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 50-250 µl	GILSON®, Villiers le Bel, Frankreich
Pipettenspitzen: epTIPS Standard (2-200 µl, 50-1.000 µl, 1-10 ml) LoRetention Dualfilter (300 µl,1.000 µl) Combitips Plus (2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Magnetrührer MR 1.000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter	InoLab/Wissenschaftlich-Technische- Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Waage Sartorius 3716 MP	Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland
Waage Sartorius Analytic	Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland
Waage SI-64	Denver Instruments Company, Bohemia, USA
Vataxer MS1, MS2 Minishaker IKA®	IKA Works Inc., Wilmington, USA
ELx405 Auto Plate Washer	BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
TITRAMAX 1.000 Incubator	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
SpectraMax M5 <sup>®</sup> Microplate Reader	Molecular Devices Analytical Technologies GmbH, Ismaning, Deutschland

### **Software**

SoftMax <sup>®</sup> Pro v5.2	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
IBM SPSS Statistics 22	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

## 9.4 Untersuchungsprotokoll 1: Anamnese und Signalement

### Arbeitsgruppe Lunge Anamnese und Signalement

#### Besitzer

Name: ..... Vorname: .....

#### Überweisender Tierarzt

Name: ..... Vorname: .....

#### Behandelnder Tierarzt

Assistent: ..... Supervisor: .....

#### Pferd

Name: ..... Rasse: .....

Geschlecht: ..... Alter: .....

Gewicht: ..... Stockmaß: .....

Lebensnummer: ..... Farbe: .....

Abzeichen Kopf: .....

Abzeichen Gliedmaßen: .....

#### Vorbericht

.....  
.....  
.....

#### Voruntersuchung/Vorbehandlung

.....  
.....

## 9.5 Untersuchungsprotokoll 2: Klinische Untersuchungen - Tag 1

Datum: .....			
Tag: .....1.....			
Fallnummer: .....			
<b><u>Klinische Allgemeinuntersuchung</u></b>			
Körperhaltung	physiologisch <input type="radio"/> sonstiges:		
Verhalten	ruhig und aufmerksam <input type="radio"/> sonstiges:		
Ernährungszustand	gut <input type="radio"/> mäßig <input type="radio"/>	sehr gut <input type="radio"/> schlecht <input type="radio"/>	adipös <input type="radio"/> kachektisch <input type="radio"/>
Entwicklungszustand	dem Alter entsprechend <input type="radio"/> sonstiges:		
Pflegezustand	gut <input type="radio"/>	mäßig <input type="radio"/>	schlecht <input type="radio"/>
Pulsfrequenz	..... /min		
Atemfrequenz	..... /min		
Körperinnentemperatur	..... °C		
Körperoberflächentemperatur	zu den Akren hin abnehmend <input type="radio"/> sonstiges:		
Hautturgor	erhalten <input type="radio"/> vermindert <input type="radio"/>		
Schleimhäute	blass <input type="radio"/> zyanotisch <input type="radio"/>	blassrosa <input type="radio"/> ikterisch <input type="radio"/>	gerötet <input type="radio"/> sonstiges:
KFZ	< 2 Sek. <input type="radio"/>	2-3 Sek. <input type="radio"/>	> 3 Sek. <input type="radio"/>
Episkleralgefäße	fein gezeichnet <input type="radio"/> verwaschen <input type="radio"/>	injiziert <input type="radio"/> nicht sichtbar <input type="radio"/>	
Lnn. Mandibulares	<u>Links:</u> o. b. B. <input type="radio"/> vergrößert <input type="radio"/> (Größe ....) derb <input type="radio"/> schmerzhaft <input type="radio"/> nicht verschieblich <input type="radio"/>	<u>Rechts:</u> o. b. B. <input type="radio"/> vergrößert <input type="radio"/> (Größe ....) derb <input type="radio"/> schmerzhaft <input type="radio"/> nicht verschieblich <input type="radio"/>	

<b><u>Spezielle Untersuchung der Atemwege</u></b>		
Atemtyp	costoabdominal <input type="checkbox"/> verstärkt costal <input type="checkbox"/> Afteratmung <input type="checkbox"/>	verstärkt abdominal <input type="checkbox"/> Dampfrinne <input type="checkbox"/>
Nüstern	o.b. B. <input type="checkbox"/> Luftstrom:  Sekretrinne <input type="checkbox"/>	gebläht <input type="checkbox"/> gleichmäßig <input type="checkbox"/> rechts vermindert <input type="checkbox"/> links vermindert <input type="checkbox"/>
Nasenausfluss	o.b.B. <input type="checkbox"/> <u>Links:</u> ggr. <input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr. <input type="checkbox"/> serös <input type="checkbox"/> seromükös <input type="checkbox"/> mukopurulent <input type="checkbox"/> hämorrhagisch <input type="checkbox"/> mit Futterpartikeln <input type="checkbox"/>	beidseits <input type="checkbox"/> <u>Rechts:</u> ggr. <input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr. <input type="checkbox"/> serös <input type="checkbox"/> seromükös <input type="checkbox"/> mukopurulent <input type="checkbox"/> hämorrhagisch <input type="checkbox"/> mit Futterpartikeln <input type="checkbox"/>
Husten	spontan <input type="checkbox"/> auslösbar <input type="checkbox"/> feucht <input type="checkbox"/>	mehrfach spontan <input type="checkbox"/> mehrfach auslösbar <input type="checkbox"/> trocken <input type="checkbox"/>
Dyspnoe	in Ruhe <input type="checkbox"/> expiratorisch <input type="checkbox"/>	inspiratorisch <input type="checkbox"/> gemischt <input type="checkbox"/>
Stridor	inspiratorisch <input type="checkbox"/>	expiratorisch <input type="checkbox"/>
Auskultation Lunge	<u>Links:</u> <u>Rechts:</u>	
Auskultation Trachea		
Auskultation Larynx		
Perkussion Lungenfeld	o. b. B. <input type="checkbox"/> > 1 Handbreit erweitert <input type="checkbox"/>	gedämpft <input type="checkbox"/> > 2 Handbreit erweitert <input type="checkbox"/>
CO <sub>2</sub> -Rückatmung		
Endoskopie		
Thorax-Röntgen		
Diagnose		
Therapie		

## 9.6 Untersuchungsprotokoll 3: Klinische Untersuchungen - Tage 2 und 3

Datum: ..... Tag: ..... <b>2 - 3</b> ..... Fallnummer: .....			
<b><u>Klinische Allgemeinuntersuchung</u></b>			
Körperhaltung	physiologisch <input type="radio"/> sonstiges:		
Verhalten	ruhig u.aufmerksam <input type="radio"/> sonstiges:		
Pulsfrequenz	..... /min		
Atemfrequenz	..... /min		
Körperinnentemperatur	..... °C		
Schleimhäute	blass <input type="radio"/> zyanotisch <input type="radio"/>	blassrosa <input type="radio"/> ikterisch <input type="radio"/>	gerötet <input type="radio"/> sonstiges:
KFZ	< 2 Sek. <input type="radio"/>	2-3 Sek. <input type="radio"/>	> 3 Sek. <input type="radio"/>
Episkleralgefäße	fein gezeichnet <input type="radio"/> verwaschen <input type="radio"/>	injiziert <input type="radio"/> nicht sichtbar <input type="radio"/>	
<b><u>Spezielle Untersuchung der Atemwege</u></b>			
Atemtyp	costoabdominal <input type="radio"/> verstärkt costal <input type="radio"/> Afteratmung <input type="radio"/>	verstärkt abdominal <input type="radio"/> Dampfrinne <input type="radio"/>	
Nüstern	o. b. B. <input type="radio"/> Luftstrom:  Sekretrinne <input type="radio"/>	gebläht <input type="radio"/> gleichmäßig <input type="radio"/> rechts vermindert <input type="radio"/> links vermindert <input type="radio"/>	

Nasenausfluss	o. b. B. <input type="radio"/> <u>Links:</u> ggr. <input type="radio"/> mgr. <input type="radio"/> hgr. <input type="radio"/> serös <input type="radio"/> seromükös <input type="radio"/> mukopurulent <input type="radio"/> hämorrhagisch <input type="radio"/> mit Futterpartikeln <input type="radio"/>	beidseits <input type="radio"/> <u>Rechts:</u> ggr. <input type="radio"/> mgr. <input type="radio"/> hgr. <input type="radio"/> serös <input type="radio"/> seromükös <input type="radio"/> mukopurulent <input type="radio"/> hämorrhagisch <input type="radio"/> mit Futterpartikeln <input type="radio"/>
Husten	spontan <input type="radio"/> auslösbar <input type="radio"/> feucht <input type="radio"/>	mehrfach spontan <input type="radio"/> mehrfach auslösbar <input type="radio"/> trocken <input type="radio"/>
Dyspnoe	in Ruhe <input type="radio"/> expiratorisch <input type="radio"/>	inspiratorisch <input type="radio"/> gemischt <input type="radio"/>
Stridor	inspiratorisch <input type="radio"/>	expiratorisch <input type="radio"/>
Auskultation Lunge	<u>Links:</u> <u>Rechts:</u>	
Auskultation Trachea		
Auskultation Larynx		

## 9.7 Untersuchungsprotokoll 4: Belastungstest

Datum: ..... Tag: ..... Fallnummer: .....		
<b><u>Belastungstest</u></b>		
Zeit (Minuten)	Herzfrequenz (Schläge/min)	Atemfrequenz (Atemzüge/min)
0		
5		
10		
15		
20		
25		
30		

Laktat vor Belastung: ..... mmol/l

Laktat nach Belastung: ..... mmol/l



## 9.8 Untersuchungsprotokoll 5: TBS-Zytologie

Datum: ..... Tag: ..... Fallnummer: .....					
<b><u>TBS</u></b>					
Makrophagen					
Lymphozyten					
Neutrophile Granulozyten					
Eosinophile Granulozyten					
Mastzellen					
Sonstiges:					
Ergebnisse (%)	<b>MP</b>	<b>LY</b>	<b>NG</b>	<b>EG</b>	<b>MZ</b>

## 9.9 Untersuchungsprotokoll 6: BALF-Zytologie

Datum: ..... Tag: ..... Fallnummer: .....					
Eingegebene Spülflüssigkeit: .....(ml) Zurückgewonnene Spülflüssigkeit: .....(ml)					
<b><u>BALF</u></b>					
Makrophagen					
Lymphozyten					
Neutrophile Granulozyten					
Eosinophile Granulozyten					
Mastzellen					
Sonstiges:					
Ergebnisse (%)	<b>MP</b>	<b>LY</b>	<b>NG</b>	<b>EG</b>	<b>MZ</b>

## 10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

**Barton A., Shety T., Wirth C., Pelli A., Bondzio A., Rieger M., Einspanier R., Gehlen H.**

„Einfluss der inhalativen Glukokortikoid-Therapie auf Entzündungsmarker in der bronchoalveolären Lavage von Pferden mit chronischen Lungenerkrankungen“

Eckhard-Deegen-Symposium, 23.-24.05.2014, Baden-Baden (Deutschland)

**Barton A., Shety T., Pelli A., Bondzio A., Rieger M., Einspanier R., Gehlen H.**

“Evaluation of inflammatory markers and treatment success in inflammatory airway disease under the course of inhalation therapy and environmental dust reduction”

2<sup>nd</sup> Havemeyer Workshop on IAD, 13.-14.10.2014, Cabourg (France)

**Barton A., Pelli A., Rieger M., Gehlen H. (2016)**

“Procalcitonin under the course of budesonide inhalation therapy in recurrent airway obstruction”

Journal of Equine Veterinary Science, 45, 58-63

## 11. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Bereitstellung des Themas, die unkomplizierte sowie freundliche Betreuung und die Bereitstellung der finanziellen Mittel für diese Arbeit bedanken.

Meiner Betreuerin, Dr. Ann-Kristin Barton danke ich vielmals für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Studie. Sie war für mich immer präsent und ich konnte in dieser Zeit viel von ihr lernen.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Anton Hartmann und seinem Team, die es mir ermöglichten, die labordiagnostischen Analysen in der Abteilung „Mikroben-Pflanzen Interaktion“ des Helmholtz-Zentrums München auszuführen. Allen voran danke ich hierbei Dr. Martin Rieger für seine geduldige und enthusiastische Unterstützung. Ohne die Bereitstellung seiner ELISA-Tests und die hervorragende Einarbeitung in diese Methodik hätte ich diese Studie nicht realisieren können.

Ein großer Dank geht auch an Prof. Marcus Doherr und PD Dr. Roswitha Merle für die ausgezeichnete Einführung in die Statistik und die freundliche Beratung bei der Auswertung meiner Daten.

Bei den Kollegen der Klinik für Pferde der FU Berlin bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung und die Hilfe bei der Untersuchung der Probanden. Danke an das „Lungen-Team“: Caroline Wirth, Henrike Heinemann und Tarek Shety. Mit euch hat die Arbeit einfach viel mehr Spaß gemacht!

Vor allem möchte ich Caroline danken, die mir freundschaftlich immer beiseite stand und mit der ich auch außerhalb der Klinik viele schöne Momente in Berlin erlebt habe.

Andrea Schulz möchte ich für die schönen und abwechslungsreichen Tage in ihrer Klinik danken. Die langen Gespräche mit ihr haben mich immer wieder auf den richtigen Pfad gebracht.

Abschließend geht mein tiefster Dank an meine Familie und ganz besonders an meine Eltern. Ohne euch hätte ich auch dieses Ziel niemals erreichen können.

## **12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

Berlin, den 10.11.2016

Anna Cristina Pelli