

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

**Spezifische Zytokinbestimmung in Trachealspülproben und im Serum
COB-kranker Pferde nach inhalativer Immuntherapie mit nanopartikulär
gebundenen CpG-ODN und spezifischen Allergenen**

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

vorgelegt von
Jeanette Elisabeth Katharina Steuer
Tierärztin
aus Bad Dürkheim

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3737

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

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

Zweiter Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach

Dritter Gutachter: Herr Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, chronic obstructive pulmonary disease, cytokines, immunotherapy, nanomaterials, allergens, therapeutic irrigation (MeSH)

Tag der Promotion: 24.03.2015

Für meine lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | |
| I EINLEITUNG..... | 1 |
| II LITERATURÜBERSICHT..... | 2 |
| 1. CHRONISCH OBSTRUKTIVE BRONCHITIS DES PFERDES (COB) | 2 |
| 1.1 <i>Begriffsdefinition</i> | 2 |
| 1.2 <i>Pathogenese und klinisches Bild</i> | 2 |
| 1.3 <i>Ätiologie</i> | 4 |
| 1.3.1 Allergische Komponente..... | 4 |
| 1.3.2 Staubexposition | 4 |
| 1.3.3 Genetische Komponente | 5 |
| 1.3.4 Infektiöse Komponente | 5 |
| 1.4 <i>Diagnostik</i> | 5 |
| 1.5 <i>Therapie</i> | 6 |
| 1.5.1 <i>Haltungsmanagement</i> | 6 |
| 1.5.2 <i>Konventionelle Therapie</i> | 7 |
| 1.5.2.1 <i>Systemische Medikation</i> | 7 |
| 1.5.2.2 <i>Inhalationstherapie</i> | 8 |
| 2. IMMUNOLOGIE DER COB..... | 8 |
| 2.1 <i>Th1/Th2-Balance</i> | 10 |
| 2.2 <i>Allergietypen und COB</i> | 10 |
| 2.3 <i>Allergiediagnostik mit dem funktionellen in-vitro Test (FIT)</i> | 13 |
| 3. CYTOSIN-PHOSPHAT-GUANIN-OLIGODEOXYNUKLEOTIDE (CpG-ODN)..... | 13 |
| 3.1 <i>Zusammensetzung und Wirkung</i> | 13 |
| 3.2 <i>Einsatz der CpG-ODN</i> | 15 |
| 3.2.1 <i>Spezifische Immuntherapie in Kombination mit CpG-ODN</i> | 15 |
| 3.2.2 <i>CpG-ODN als Adjuvants bei Impfungen</i> | 16 |
| 3.2.3 <i>Inhalation der CpG-ODN mit Hilfe von Gelatinenpartikeln</i> | 17 |
| III MATERIAL UND METHODEN..... | 19 |
| 1. ZIELSETZUNG UND VERSUCHSDESIGN..... | 19 |
| 2. PATIENTENGUT..... | 19 |
| 3. SIGNALEMENT UND ANAMNESE..... | 20 |
| 4. ALLGEMEINUNTERSUCHUNG..... | 21 |
| 5. SPEZIELLE UNTERSUCHUNG..... | 21 |
| 5.1 <i>Trachealspülprobe und TBS-Gewinnung</i> | 21 |
| 5.2 <i>Serumgewinnung zur Bestimmung der Zytokine</i> | 22 |
| 6. BESTIMMUNG DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IM TBS..... | 22 |
| 7. FUNKTIONELLER IN-VITRO TEST..... | 22 |
| 7.1 <i>Aufbereitung der Allergene zur Inhalation</i> | 23 |
| 8. AUFBEREITUNG DER CpG-ODN MIT GNP..... | 24 |
| 9. INHALATIONSProtokoll | 25 |
| 10. SANDWICH-ELISA (ENZYM-LINKED IMMUNOSORBEND ASSAY)..... | 27 |
| 10.1 <i>ELISA-Protokoll für IL-4, IFN-γ und IL-10</i> | 27 |
| 10.2 <i>ELISA-Protokoll für IL-17</i> | 30 |
| 11. STATISTISCHE ANALYSEN..... | 31 |
| IV ERGEBNISSE..... | 33 |
| 1. ERGEBNISSE DER ANAMNESE UND ALLGEMEINUNTERSUCHUNG | 33 |
| 2. ERGEBNISSE DER SPEZIELLEN UNTERSUCHUNGEN | 33 |
| 2.1 <i>Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS</i> | 33 |
| 3. ERGEBNISSE DES FUNKTIONELLEN IN-VITRO TESTS | 33 |
| 4. ELISA-ERGEBNISSE..... | 36 |
| 4.1 <i>Zytokinstatus vor Inhalation</i> | 36 |
| 4.2 <i>IL-4-Freisetzung nach der Inhalation</i> | 38 |
| 4.3 <i>IL-10-Freisetzung nach der Inhalation</i> | 40 |
| 4.4 <i>IFN-γ-Freisetzung nach der Inhalation</i> | 40 |

| | | |
|-------------|--|---|
| 4.5 | <i>IL-17-Freisetzung nach der Inhalation</i> | 41 |
| 4.6 | <i>Vergleich der beiden Inhalationsgruppen CpG mit und ohne Allergen</i> | 42 |
| V | DISKUSSION | 43 |
| 1. | ZIELSETZUNG | 43 |
| 2. | AUSGEWÄHLTES PATIENTENGUT | 43 |
| 3. | AUFBEREITUNG DER CpG-ODN UND DER ALLERGENE | 44 |
| 4. | DURCHFÜHRUNG DER STUDIE | 44 |
| 5. | ERGEBNISSE DES FIT UND SPEZIFISCH AUSGEWÄHLTE ALLERGENE | 45 |
| 6. | AUSWAHL DER ZYTOKINE | 46 |
| 7. | KONZENTRATIONSENTWICKLUNG DES IL-4 | 46 |
| 8. | KONZENTRATIONSENTWICKLUNG DES IL-10 | 48 |
| 9. | KONZENTRATIONSENTWICKLUNG DES IFN- γ | 49 |
| 10. | KONZENTRATIONSENTWICKLUNG DES IL-17 | 50 |
| 11. | THERAPIEERFOLG DER CpG-ODN THERAPIE IN KOMBINATION MIT ALLERGENEN..... | 50 |
| 12. | SCHLUSSFOLGERUNG DER ERGEBNISSE | 51 |
| VI | ZUSAMMENFASSUNG | 53 |
| VII | SUMMARY | 55 |
| VIII | LITERATURVERZEICHNIS | 57 |
| IX | ANHANG | 67 |
| 1. | ANAMNESEBOGEN | 67 |
| 2. | FIT ERGEBNIS..... | 68 |
| 3. | LUNGSCORINGSYSTEM..... | 69 |
| 4. | VERWENDETE REAGENZIEN, GERÄTE UND SPEZIELLE VERBRAUCHSMATERIALIEN | 72 |
| 4.1 | <i>Verwendete Reagenzien</i> | 72 |
| 4.2 | <i>Verwendete Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien</i> | 73 |
| 5. | DANKSAGUNG | FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. |
| 6. | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG..... | 75 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------|---|
| A | Adenin |
| AaDO₂ | Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| ASIT | Allergenspezifische Immuntherapie |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| C | Cytosin |
| C3a, C5a | Komplementfaktoren |
| CD | Cluster of differentiation |
| COB | Chronisch obstruktive Bronchitis |
| COPD | Chronic obstructive pulmonary disease |
| COX | Cyclooxygenase |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanosin |
| CpG-ODN/GNP | Gelatinen nanopartikel-gebundene Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide |
| CpG-ODN | Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide |
| DC | Dendritische Zellen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDC | 1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| et al. | und andere (et alii) |
| Fc-Rezeptor | Crystallisable fragment -Rezeptor |
| FIT | Funktioneller in-vitro Test |
| g | Beschleunigung |
| G | Guanin |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GNP | Gelatinen nanopartikel |
| GpA | Guanin-Phosphat-Adenin |
| HPW | Highly purified water |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IAD | Inflammatory airway disease |
| Ig | Immunglobulin |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |

| | |
|------------------------------------|---|
| i. v. | Intravenous |
| KG | Körpergewicht |
| KP | Kaliumphosphat |
| LT | Leukotrien |
| LPS | Lipopolysacharid |
| M | Molar |
| MBP | Myelin-Basic Protein |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MIP | Macrophage inflammatory protein |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| n | Anzahl (n-fach) |
| NaP | Natriumphosphat |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| ODN | Oligodeoxynukleotide |
| p | Signifikanzniveau |
| P1, P2 | Purinbase 1, Purinbase 2 |
| PAF | Plättchen aktivierender Faktor |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PBMC | Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (Peripheral blood mononuclear cells) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| P_aCO₂ | Kohlendioxidpartialdruck |
| PD | Phosphodiester |
| PS | Phosphothioester |
| P_aO₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| Poly-G | Poly-Guanosin |
| PY1, PY2 | Pyrimidinbase 1, Pyrimidinbase 2 |
| RAO | Recurrent airway obstruction |
| RD | Reagent diluent |
| RIT | Rush-Immunotherapie |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| S.D. | Standardabweichung |
| sec | Sekunde |
| SIT | Spezifische Immuntherapie |
| S-ODN | Suppressive Oligodeoxynukleotide |
| SP-RAO | Summer pasture-recurrent airway obstruction |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--------------------------|
| TBS | Tracheobronchialsekret |
| Th | T-Helfer-Zelle |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TpC | Thymin-Phosphat-Cytosin |
| TpG | Thymin-Phosphat-Guanosin |
| TpT | Thymin-Phosphat-Thymin |
| Treg | T-regulatorische Zelle |
| VLP | Virus-like particles |

I Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung eines neuen Therapieansatzes zur Behandlung der „chronisch obstruktiven Bronchitis“ (COB) des Pferdes. Die COB, bzw. „recurrent airway obstruction“ (RAO) des Pferdes hat in unseren Breitengraden Europas in den letzten Jahren vor allem durch die überwiegende Stallhaltung der Pferde stark zugenommen. Insbesondere das Haltingsmanagement, genetische Faktoren und die Nutzung des Pferdes spielen bei der Entwicklung der Erkrankung eine große Rolle. Die allergische Komponente in Hinblick auf die Verbreitung von Allergenen in der Umwelt nimmt einen großen Stellenwert bei der Ausprägung des Schweregrads der COB ein, da die Pferde durch ihr Haltingsmanagement oft sehr vielen Allergenen ausgesetzt sind. Deshalb ist ein Therapieansatz zur Behandlung der Erkrankung neben den schon standardmäßig angewendeten Medikamenten, welche vor allem aus Sekretolytika, Mukolytika, Bronchodilatoren und Kortikosteroiden bestehen, eine Stimulation des unspezifischen und spezifischen Immunsystems. Da gerade die bisher angewendeten symptomatischen Therapien nur vorübergehend eine Linderung der Symptome hervorrufen und teilweise auch bei wiederholter Anwendung ein Gewöhnungseffekt eintritt, wird verstärkt nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht. Ein bereits in der Humanmedizin und in früheren Studien an COB-erkrankten Pferden getestete Therapie stellt die CpG-ODN-Inhalation dar. Es handelt sich hierbei um Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide, eine DNA-Sequenz, die vermehrt in Bakterien und Viren vorkommt und das Immunsystem stimuliert. Bereits in früheren Studien konnte eine gute Wirkung durch die alleinige Inhalation mit GNP-CpG-ODN erzielt werden.

In dieser Studie soll als Hauptaspekt getestet werden, ob eine Inhalationstherapie mit an Gelatinenanoartikel (GNP) gebundenen Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) kombiniert mit spezifisch ausgewählten Allergenen im Vergleich zu einer alleinigen CpG-ODN-Inhalation einen stärkeren Therapieerfolg und eine lang anhaltende Linderung der Symptome bei an COB-erkrankten Pferden bewirken kann. Die kombinierte Allergeninhalation soll im Sinne einer lokalen Hyposensibilisierung angewendet werden. Dafür werden die Pferde zuvor mit Hilfe eines funktionellen in-vitro Tests (FIT) in Hinblick auf die für die klinische Ausprägung der COB-relevanten Allergenen hin untersucht, um die entsprechenden Allergene für die Inhalationstherapie auszuwählen.

Die Erfolge der Inhalationstherapie sollen anhand spezifisch gemessener Zytokine (IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-17), welche bei der Entwicklung von spezifischen Krankheitssymptomen bei der COB des Pferdes eine große Rolle spielen, in Trachealspülproben und im Serum überprüft werden. Es wird deshalb untersucht, ob es während bzw. nach der jeweiligen Therapie (alleinige CpG-ODN-Inhalation und kombinierten Inhalation von CpG-ODN zusammen mit den spezifischen Allergenen) zu messbaren Konzentrationsveränderungen der Zytokine kommt und ob bei der Expression ein Th2/Th1-Shift beobachtet werden kann. Dieser Shift würde v.a. für einen positiven Effekt der Therapie im Hinblick auf die Linderung der Symptome der COB sprechen. Auch werden die jeweiligen Zytokinkonzentrationen bei allen inhalierenden Pferden zusammengefasst und zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten miteinander verglichen, um den generellen Therapieerfolg der CpG-ODN-Inhalation zu bestätigen. Insbesondere gilt hier auch das Augenmerk darauf, ob eine längere Inhalationstherapie im Vergleich zu der bisherigen Studie von KLIER 2011 einen deutlicheren Therapieerfolg zeigt und auch ob es überhaupt einen Langzeiteffekt der Inhalation gibt.

II Literaturübersicht

1. Chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes (COB)

1.1 Begriffsdefinition

Die chronisch obstruktive Bronchitis/Bronchiolitis (COB) des Pferdes wird im englischen Sprachgebrauch auch als „recurrent airway obstruction (RAO) oder „heaves“ (Dämpfigkeit) bezeichnet. Man sollte die Begriffe COB des Pferdes und COPD (chronic obstructive pulmonary disease) des Menschen klar unterscheiden, da es sich v.a. ätiologisch um unterschiedliche Krankheitsbilder handelt, die nur vereinzelt Gemeinsamkeiten in der Symptomatik zeigen (COUETIL et al., 2007). Beide Krankheiten sind chronisch, gehen mit einer Obstruktion der Atemwege einher und es treten vermehrt neutrophile Granulozyten im sezernierten Schleim auf (ROBINSON, 2000). Eine spezielle Form der COB des Pferdes, die SP-RAO (summer pasture recurrent airway obstruction) ist klinisch kaum von der klassischen COB zu unterscheiden, außer dass die Symptome hier im Zusammenhang mit Weidegang in den Sommermonaten auftreten (COUETIL et al., 2007), da die Pferde vermehrt auf Allergene reagieren, welche nur in diesen Monaten auftreten (BEADLE et al., 2002).

Die COB des Pferdes ähnelt in vielerlei Hinsicht dem humanen Asthma. Die Gemeinsamkeiten bestehen in der Hyperreagibilität und der reversiblen Einengung der Atemwege. Das Auftreten der klinischen Symptome steht im Zusammenhang mit dem Haltungsmanagement insbesondere mit einer Allergenexposition. Auch die vermehrte Sekretion von T-Helferzellen-2-Zytokinen (Th-2) wie IL-4, IL-5 und IL-13 sind typische Erscheinungen bei allergisch bedingten Entzündungen wie sie beim Asthma Bronchiale und der COB des Pferdes auftreten (MARTIN, 2001).

Eine weitere Atemwegserkrankung des Pferdes, die IAD (inflammatory airway disease) muss per definitionem klar von der COB abgegrenzt werden. Diese weist zwar auch einige klinische, funktionelle und zytologische Gemeinsamkeiten mit der COB auf, der klare Unterschied ist jedoch, dass hier keine erhöhte Ruheatemungsfrequenz und starke Leistungseinschränkungen auftreten (COUETIL et al., 2007). Außerdem ist bei der IAD die Anzahl der Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten in der BAL (Bronchoalveolären Lavage) erhöht und die Anteil der neutrophilen Granulozyten übersteigt meist nicht 20 % (COUETIL et al., 2007).

1.2 Pathogenese und klinisches Bild

Laut SLOCOMBE (2000) ist der Zusammenhang zwischen den auslösenden Faktoren der COB, den strukturellen Veränderungen, der Atemwegshyperreagibilität (s.u.) und der Entzündung der Atemwege weiterhin unvollständig geklärt.

Die typischen Symptome der COB sind die Obstruktion der Atemwege bedingt durch eine Bronchokonstriktion bis hin zum cholinergen Bronchospasmus, vermehrte Schleimsekretion (Hypersekretion), Dyskrie und entzündlich bedingte Veränderungen in der Wand des Atmungstraktes (ROBINSON et al., 1996). Physiologischerweise reagieren die luftführenden Wege mit Bronchokonstriktion um zu verhindern, dass potenziell pathogene Partikel in die tieferen Atemwege gelangen. Bei der COB ist diese Abwehrfunktion jedoch extrem verstärkt und der Körper reagiert mit einer übermäßigen Kontraktion auf jegliche unspezifische Reize. Dies wird bronchiale Hyperreagibilität genannt (DERKSON et al., 1985; FEY, 2006). Bei der Dyskrie handelt es sich um eine veränderte Zusammensetzung des Bronchialsekretes. Im physiologischen Zustand besteht dieses aus einer unteren serösen und einer oberflächlichen mukösen Schicht. Die Flimmerhärchen

transportieren unerwünschte Partikel, durch diese Schichtung begünstigt, wieder nach oral. Bei der COB wird durch die Becherzellen vermehrt der muköse Anteil des Bronchialsekrets produziert und somit kann der physiologische Transport nicht mehr richtig stattfinden. Als Folge der Dyskrinie ist somit die mukoziliäre Clearance gestört (FEY, 2006). Des Weiteren kann die Obstruktion der Atemwege durch ein submuköses und interzelluläres Ödem verstärkt werden (KAUP et al., 1990). Abbildung 1 zeigt das Schema der bronchialen Obstruktion.

Ein weiterer typischer Befund ist das Einwandern von neutrophilen Granulozyten in den Atemtrakt mehrere Stunden nach Allergenexposition (ROBINSON, 2001).

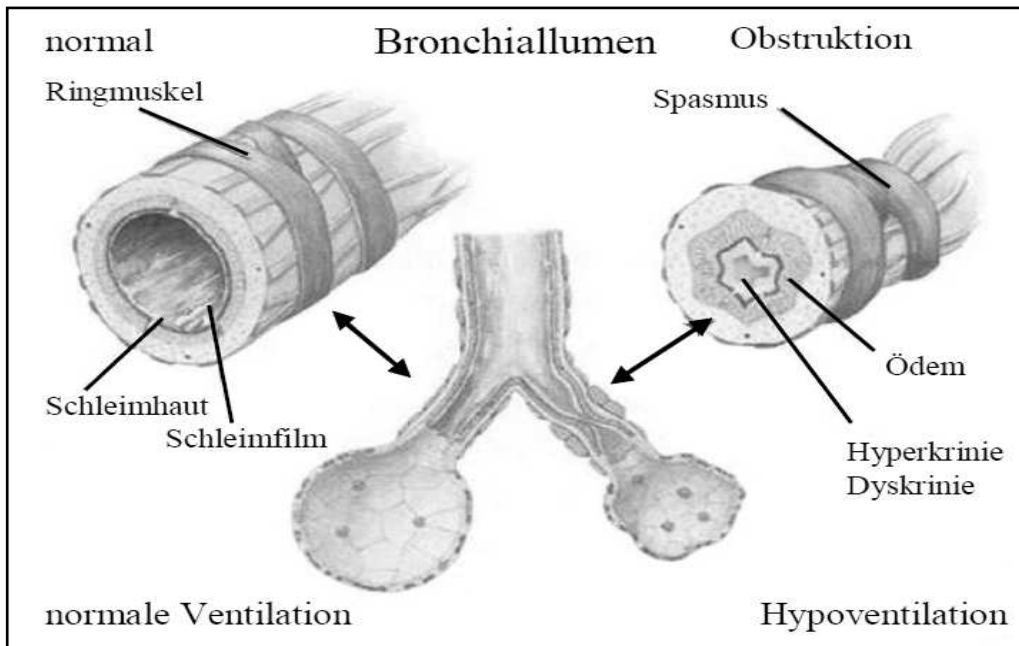


Abb. 1: Schemazeichnung der pathognomonischen bronchialen Obstruktion im Rahmen der COB (FENNER und OTTO, 2002). Mit freundlicher Genehmigung der Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH.

Als erstes klinisches Anzeichen fällt dem Besitzer meist ein milder, über einen längeren Zeitraum andauernder Husten auf, der auch saisonal oder je nach Haltungsmanagement immer wieder in Episoden auftritt (ROBINSON, 2001). Des Weiteren zeigen die betroffenen Pferde fortschreitende Leistungsintoleranz, eine erhöhte Ruheatemfrequenz bis hin zur Dyspnoe und serösen bis seromukösen Nasenausfluss. Die Ausprägung der Symptome kann sich besonders nach starker Staubexposition innerhalb weniger Stunden hochgradig verstärken (FEY, 2006). Im weiteren hochgradigeren Verlauf kommt es durch die Dyspnoe zum Nüsternblähen, Afteratmung und verstärkt sichtbarer Bauchmuskelaktivität beim Ausatmen (Bauchpresse), welche dann auch biphasisch stattfindet (ROBINSON, 2001). Der Muskelus rectus abdominis hypertrophiert und setzt sich bei der Expiration verstärkt von seinem sehnigen Anteil ab. Dies wird auch als Dampf rinne bezeichnet (FEY, 2006). Durch die starke Atemnot fressen die Pferde weniger und beginnen abzumagern (ROBINSON, 2001). Gelangt die Luft durch die Bronchialobstruktion bei der Inspiration noch in die Alveolen, kann bei der Expiration die Luft nicht mehr vollständig ausgeatmet werden, da die Alveolen durch die Obstruktion teilweise komplett verschlossen werden. Ein Teil bleibt somit in den Alveolen zurück und bläht diese auf. Dieses Phänomen wird „air trapping“ genannt. Ist irgendwann die Elastizität der Lunge überbeansprucht, zerreißen die elastischen Fasern der Lunge und es kommt zum irreversiblen Lungenemphysem (FEY, 2006).

1.3 Ätiologie

Bei der COB handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen (GERBER et al., 2008), deshalb kann die Pathogenese der Erkrankung nicht auf eine bestimmte Ursache alleine zurückgeführt werden. Sie tritt meist erst bei mittelalten Pferden auf und ist auf der Nordhalbkugel stark verbreitet, wo die Pferde oft lebenslang überwiegend in geschlossenen Ställen mit Kontakt zu staubigem Stroh gehalten und mit Heu gefüttert werden (ROBINSON, 2001). Dabei ist die Qualität des Heus meist nicht optimal und staubt somit stärker bzw. kann auch verschiedene Schimmelpilzsporen enthalten.

1.3.1 Allergische Komponente

In mehreren Studien wurden schon verschiedene Antigene von Schimmelpilzen und Milben an gesunden und an COB-erkrankten Pferden getestet, welche auch in der Humanmedizin für das Auslösen von Asthma oder der „farmer’s lung disease“ mitverantwortlich sind. Da man bei Pferden mit COB z.T. einen vermehrten Anstieg des IgE-Levels in der BAL finden kann, wird vermutet, dass COB durch eine allergische Reaktion ausgelöst werden kann (ROBINSON, 2001). Dieser Anstieg konnte bei erkrankten Pferden auch nach Exposition mit *Aspergillus fumigatus* (SCHMALLENBACH et al., 1998) und *A. fumigatus* in Kombination mit *A. alternata* (KÜNZLE et al., 2007) festgestellt werden. Die Inhalation von *Micropolyspora faeni* bei COB-anfälligen Pferden hat eine verminderte Lungenfunktion zur Folge (DERKSEN et al., 1988) und auch die Exposition mit *A. fumigatus* Antigenen löst die typischen COB-Symptome bei erkrankten Tieren aus (MCGORUM et al., 1993), wobei die Ausprägung der Symptome auch von der inhalierten Dosis abhängig ist (PIRIE et al., 2003, SIMONEN-JOKINEN et al., 2005). BEELER-MARFISI et al. (2010) testeten ebenfalls verschiedene Pilzsporen per Inhalation und konnten einen Anstieg des pleuralen Drucks der Lunge zeigen. Auch wurde bisher herausgefunden, dass an COB-erkrankte Pferde auf intradermal injizierte Antigene von *M. faeni* und auch von *A. fumigatus* doppelt so sensibel reagieren wie gesunde Probanden (MC PHERSON und THOMSON, 1983). Eine weitere Rolle als auslösende Allergene spielen die Hausstaubmilben, *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*, welche im funktionellen In Vitro-Test (FIT) bei COB-kranken Pferden sehr häufig eine Reaktion aufweisen (BRUENNLEIN, 2001).

1.3.2 Staubexposition

Es ist charakteristisch für die COB, dass es bei den betroffenen Pferden nach Staubexposition mit Heu und Stroh meist in einer Späten-Phase-Reaktion der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ-I zu einer Entzündung der tieferen Atemwege kommt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nach ca. fünf Stunden die Histaminkonzentration in der BAL signifikant ansteigt, nicht jedoch bereits nach 30min. Ebenso dauert es einige Stunden oder auch Tage bis die klinischen Symptome der COB sichtbar werden (DEATON et al., 2006). Heustaub löst bei gesunden Pferden im Gegensatz zu COB-kranken Pferden keine typischen Reaktionen wie Schleimhypersekretion, Obstruktion der Atemwege und keinen so deutlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten aus. Der Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BAL ist dosisabhängig findet jedoch auch bei gesunden Pferden im geringen Maße statt (PIRIE et al., 2002). Die Reaktionen der Pferde auf den Heustaub sind von den einzelnen Bestandteilen im Staubgemisch abhängig. Extrahiert man die Endotoxine aus dem Staub, fällt die Reaktion weniger stark aus. Lässt man jedoch die Endotoxine als alleinige Lösung inhalieren, ist die Ausprägung der Symptome ebenso geringer als in Kombination. Somit kommt den Endotoxinen als Bestandteile im Heustaub eine bedeutende Rolle zu (PIRIE et al., 2003).

1.3.3 Genetische Komponente

„Mehrere Studien haben gezeigt, dass die RAO familiär gehäuft auftritt, und es ist nun gesichert, dass die Krankheit auch durch genetische Faktoren beeinflusst wird. Das Risiko, RAO zu entwickeln, ist bei Nachkommen eines betroffenen Elterntiers 3-fach erhöht und steigt bei Pferden mit zwei betroffenen Elternteilen weiter auf fast das 5-fache an“ (GERBER et al., 2008). MARTI et al. 1991 konnten zeigen, dass die Nachkommen von bestimmten Hengstfamilien mit COB zu 39 % an der Krankheit erkrankten und im Gegensatz dazu gesunde Hengste nur zu 12 % Nachkommen erzeugen, die COB entwickeln. Die klinische Manifestation von chronisch obstruktiver Bronchitis ist somit ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren und des Haltungsmanagements (MARTI, 2001).

1.3.4 Infektiöse Komponente

Derzeit gibt es keinerlei Hinweise darauf, dass die COB aufgrund eines infektiösen Prozesses entsteht. Man findet lediglich aufgrund der gestörten mukoziliären Clearance vereinzelt Bakterien in der BAL, da diese nicht mehr vollständig zusammen mit dem Schleim abtransportiert werden können. Es gibt jedoch die Vermutung, dass vorrangegangene bakterielle Infektionen der Atemwege oder eine Infektion mit Equinen Influenza Viren prädisponierend für die COB sein können (LAVOIE, 2007).

1.4 Diagnostik

Die COB wird durch Ausschlussdiagnostik festgestellt, deshalb sind eine sorgfältige Anamnese, Allgemeinuntersuchung und spezielle Untersuchung sehr wichtig (FEY, 2006). Bei der Anamnese des Patienten ist besonders nach der Haltung, Fütterung, Alter, Nutzung des Pferdes, Auftreten von Husten, Atmungsproblemen, Leistungsrückgang, Nasenausfluss und möglicher familiärer Prädisposition zu fragen. Man achtet auf das Auftreten der typischen klinischen Symptome der COB wie Husten, geblähte Nüstern in Ruhephase, verstärkte Bauchpresse bei der Expiration, Leistungsintoleranz, eine erhöhte Ruheatemfrequenz bis hin zur Dyspnoe und z.T. serösen - seromukösen Nasenausfluss. Falls vermutet wird, dass der Patient zuvor bereits eine infektiöse Erkrankung durchgemacht hat, sollten die Symptome der COB mindestens schon drei Monate auftreten (FEY, 2006). Differentialdiagnostisch kommen eine Lungenfibrose oder eine Neoplasie in der Lunge in Frage (ROBINSON, 2001).

In der Zytologie des Tracheobronchialsekrets (TBS) oder der Bronchoalveolären Lavage (BAL), welche man durch eine Tracheobronchoskopie gewinnt, findet man vermehrt neutrophile Granulozyten. Der Anteil liegt meist bei 60 % oder mehr (DERKSEN et al., 1985). Bei gesunden Pferden findet man in der BAL überwiegend Lymphozyten und Makrophagen und weniger als 10 % neutrophile Granulozyten (ROBINSON, 2001). Außerdem kann man bei der Endoskopie die Quantität und die Qualität des Sekretes und die gesamte Trachea bis hin zur Bifurcatio tracheae beurteilen.

Die Atemfrequenz bei erkrankten Pferden liegt meist bei mehr als 16 Atemzügen pro Minute und man kann meist eine verstärkt abdominale Atmung beobachten. Bei der Lungenauskultation hört man verstärkt inspiratorische oder auch zusätzlich expiratorische Atemgeräusche (FEY, 2006). Bei hochgradiger Sekretanstauung in der Trachea oder den Bronchien kann man manchmal auch ein Giemen hören, welches auch bei einem Bronchospasmus auftritt. Außerdem sollte noch eine Lungenperkussion durchgeführt werden, um die Größe des Lungenfeldes zu bestimmen. Das Lungenfeld kann durch die Luftanstauung in den Alveolen kaudal und kaudoventral vergrößert sein, man kann jedoch durch die Perkussion nicht

unterscheiden, ob die Alveolen nur gebläht sind („air trapping“) oder schon ein irreversibles Lungenemphysem vorliegt (FEY, 2006).

Als weiteres diagnostisches Mittel wird arterielles Blut zur Blutgasuntersuchung entnommen. Jedoch sind die Werte bei ca. 25 % der COB-erkrankten Pferde im Normalbereich (FEY, 2006). Liegen die Werte des P_{aO_2} (Sauerstoffpartialdruck) unter 95mmHg liegt eine Partialinsuffizienz vor, sind zusätzlich die P_{aCO_2} (Kohlendioxidpartialdruck) Werte $>45\text{mmHg}$, spricht man von einer Globalinsuffizienz (GRABNER, 2005b). Zur Verlaufskontrolle dient die Blutgasanalyse als ein gutes diagnostisches Kontrollmittel (FEY, 2006). Mit Hilfe des aktuellen Barometerdrucks zum Entnahmezeitpunkt, kann auch die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz ($AaDO_2$) errechnet werden. Diese ist bei COB erkrankten Pferden erhöht und dient als ein zusätzlicher Anhaltspunkt zum Schweregrad der Erkrankung (GEHLEN und MAY, 2011). Folgende Formel wird zum Errechnen benutzt:

$$AaDO_2 = P_{AO_2} - P_aO_2$$

$$P_{AO_2} = (\text{aktueller Barometerdruck in Torr} - 47 \times \text{Torr}) \times 0,2095 - P_aCO_2$$

Eine $AaDO_2$ von über 25mmHg tritt bei hochgradig an COB-erkrankten Pferden auf (GRABNER, 2005).

Ein Differentialblutbild und eine blutchemische Untersuchung zeigen bei der COB keinerlei pathologische Veränderungen (FEY, 2006). Zusätzlich kann noch der maximale intrathorakale Druck gemessen werden. Dies stellt zusammen mit der arteriellen Blutgasuntersuchung zu Beginn der Erkrankung ein gutes Diagnostikum dar (MCPHERSON und THOMSON, 1983). Eine Möglichkeit zur Messung bietet die indirekte interpleurale Druckmessung mittels einer Ösophagussonde, da der im thorakalen Teil des Ösophagus vorherrschende Druck nur geringgradig vom interpleuralen Druck während der In- und Expiration abweicht (DEEGEN und KLEIN, 1987). Bei der In- und Expiration kommt es physiologischerweise zu geringen alveolären Druckschwankungen, welche durch die interpleuralen Druckschwankungen hervorgerufen werden. Dies ist für das Ein- und Ausströmen der Luft notwendig. Bei der COB sind durch den verstärkten Widerstand beim Ausatmen die interpleuralen Druckschwankungen jedoch sehr hoch und können diagnostisch zum Einschätzen des Schweregrades genutzt werden. (DEEGEN und KLEIN, 1987)

Zusätzlich kann noch eine röntgenologische Untersuchung der Lunge zur Beurteilung der Bronchienwandverdickung und interstitiellen Verschattung durchgeführt werden (GEHLEN et al., 2009).

1.5 Therapie

1.5.1 Haltungsmanagement

Die Verbesserung der Haltungsbedingungen ist beim Management der COB neben der Therapie mit Glukokortikoiden und Bronchodilatoren das wichtigste Element. (ROBINSON, 2001). Vor allem muss die Staubbelastung herabgesetzt werden, welche insbesondere durch Strohaufstallung und Heufütterung hervorgerufen wird (KRAFT, 1987; WOODS et al., 1993; MCGORUM et al., 1998). Die Pferde sollten optimalerweise ganztägig auf der Weide gehalten und ausreichend in staubarmer Umgebung bewegt werden (ROBINSON, 2001). Die Bewegung hat auch den positiven Effekt der Sekretolyse und Verbesserung der mukoziliären Clearance (FEY, 2006). Ebenso ist neben dem Weidegang eine Fütterung mit Silage oder Heupellets eine gute Lösung (ROBINSON, 2001), denn Heu produziert nachweislich den meisten Staub (ROBINSON, 2001). Wenn weiterhin Heu gefüttert wird, kann man dies in Wasser einweichen, um die Staubbelastung herabzusetzen (DIXON et al., 1995).

1.5.2 Konventionelle Therapie

Durch eine medikamentöse Therapie kann man die Symptome der COB, wie den Bronchospasmus, Dyskrinie, Hyperreagibilität und eine Schleimhautschwellung bekämpfen (FEY, 2006). Es gibt sowohl die Möglichkeit der systemischen Gabe der Medikamente als auch einer Inhalationstherapie. Die Inhalationstherapie hat den Vorteil, dass weniger systemische Nebenwirkungen auftreten und die Dosis des Medikaments verringert werden kann (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

1.5.2.1 Systemische Medikation

Zur Bronchospasmolyse gibt es drei Wirkstoffklassen, die eingesetzt werden können: Sympathomimetika, Parasympatholytika und Phosphodiesterasehemmer. Bronchospasmolytika sollten bei der COB immer in Kombination mit Glukokortikoiden gegeben werden um auch die zugrunde liegende Entzündung zu bekämpfen. Bei den Sympathomimetika ist in Deutschland das an β_2 -Rezeptoren wirkende Clenbuterol zugelassen. Die empfohlene Dosis liegt bei zweimal täglich 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM per os. Mögliche Nebenwirkungen bei höherer Dosierung zeigen sich in Schwitzen, Tachykardie und Unruhe (FEY, 2006). Da es bei Langzeittherapie zur Herunterregulation der β_2 -Rezeptoren kommen kann, sollte die Anwendung nur in Kuren von 10 bis 20 Tagen erfolgen (FEY und OHNESORGE, 2009). Die Parasympatholytika Atropin oder Buthylscopolamin können bei akut auftretender Dyspnoe einmalig gegeben werden. Man sollte bei der einmaligen Applikation bleiben, da diese Wirkstoffe erhebliche systemische Nebenwirkungen bedingen können. Auch ist ihre Wirkung sehr kurz, z.B. 10min bei Atropin. Die Dosierung von Atropin liegt bei 0,02 mg/kg i.v. (ROBINSON, 2001). Bei den Phosphodiesterasehemmern gibt es kein Therapeutikum der Wahl, da die therapeutische Breite sehr gering ist. Dazu zählen Theophyllin und Koffein. Sie aktivieren die Kalziumpumpe und wirken entspannend auf die glatte Bronchialmuskulatur (FEY, 2006).

Zur Erleichterung des Abtransportes des angesammelten Schleimes können Sekretolytika und Mukolytika eingesetzt werden. Dembrexin (0,3 mg/kg per os), Bromhexin (0,1 – 0,2 mg/kg per os) oder Ambroxol (0,6 mg/kg per os) je zweimal tägliche Gabe, dienen als Sekretolytika. Sie bewirken eine gesteigerte Surfactantbildung und einen besseren Abtransport des Schleimes auch durch eine vermehrt seröse Sekretbildung (FEY, 2006). Des Weiteren kann zur Sekretolyse eine Hyperinfusionstherapie durchgeführt werden. Sie kann mit einer Nasenschlundsonde oder intravenös erfolgen, wobei die Dosierung immer bei 67 ml/kg 0,9 % NaCl-Lösung liegt und an drei aufeinander folgenden Tagen stattfinden sollte (FEY, 2006). Es kommt hierdurch zu einem alveolären Ödem, bei dem die Flüssigkeit nach oral abtransportiert wird und der anhaftende Schleim mitgeführt wird. Ist bereits zu viel Sekret in der Trachea oder besteht eine Herz-Kreislauf- oder Niereninsuffizienz, ist diese Therapie kontraindiziert. Außerdem muss die Behandlung streng auf etwaige Nebenwirkungen überwacht werden (FEY, 2006).

Das Mukolytikum Acetylcystein spaltet das muköse Sekret in kleinere Moleküle und kann somit auch den Abtransport erleichtern. Die empfohlene Dosierung liegt bei 10 mg/kg zweimal täglich per os (FEY, 2006).

Eine weitere pharmakologische Gruppe zur systemischen Therapie der COB sind die Antiphlogistika. Hier werden jedoch nur die steroidalen Entzündungshemmer eingesetzt, da nicht-steroidale Antiphlogistika im Atmungstrakt keine erwünschte Wirkung zeigen (FEY, 2006). Die Wirkung der eingesetzten Glukokortikoide beruht vor allem auf der schleimhautabschwellenden Wirkung und verbessert somit auch sehr schnell die Symptome. Man sollte sich auf die kurzwirksameren Glukokortikoide beschränken, um das Risiko einer Reheentwicklung gering zu halten. Hierfür haben sich sowohl Prednisolon (0,5 – 1 mg/kg, 2mal tägl. per os) als auch Dexamethason (0,04 mg/kg 1mal tägl. per os) bewährt. Die Dosis sollte nach drei bis fünf Tagen, ausschleichend, täglich um ca. 10 % verringert werden. (FEY,

2006). Eine einmalige intravenöse Verabreichung von Dexamethason (0,1 mg/kg) verbessert drastisch die Lungenfunktion und reduziert auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Atmungstrakt (ROBINSON, 2002).

1.5.2.2 Inhalationstherapie

Es stehen verschiedene Inhalationssysteme wie Dosier-Aerosole, Vernebler oder Trockenpulverinhalatoren für eine Inhalation zur Verfügung, wobei sich letztere in der Pferdemedizin nicht durchgesetzt haben. Die Partikelgröße des Aerosols sollte zwischen 1-5 µm liegen, damit diese in den tiefen Atemwegen sedimentieren können. Zur Inhalation eignen sich sowohl Bronchodilatoren als auch Glukokortikoide. Die Wirksamkeit und Sicherheit der Inhalation dieser Wirkstoffe beim Pferd wurde mehrfach geprüft. Bei mittelgradig bis hochgradig symptomatischen Pferden sollte man zu Beginn der Inhalationstherapie systemisch wirksame Medikamente verabreichen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Es müssen die in der Humanmedizin eingesetzten Medikamente für das Pferd umgewidmet werden, da in der Tiermedizin keine zugelassenen Medikamente zu Inhalationszwecken verfügbar sind. Dabei muss darauf geachtet werden, dass bei zur Lebensmittellieferung dienenden Pferden keine nicht zugelassenen Wirkstoffe ausgewählt werden.

Die einzelnen Wirkstoffe bei der Gruppe der Glukokortikoide wirken unterschiedlich stark und lange. Da sie auch bezüglich ihrer systemischen Nebenwirkungen beim Pferd variieren, gibt es verschiedene Empfehlungen verschiedener Autoren zur Medikation. Als Beispiel kann man die Pferde mit der Equine Aero Mask zweimal täglich 500 – 1500 µg Beclomethason inhalieren lassen (RUSH et al., 2000). NIEDERMAIER und GEHLEN (2009) empfehlen initial mit höheren Dosen zu beginnen und diese schrittweise über 2 Wochen auf die Erhaltungsdosis zu reduzieren.

Bei den Bronchodilatoren können bei Bedarf β_2 -adrenerge Bronchodilatoren und Anticholinergika gemeinsam verwendet werden, da sie jeweils in unterschiedlicher Tiefe der Atemwege am besten wirken. Somit erreicht man im gesamten Atmungstrakt eine gute Wirkung (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Es wird auch empfohlen vor der Inhalation mit Glukokortikoiden Bronchodilatoren einzusetzen, um die Bronchialobstruktion zu verringern, damit die Glukokortikoide auch ihren Wirkungsort erreichen können (RUSH et al., 1999). Auch hier gibt es wieder verschiedene Empfehlungen zur Dosierung und Auswahl der Wirkstoffe. Zum Beispiel kann Salbutamol einmal täglich in einer Dosierung von 500 – 1000 µg mit der Equine Aero Mask inhalieren lassen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

Auch das Vernebeln von physiologischer NaCl-Lösung setzt die Viskosität des Schleimes herab und verbessert die mukoziliäre Clearance (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Die Anwendung von hypotoner oder hypertoner NaCl-Lösung sollte vermieden werden, da es hier zu einem Bronchospasmus kommen kann (FEY, 2006).

Des Weiteren gibt es noch die Gruppe der Mastzellstabilisatoren. Dazu gehören Cromoglyzinsäure und Nedocromil, wobei letzteres 20fach potenter ist. Die Wirkung dieser Wirkstoffgruppe beruht auf der Verhinderung der Degranulation der Mastzellen durch eine Membranstabilisierung. Sie können vor allem prophylaktisch bei prädisponierten Pferden eingesetzt werden (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

2. Immunologie der COB

Die genauen Abläufe der immunologischen Reaktionen bei der COB sind trotz zahlreicher Studien noch nicht vollständig geklärt (MORAN und FOLCH, 2011). Dazu zählen auch die Mitwirkungen der gebildeten Zytokine beim Krankheitsprozess (PIETRA et al., 2011).

Die zellvermittelte Immunreaktion ist bei chronischen Atemwegserkrankungen an der Pathogenese beteiligt. T-Helferzellen (CD4+) und T-Suppressorzellen (CD8+) spielen hier eine wichtige Rolle als Bestandteil des erworbenen Immunsystems (LAVOIE et al., 2001). Die CD4+ T-Helferzellen können in die Subtypen Th1, Th2 und Th17 unterteilt werden, welche aus den juvenilen Th0-Zellen entstehen. Die Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, welche bei allergischen Reaktionen, wie beim humanen Asthma, aber auch der COB des Pferdes eine Rolle spielen (ROMAGNANI, 1994; LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002). IL-4 bewirkt wiederum eine Differenzierung der Th0-Zellen zu den Th2-Zellen, stimuliert die B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und zum Isotypenswitch von IgM (Ig = Immunglobuli) zu IgG (CORDEAU et al., 2004, LUNN und HOROHOV, 2010). IL-4 wird auch von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet (GESSNER et al., 2005). LAVOIE et al. (2001) und CORDEAU et al. (2004) zeigten, dass ein Th2-Zytokinprofil bei der COB vorliegt und vermehrt in der BAL exprimiert wird. Auch sind die Konzentrationen von IL-4 mRNA im Blut und in der BAL erhöht (BOWLES et al., 2002). Die IFN- γ -Konzentration dagegen geht nach Allergenexposition zurück. Dieses Zytokin zählt wie auch TNF- α und IL-2 zu den Th1-Zytokinen. HOROHOV et al. fanden 2005 allerdings im Gegensatz dazu heraus, dass die Expression von IFN- γ und den Th2-Zytokinen nach Allergenexposition steigt. Auch GIGUERE et al. (2002) und AINSWORTH et al. (2003) stellten diesen Anstieg von IFN- γ fest. Es bewirkt eine Suppression allergischer Reaktion durch eine Vielzahl von Effekten. Unter anderem unterdrückt es die Th2-Zellen, bewirkt eine Apoptose von eosinophilen Granulozyten und T-Zellen, verhindert die Allergenpräsentation und den Isotypenswitch von IgG hin zu IgE durch die B-Zellen (TEIXEIRA et al., 2005). Insgesamt kommen bei der COB sowohl Th2- als auch Th1-Zytokine vor (MORAN und FOLCH, 2011). Th1-Zytokine findet man normalerweise vorwiegend bei chronisch entzündlichen Vorgängen (AARVAK et al., 1999).

Eine weitere T-Helferzellen-Subpopulation spielt eine große Rolle bei der COB - die CD4+ Th17-Zellen. Die nativen T-Helfer-Zellen werden hauptsächlich durch IL-23 zur Differenzierung in Th-17-Zellen stimuliert (IWAKURA und ISHIGAME, 2006). Zur IL-17 Zytokinfamilie gehören sechs Zytokine (IL-17A bis IL17F) (KOLLS und LINDÉN, 2004). Das IL-17A (auch nur IL-17 genannt) stellt das wichtigste Zytokin der Familie dar, welches chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten wirkt und auch für die Hypersekretion von Schleim und die Umbauvorgänge im Atmungstrakt mit verantwortlich zu sein scheint (DEBRUE et al., 2005). Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zusammen mit dem IL-17F maßgeblich an der Entzündung der Atemwege und der Hyperreagibilität beteiligt ist (KAWAGUCHI et al., 2004). AINSWORTH et al. (2006) zeigten, dass die IL-17-Konzentrationen in der BAL bei COB-erkrankten Pferden nach 14-tägiger kontinuierlicher Heustaubexposition ansteigen.

Charakteristischerweise wandern nach Allergenexposition neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten in den Atmungstrakt ein (ROBINSON, 2001). Die neutrophilen Granulozyten werden vor allem von IL-8 rekrutiert, welches von verschiedenen Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur gebildet wird. Die IL-8-Konzentrationen bei COB Pferden sind erhöht (RIIHIMÄKI et al., 2007). Ebenso sind weitere Zytokine und Chemokine, wie IL-1 β , MIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), welche die Bildung von neutrophilen Granulozyten unterstützen, hochreguliert (FRANCHINI et al., 2000). Die Auswirkung der aktivierten neutrophilen Granulozyten besteht vor allem in der Produktion von über 50 verschiedenen Gewebetoxinen, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, Proteasen, Nitritoxide, LTB-4 (Leukotrien-B-4), LTA-4 (Leukotrien-A-4), Thromboxan A₂, PAF (Plättchen aktivierender Faktor), Lactoferrin und Lysozym. Ebenso produzieren sie wiederum proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 und Chemokine wie IL-8 und MIP-2 (LAVOIE et al., 2001). Das Einwandern der neutrophilen

Granulozyten nach mehreren Stunden ist ein Hinweis auf eine Typ-III Hypersensitivitätsreaktion (MEURER und WOLF, 2006). Makrophagen, welche als Antigen-präsentierende Zellen sowohl für Gewebeerstörung als auch Reparatur (Angiogenese, Bildung von Granulationsgewebe) zuständig sind, kommen ebenfalls bei der COB vor. Sie sezernieren Mediatoren und betreiben Phagozytose. Bei der COB findet man vor allem Makrophagen, welche besonders aktiv im Freisetzen von Mediatoren sind (TREMBLAY et al., 1993). Eosinophile Granulozyten spielen im Gegensatz zum humanen Asthma keine Rolle bei der COB des Pferdes (HORHOV et al., 2009).

2.1 Th1/Th2-Balance

Nach Aktivierung entwickeln sich die nativen T-Helferzellen (Th0) entweder zu Th1, Th2, Treg oder Th17-Zellen. Jede Klasse sezerniert wiederum verschiedenen Zytokine und hat somit unterschiedliche Wirkungen und Aufgaben im Immunsystem (WAGNER et al., 2010). Bei der erworbenen Immunantwort ist die zelluläre Immunantwort vor allem für die Abwehr von intrazellulären Erregern zuständig, die humorale Immunantwort dagegen wehrt extrazelluläre Erreger mit Hilfe von gebildeten Antikörpern ab. Unter Einfluss von IFN- γ und IL-12 differenzieren sich die Th0-Zellen zu Th1-Zellen, wohingegen sie sich durch IL-4 zu Th2-Zellen entwickeln. Die Th1-Zellen aktivieren durch ihr gebildetes Zytokinprofil (IFN- γ , IL-2, TNF- β) die zelluläre Immunantwort, während die Th2-Zellen mit den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 die humorale Abwehrkaskade aktivieren (MILLER et al., 2007). Auch werden hierdurch die B-Zellen zur spezifischen IgE-Produktion angeregt (TAYLOR et al., 2006). Die jeweilig gebildeten Zytokine hemmen wiederum die Ausbildung der anderen Subklassen von Th-Zellen (MOSMANN und SAD, 2003).

Eine weitere Subklasse der T-Zellen, die regulatorischen T-Zellen (Treg), hemmen sowohl die Th1 als auch die Th2-Immunantwort. Sie produzieren die Zytokine IL-10 und TNF- β (TAYLOR et al., 2006). IL-10 ist somit ein anti-entzündliches und regulatorisches Zytokin. Das Hemmen der Th1-Immunantwort ist eine wichtige regulatorische Maßnahme, sodass es durch den Th2/Th1-Shift nicht zu einer überschießenden Th1-Immunantwort kommt (BELLINGHAUSEN et al., 1997). IL-10 wird auch von mononukleären Phagozyten, NKs und Th1- und Th2-Zellen gebildet (AKDIS et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 nach entsprechender Allergenexposition bei Allergikern angekurbelt werden konnte (AKDIS et al., 1998; AKKOC et al., 2011). Jedoch ist die Produktion von IL-10 bei gesunden Individuen als Reaktion auf z.B. Endotoxine viel größer als bei Allergikern. Dies wurde bei Asthmatikern getestet und ist mit ein Grund für die Entzündungsreaktionen beim humanen Asthma, da diese nicht verstärkt durch IL-10 gehemmt werden können (BORISH et al., 1996).

Bei einer überschießenden Th2-Immunantwort können allergische Erkrankungen die Folge sein. Im neonatalen Immunsystem herrscht diese Th2-Immunantwort vor, die Th1-Immunantwort entwickelt sich erst nach Kontakt mit Bakterien oder Viren (KLINE, 2007). Deshalb weiß man heute, dass es für die richtige Entwicklung des Immunsystems wichtig ist, sich mit Krankheitserregern auseinanderzusetzen. Bei der COB geht man von einer gestörten Th2/Th1-Balance aus, die in Richtung der Th2-Zellen verschoben ist (HORHOV et al., 2009).

2.2 Allergietypen und COB

GELL und COOMBS teilten 1963 die Hypersensitivitätsreaktionen in vier Typen ein: Beim Typ-I kommt es zur Bildung von IgE Antikörpern, die an Mastzellen gebunden sind. Zu diesem Typ zählt zum Beispiel das humane Asthma. Es handelt sich allgemein um eine Allergie vom Soforttyp. Man kann diesen Typ jedoch auch in eine

Frühe-Phase-Reaktion und eine Späte-Phase-Reaktion einteilen (BOUSQUET et al., 2000). Die antigenpräsentierenden Zellen bewirken mit dem präsentierten Antigen eine Aktivierung der T-Lymphozyten, welche wiederum die B-Lymphozyten zur spezifischen IgE-Produktion anregen. Diese heften sich über die Fc ϵ -Rezeptoren an die basophilen Granulozyten und Mastzellen. Nach wiederholtem Antigenkontakt kommt es zur Mastzelldegranulation durch eine Vernetzung der Zellen über die IgE mit dem Antigen und dadurch zu einer Mediatorenfreisetzung (MEURER und WOLF, 2006). Dies hat eine Vasodilatation, vermehrte Schleimproduktion, Becherzellhyperplasie und Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchospasmus) zur Folge (RAJAN, 2003). Außerdem gibt es noch einen geringer-affinen Fc ϵ -Rezeptor auf verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (CD23), der an antigen- gebundene IgE bindet. Die Bildung des Fc ϵ -Rezeptors wird vermehrt durch IL-4 gefördert (LUNN und HOROHOV, 2010; COOMBS, 1986). Bei der Degranulation werden folgende Mediatoren frei: Histamin, Serotonin, chemotaktische Faktoren, Arachidonsäuremetaboliten, Proteasen und verschiedene Zytokine (IL-4, IL-12, IL-3, IL-5 und TNF- α). Weitere Beispiele für die Typ-I Überempfindlichkeitsreaktion sind Atopien und das Sommerekzem des Pferdes. (MEURER und WOLF, 2006). Bei der Späten-Phase-Reaktion (nach 6 bis 8 Stunden) spielen die Th2-Zellen, die eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten und die durch diese typisch ausgelösten Symptome die Hauptrolle (BOUSQUET et al., 2000). Beim humanen Asthma ist die Bronchokonstriktion das charakteristische Symptom der frühen Phase und die Schleimproduktion, Vasodilatation und mikrovaskuläre Läsionen das Hauptmerkmal der Späten-Phase-Reaktion (BOUSQUET et al., 2000). In Abbildung 2 ist das Schema der Typ-I Hypersensitivitätsreaktion dargestellt.

Zur Typ-II Hypersensitivitätsreaktion werden z.B. Überempfindlichkeiten gegen Medikamentenwirkstoffe oder Vaskulitiden gezählt. Nach GELL und COOMBS (1963) ist das Charakteristische die Antigen-Antikörper-Interaktion. Bestimmt wird diese Reaktion über die Bindung von IgG und IgM an körpereigene Zellen. Über den crystallisable-fragment-Rezeptor (Fc-Rezeptor) binden sich Makrophagen und NK an den an die Zielzelle gebundenen Antikörper, das Komplementsystem wird aktiviert. Entweder kommt es daraufhin zur Zytolyse oder zur Opsonisierung und daraufhin zur Phagozytose durch Makrophagen (MEURER und WOLF, 2006). Diese Reaktion dient ursprünglich insbesondere der Elimination von extrazellulären Mikroorganismen (RAJAN, 2003).

Die Typ-III Reaktion ist charakterisiert durch Bildung von löslichen Antigen-Antikörperkomplexen im Blut, welche sich in den Glomerula der Niere oder in der Basalmembran der Lunge ablagern können. Ursprünglich diente diese Reaktion der Elimination von Viruspartikeln. Ein typisches Beispiel für eine solche Reaktion ist der systemische Lupus Erythematosus (RAJAN, 2003). Nach Ablagerung der Immunkomplexe im Gewebe oder Organen kommt es wiederum zur Komplementaktivierung. Dabei locken die Komplementfaktoren C3a und C5a neutrophile Granulozyten an und induzieren eine Histaminfreisetzung aus Mastzellen und basophilen Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten setzen lysosomale Enzyme frei, welche eine Gewebsschädigung bis hin zur Nekrose zur Folge haben. Auch kann es zu Thrombozytenaggregationen kommen, da diese Fc-Rezeptoren für Immunglobuline besitzen (MEURER und WOLF, 2006). Typ-II und Typ-III sind IgG-vermittelt (LUNN und HOROHOV, 2010).

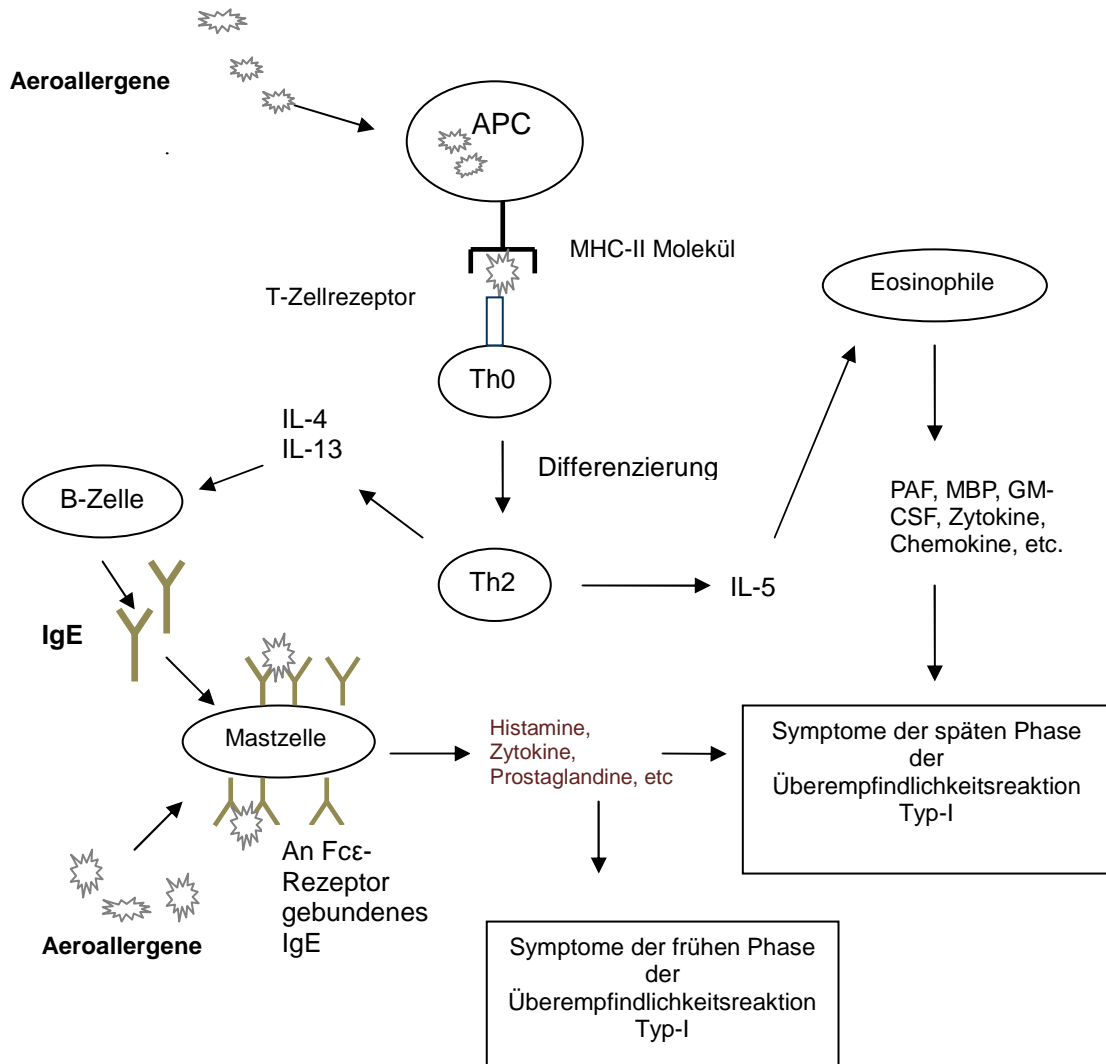


Abb. 2: Mechanismen der Überempfindlichkeitsreaktion Typ-I (modifiziert nach Holt et al. 1999; Dütsch, 2008).

GELL und COOBMS (1963) klassifizierten verschiedene spezifische Organ Autoimmunerkrankungen in die Kategorie IV. Typisch ist eine Th1-Aktivierung mit Bildung von IFN- γ . Beim Erstkontakt mit dem Allergen erkennen native Th0-Zellen das Antigen auf den antigenpräsentierenden Zellen. Sie entwickeln sich daraufhin zu Th1-Zellen und Gedächtniszellen. Nach wiederholten Antigenkontakt werden die Th1-Zellen aktiviert, gelangen in die Zirkulation und setzen verschiedene Zytokine frei (IFN- γ , IL-2, MAF (Makrophagen-aktivierender Faktor), MIF (Makrophagen-Migrationsinhibitor Faktor), TNF- α , TNF- β). Ein Beispiel ist die Kontaktallergie. Die Typ-IV Reaktion ist eine Reaktion vom verspäteten Typ, da die Reaktionszeit zwischen 24 Stunden und mehreren Wochen liegt (MEURER und WOLF, 2006).

Nach LEIBOLD (2003) gibt es noch einen Typ-V der Überempfindlichkeitsreaktionen. Kreuzreagierende Antikörper binden an körpereigene Strukturen, welche dabei blockiert werden, es kommt hier nicht zur Auslösung einer Reaktionskaskade, sondern zum Blockieren einer Funktion. Ein Beispiel wäre die Myasthenia gravis (LEIBOLD, 2003).

Die Zuordnung der COB in eine definierte Kategorie ist nicht möglich, da sie verschiedene Charakteristika der jeweils verschiedenen Gruppen vereint (LUNN und HOROHOV, 2010). Jedoch sind die antigenspezifischen Antikörper IgE und IgA bei COB-erkrankten Pferden in der BAL signifikant erhöht. Dies spricht für eine lokale Hypersensitivitätsreaktion vom Typ-I (HALLIWELL et al., 1993). Auch ist die

Produktion der antigenspezifischen IgE-Antikörper verstärkt, welche durch IL-4 und IL-13 reguliert wird (HOROHOV et al., 2005). Die IL-4 mRNA Expression korreliert direkt mit der produzierten Menge von IgE. Jedoch konnten mehrere Studien zeigen, dass die IgE medierte Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp (frühe Phase-Typ-I) nicht die vorherrschende Reaktion darstellt, sondern dass die Späte-Phase-Reaktion der Typ-I Reaktion (durch Th2-Zellen) und die Reaktion vom verzögerten Typ (Typ-IV) die bedeutsameren bei der Pathogenese der COB sind (MARTI, 2009). DEATON et al. (2006) zeigten in ihrer Studie, dass erst fünf Stunden nach Staubexposition die Histaminkonzentrationen anstiegen und die typischen klinischen Symptome der COB sogar erst nach Tagen sichtbar wurden. Die COB beinhaltet jedoch auch Eigenschaften der Typ-III Reaktion (vergleichend mit der Farmerlunge des Menschen). Dies ist insbesondere durch das Einwandern der neutrophilen Granulozyten bedingt (MEURER und WOLF, 2006).

2.3 Allergiediagnostik mit dem funktionellen in-vitro Test (FIT)

Der FIT wurde 1998 von KAUL et al. entwickelt. Er wird beim Pferd zur Typ-I Hypersensitivitätsdiagnostik eingesetzt und ermöglicht die quantitative und qualitative Beurteilung der Sensibilisierung der basophilen Granulozyten durch membrangebundene Antikörper (BRUENNLEIN, 2001). Im Gegensatz zu anderen Typ-I Allergiediagnostikverfahren (Radio- oder Enzym-Allergosorbent-Test und der Fcε-Rezeptortest), welche die freien Antikörper im Blut messen, werden beim FIT nur die membrangebunden Antikörper, welche auch tatsächlich die Allergiesymptome auslösen, getestet.

Die gewaschenen Blutzellen des Pferdes werden mit spezifischen Allergenen in-vitro zusammengebracht und anschließend wird die freigesetzte Histaminmenge mit Hilfe eines kompetitiven Radioimmunoassays gemessen. Als Negativkontrolle dient die spontane Histaminfreisetzung aus den Basophilen ohne Stimulation. Da in verschiedenen Intervallen unterschiedliche Mengen der Allergene hinzugegeben werden, kann auch eine Aussage darüber gemacht werden, wie sehr (quantitativ) das Pferd auf das entsprechende Allergen reagiert. Der Test kann auch in symptomfreien Intervallen durchgeführt werden (KAUL, 1998; ROHWER et al., 2008).

BRUENNLEIN testete 2001 an COB-erkrankten Pferden mit Hilfe des FIT auf verschiedene Allergene (Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Hausstaub, Schimmelpilze, Baumpollen, Graspollen). 40 von 46 erkrankten Pferden zeigten eine positive Reaktion auf ein oder mehrere Allergene. Signifikant häufig war die Reaktion auf beide Hausstaubmilben und den Hausstaub selbst.

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

3.1 Zusammensetzung und Wirkung

Bei den CpG-ODN handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die häufig in bakteriellen und viralen Genomen vorkommt (KRIEG et al., 1995). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Dr. William Coley, dass diese DNA bei nicht-bakteriellen Infektionen einen immunstimulatorischen Effekt hat (WEINER, 2000). Er injizierte lebende Streptokokken in einen Tumor, welcher daraufhin in Regression trat. Jedoch starb ein Patient auch an einer durch die lebenden Bakterien hervorgerufenen Hautinfektion. Dies wurde als das „Coley Toxin“ bekannt (WEINER, 2000; COLEY, 1893 und 1991). In den nächsten zwei Jahrzehnten forschte er mit inaktivierten gram-positiven und gram-negativen Bakterien weiter. Heute steht fest, dass bestimmte bakterielle DNA-Abschnitte einen immunstimulatorischen Effekt haben. Es handelt sich um die Sequenz aus zwei

5'Purinbasen (P1, P2), einem unmethylierten CpG-Motiv in der Mitte und zwei 3'Pyrimidinbasen (PY1, PY2) (KRIEG et al., 1995; KLIER, 2011). Die beste B-Zellaktivierung wird erreicht, wenn die zwei Purinbasen aus dem Dinukleotid Guanin-Phosphat-Adenin (GpA) bestehen und die Pyrimidinbasen aus Thymin-Phosphat-Cytosin (TpC) oder Thymin-Phosphat-Thymin (TpT) (KRIEG et al., 1995). Die spezifische Wirkung beim Säuger beruht darauf, dass im Vergleich zu Bakterien oder Viren die CpG-Sequenz deutlich seltener auftritt und diese auch überwiegend methyliert vorliegt (KRIEG, 2000; VOLLMER und KRIEG, 2009). Beim Säuger liegen ca. 70 % des Cytosins methyliert vor (BOHLE, 2002). Die Methylierung bewirkt ein „Silencing“ des betroffenen Genabschnittes, d.h. die Transkription des DNA-Abschnittes wird verhindert (ATTWOOD et al., 2002, HOELZER et al., 2008). Das Vorliegen von unmethylierten CpG-Abschnitten aktiviert das Immunsystem und bewirkt eine Th1-assoziierte Immunantwort. Es schützt somit den Körper vor dem Eindringen mikrobieller DNA (BOHLE, 2002). 2001 konnten RANKIN et al. nach Untersuchung von 30 verschiedenen CpG-ODN-Motiven bei 10 verschiedenen Tierarten inklusive des Pferdes feststellen, dass die Sequenz 5'-GTCGTT-3', tierartlich übergreifend, eine sehr starke Wirkung auf das Immunsystem hat.

Die CpG-ODN aktivieren B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (WEINER, 2000). In der Humanmedizin wurde auch eine positive Wirkung bei allergischen Erkrankungen in vitro nachgewiesen und die CpG-ODN befinden sich bereits in der klinischen Phase der Erprobung (SENTI et al., 2009). Es wurde nachgewiesen, dass eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 9 (TLR-9) das Th2-Zytokin IL-4 herunterreguliert und das Th1-Zytokin IFN- γ hochreguliert (BOHLE, 2002; KLIER, 2012). Bei den TLR handelt es sich um eine Proteinfamilie, die bestimmte pathogen-assoziierte Muster auf Mikroorganismen erkennt, sogenannte PAMPS (= pathogen associated molecular patterns). Es gibt insgesamt 10 Arten der TLRs (BOHLE, 2002). Sie unterscheiden körpereigene von körperfremden Molekülen. Der TLR-9 befindet sich intrazellulär im sauren Milieu in den Endosomen (AKIRA et al., 2006; HAAS et al., 2008). Er kommt beim Pferd vermehrt in Alveolarmakrophagen, intravaskulären Makrophagen, Kapillarendothelzellen und

Bronchialepithelzellen vor (SCHNEBERGER et al., 2009). SCHNEBERGER et al. zeigten in einem Versuch 2009, dass TLR-9-mRNA in der Lunge von Pferden nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation vermehrt exprimiert werden. Dies bedeutet, dass dieser Weg des Immunsystems (Th1-Reaktion) nach Antigenkontakt von gramnegativen Bakterien in der Lunge angekurbelt wird.

Durch den Kontakt mit den CpG-ODN kommt es über die Aktivierung der TLR-9 zu einer vermehrten Differenzierung von Th1-Lymphozyten aus CD-4+ T-Zellen. Damit einhergehend ist wiederum die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18, welche einen IFN- γ -Anstieg bewirken. Diese Th1-Zytokine unterdrücken die Th2-Immunantwort und somit die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13, welche beim Allergiegesehen wie dem Asthma des Menschen und auch der COB des Pferdes eine Rolle spielen (KLINE und WALDSCHMIDT, 1998; BOHLE, 2002; KLIER, 2011). Eine weitere wichtige Reaktion auf die CpG-ODN besteht darin, dass IL-10 von dendritischen Zellen durch aktivierte T-Regulatorzellen (Treg) gebildet wird (MOSEMAN et al., 2004). IL-10 hemmt sowohl die Bildung des Th2-Zytokins IL-4, als auch die Bildung von IFN- γ (Th1) und wirkt somit sowohl antiallergisch als auch antiinflammatorisch (TAYLOR et al., 2006; KLIER, 2011). Abbildung 3 zeigt das Schema der CpG-ODN-Wirkung.

Man unterscheidet drei CpG-Hauptklassen (A, B und C). Die Unterschiede beruhen auf den unterschiedlichen Sequenzen der CpG-ODN mit den flankierenden Basensequenzen, welche auch als Palindrome auftreten. Die drei Klassen haben unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem, wobei alle den TLR-9 aktivieren (KRIEG, 2006). Klasse A bzw. auch Klasse D genannt, ist ein starker Aktivator von

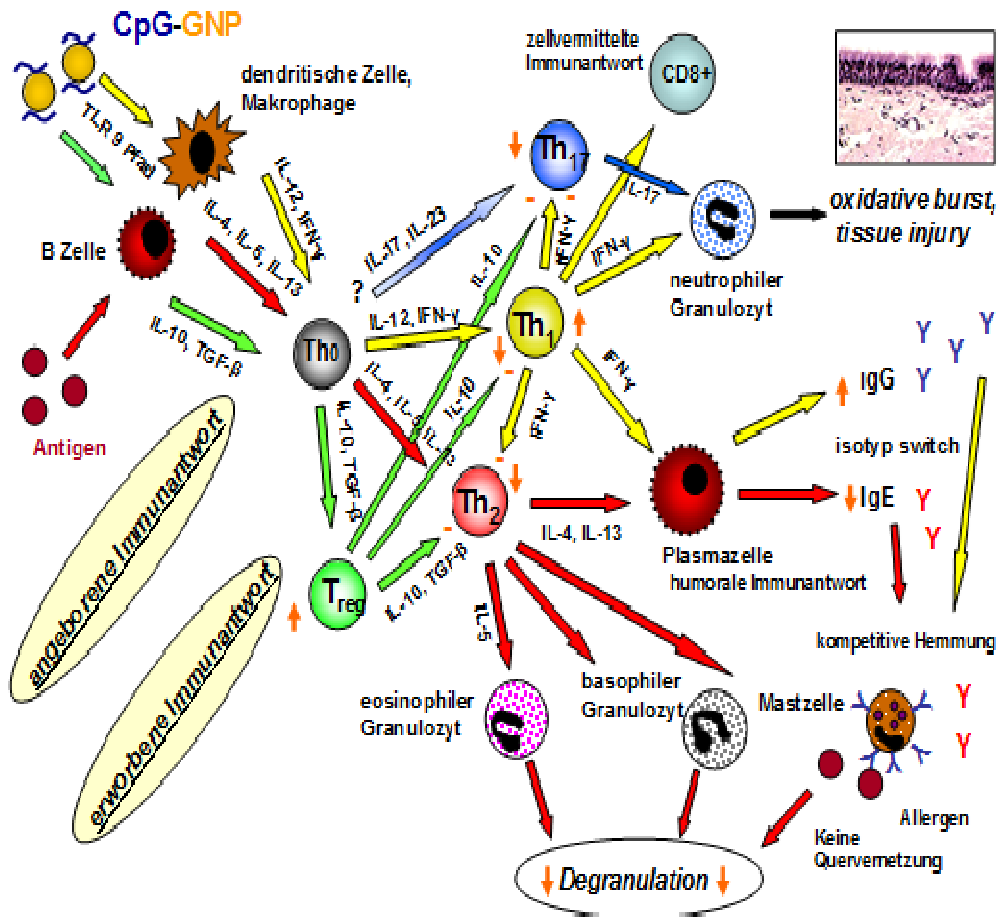


Abb. 3: Schemazeichnung der CpG-induzierten immunologischen Mechanismen. Einfluss von CpG-GNP auf das angeborene und erworbene Immunsystem unter besonderer Berücksichtigung der T-Helfer-Zellsubklassen (KLIER, 2011).

IFN- γ , stimuliert jedoch kaum die B-Zellen. Strukturell besitzt diese Klasse an beiden DNA-Enden (3' und 5') eine Poly-G-Sequenz und palindromische CpG. Diese Form ist sehr stabil und kann komplexere Strukturen bilden. Bei der Klasse B (oder auch K) sind alle Bindungen im Zuckerrückgrat Phosphorthiosäurebindungen. Die Klasse B kann keine höhergeordneten Strukturen bilden und ist ein starker B-Zellaktivator und ein geringer IFN- γ -Stimulator. Die Klasse C vereint beide Eigenschaften von A und B, d.h. sie aktiviert sowohl die B-Zellen, als auch IFN- γ (KRIEG, 2002 und 2006). KLIER testete 2011 in-vitro an bronchoalveolären Zellen von Pferden, welche Klasse sich stimulatorisch am besten, bezogen auf die angestrebte Th-1 Zytokinstimulation bei gleichzeitiger Th-2 Suppression, auf das Immunsystem bei der COB des Pferdes auswirkt. Er fand in einem in-vitro Versuch mit 5 verschiedenen CpG-ODN-Sequenzen an BAL-Zellen heraus, dass der CpG-Typ der Klasse A 2216 CpG-ODN 5'-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G-3' (* = Phosphothioesterrückgrat; die anderen Basen besitzen ein Phosphodiesterrückgrat) den größten Effekt bei der TLR-9 Aktivierung mit einem Th2/Th1-Shift und einer erhöhten IL-10-Sekretion zeigte.

3.2 Einsatz der CpG-ODN

3.2.1 Spezifische Immuntherapie in Kombination mit CpG-ODN

Die allergenspezifische Immuntherapie (ASIT) ist eine Methode, bei der man

Individuen, welche mit typischen allergiebedingten klinischen Anzeichen auf bestimmte Allergene reagieren, einer steigenden Allergenmenge ausgesetzt, mit dem Ziel die Allergiesymptome auf das spezifische Allergen zu verringern (Hyposensibilisierung). Sie wurde 1911 durch Noon und Freeman entwickelt (BOUSQUET et al., 1998).

Periphere Mononukleäre Zellen (PBMC) zeigten bei Hunden mit atopischer Dermatitis nach einer ASIT einen Anstieg der IFN- γ mRNA und eine gleichbleibende IL-4 mRNA-Menge, also eine verstärkte Th1-Zellimmunantwort (SHIDA et al., 2004), anstatt einer zuvor vorliegenden Th2-Immunität (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2008). Bei Katzen mit felinem Asthma wurde nach einer Rush-Immuno-therapie (Kurzzeit-Immuno-therapie, RIT) eine gesunkene IL-4- und IL-5-Konzentration und ein Anstieg von IFN- γ und IL-10 festgestellt (REINERO et al., 2007). Auch hier konnte somit eine Tendenz zur gewünschten Th1-Immunität festgestellt werden. Bei der RIT wird die Dosis der Allergenapplikation innerhalb eines Tages bis zur gewünschten Erhaltungsdosis gesteigert, welche dann jeweils im Abstand von 4 bis 6 Wochen über mehrere Jahre appliziert wird (FREW, 2010). Da in mehreren Studien bereits festgestellt wurde, dass die CpG-ODN einen Shift von Th2 zu Th1 bewirken und auch weitere positive Effekte in der Reduktion des Allergieschehens haben, wird diese in Kombination mit einer ASIT vermehrt geprüft (JAHN-SCHMID et al., 1999; KOHAMA et al., 1999; BOHLE, 2002; REINERO et al., 2007; SENTI et al., 2009). Ein Shift von einer Th2- zu einer Th1-Immunität ist ein wichtiges Ziel bei der Therapie einer Typ-1-Allergie (BOHLE, 2002). REINERO et al. testeten 2007 den Einsatz von CpG-ODN bei der Durchführung einer Rush-Immuno-therapie (RIT) bei Katzen mit felinem Asthma und konnten einen Abfall der eosinophilen Granulozyten beobachten. Bei den verschiedenen Zytokinen (IL-4, IFN- γ und IL-10) stellte sie jedoch keine Auswirkung in der BAL fest. Auch bei einer ASIT kombiniert mit CpG-ODN an Mäusen mit Birkenpollenallergie erzielten JAHN-SCHMID et al. 1999 Erfolge. 2009 testeten SENTI et al. in einer klinischen Studie die CpG-ODN als Adjuvants bei einer subkutanen allergenspezifischen Immuno-therapie (SCIT). Bei Typ-I Allergien eignen sich die CpG-ODN sehr gut, da diese die gewünschten Th1-Zytokine, wie IFN- γ und IL-12 aktivieren (BOHLE, 2002). Bis dahin wurde Aluminiumhydroxid als Adjuvants eingesetzt, welches vor einer Anaphylaxie schützt und den immunmodulatorischen Effekt verstärkt (COX und COULTER, 1997). Allerdings bewirkt dies auch meist zusätzlich einen Th2-Effekt, welchen man vermeiden möchte. SENTI et al. (2009) testeten die CpG-ODN in Kombination mit den Allergenen von *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae* bei Asthmapatienten. Er nahm die CpG-ODN vom Typ A, da diese die stärkste IFN- γ -Aktivierung hervorruft und verpackte sie in Viruspartikel von Bakteriophagen, um sie stabiler zu machen. Bei bereits durchgeführten Versuchen an Mäusen konnte eine starke Th1-Immunität, ein Rückgang des IgE und eine Besserung der klinischen Symptome beobachtet werden (KOHAMA et al., 1999). SENTI et al. erzielten bei ihrer Studie 2009 Erfolge. Die klinischen Symptome der Allergie gingen bereits nach 10 Wochen zurück und es entstand eine größere Toleranz gegenüber den Allergenen nach der Therapie. Diese Ergebnisse erlangte man bei bisherigen SCIT erst nach einer längeren Anwendung von bis zu zwei Jahren. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Es zeigte sich folglich, dass eine Therapie aus einer Kombination von CpG-ODN mit Allergenen bei einer überwiegenden Typ-I Allergie eine sehr gute Wirkung erzielen kann.

3.2.2 CpG-ODN als Adjuvants bei Impfungen

Auch bei Impfungen wird der Einsatz von CpG-ODN als Adjuvants vermehrt getestet und eingesetzt (VOLLMER und KRIEG, 2009). Der B-Typ CpG-ODN verstärkt dabei die B-Zellaktivierung, verringert die Apoptoserate und verstärkt den Immunglobulinklassenswitch vom IgM zum IgG. Der gewünschte Antikörpertiter wird

viel schneller erreicht als ohne die CpG-ODN, man benötigt eine geringere Antigenmenge und die Aufnahme dessen wird verbessert (VOLLMER und KRIEG, 2009). In weiteren Studien erwiesen sich die CpG-ODN als ein vielversprechendes Hilfsmittel bei der Tumortherapie (LINK et al., 2006; VOLLMER und KRIEG, 2009) und als Monotherapie bei der Behandlung chronischer Infektionen (VOLLMER und KRIEG, 2009; OLBRICH et al., 2002; LINK et al., 2006).

Zusammenfassend sind die positiven Eigenschaften der CpG-ODN als Adjuvants sowohl bei Impfungen, ASIT und sonstigen Therapien im Vergleich zu den bisher eingesetzten Adjuvantien viel größer. Sie bewirken eine Th1-Antwort, verstärken die B-Zellaktivierung, induzieren eine vermehrte spezifische IgG-Antikörperproduktion, unterstützen die antigenpräsentierenden Zellen und sind kostengünstig herzustellen (WEINER 2000).

3.2.3 Inhalation der CpG-ODN mit Hilfe von Gelatinenpartikeln

Der Einsatz von CpG-ODN zeigte bei klinischen Studien zwar schon große Erfolge, jedoch gibt es noch Schwierigkeiten bezüglich der Stabilität, der Pharmakokinetik, der Verteilung im Körper und der Aufnahme in den Zielzellen (WILSON et al., 2009). Verschiedene partikuläre und liposomale Trägersysteme sind bereits entwickelt worden, um den immunstimulatorischen Effekt der CpG-ODN zu erhöhen (ZWIOREK et al., 2008). Auch die Verpackung in virus-like Partikeln ist hilfreich (STORNI et al., 2004). Die CpG-ODN alleine werden schnell durch ubiquitäre Nukleasen abgebaut und vom Ort der Applikation sehr schnell absorbiert (MUTWIRI et al., 2004). Die Klasse A mit dem Phosphodiester-Zuckerrückgrat hat eine kurze Halbwertszeit von nur 5 Minuten nach Injektion (SANDS et al., 1994), die Klasse B und C mit dem Phosphothioesterrückgrat dagegen werden schnell im Organismus verteilt und haben eine Halbwertszeit von bis zu 48 Stunden (MUTWIRI et al., 2004).

Von besonderer Bedeutung als Transportsystem für die CpG-ODN sind Gelatinenpartikel. Sie sind sowohl bei der Lagerung als auch in-vivo stabiler als liposomale Trägersysteme und können einfacher hergestellt werden (COESTER et al., 2006). Unverpackte CpG-ODN können außerdem nicht nur lokale, sondern auch systemische Immunreaktionen im gesamten Organismus hervorrufen oder auch zur Splenomegalie führen (STORNI et al., 2004). 2008 erforschten ZWIOREK et al. die Gelatinenpartikel als ein effektives Transportsystem für die CpG-ODN. Sie selbst haben immunologisch keinerlei Auswirkungen (ZWIOREK et al., 2008; KLIER, 2011; 2012). Hergestellt wurden sie aus Gelatine Typ A (aus Schweinehaut). Über elektrostatische Anziehung kann die positiv geladene Gelatine mit den negativ geladenen CpG-ODN verbunden werden. Als optimale Beladungsdichte hatten ZWIOREK et al. 2008 eine Beladung von 1:20 etabliert, welche sich als stabilste herausstellte und auch nicht zu Aggregationen führt, die bei höherer Beladungsdichte auftreten kann (ZWIOREK et al., 2008). In ihrer Studie konnten ZWIOREK et al. 2008 ebenfalls feststellen, dass bei dieser Beladungsdichte nach 12 Stunden Inkubation die myeloiden DC zu 68 % die mit CpG-ODN beladenen GNP aufgenommen haben. Auch spielt die Partikelgröße eine Rolle, wobei die größeren Partikel (ca. 300nm) bessere Ergebnisse erzielten als die kleineren (ca. 150nm), da sie länger in den Endosomen, an die GNP gebunden, verweilen. Die GNP selbst sind immunologisch jedoch inaktiv (ZWIOREK et al., 2008). Die CpG-ODN zeigten an die GNP gebunden eine zwei- bis dreifach höhere Zytokininduktion als die unverpackten CpG-ODN (ZWIOREK et al., 2008).

2011 zeigte KLIER in einem in-vitro Versuch, dass sich CpG-ODN/GNP als ein geeignetes Trägersystem beim Einsatz mit equinen BAL-Zellen darstellen. Gegenüber dem Einsatz von CpG-ODN, die nicht an GNP gebunden sind, waren die Zytokinfreisetzungen erhöht oder gleichgeblieben.

Bei der Vernebelung der CpG-ODN zur Anwendung als Inhalat sollte die Partikelgröße zwischen 1 und 5µm liegen, um auch in die tiefen Atemwege zu

gelangen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Die GNP sind aerodynamisch stabil und können somit zur Inhalation eingesetzt werden (TSENG et al., 2008). KLIER (2011) konnte klinisch keinerlei Unverträglichkeitsreaktionen nach der Inhalation feststellen. Er ließ die CpG-ODN/GNP in einer Konzentration von 0,075 mg/ml CpG und 1,5mg/ml GNP inhalieren, dies entspricht einer Beladung von 5 %. Pro Inhalation ließ er davon eine Dispersion aus 0,18 mg CpG-ODN und 3,75mg GNP inhalieren.

Die Inhalation führte zu einem deutlichen Anstieg von IL-10 und IFN- γ .

III Material und Methoden

Die verwendeten Geräte und Materialien sind im Anhang genauer aufgeführt.

1. Zielsetzung und Versuchsdesign

Das Ziel dieser Studie war es in Anlehnung an bereits durchgeführte Studien an COB-erkrankten Pferden mit CpG-Inhalation (KLIER, 2011) zu zeigen, ob die allergenspezifische Immuntherapie (ASIT) kombiniert mit einer CpG-Inhalation im Gegensatz zur Monotherapie mit CpG-ODN einen Vorteil sowohl in Hinblick auf einen stärker immunologischen als auch einen länger andauernden Effekt hat. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch die im Vergleich zu vorherigen Studien länger durchgeführte Inhalationstherapie ein länger andauernder oder stärkerer Effekt erzielt werden kann. Die Inhalation erfolgte siebenmal jeweils im Abstand von zwei Tagen. Bei vorherigen Studien war die Anzahl der Wiederholungsinhalationen geringer. Zur Inhalation wurde die von KLIER 2011 entsprechend etablierte CpG-ODN-Sequenz der Klasse A 2216 verwendet und diese an GNP als Trägermedium angehängt.

Die Studie wurde in den Sommer- und Herbstmonaten durchgeführt (Juli bis November). Bei den Patienten wurde vor der ersten, zwei Tage nach der siebten Inhalation und sechs Wochen nach der letzten Inhalation eine Trachealspülprobe entnommen. Die zweite Probenentnahme erfolgte zwei Tage nach der letzten Inhalation und nicht direkt im Anschluss, sodass die Inhalation noch ihre Wirkung entfalten konnte. Die letzte Probenentnahme sechs Wochen nach der Therapie sollte den Langzeiteffekt der Inhalationen erfassen. Aus dem Überstand der Proben wurden mit Hilfe eines ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) die Konzentrationsänderungen von IL-4 (Th2-Zytokin), IFN- γ (Th1-Zytokin), IL-10 und IL-17 (Th-17-Zytokin) gemessen. Im Serum wurde jeweils IL-4, IFN- γ und IL-10 bestimmt.

2. Patientengut

Es wurden insgesamt 20 Pferde in die Studie aufgenommen (Tabelle 1). Alle waren schon seit einem längeren Zeitraum (im Durchschnitt 7 Jahre) mittelgradig an COB erkrankt, stammten sowohl aus Privatbesitz als auch aus dem Patientengut der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilian-Universität München. Die Haltungsbedingungen der Pferde wurden während der Studie nicht verändert oder verbessert. Die gewohnte Haltungsumgebung wurde beibehalten um diesen Einflussfaktor so gering wie möglich zu halten. Die Haltungsbedingungen waren bei allen untersuchten Pferden, aufgrund der seit langem bekannten Erkrankung weitestgehend optimiert und vergleichbar. Sie wurden so weit wie möglich in einer staubreduzierten Stallhaltung gehalten und erhielten regelmäßigen Weidegang. Alle Pferde wurden mindestens einen Monat vor der Studie und auch währenddessen nicht mit Medikamenten behandelt. Das Durchschnittsalter der Pferde betrug 17,5 Jahre und das durchschnittliche Gewicht 501,7 Kg.

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

Tab 1: Patientengut (m = männlich, w = weiblich, k = kastriert).

| Nr | Alter | Rasse | Geschlecht | Gewicht (kg) | Größe (cm) | Nutzung |
|----|-------|------------------------|------------|--------------|------------|----------|
| 1 | 25 | Leutstetter-Mix | mk | 550 | 160 | Freizeit |
| 2 | 16 | Isländer | w | 300 | 128 | Freizeit |
| 3 | 21 | Haflinger | mk | 450 | 145 | Freizeit |
| 4 | 14 | Tinker | mk | 630 | 160 | Freizeit |
| 5 | 22 | Trakehner | mk | 600 | 164 | Freizeit |
| 6 | 9 | Connemara | mk | 400 | 144 | Freizeit |
| 7 | 18 | Isländer | mk | 414 | 141 | Freizeit |
| 8 | 11 | Isländer | mk | 400 | 138 | Freizeit |
| 9 | 18 | Friese | m | 650 | 168 | Freizeit |
| 10 | 25 | Andalusier | m | 550 | 158 | Freizeit |
| 11 | 12 | Dt Reitpony | mk | 400 | 148 | Turnier |
| 12 | 17 | Sachsen-Anhaltiner | mk | 680 | 172 | Freizeit |
| 13 | 16 | Isländer | mk | 340 | 130 | Freizeit |
| 14 | 18 | Quarter Horse | mk | 490 | 145 | Freizeit |
| 15 | 18 | Isländer | w | 390 | 130 | Freizeit |
| 16 | 8 | Isländer | w | 400 | 143 | Freizeit |
| 17 | 14 | Östr. Warmblut | mk | 550 | 168 | Turnier |
| 18 | 20 | Mecklenburger Warmblut | mk | 650 | 173 | Freizeit |
| 19 | 21 | Hannoveraner | mk | 650 | 172 | Freizeit |
| 20 | 27 | Hannoveraner | w | 570 | 160 | Freizeit |

3. Signalement und Anamnese

Es wurde eine ausführliche Anamnese mit Hilfe eines standardisierten Anamnesebogens durchgeführt (siehe Anhang), um den aktuellen Krankheitsstand, die Kranken- und Behandlungsgeschichte und die Haltungsart zu evaluieren. Dies ermöglichte zusammen mit der Allgemeinuntersuchung und der speziellen Lungenuntersuchung die Pferde entsprechend einem Lungen-Scoring-System einzustufen. Das genaue Scoring-System ist im Anhang dargestellt. Die Pferde hatten vorherichtlich über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen weder Medikamente erhalten noch einen Stallwechsel oder eine Haltungsanstellung erfahren.

4. Allgemeinuntersuchung

Die Allgemeinuntersuchung wurde mit Hilfe eines standardisierten Untersuchungsbogens durchgeführt (Anhang). Sie diente vor allem dazu gleichzeitige andere Erkrankungen auszuschließen und den aktuellen Krankheitsstatus der Patienten festzustellen. Besonderes Augenmerk fiel dabei auf den Atmungstyp, die Atemfrequenz, Husten, Nasenausfluss und die Auskultation der Lunge. Daraufhin wurde eine spezielle Untersuchung des Atmungstraktes durchgeführt.

5. Spezielle Untersuchung

Im Rahmen der speziellen Lungenuntersuchung wurde eine Lungenperkussion, eine arterielle Blutgasuntersuchung, eine Interpleuraldruckmessung mit Hilfe eines Ventigraphen, sowie eine endoskopische Beurteilung der luftleitenden Wege bis hin zur Bifurcatio tracheae mit Entnahme einer Probe des Tracheobronchialsekretes (TBS) und einer Trachealspülprobe durchgeführt. Außerdem wurde zusätzlich noch eine venöse Blutprobe entnommen. Aus dieser wurde ein Differentialblutbild angefertigt, ein FIT-Test durchgeführt und die Zytokine bestimmt (5.1 – 7). Das Differentialblutbild wurde wiederum nur zum Ausschluss sonstiger Erkrankungen oder systemischer Entzündungen durchgeführt.

5.1 Trachealspülprobe und TBS-Gewinnung

Zum Gewinnen von Probenmaterial für die lokale Zytokinbestimmung und dem Auszählen der neutrophilen Granulozyten, wurden das TBS und eine Trachealspülprobe entnommen. Diese wurde während der endoskopischen Untersuchung der Pferde gewonnen. Die Pferde wurden zuvor mit 0,01 mg/Kg Detomidin (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) und 0,01 mg/Kg Butorphanol (Dolorex 10 mg/ml, Intervet Deutschland, Unterschleißheim) intravenös, in die Vena jugularis externa verabreicht, sediert, um die Endoskopie durchführen zu können. Anschließend erfolgte die Endoskopie mit einem flexiblen Endoskop (ETM Vet 175, ETM Endoskopische Technik GmbH, München). Unter Sichtkontrolle wurde das Endoskop über den ventralen Nasengang bis hin zum Kehlkopf geführt und bei maximaler Inspiration in die Trachea vorgeschoben. An der tiefsten Stelle in der Trachea, an der sich meist vermehrt Sekret gesammelt hatte, wurde über einen sterilen Katheter Sekret abgesaugt (Abb. 4) (MAY und GEHLEN, 2009). Dieses wurde direkt im Anschluss auf einem Objektträger dünn ausgestrichen und getrocknet, um es später mikroskopisch auf die prozentuale Anzahl der neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. Um die Trachealspülprobe zu gewinnen, wurden anschließend 20ml sterile Kochsalzlösung über einen sterilen Katheter unter Sichtkontrolle im oberen Drittel der Trachea abgesetzt. Kurz vor der Bifurcatio tracheae wurde daraufhin die Spülprobe wieder vollständig über den Katheter aufgesaugt (FEY, 2006). Anschließend wurde die gewonnene Probe 5 Min. bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen Spritze abgezogen. Dieser wurde daraufhin sofort in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Gefrierschrank bei -80°C bis zur Untersuchung im Labor gelagert.

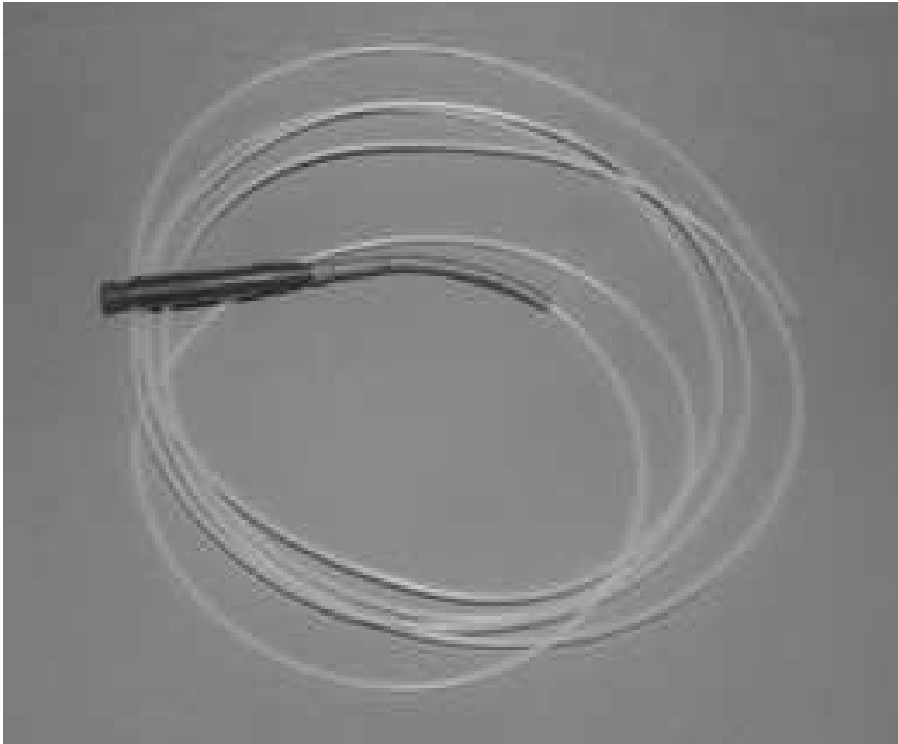


Abb. 4: Steriler Katheter zur TBS-Entnahme und zur Durchführung der Trachealspülprobe (MAY und GEHLEN, 2009).

5.2 Serumgewinnung zur Bestimmung der Zytokine

Für die systemische Zytokinbestimmung mit Hilfe eines ELISA wurde bei jeder endoskopischen Untersuchung eine venöse Serumprobe gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte im Zusammenhang mit der Sedierung an der Vena jugularis externa. Ca. 8 ml venöses Blut wurden jeweils in ein Serurröhrchen gefüllt und anschließend 8 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Insgesamt wurden pro Pferd zwei Serurröhrchen mit Blut gefüllt. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgezogen, ebenfalls sofort in Kryorröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert und anschließend bei -80°C bis zur Zytokinbestimmung eingefroren.

6. Bestimmung der neutrophilen Granulozyten im TBS

Das auf einem Objektträger ausgestrichenen, getrockneten und mit Haema-Schnellfärbung angefärbte TBS wurde mikroskopisch auf den prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten hin untersucht. Dafür wurden bei einer Vergrößerung um den Faktor 1000 ca. 200 Zellen (MAY und GEHLEN, 2009) ausgezählt und darunter die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bestimmt. Anschließend wurde diese prozentual festgehalten. Diese Ergebnisse wurden mit den gemessenen IL-17-Konzentrationen zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten auf eine mögliche Korrelation hin verglichen.

7. Funktioneller in-vitro Test

Der FIT wurde bei allen 20 Pferden durchgeführt, um festzustellen auf welche spezifischen Allergene die jeweiligen COB-Patienten allergisch (Typ-I Hypersensitivitätsreaktion) reagieren. Dazu wurden im Rahmen der Blutentnahmen 20 ml Blut in insgesamt vier EDTA-Röhrchen (Ethyldiamintetraacetat) á 5 ml

gefüllt und innerhalb von 24 h bei der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover untersucht. Anschließend wurden anhand der Ergebnisse bei 10 (bzw. 11) blind ausgewählten Pferden je zwei Allergene zur späteren Verwendung bei der lokalen spezifischen Immuntherapie per Inhalation ausgesucht, auf die die Pferde die stärksten Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ-I in-vitro zeigten (Tab. 2; Beispiel für ein Untersuchungsergebnis im Anhang). Bei den getesteten Allergenen handelte es sich um einen Gräser-Mix Pollen, Gräser-Mix Korn, Spätpollen-Mix, Baum-Mix früh, Baum-Mix spät, Schimmelpilz-Mix, Birke, Haselnuss, Raps, Heumilbe (*Lepidoglyphus destructor*), Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) und Mehmilbe (*Acarus siro*). Die untersuchten Allergene ergaben sich sowohl aus den vorgegebenen Testungsmöglichkeiten als auch daraus, welche Allergene bisher besonders häufig als Verursacher der COB festgestellt wurden.

7.1 Aufbereitung der Allergene zur Inhalation

Die ausgesuchten Allergene (Artu Biologicals Europe B.V., Lelystad, Niederlande) wurden jeweils mit Hilfe von Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Dulbeco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) auf eine Konzentration von 1:1000 verdünnt (Tab. 2). Diese Verdünnungsstufe wurde ausgewählt, da es in anderen Untersuchungen einer noch nicht veröffentlichten Studie mit dieser Konzentration bei fast allen Probanden gerade noch nicht zu Überempfindlichkeitsreaktionen gekommen war. Die hergestellten Allergenlösungen wurden jeweils direkt im Anschluss an die CpG-ODN-Inhalation mit Hilfe des Ultraschallverneblers „Aeroneb Go“ (Aerogen, Galway, Ireland) und des „Equine Haler“ (Equine HealthCare Aps, Hoersholm, Dänemark) angewendet. Die Menge der zu inhalierenden Allergenlösung wurde systematisch gesteigert, um einen Gewöhnungseffekt und somit eine Hyposensibilisierung zu erlangen. Die Allergene wurden von den Pferden zudem nach der CpG-ODN-Inhalation inhaliert, um mögliche Wechselwirkungen wie Ladungsverschiebungen oder Interferenzen bei der Verbindung zwischen den CpG-ODN und den GNP zu vermeiden. Es wurde mit 0,3 ml pro inhaliertem Allergen gestartet, da dies die kleinstmöglich zu vernebelnde Menge für den Ultraschallvernebler darstellt (Inhalationsprotokoll unter Punkt 8, Seite 35). Dabei ließ man beide Allergene zusammen inhalieren.

Tab. 2: Ausgesuchte Allergene zur Inhalation.

| Pferd Nr. | Allergen I | Allergen II |
|------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | Acarus siro | Wiesenfuchsschwanz |
| 2 | Raps | Lepidoglyphus destructor |
| 3 | Aspergillus | Acarus siro |
| 4 | Acarus siro | Dermatophagoides pteronyssinus |
| 5 | Acarus siro | Dermatophagoides pteronyssinus |
| 6 | Aspergillus | Acarus siro |
| 7 | Lepidoglyphus destructor | Dermatophagoides pteronyssinus |
| 8 | Aspergillus | Dermatophagoides pteronyssinus |

| | | |
|----|-------------|--------|
| 9 | Aspergillus | Raps |
| 10 | Raps | Keines |

8. Aufbereitung der CpG-ODN mit GNP

Aufgrund bisheriger Studienergebnisse (KLIER, 2011) wurde die CpG-ODN-Sequenz A 2216: 5`-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G-3` für diese Studie ausgewählt. Die Herstellung der GNP erfolgte im Department für Pharmazie und Pharmazeutische Technologie der LMU München und wurde nach dem Standardprotokoll von COESTER et al. (2000) durchgeführt. Es wurde die Gelatine Typ A verwendet, welche aus Schweinehaut (175 Bloom) mit Hilfe von 25 % Glutaraldehyd, Aceton und EDC-Katalysator (1-Ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) gewonnen wurde (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die hergestellten GNP-Chargen hatten unterschiedliche Konzentrationen, was beim Beladen mit den CpG-ODN berücksichtigt wurde.

Pro Inhalation wurde eine Gesamtmenge von 2,5 ml CpG-ODN/GNP inhaliert und die Inhalationslösung nach dem Protokoll von KLIER (2011) hergestellt. Die jeweilige Konzentration der CpG-ODN pro Inhalat betrug 75 µg/ml, d.h. in der Gesamtmenge von 2,5 ml waren 187,5 µg CpG-ODN enthalten. Die GNP wurden so dazugegeben, dass eine 5 %-Beladung mit CpG-ODN erreicht wurde. Somit waren 1,5 mg/ml GNP im Inhalat enthalten. Die CpG-ODN lagen als Lyophilisat in ihrer Ausgangsform vor und wurden vor der Anwendung mit highly purified water (HPW) dispergiert (4,3 mg CpG-ODN gelöst in 4,3 ml HPW, entsprach nun einer Konzentration von 1 mg/ml). Da die GNP-Chargen in unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen vorlagen, wurden sie jeweils entsprechend mit HPW soweit verdünnt, dass sie wie gewünscht eine Konzentration von 1,5 mg/ml erreichten. Als Beispiel hier folgende Rechnung:

GNP-Konzentration: 9,891 mg/ml

=> 379,1 ml GNP-Lösung + 187,5 µl CpG-ODN + 1933 ml HPW

Um eine Agglutination zu vermeiden, wurde zuerst das HPW vorgelegt, anschließend die gewünschte Menge GNP hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipette dispergiert. Danach erfolgte die vorsichtige Zugabe der 187 µl CpG-ODN (Abb. 5). Um eine homogene Dispersion und eine optimale Beladung der CpG-ODN mit den GNP zu erhalten, wurde nun die Dispersion bei 22°C für 30 Min. bei 300 rpm in einen Thermoschüttler gegeben. Die hergestellte Dispersion wurde bis zur Verwendung gekühlt transportiert und innerhalb weniger Stunden verwendet, da es sonst nach ca. 24 Stunden Lagerung zum Teil zu Agglutinationen kommen kann und die einwandfreie Wirkung nicht mehr gewährleistet wäre.

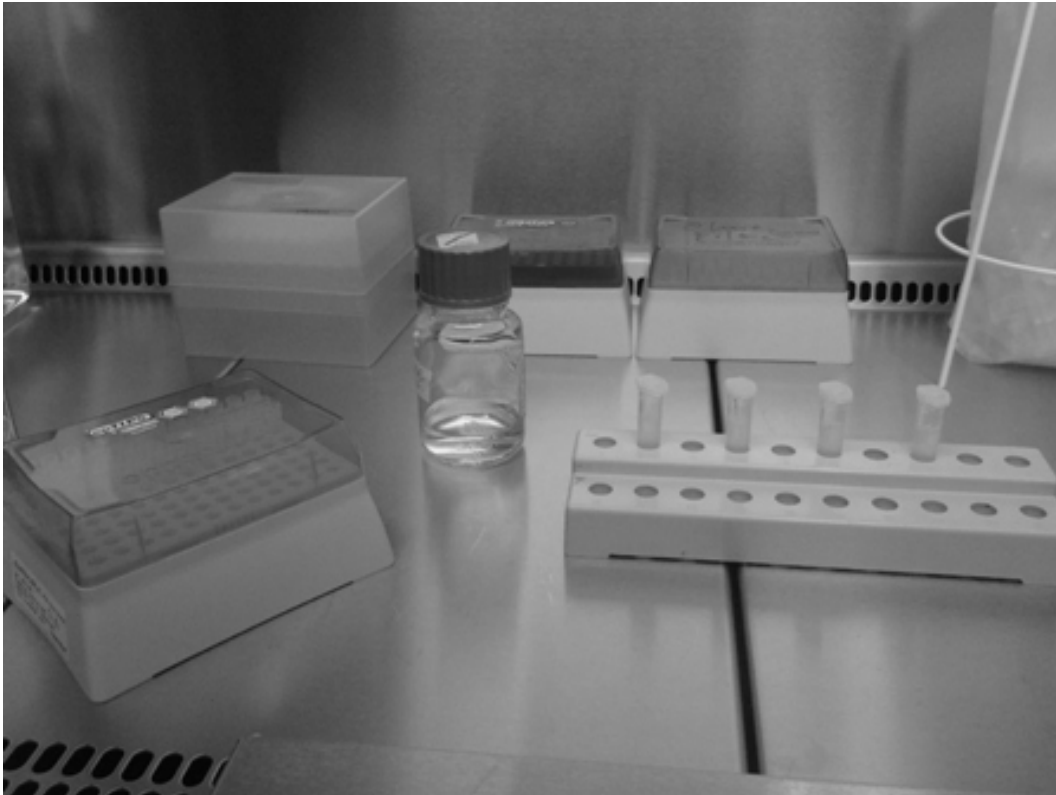


Abb. 5: Fertiggestellte CpG-ODN/GNP, bereit zur Inhalation.

9. Inhalationsprotokoll

Es wurden der Ultraschallvernebler „Aeroneb Go“ (Aerogen, Galway, Ireland) und der „Equine Haler“ (Equine HealthCare Aps, Hoersholm, Dänemark) zur Inhalation verwendet. Der Ultraschallvernebler wurde mit Hilfe eines Glaskolbens als Zwischenstück an der Atemmaske befestigt. Das Netzgerät zum An- und Ausschalten des Gerätes wurde zur besseren praktischen Anwendung mit Klebeband am „Equine Haler“ fixiert (Abb.6).



Abb. 6: Kombiniertes Inhalationsgerät aus dem „Equine Haler“ und dem „Aeroneb Go“ (KLIER, 2011).

Beim Einatmen des Pferdes wurde die Atemmaske auf eine Nüster gehalten und gleichzeitig die andere Nüster zugehalten, damit möglichst viel Aerosol pro Atemzug eingeatmet wurde. Während der Expiration wurde das Verneblungsgerät kurz ausgeschaltet, um Verluste des Inhalats zu vermeiden, da es durch ein permanentes Vernebeln zu einer Sättigung der Verneblerkammer mit dem Inhalat kommen würde. Dies wiederum würde dann zu einer Kondensation der Dispersion an den Wänden des Inhalators führen und somit zu Tröpfchenverlusten. Die Inhalation der 2,5 ml der CpG-ODN/GNP-Lösung dauerte je nach Kooperation des Pferdes ca. 15 Min. Insgesamt wurde die Inhalation sehr gut toleriert und konnte ohne jegliche Ruhigstellung oder Fixation erfolgen. Bei den 11 Pferden, die anschließend noch mit den Allergenlösungen inhalieren sollten, ließ man im Anschluss die beiden ausgewählten Allergene zusammen inhalieren. Dies nahm, je nach inhalierter Menge, noch weitere 5-10 Min. in Anspruch. Anschließend und auch zwischen der Verabreichung der beiden Inhalationslösungen wurde der Ultraschallvernebler mit ca. 1-2 ml HPW im Leerlauf gefahren, um ihn zu reinigen und eine Kontamination zwischen den verwendeten Allergenen und den CpG-ODN zu vermeiden. Die Pferde inhalierten insgesamt siebenmal im Abstand von je zwei Tagen. Die jeweilige Menge der Allergeninhalation der 11 Pferde erfolgte nach dem genannten Schema (Tab. 3). Vor der ersten Behandlung, zwei Tage nach der letzten und noch einmal sechs Wochen nach der letzten Inhalation erfolgte eine gründliche Allgemein- und spezielle Lungenuntersuchung. Bei der Endoskopie wurden jeweils die Trachealspülproben gewonnen, die später im Labor mittels ELISA auf die entsprechend ausgewählten Zytokine untersucht wurden zeitgleich auch die Serumproben für die späteren Zytokinmessungen entnommen.

Tab 3: Allgemeines Inhalationsschema der Studie.

| | 1. Inhalation | 2. Inhalation | 3. Inhalation | 4. Inhalation | 5. Inhalation | 6. Inhalation | 7. Inhalation |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 9 Pferde | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP | 2,5ml CpG-ODN- GNP |
| 11 Pferde | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 0,6ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 0,6ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 0,8ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 0,8ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 1ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 1ml Allergen | 2,5ml CpG-ODN- GNP + 1,25ml Allergen |

Der Fokus der vorliegenden Studie lag auf den labordiagnostischen Analysen der verschiedenen Zytokinen. Die Ergebnisse der Allgemeinuntersuchung und verschiedenen speziellen Untersuchungen (Blutgasmessung, Endoskopie, Zytologie des TBS, Sekretmengen- und Viskositätsbestimmung in der Trachea) wurden im Rahmen dieser Arbeit deshalb nur soweit dargestellt, wie es bezüglich der erhobenen immunologischen Parameter und einer möglichen Korrelation notwendig erschien.

10. Sandwich-ELISA (Enzym-linked Immunosorbend Assay)

Um die Zytokine IL-4, IFN- γ , IL-10 und IL-17 in der Trachealspülprobe und im Serum zu bestimmen, wurde die Technik des Sandwich-ELISA verwendet. Das IL-17 wurde nur in der Spülprobe und nicht im Serum gemessen, da es aufgrund seiner Funktion im Prinzip nur lokale Auswirkungen im Atmungstrakt hervorruft (Schleimsekretion, Chemotaxis auf die neutrophilen Granulozyten) und sein systemisches Erscheinen deshalb im Prinzip für die Studie von untergeordneter Bedeutung war.

Allgemein handelt es sich beim ELISA um ein Nachweisverfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruht, welche durch ein Enzym und ein daran bindendes Substrat zu Farbreaktionen veranlasst wird. Diese kann wiederum quantitativ mittels eines Photometers gemessen werden. Die Stärke der Farbreaktion korreliert dabei positiv mit der Konzentration des nachzuweisenden Antigens und kann mit Hilfe der mitgemessenen Standardverdünnungsreihe, bei der die jeweilige Konzentration bekannt ist, verglichen werden.

10.1 ELISA-Protokoll für IL-4, IFN- γ und IL-10

Für die Messung der Zytokine IL-4, IFN- γ und IL-10 im Serum und im Überstand der Trachealspülproben wurden der jeweilige ELISA Kit „DuoSet ELISA Development System“ der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Mit einem Set kann man bis zu Fünfzehn 96-well-Platten (Thermo Fisher Scientific, Roskilde Site, Dänemark) untersuchen. Das Set enthält hierfür die benötigten

Antikörper, das Enzym, einen Signalverstärker (Streptavidin) und den Standard zum Herstellen der Standardverdünnungsreihe. Das Substrat, der Waschpuffer, ein Blockpuffer und die Stop Solution waren nicht im Set enthalten und mussten zusätzlich angeschafft bzw. hergestellt werden.

Im ersten Schritt wurden von den jeweiligen Sets die Antikörper und der Standard wie im jeweiligen Protokoll angegeben mit PBS („phosphat-bufferd-salt-solution“: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 Na₂HPO₄, 1,5 KH₂PO₄, pH 7,2-7,4, 0,2 µm gefiltert) oder RD („Reagent Diluent“: 1 % BSA (bovines serum albumin), pH 7,2-7,4, 0,2 µm gefiltert) rekonstituiert und in die später pro 96-well Platte benötigten Mengen aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Bei IL-4 und IL-10 betrug die nun vorliegende Konzentration des Capture Antibodys 144 µg/ml. Da die später benötigte Arbeitskonzentration hier 0,8 µg/ml betrug, wurden jeweils 58 µl abgefüllt und später mit 10442 µl PBS verdünnt. Bei IFN-γ war die Ausgangskonzentration 72 µg/ml. Davon wurden 58 µl zusammen mit 10442 µl PBS auf die Arbeitskonzentration von 0,4 µg/ml verdünnt. Hier wurden also ebenfalls jeweils 58 µl aliquotiert und eingefroren. Diese Arbeitsschritte, bestehend aus der Rekonstitution und dem Aliquotieren wurden auch für den Detection Antibody und den Standard durchgeführt. Somit wurden hier auch die Mengen einzeln eingefroren, welche später zum Herstellen der benötigten Arbeitskonzentrationen pro 96-well Platte verwendet wurden.

Zum Durchführen des eigentlichen ELISA wurde zunächst die 96-well Platte mit dem Capture Antibody beschichtet. Hierfür wurden jeweils 100 µl pro well des auf die Arbeitskonzentration verdünnten Antikörpers pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit dem hergestellten Waschpuffer (0,05 % Tween^R 20 in PBS, pH 7,2-7,4) dreimal mit je 400 µl/well gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Hierzu wurde der Immuno Washer von Bio-rad laboratories (München, Deutschland) verwendet. Anschließend wurden pro well 300 µl RD pipettiert, um den Rest des Plattenbodens zu blockieren, damit im weiteren Verlauf nichts unspezifisch binden konnte. Die auf die Platte pipettierte RD wurde eine Stunde inkubiert und danach erneut mit dem Immuno Washer wie oben beschrieben dreimalig gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Proben und die Standardreihe aufgetragen. In jede Vertiefung wurden im Doppelansatz 100 µl der zu messenden Probe bzw. des Standards pipettiert, mit einer adhäsiven Folie zum Schutz bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Beispielschema siehe Tab. 4).

Tab. 4: Beispiel für die aufgetragenen Proben auf die ELISA-Platte bei IL-10.

| | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Standard 156,25pg/ml | Standard 312,5pg/ml | Standard 625pg/ml | Standard 1250pg/ml | Standard 2500pg/ml | Standard 5000pg/ml | Standard 10000pg/ml | Standard 20000pg/ml |
| Standard 156,25pg/ml | Standard 312,5pg/ml | Standard 625pg/ml | Standard 1250pg/ml | Standard 2500pg/ml | Standard 5000pg/ml | Standard 10000pg/ml | Standard 20000pg/ml |
| Probe 5 | Probe 4 | Probe 3 | Probe 2 | Probe 1 | NaCl | PBS | RD |
| Probe 5 | Probe 4 | Probe 3 | Probe 2 | Probe 1 | NaCl | PBS | RD |
| Probe 13 | Probe 12 | Probe 11 | Probe 10 | Probe 9 | Probe 8 | Probe 7 | Probe 6 |
| Probe 13 | Probe 12 | Probe 11 | Probe 10 | Probe 9 | Probe 8 | Probe 7 | Probe 6 |
| Probe 21 | Probe 20 | Probe 19 | Probe 18 | Probe 17 | Probe 16 | Probe 15 | Probe 14 |
| Probe 21 | Probe 20 | Probe 19 | Probe 18 | Probe 17 | Probe 16 | Probe 15 | Probe 14 |
| Probe 29 | Probe 28 | Probe 27 | Probe 26 | Probe 25 | Probe 24 | Probe 23 | Probe 22 |
| Probe 29 | Probe 28 | Probe 27 | Probe 26 | Probe 25 | Probe 24 | Probe 23 | Probe 22 |
| Probe 37 | Probe 36 | Probe 35 | Probe 34 | Probe 33 | Probe 32 | Probe 31 | Probe 30 |
| Probe 37 | Probe 36 | Probe 35 | Probe 34 | Probe 33 | Probe 32 | Probe 31 | Probe 30 |

Nach dieser Zeit wurden die Platten wieder dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen und anschließend pro well 100 µl der Arbeitskonzentration des Detection Antibodys zugegeben. Es erfolgten eine zweistündige Inkubation und anschließend ein erneuter Waschschrift nach dem bekannten Schema.

Anschließend wurde das Enzym HRP (Horse Radish Peroxidase) zusammen mit dem Signalverstärker Streptavidin zugegeben. Hier galt zu beachten, dass das Streptavidin sehr lichtempfindlich ist und deshalb nicht bei direktem Licht pipettiert und inkubiert werden sollte. Es wurden wieder je 100 µl in jede Vertiefung pipettiert und 20 Min. inkubiert. Danach erfolgte zum letzten Mal eine Waschung der Platte. Nun wurde je 100 µl der Substratsolution (1:1 mixture von Reagent A (H₂O₂) und Reagent B (Tetramethylbenzidine) dazugegeben und wieder 20 Min. inkubiert. Auch hier musste darauf geachtet werden, dass kein direktes Licht auf die Platte und die Substratsolution gelangt. Während der Inkubationszeit konnte man eine Blaufärbung der Proben erkennen.

Im letzten Schritt wurde die Stop Solution (2 N H₂SO₄) pipettiert. Hier waren es pro well nur 50 µl. Diese stoppte die weitere Umsetzung des Substrates durch das Enzym und bewirkte durch die Säure eine Verfärbung von blau nach gelb.

Die Messung im Photometer erfolgte mit dem Wallac Victor Multilabel Counter® (Perkin Elmer, Fremont USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Messung von 0,1 sec/well) und bei 530 nm (1 sec/well). Die Intensität der Färbung und somit die gemessene Extinktion korrelierte direkt mit der Konzentration des gesuchten Zytokins in der Probe. Mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe und den gemessenen Extinktionswerten der Proben und der Standardreihe, konnten die Konzentrationen der Zytokine in den Proben ausgerechnet werden.

Die Messbereiche des ELISA-Sets lagen bei IL-4 bei 15,6-2000 pg/ml, bei IL-10 bei 156,2-20000 pg/ml und bei IFN-γ bei 31,2-4000 pg/ml. Da mehrere Proben über der oberen Grenze des Messbereichs lagen, wurde diese mit steriler NaCl-Lösung verdünnt. Das NaCl wurde als Negativkontrolle ebenfalls mitgemessen und die gemessenen Werte bzw. daraus berechneten Konzentrationen wurden durch Subtraktion von den Werten der Proben abgezogen. Die Verdünnungsstufen wurden in einem letzten Rechenschritt wieder zurückgerechnet, sodass man dann die Ausgangskonzentration der Proben erhielt.

10.2 ELISA-Protokoll für IL-17

Zur Bestimmung der IL-17-Konzentrationen in den Trachealspülproben wurde das „Equine IL-17A VetSet™ Elisa Development Kit“ (Kingfisher Biotech, St. Paul, Minnesota, USA) verwendet. Im Set waren zwei schon mit dem Capture Antibody beschichtete 96-well Platten enthalten, sowie der Detection Antibody, der Standard und das Streptavidin für diese beiden Platten. Im Prinzip war die Vorgehensweise ähnlich zu den ELISA der anderen Zytokine.

Im ersten Schritt konnten die Probe direkt aufgetragen werden. Es wurden 100 µl/well auf die beschichtete Platte pipettiert, mit einer adhäsiven Folie abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit dem Immuno Washer von Bio-rad laboratories (München, Deutschland), wobei hier viermal mit je 400 µl/well gewaschen wurde.

Nun wurden je 100 µl/well Detection Antibody auf die Platte pipettiert. Dieser wurde zuvor in 11,5 ml RD (Reagent Dilution: 4 % BSA in DPBS: 0.008M NaP, 0,002M KP, 0,14 M NaCl, 0,01 M KCl, pH 7,4) auf die benötigte Arbeitskonzentration verdünnt.

Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde die Platte erneut viermalig gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Als nächsten Schritt wurden je 100 µl/well Streptavidin-HRP als Enzym und

Signalverstärker auf die Platte gegeben und wiederum nach 30-minütiger Einwirkzeit abgewaschen. Das Streptavidin-HRP musste zuvor mit Hilfe von 11,5 ml RD auf die Arbeitskonzentration verdünnt werden. Nun erfolgte die Zugabe des Substrats 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (100 µl/well), welches eine Einwirkzeit von 30 bis 40 Minuten benötigte. Währenddessen färbten sich die Proben bläulich. Zu beachten galt hier wieder, dass das Pipettieren und das Inkubieren in einer dunklen Umgebung stattfand und auch dass die Platte hier nicht abgedeckt werden sollte. Ohne einen erneuten Waschschriff wurden 100 µl/well der Stoppsolution (0,18 M Schwefelsäure) auf die Wells pipettiert, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die blaue Farbe änderte sich hin zu einer gelben Färbung (Abb. 7).

Die Messung im Wallac Victor Multilabel Counter® (Perkin Elmer, Fremont USA) erfolgte bei den Wellenlängen 450 nm (0,1 sec) und 530 nm (1 sec). Der Messbereich anhand der Standardreihe des ELISA lag bei 39,06-5000pg/ml.

Auch hier konnten mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe und den gemessenen Extinktionswerten der Proben und der Standardreihe, die Konzentrationen der Zytokine in den Proben ausgerechnet werden.



Abb. 7: Gelbfärbung der Proben auf der ELISA Platte nach Zugabe der Stoppsolution.

11. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen und die graphischen Darstellungen der Daten wurden mit den Programmen GraphPadPrism, Microsoft Excel und SPSS durchgeführt. Die vorliegenden Daten unterlagen keiner Normalverteilung, deshalb wurde zum Berechnen der Signifikanzen der Vorzeichenstest verwendet, welcher sich hier als ein nichtparametrischer Test am besten geeignet hat. Es wurden die Vorzeichen der Differenzen von verbundenen Stichproben verglichen. Der Signifikanzwert $p = 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant festgesetzt. Aufgrund der z.T. sehr divergierenden Messergebnisse der Zytokinkonzentrationen konnte der Mittelwert für graphische Darstellungen nicht verwendet werden, da er sich als nicht repräsentativ darstellte. Deshalb wurde die Darstellung des Median ausgewählt.

Es wurden sowohl die Zytokinkonzentrationen vor, direkt nach der Inhalationstherapie und sechs Wochen später innerhalb der jeweiligen Inhalationsgruppen CpG-ODN-Inhalation mit Allergene und ohne Allergene verglichen als auch beide Gruppen zusammengefasst, um einen generellen Therapieerfolg durch die Inhalation zu untersuchen. Dabei wurde durchgängig der

Vorzeichentest verwendet. Die Messergebnisse der Trachealspülproben und der Serumproben wurden dabei unabhängig voneinander betrachtet und nicht miteinander verglichen.

Somit wurden in den jeweiligen Inhalationsgruppen und bei allen Pferden zusammengefasst die Zytokinkonzentrationen der jeweils einzelnen Zytokine (IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-17) vor der Inhalation mit dem Wert zwei Tage nach der letzten Inhalation und mit dem Wert sechs Wochen nach Therapieende verglichen. Die Zytokinkonzentrationen zwei Tage nach der letzten Inhalation wurde ebenfalls dem Wert nach sechs Wochen gegenübergestellt. Des Weiteren wurden die prozentualen Anteile neutrophilen Granulozyten im TBS mit den IL-17-Konzentrationen in den Trachealspülproben verglichen. Dabei wurden die Werte in den jeweiligen Inhalationsgruppen und bei allen Pferden zusammengefasst zu den drei Untersuchungszeitpunkten gegenübergestellt. Dabei sollte untersucht werden, ob diese beiden Messparameter miteinander korrelieren. Es kamen hier verschiedene Korrelationstests zum Einsatz (Kendalls Tau, Spearmans Rho).

IV Ergebnisse

1. Ergebnisse der Anamnese und Allgemeinuntersuchung

Bei allen 20 Pferden wurde mit Hilfe der Anamnese und der klinischen Allgemeinuntersuchung eine schon länger bestehende COB-Erkrankung festgestellt. Alle Pferde wiesen die typischen Symptome dieser Krankheit auf. Die klinische Ausprägung der einzelnen Symptome variierte zwischen den Patienten, wurde aber mit Hilfe eines Punktescoringsystems (Anhang 3) objektiviert. Die Atemfrequenz und die Auskultation der Lunge zeigten bei allen Patienten pathologische Veränderungen. So lagen die Atemfrequenzen der Pferde bei 18 +/- 3 Atemzüge pro Minute. Auch wurde bei allen Probanden Nasenausfluss von serös bis seromukös unterschiedlich starker Ausprägung festgestellt.

2. Ergebnisse der speziellen Untersuchungen

Die Pferde wiesen auch bei den speziellen Lungenuntersuchungen alle pathologische, COB-typische Krankheitssymptome auf. Mit Hilfe der Untersuchungen und dem Scoringssystem wurden alle Pferde als mittelgradig an COB erkrankt eingestuft und wiesen somit vergleichbare Ausgangsbedingungen bezüglich des Schweregrades der Erkrankung für die Studie auf.

2.1 Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS

In der Patientengruppe, welche die Inhalation ohne Allergene erhielten, lag der Ausgangswert des durchschnittlichen prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten im TBS bei 63,1 % und stieg direkt nach der siebten Inhalationen auf 71,8 % an. Bei der letzten Messung sechs Wochen nach Beendigung der Inhalationstherapie lag der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten im TBS bei 86,8 % und war somit weiter angestiegen. In der Allergengruppe lag der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten vor Inhalation bei 68,2 % und fiel im Gegensatz zur reinen CpG-Gruppe ab, auf durchschnittlich 65,1 %. Nach sechs Wochen lag hier der Mittelwert bei 74 %.

3. Ergebnisse des funktionellen in-vitro Tests

Alle Pferde wurden mit Hilfe des funktionellen in-vitro Tests qualitativ und quantitativ auf eine Hypersensibilität der allergischen Typ-I Reaktion gegen verschiedene Allergene getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Daraufhin wurden jeweils zwei Allergene in Abhängigkeit zur klinischen Relevanz und unter Berücksichtigung der individuellen Anamnese zur lokalen, inhalativen Hyposensibilisierung zusammen mit den CpG-ODN ausgewählt.

IV. Ergebnisse

Tab. 5: Ergebnisse des FIT: Die Zahlen von 0,5 bis 4 stehen für die Stärke der positiven Typ-I Reaktionsbereitschaft auf die entsprechenden Allergene. 1 = eindeutig positiv bis 4 = hochgradig positiv.

| Pferd Nr. | Gr | Spp | Sp | GrK | Bmf | Bms | Bir | Hn | Rp | LepD | DmPt | AcS |
|-----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|------|------|-----|
| 1 | | | 2 | 0,5 | | | | | | | 1 | |
| 2 | | | | | 1 | 1 | | | | | | |
| 3 | | 1 | | 1 | 1 | 1 | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | | | 2 | | | | | | 1 | | | 1 |
| 5 | | 1 | 0,5 | 1 | 1 | | | | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 6 | | | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 7 | 1 | 2 | | 2 | 1 | 1 | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 8 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | 1 | | | | | 1 | 1 | |
| 10 | | | 1 | | 1 | | | | 0,5 | | | |
| 11 | | | | 1 | 1 | 0,5 | | | 2 | | | 2 |
| 12 | | | 1 | | | | | | 2 | | 1 | 2 |
| 13 | | | 1 | | | 1 | | | 2 | | | 2 |
| 14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 15 | | | 1 | | | | | | 1 | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | 0,5 | | | |
| 19 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 2 | 2 | 3 | 4 |
| 20 | | 1 | 0,5 | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | 1 |

Gr = Gräser; Spp = Spätpollen; Sp = Schimmelpilzmix; GrK = Gräser Korn; Bmf = Baum früh; Bms = Baum spät; Bir = Birke; Hn = Haselnuss; Rp = Raps; LepD = Lep. destr; DmPt = Derm. pteron.; AcS = Acarus siro

Keines der 20 getesteten Pferde zeigte eine Hypersensitivität auf Haselnussallergene und lediglich ein Pferd auf Birkenallergene. Zwei reagierten schwach positiv auf den Gräser-Pollen-Mix und neun auf den Gräser-Korn-Mix. Sechs Pferde waren auf die Spätpollen sensibel, 11 auf Baum-früh- und neun auf Baum-spät-Allergene. Die häufigsten Reaktionen zeigten die Pferde auf die Rapsallergene. Hier reagierten 14 von 20 getesteten Pferden, also 70 % der Probanden sensibel. Die drei verschiedenen Milbenarten (Heumilbe, Hautmilbe und Mehlmilbe) führten ebenfalls häufig zu positiven Reaktionen. Sieben Pferde reagierten positiv auf die Heumilbe, 10 auf die Hautmilbe und 11 Probanden auf die Mehlmilbe, wobei hier auch die stärksten Reaktionen auftraten.

Der Schimmelpilzmix zeigte ebenfalls sehr oft eine positive Hypersensitivitätsreaktion an. Der Test auf dieses Antigen fiel bei 11 Pferden positiv aus. Die meisten positiven Reaktionen waren mit (1+) als eindeutige Hypersensitivitätsreaktion auf das entsprechende Allergen zu werten. Einige waren mit (2+) auch noch deutlicher sensibel. Drei Pferde wiesen keinerlei positive Reaktionen auf eines der Allergene auf. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen im Einzelnen welche Allergene die meisten bzw. stärksten Reaktionen hervorriefen.

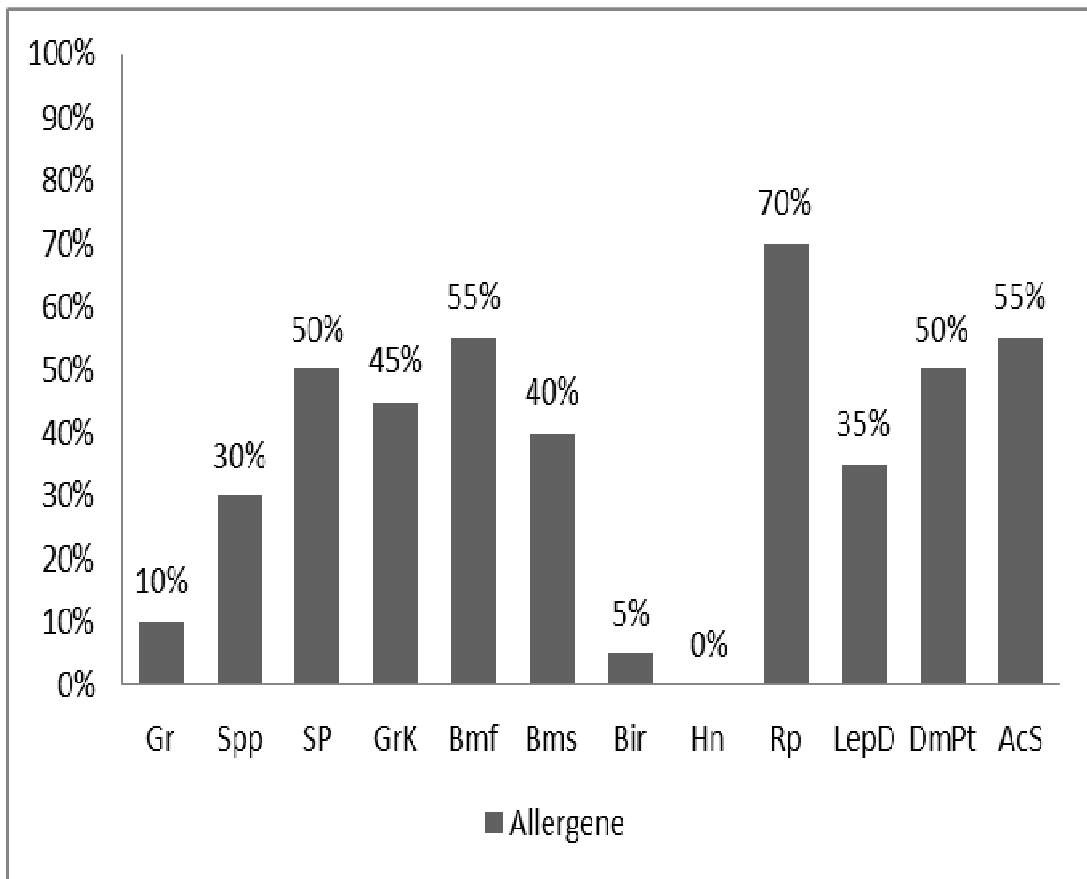
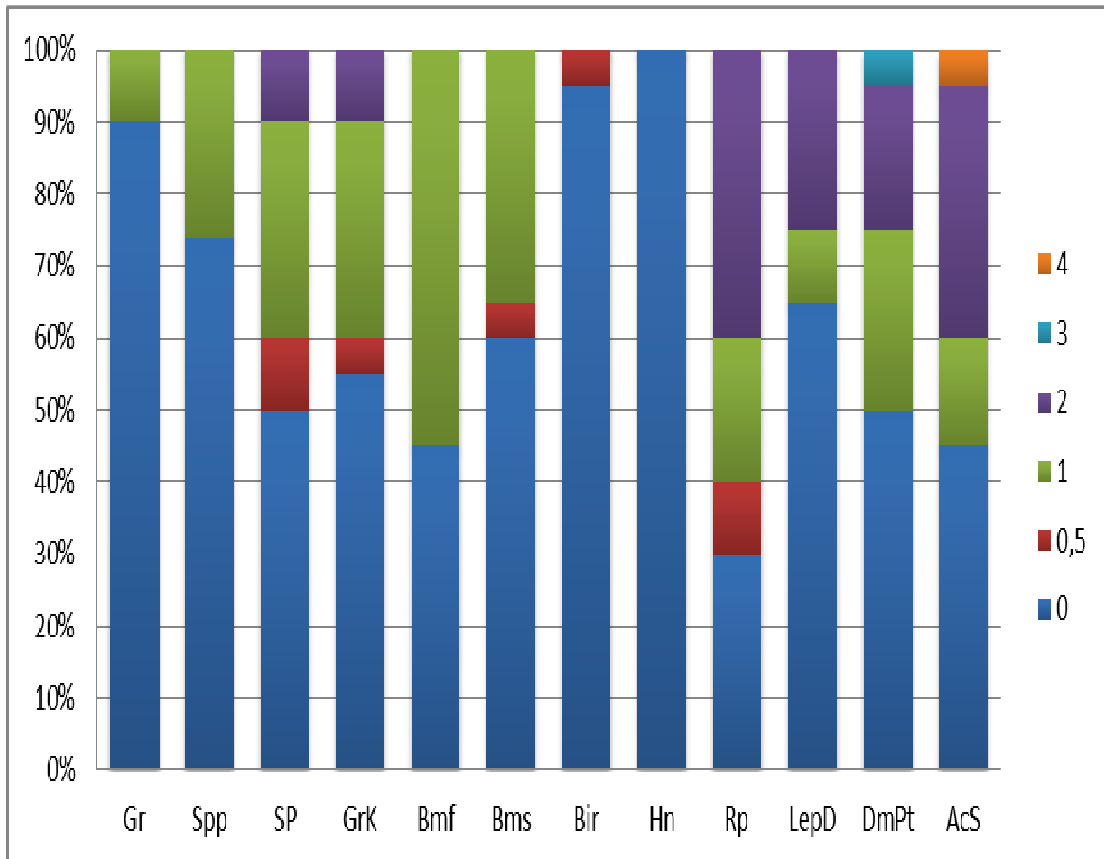


Abb. 8: Ergebnisse des FIT. Die Zahlen von 0,5 bis 4 stehen für die Stärke der positiven Typ-I Reaktionsbereitschaft auf die entsprechenden Allergene. 0 = keine Reaktion, 1 = eindeutig positiv bis 4 = hochgradig positiv.



Gr = Gräser; Spp = Spätpollen; Sp = Schimmelpilzmix; GrK = Gräser Korn; Bmf = Baum früh; Bms = Baum spät; Bir = Birke; Hn = Haselnuss; Rp = Raps; LepD = Lep. destr; DmPt = Derm. pteron.; AcS = Acarus siro

Abb. 9: Ergebnisse des FIT-Tests: Prozentual positiv reagierende Probanden auf die entsprechenden Allergene (n = 20, Angaben in Prozent).

Gr = Gräser; Spp = Spätpollen; Sp = Schimmelpilzmix; GrK = Gräser Korn; Bmf = Baum früh; Bms = Baum spät; Bir = Birke; Hn = Haselnuss; Rp = Raps; LD = Lep. destr; DPT = Derm. pteron.; AcS = Acarus siro

4. ELISA-Ergebnisse

4.1 Zytokinstatus vor Inhalation

Die gemessenen Ausgangskonzentrationen der verschiedenen Zytokine waren bei den einzelnen Pferden insgesamt sehr divergierend und stark gestreut verteilt. Dies ist am Beispiel des IL-10 dargestellt (Abb.10). Die Konzentrationen schwankten hier im Serum zwischen 78 pg/ml und >400000 pg/ml. Beim IL-4 lag die Spanne der gemessenen Konzentrationen sogar zwischen 7,8 pg/ml und 900000 pg/ml. Lediglich beim IL-17 variierten die Ausgangskonzentrationen weniger stark.

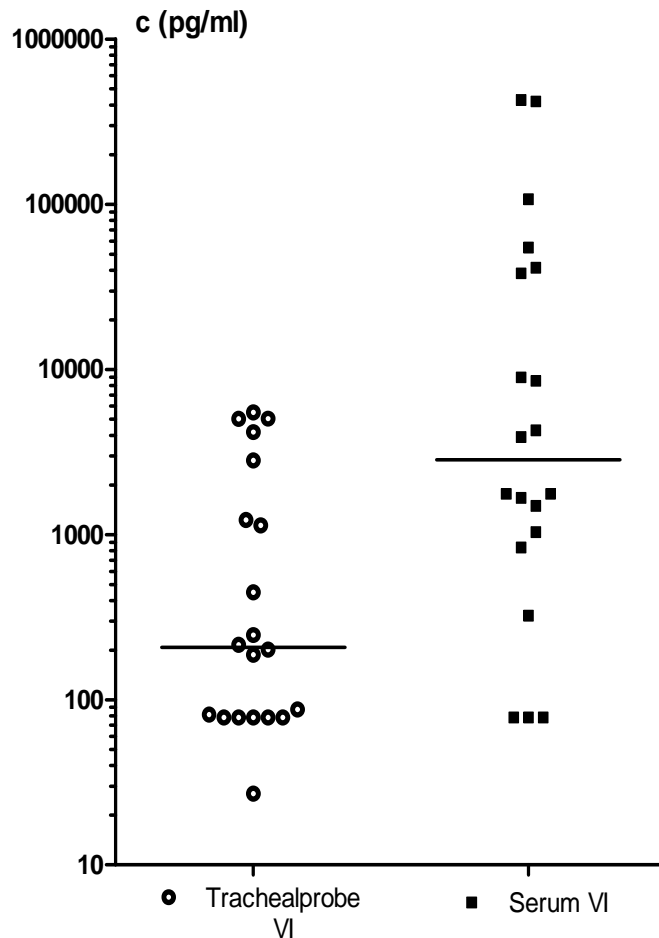


Abb. 10: IL-10-Ausgangskonzentrationen aller Pferde. Jeweils für die Trachealspülprobe und das Serum dargestellt. Die horizontale Linie stellt jeweils den Median dar. VI = vor der ersten Inhalation.

Des Weiteren konnte man bei allen gemessenen Zytokinen erkennen, dass die Zytokinkonzentrationen in den Trachealspülproben tendenziell etwas niedriger lagen und weniger streuten als im jeweiligen Serum. Es lag jedoch kein einheitliches Verteilungsmuster vor. Abbildung 11 zeigt die Verteilung der Ausgangskonzentrationen des IL-17.

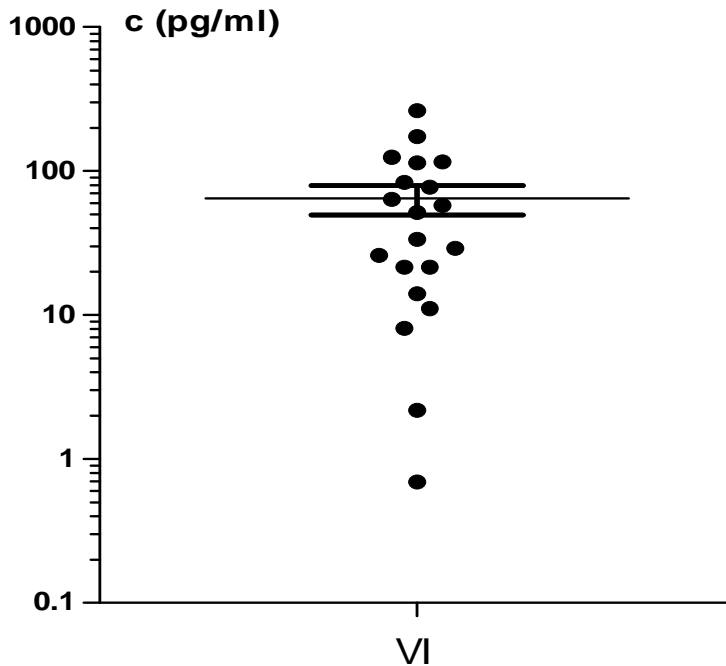


Abb. 11: IL-17-Ausgangskonzentration (nur Trachealspülprobe gemessen). Die horizontale Linie in der Mitte stellt den Median dar. VI = vor der ersten Inhalation.

4.2 IL-4-Freisetzung nach der Inhalation

Verglich man bei allen Pferden zusammengefasst die Freisetzung des Th2-Zytokins IL-4 zwei Tage nach der letzten Inhalation und nach weiteren sechs Wochen, so konnte festgestellt werden, dass die IL-4-Konzentration in der Trachealspülprobe bei 15 Pferden zwei Tage nach der letzten Inhalation signifikant abfiel ($p = 0,041$), auch nach weiteren sechs Wochen ohne Therapie sank diese im Vergleich zum Ausgangswert bei 14 Pferden signifikant ($p = 0,031$) weiter ab. Zwischen der zweiten und der dritten Untersuchung war der Abfall jedoch nicht mehr signifikant. Prozentual gesehen lag der Median des ersten Abfalls bei 33,2 % und vom Ausgangswert zum Messwert sechs Wochen nach der Inhalation bei 49,7 %.

Dies bedeutet, dass die Produktion des Th2-Zytokins in gewissem Umfang herunterreguliert wurde. Jedoch konnte man diese Entwicklung im Serum nicht im gleichen Maße beobachten. Hier gab es nur nach sechs Wochen eine signifikante Veränderung hin zum Konzentrationsabfall, direkt nach Inhalation jedoch nicht. Bei 14 Pferden fiel die IL-4-Konzentration im Serum sechs Wochen nach der letzten Inhalation signifikant ab ($p = 0,013$), (Median bei 17,2 % Abfall).

Verglich man die IL-4-Konzentrationsentwicklung nach den Inhalationen zwischen den beiden Therapiegruppen (Inhalation nur mit CpG-ODN-Sequenz der Klasse A 2216 und Inhalation mit der entsprechenden CpG-Sequenz in Kombination mit zwei spezifische Allergenen), so konnte weder in der Trachealspülprobe noch im Serum ein statistisch signifikanter Unterschied der Konzentrationsänderungen von IL-4 festgestellt werden (Abb.12 und 13). Die Inhalation mit CpG-ODN in Kombination mit Allergenen im Sinne einer Hyposensibilisierung ergab somit keine stärkere Herunterregulation des IL-4.

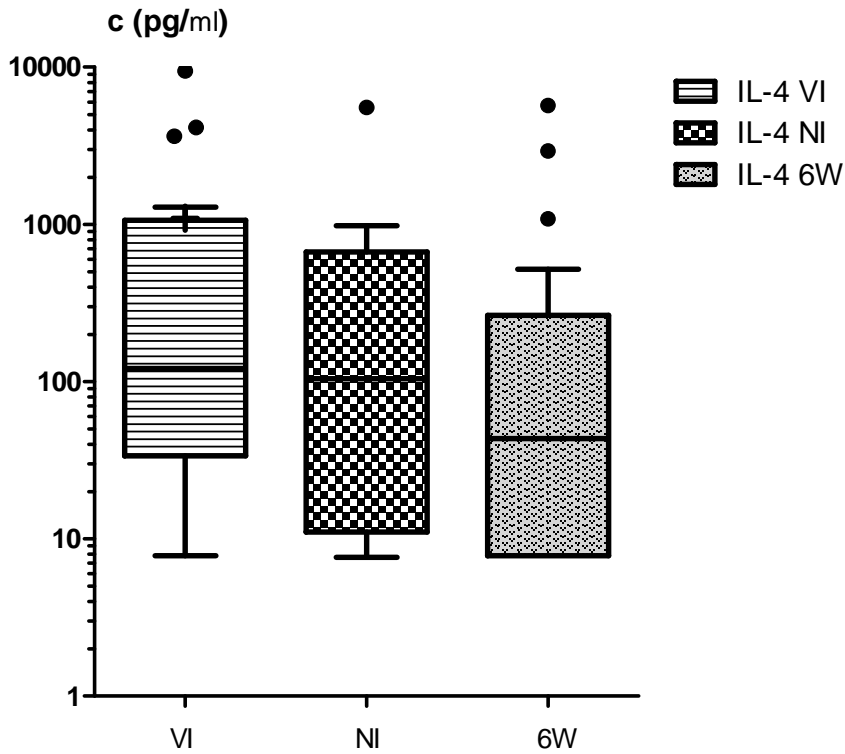


Abb. 12: IL-4-Konzentrationen in der Trachealspülprobe. Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen vor der ersten Inhalation (VI), 2 Tage nach der letzten (NI) und 6 Wochen nach der letzten Inhalation (6W).

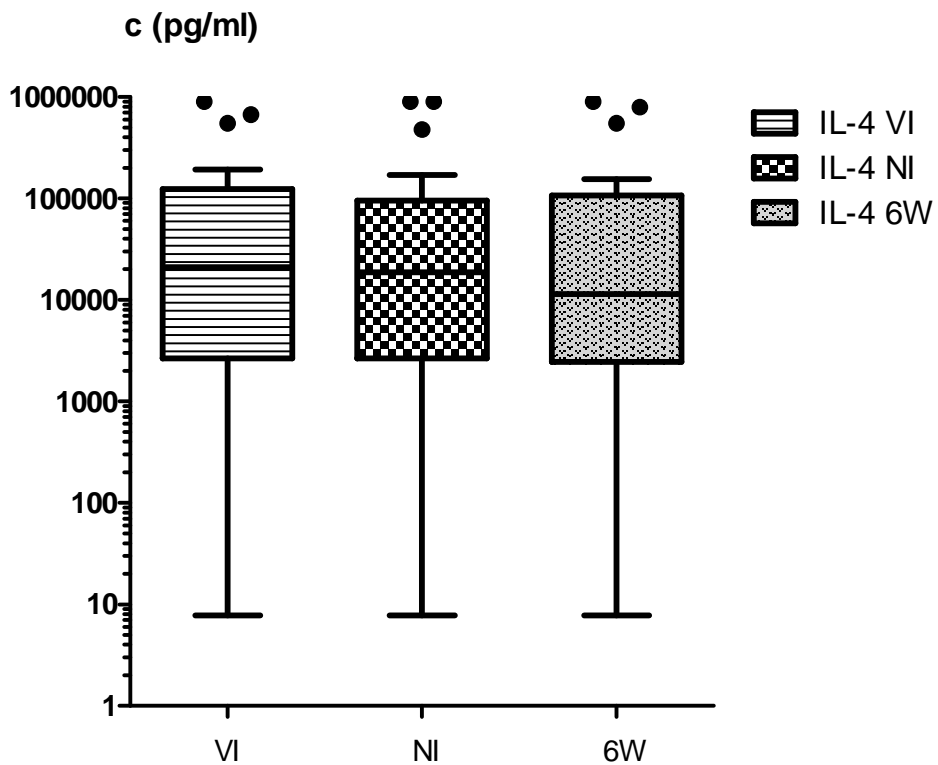


Abb. 13: IL-4-Konzentration im Serum. Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen vor der ersten Inhalation (VI), zwei Tage nach der letzten (NI) und sechs Wochen nach der letzten Inhalation (6W).

4.3 IL-10-Freisetzung nach der Inhalation

Bei der Freisetzung des IL-10 wurde bei allen Pferden zusammengefasst, in der letzten Serumprobe nach sechs Wochen im Vergleich zur Probe zwei Tage nach der letzten Inhalation ein signifikanter Abfall bei 14 Pferden beobachtet ($p = 0,008$). Setzte man die gemessenen Konzentrationen zwei Tage nach der letzten Inhalation gleich 1, lag der Median des gemessenen IL-10 nach weiteren sechs Wochen bei 0,835. Somit lag der relative Abfall bei 16,5 % (Abb.14). Demnach zeigte sich bei IL-10 erst nach sechs Wochen ein signifikanter Effekt.

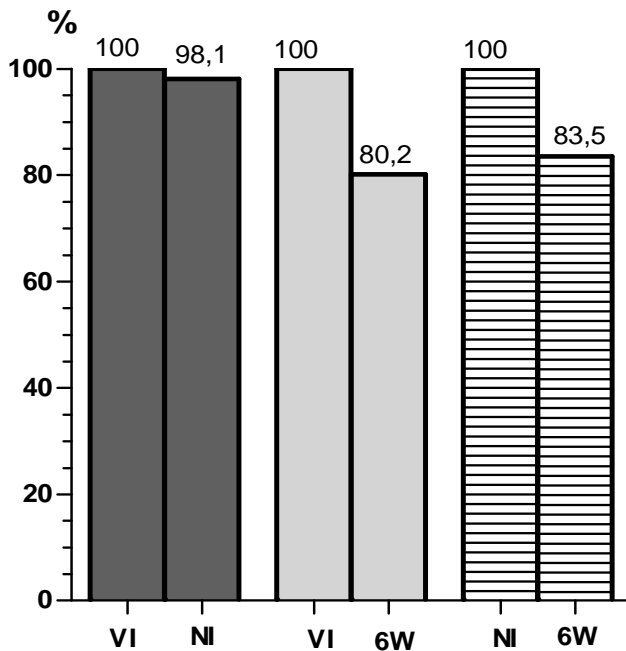


Abb. 14: Relative IL-10-Serumkonzentration im Vergleich zur vorhergehenden Probe in %. Dargestellt ist jeweils der Median im Vergleich zur vorherigen Probenentnahme (jeweils auf 100 % gesetzt). VI = vor der ersten Inhalation, NI = zwei Tage nach der letzten Inhalation, 6W = sechs Wochen nach der letzten Inhalation.

In der Trachealspülprobe konnte keine einheitliche Entwicklung in der IL-10-Ausschüttung festgestellt werden. Bei manchen Pferden sanken und bei anderen stiegen die Konzentrationen von IL-10 an.

In dieser Studie war kein Unterschied in den IL-10-Produktionen zwischen den Therapiegruppen zu beobachten. Ebenso konnte keine vermehrte Freisetzung von IL-10 nach Inhalation bei beiden Gruppen festgestellt werden. Es kam hingegen in beiden Gruppen sechs Wochen nach Therapieende zu einem signifikanten Abfall von IL-10.

4.4 IFN- γ -Freisetzung nach der Inhalation

Betrachtete man bei allen Probanden ($n = 20$) die IFN- γ -Konzentrationen in der Trachealspülprobe, so war sechs Wochen nach Inhalationsende im Vergleich zur Probe nach der letzten Inhalation ein signifikanter Abfall bei 15 Pferden nachzuweisen ($p = 0,041$). Der Median des relativen Abfalls verglichen mit dem Wert nach der letzten Inhalation lag bei 18,7 %.

In der Serumprobe betrug der Median des Konzentrationsabfalls vor Beginn der Inhalation bis zur Probenentnahme nach sechs Wochen ebenfalls 18,7 %. Hier fiel der Wert insgesamt bei 15 Pferden ab und die statistische Signifikanz lag bei $p = 0,02$. Auch zwischen der zweiten Probenentnahme und der letzten konnte bei 14

Pferden ein statistisch relevanter Abfall beobachtet werden ($p = 0,013$). Setzte man auch hier den zweiten Wert gleich 1, ergab sich daraus ein Konzentrationsabfall im Median von 11,1 % (Abb. 15). Beim IFN- γ erzielte man somit erst nach sechs Wochen einen signifikanten Abfall durch die Therapie.

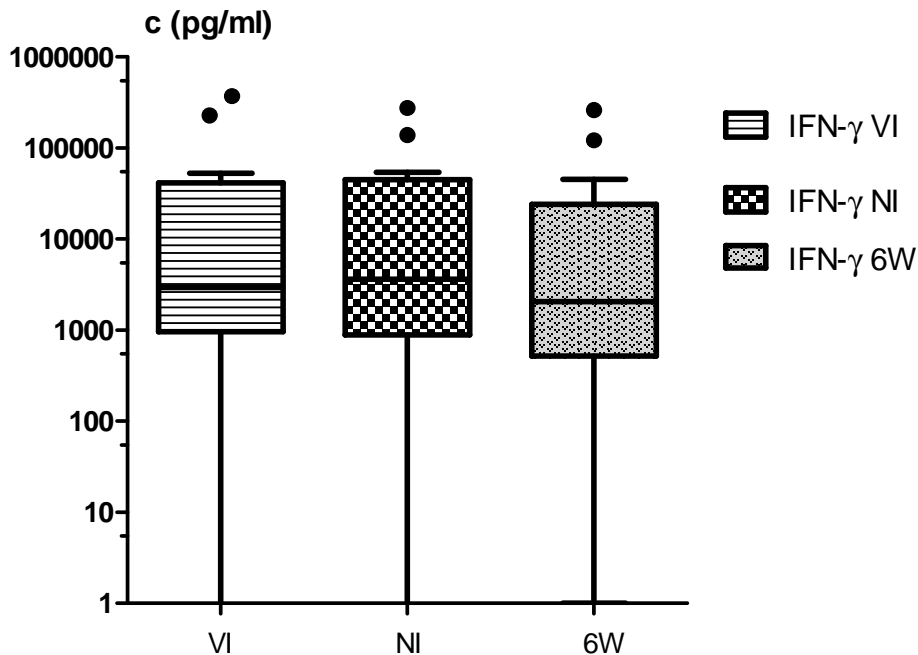


Abb. 15: Gemessene IFN- γ -Konzentrationen im Serum bei allen Probanden ($n = 20$) vor der ersten Inhalation (VI), zwei Tage nach der letzten Inhalation (NI) und sechs Wochen nach der letzten Inhalation.

Verglich man die beiden Inhalationsgruppen (CpG-ODN mit Allergenen und CpG-ODN als Monotherapie), so gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der Zytokinentwicklung bezogen auf IFN- γ zwischen den beiden Therapiegruppen. Die Werte variierten auch hier stark und zeigten große Streuungen bei den Konzentrationsänderungen des IFN- γ .

4.5 IL-17-Freisetzung nach der Inhalation

Die Konzentrationen von IL-17 wurden nur in der lokalen Trachealspülprobe gemessen. Die gemessenen Werte divergierten sowohl in den Ausgangskonzentrationen als auch in den direkt nach der Inhalation und nach sechs Wochen entnommenen Proben in beiden Gruppen und auch innerhalb der Gruppen stark. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der IL-17-Konzentrationen ausgemacht werden. In der ersten Trachealspülprobe lag die Anzahl der neutrophilen Granulozyten durchschnittlich bei 65,6 %. Im Vergleich dazu stieg die Anzahl im Mittelwert an und lag zwei Tage nach der letzten Inhalation bei 68,5 %. Insgesamt fielen trotzdem bei 11 von 20 Pferden die neutrophilen Granulozyten ab. Sechs Wochen nach der Inhalation war jedoch ein weiterer durchschnittlicher Anstieg auf 80,4 % zu verzeichnen. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Ausgangskonzentration und dem Anstieg bzw. des Abfalls der IL-17-Konzentrationen in der Trachealspülprobe und den neutrophilen Granulozyten im TBS festgestellt werden.

4.6 Vergleich der beiden Inhalationsgruppen CpG mit und ohne Allergen

Verglich man die beiden Inhalationsgruppen CpG-ODN Inhalation als Monotherapie (n = 9) und CpG-ODN Inhalation mit Allergenen kombiniert (n = 11), so gab es keinerlei signifikante Unterschiede in den Konzentrationsänderungen der Zytokine zwischen den beiden Gruppen. In beiden Gruppen fielen die Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ab oder stiegen auch an, zeigten also keine einheitliche Tendenz. Dabei waren die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Pferden und den einzelnen Messungen sehr großen Schwankungen unterlegen.

Abbildung 16 zeigt die Verteilung der Konzentrationen am Beispiel der Trachealspülprobe des IL-4. Es zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen oder zu den verschiedenen Probeentnahmezeitpunkten. Lediglich bei der letzten Spülprobe konnte eine geringgradige Tendenz beobachtet werden, dass die Allergengruppe einen etwas deutlicheren Konzentrationsabfall des IL-4 aufwies.

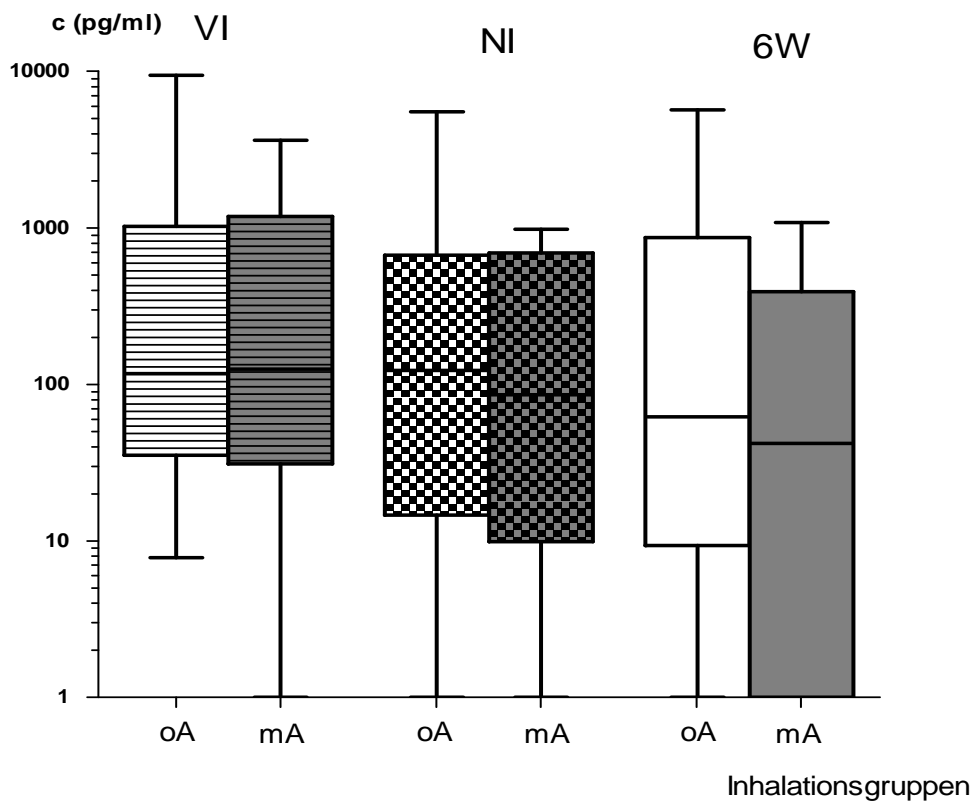


Abb. 16: IL-4-Konzentration in der Trachealspülprobe der beiden Versuchsgruppen. „oA“ steht für die jeweilige Gruppe, welche nur CpG-ODN inhalierten (ohne Allergen), „mA“ steht für die Gruppe, welche zusätzlich Allergene erhielt (mit Allergen). VI = vor der ersten Inhalation (Erstuntersuchung), NI = zwei Tage nach der letzten Inhalation, 6W = sechs Wochen nach der letzten Inhalation. Die horizontale Linie in der Mitte steht für den jeweiligen Median der gemessenen Werte.

V Diskussion

1. Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie war es in Anlehnung an bereits durchgeführten Studien an COB-erkrankten Pferden mit CpG-Inhalation (KLIER, 2011; LEHMANN 2013) zu zeigen, ob die ASIT kombiniert mit einer CpG-Inhalation im Gegensatz zur Monotherapie mit CpG-ODN einen Vorteil sowohl in Hinblick auf einen stärkeren immunologischen, als auch einen länger andauernden Effekt hat. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch die im Vergleich zu vorherigen Studien länger durchgeführte Inhalationstherapie ein länger andauernder oder stärkerer Therapieeffekt erzielt werden kann. Es wurden erneut die CpG-ODN-Sequenz der Klasse A 2216 verwendet, da sich diese bei KLIER 2011 schon als verträglich und als effektivste der getesteten Sequenzen in Bezug auf die Stimulation des Immunsystems erwiesen hatten.

2. Ausgewähltes Patientengut

Alle Probanden waren vorberichtlich mittelgradig und über längere Zeit (Mittelwert sieben Jahre) an COB erkrankt. Die Patienten wurden in ihrer gewohnten Umgebung behandelt und untersucht, ohne Veränderungen oder Verbesserungen der Haltungsbedingungen. Auch erhielten sie allesamt mindestens vier Wochen vor Beginn und auch während der Studie keinerlei Medikamente. Da die Patienten jedoch trotz alledem in unterschiedlichen Ställen gehalten wurden, könnte es bei den einzelnen Pferden zu Beeinflussungen insbesondere zu unterschiedlich starken Staubbelastungen gekommen sein. Die Pferde erhielten unterschiedliches Heu, welches dementsprechend auch unterschiedlich stark mit Allergenen und Staub belastet war. Dies beeinflusst zum einen die Ausprägung der klinischen Symptomatik (ROBINSON, 2001), zum anderen könnte dadurch insbesondere die Wirkung der ASIT beeinflusst werden. Womöglich unterlagen deshalb manche Pferde automatisch bereits einer gewissen Allergenbelastung auf die sie reagierten. Hätte man allerdings die Pferde zur Standardisierung der Umweltfaktoren aus ihrer gewohnten Umgebung herausgeholt und unter gleiche Haltungsbedingungen gestellt, hätte man dadurch eine Haltungsänderung durchgeführt und den aktuellen Krankheitszustand verändert. Dadurch wäre ein Einfluss auf die klinischen Symptome sowie die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen genommen worden, da sich dadurch sowohl die Allergenart als auch die Allergen- und Staubbelastungsmenge (Mikroklima der Ställe) verändert hätte (AINSWORTH et al., 2003; DEBRUE et al., 2005). Somit war das Belassen der Pferde in ihrer gewohnten Umwelt in Bezug auf den Feldversuch ein gewollter Aspekt der Studie. Eine vollkommen homogene Gruppe mit identischen Ausgangsbedingungen in Bezug auf Krankheitsdauer, individuelle Auslöser, Pathogenese, zugrunde liegende genetische Komponente, individuelle Sensibilisierungen und Allergenzusammensetzung ist bei dieser multifaktoriellen Erkrankung schlichtweg nicht möglich (SLOCOMBE, 2000; MARTI, 2000; ROBINSON, 2001; DEATON et al., 2006; GERBER et al., 2008). Da deshalb auch die Allergiebereitschaft, die Krankheitsgeschichte und die Allergenzusammensetzung bei den Patienten zudem naturgemäß variiert, ist eine Feldstudie sinnvoller als eine standardisierte Versuchsreihe in Bezug auf die klinische Aussagekraft und die erwünschte Praxisrelevanz.

3. Aufbereitung der CpG-ODN und der Allergene

Das Verfahren zur Herstellung der Inhalationsdispersion hat sich in vorherigen Studien (KLIER, 2011, LEHMANN, 2013) bewährt und stellte sich auch in dieser Studie als eine gute Methode dar.

Um mögliche Wechselwirkungen zu vermeiden, ließ man die Allergene von den jeweiligen Pferden im Anschluss an die CpG-ODN inhalieren. Da es bisher in der Literatur noch keine Studie gab, die sich mit einer lokalen inhalativen Hyposensibilisierung bei COB-erkrankten Pferden beschäftigt hat, gab es auch keine genaueren Angaben über die zu inhalierende Allergenmenge. In Studien an Katzen und Mäusen wurden jedoch bereits vielversprechende Ergebnisse durch die Kombination von CpG-ODN mit einer ASIT erzielt (JAHN-SCHMIDT et al., 1999; REINERO et al., 2007). Jedoch wurde die Therapie in diesen Studien nicht durch Inhalation durchgeführt, sondern mittels subkutaner oder nasaler Applikation. Anhand einer noch nicht veröffentlichten Studie über Hypersensitivitätsreaktionen beim Pferd nach Inhalation von Allergenen (Dissertation Daniela Nömayer), erwies sich die Anfangsdosierung von einer Verdünnung der reinen Allergene auf 1:1000 als sinnvoll für diese Studie, um keinen akuten Bronchospasmus auf die Inhalation auszulösen. Um genauer zu evaluieren, wie sich die Allergenmenge immunologisch auswirkt, müsste eine Dosis-Wirkungsstudie zu den inhalierten Allergenen und daraufhin gemessenen Zytokinen durchgeführt werden. Dies wurde bisher noch nicht getestet. Problematisch ist hier nach wie vor, die schwierig zu interpretierenden Ergebnisse der Allergietests (sie weisen nur eine Sensibilisierung und keine klinisch manifeste Allergie nach) und damit die Identifizierung geeigneter Allergene mit klinischer Relevanz. Hierzu könnten nur Provokationstests mit den entsprechenden Allergenen eindeutige Ergebnisse liefern (GONSIOR et al. 2002). Allerdings wird solch ein Test von den Besitzern nicht toleriert. Alternativ könnten diese Versuche in vitro anhand von isolierten BAL-Zellen von COB Pferden durchgeführt werden, welche nach Allergenstimulation in steigender Dosis auf ihre produzierten Zytokine untersucht werden. Bei dieser Studie kam es mit der verwendeten Allergendosis und der anschließenden Dosissteigerung zu keinerlei anaphylaktischen Reaktionen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Dosierung der Allergen für eine Hyposensibilisierung zu gering gewählt wurde oder die Dauer der Anwendung nicht ausreichend ist um einen messbaren Effekt nachzuweisen, da die klassische Hyposensibilisierung, abgesehen von der RIT über einen deutlich längeren Zeitraum geht.

4. Durchführung der Studie

Die Studie wurde in den Sommermonaten bis in den Herbst hinein (Juli bis November) durchgeführt, wobei die Temperaturen an den verschiedenen Untersuchungstagen stark schwankten. Ergo könnte dies auch auf immunologischer Ebene einen Einfluss auf die Zytokinfreisetzungen gehabt haben. Auch die Beteiligung von saisonalen Allergenen kann einen Einfluss auf die klinischen und immunologischen Werte haben (BRUENLEIN, 2001; PIRIE et al., 2003).

Das Inhalationsregime mit dem „Equine Haler“ kombiniert mit dem „Aeroneb Go“ erwies sich als sehr einfach in der Handhabung. Da die Geräte nach jeder Inhalation und insbesondere nach Allergenverabreichung gereinigt wurden, um zu verhindern, dass Reste der Allergene im Inhalator zurückbleiben, ist deshalb nicht davon auszugehen, dass es zu Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Allergenen und den Pferden gekommen sein könnte.

5. Ergebnisse des FIT und spezifisch ausgewählte Allergene

Der FIT wurde bei allen 20 Pferden unmittelbar vor Beginn der Studie durchgeführt. Die Auswahl der getesteten Allergene beruhte zum einen darauf, welche Allergene im FIT zur Auswahl standen und zum anderen, welche Allergene für die Entwicklung der COB eine Rolle spielen (MCGORUM et al., 1993; SCHMALLENBACH et al., 1998; BRUENNLEIN, 2001; KÜNZLE et al., 2007), siehe Abb. 9 und 10. Allergene, die für die Studie keine Relevanz hatten, wurden weggelassen, wie z.B. die Insektenallergene, welche wichtige Auslöser des Sommerkeuzems darstellen, aber für die Pathogenese der COB keine Rolle spielen.

Die Ergebnisse waren insgesamt sehr inhomogen verteilt. Viele Pferde reagierten auf die Pollenantigene (Gräser, Baumpollen früh und spät, Birke, Haselnuss, Raps), welche eigentlich eher typisch für die SP-RAO sind, da sie in den Sommermonaten vorkommen (LAVOIE, 2007). Dies zeigt, dass einige Pferde wahrscheinlich nicht nur an der COB sondern auch an der SP-RAO leiden. Eine klinische Unterscheidung ist bei diesen Krankheitstypen jedoch nicht möglich (LAVOIE, 2007). Alleine die Saisonalität gibt einen Hinweis. 70 % der Probanden reagierten positiv auf die Rapsallergene, bei denen die Hauptbelastung in der Luft von April bis August vorliegt, ein Pferd reagierte sogar lediglich auf Raps. Ein Pferd zeigte nur bei den Baumpollen eine Ausschüttung von Histamin aus den basophilen Granulozyten. Vermutlich leiden diese beiden Teilnehmer auch an der SP-RAO. Auffällig war, dass drei Pferde überhaupt keine Allergensensibilität im FIT zeigten. Dies könnte daran liegen, dass diese Tiere die COB-Symptome alleine durch den Heustaub und die darin enthaltenen Endotoxine entwickeln (PIRIE et al., 2003; DEATON et al., 2006) und bei diesen die allergische Komponente mit den getesteten Allergenen evtl. keine oder eine untergeordnete Rolle spielt. MCGORUM et al. (2003) konnten zum Beispiel eine deutliche Histaminfreisetzung bei Pferden mit COB durch Exposition mit Heu- und Strohstaub hervorrufen. Möglicherweise sind diese drei Pferde aber auch auf bestimmte Allergene sensibel, welche nicht im FIT getestet wurden. Auch muss daran gedacht werden, dass es sich bei der COB nicht alleine um eine Hypersensibilitätsreaktion vom Typ-I handelt, sondern auch der Typ-III und -IV eine Rolle in der Pathogenese spielt (MARTI, 2009; LUNN und HOROHOV, 2010). Hierfür steht allerdings kein kommerziell verfügbarer Allergietest zum Nachweis zur Verfügung. Der FIT testet nur die Hypersensitivität in Bezug auf die Typ-I Hypersensibilitätsreaktion und nicht die anderen Formen. Zudem handelt es sich bei allen kommerziell verfügbaren Allergietests nur um den Nachweis einer Sensibilisierung (BRUENNLEIN, 2001). Eine klinisch relevante Allergie lässt sich letzten Endes nur durch einen Provokationstest nachweisen (GONSIOR et al. 2002). Dies ist in den meisten Fällen allerdings nicht möglich. Zum einen stehen relevante rekombinante Einzelallergene (Epitope) häufig nicht zur Verfügung und zum anderen wünschen die Besitzer keine Provokationstests, da diese doch mit einigen Nebenwirkungen bzw. mit stark ausgeprägten COB-Symptomen einhergehen könnten. Bisher wurden solche speziellen Provokationstests mit inhalierten Allergenen bei Pferden noch nicht durchgeführt.

Die verschiedenen Pferde (15 von 20) reagierten im FIT unterschiedlich stark auf die für die COB-typischen Allergene, dies war insgesamt auch das zu erwartende Ergebnis (DERKSEN et al., 1988; MCGORUM et al., 1993; SCHMALLENBACH et al., 1998; BRUENNLEIN, 2001; KÜNZLE et al., 2007; BEELER-MARFISI et al., 2010). In dieser Studie kann festgehalten werden, dass das Rapsallergen bei der allergischen Komponente der COB eine wichtige Rolle spielt. Dies wurde bisher in anderen Studien noch nicht festgestellt. Wie auch BRUENNLEIN (2001) festgestellt hatte, sind hier auch die Allergene der Hausstaubmilben häufige Auslöser der allergischen Reaktionen bei der COB. Zusätzlich konnte gesehen werden, dass auch die Mehlmilbe mitbeteiligt ist. Mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen deckt sich auch, dass die Schimmelpilze meist eine wichtige Rolle beim

Allergiegesehen der COB haben. (MCGORUM et al., 1993; SCHMALLENBACH et al., 1998; PIRIE et al., 2003; SIMONEN-JOKINEN et al., 2005; BEELER-MARFISI et al., 2010).

Die Auswahl der Allergene für die Inhalationstherapie richtete sich nach den Ergebnissen im FIT, der individuellen klinischen Anamnese der Patienten und Befragung der Besitzer. Bei den 11 Pferden, welche mit Inhalationsallergenen therapiert werden sollten, wurden die beiden Allergene ausgewählt, auf welche sie die stärksten Reaktionen zeigten und die entweder in der Nähe des Stalles vorkamen oder aufgrund der Anamnese eine potentielle Bedeutung im Krankheitsgeschehen der Patienten haben konnten. Da die beiden Inhalationsgruppen zuvor per Losverfahren ermittelt wurden, konnte bei einem Pferd lediglich ein Allergen für die Inhalationstherapie angewendet werden, da dieses nur auf ein Allergen im FIT sensibel reagierte. Allerdings handelte es sich hier auch um den Probanden, welcher nur auf das Rapsallergen allergisch war und somit evtl. nicht definitiv an der COB alleine sondern auch an der SP-RAO erkrankt sein könnte oder eine reine Sensibilisierung ohne klinische Relevanz aufwies. Im Prinzip spielt dies jedoch für den erwarteten Therapieerfolg kaum eine Rolle, da die Pathogenese und die klinischen und immunologischen Parameter der beiden Krankheiten fast identisch sind und auf die Wirkung der CpG-ODN keinen Einfluss haben sollten (LAVOIE, 2007). Lediglich der Zeitpunkt für das Auftreten der klinischen Symptome (COUETIL et al., 2007) und die Allergene, auf welche die Pferde sensibel sind, stellen den eigentlichen Unterschied der beiden Krankheiten dar (BEADLE et al., 2002).

Möchte man untersuchen, ob die CpG-ODN bei der Therapie der SP-RAO einen anderen Therapieeffekt als bei den COB-erkrankten Pferden haben, so wäre dies in einer weiteren Studie zu klären.

6. Auswahl der Zytokine

Die Auswahl der gemessenen Zytokine erfolgte anhand der Zuordnung zu den verschiedenen T-Zelltypen, durch welche sie produziert werden (ROMAGNANI, 1994; O`GARRA, 1998; LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002). Auch sollte ein kommerzieller ELISA zur Verfügung stehen. Als ein Vertreter der Th2-Zellen wurde das IL-4 ausgewählt (LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2009). IFN- γ repräsentiert die Th1-Zellen (O`GARRA, 1998; GIGUERE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2003; HOROHOV et al., 2005). Das IL-10 war als ein regulatorisches Zytokin von Interesse, da es sowohl die Th2- also auch die Th1-Immunantwort reguliert (TAYLOR et al., 2006). Das IL-17 wurde ausgewählt, da es chemotaktisch auf die neutrophilen Granulozyten wirkt, welche gerade bei der COB von entscheidender Bedeutung in der Pathogenese sind. Zudem scheint dieses Zytokin und auch für die Hypersekretion von Schleim und die Umbauvorgänge im Atmungstrakt mit verantwortlich zu sein (DEBRUE et al., 2005). Dieses Zytokin wurde in der lokalen Trachealspülprobe bestimmt. Die anderen Zytokine wurden sowohl lokal als auch systemisch im Serum gemessen, um zu evaluieren, ob es lokale Unterschiede in der Wirkung der Inhalation gibt und ob die Inhalation einen systemischen immunologischen Effekt hat.

7. Konzentrationsentwicklung des IL-4

Das IL-4 als Vertreter der Th2-Zellen wird bei der COB zum Teil vermehrt exprimiert (LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2009). Der Nachweis einer überschießenden Th2-Immunantwort ist allerdings nicht in allen Fällen bei COB Patienten möglich (MORAN und FOLCH, 2011). Dies

hängt wahrscheinlich von individuell variierenden Faktoren wie Exazerbationsphasen, Dauer der Erkrankung, exogene Auslösefaktoren und Allergenbelastung, sowie genetischen Komponenten ab (MARTI, 2001). Es bestand die Annahme, dass die IL-4-Ausgangskonzentrationen der Patienten eher hoch sind. Tatsächlich waren sie jedoch sowohl in der Trachealspülprobe als auch im Serum bei je zwei Pferden unter der Nachweisgrenze des ELISA. Die CpG-ODN sollten über die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 9 die Th2-Immunantwort und somit die IL-4-Sekretion herunterregulieren (BOHLE, 2002; KLIER, 2012). Da das IL-4 maßgeblich daran beteiligt ist in aktivierten B-Zellen die IgE-Produktion anzuregen und die darauffolgende Mastzelldegranulation zu bewirken, spielt es damit bei der Pathoimmunologie der COB eine große Rolle (RAJAN, 2003; MEURER und WOLF, 2006) und seine Herunterregulierung stellt somit ein wichtiges Ziel der CpG-Therapie dar. Allerdings gelang es nicht in allen Studien eine Beteiligung von IgE an der Pathogenese der COB nachzuweisen (MARTI, 2009). Demzufolge handelt es sich wahrscheinlich eher um einen Teilaspekt im multifaktoriellen Krankheitsgeschehen der COB. Es konnte bisher auch in verschiedenen Studien, bei denen bei Typ-I Allergien CpG-ODN mit einer ASIT kombiniert wurden, gezeigt werden, dass die IL-4-Konzentration signifikant zurückging (REINERO et al., 2007) bzw. eine verstärkte Th1-Immunantwort hervorgerufen wurde (SHIDA et al., 2004).

Es wurde aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse erwartet, dass die IL-4-Konzentrationen insgesamt nach der Inhalationstherapie zurückgehen würden (JAHN-SCHMID et al., 1999; KOHAMA et al., 1999; BOHLE, 2002; REINERO et al., 2007; SENTI et al., 2009; KLIER, 2012). Explorativ sollte in der Allergengruppe getestet werden, ob dieser Rückgang durch die Hyposensibilisierung noch stärker ist. Ohne Beachtung der beiden Gruppen (n = 20) trat dieser Effekt in der Trachealspülprobe direkt nach der letzten Inhalation auch auf. Sogar sechs Wochen nach Therapieende war noch einmal ein deutlich signifikanter Abfall der IL-4-Konzentration zu sehen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Th2-Immunantwort durch die CpG-Therapie herunterreguliert wird. Im Vergleich dazu konnte KLIER 2011 durch seine CpG-Inhalationstherapie bei der Messung der lokalen Konzentrationsentwicklung des IL-4 keine statistisch signifikanten Ergebnisse in Hinblick auf einen Konzentrationsabfall erzielen.

Diese Ergebnisse der Studie sprechen für einen Langzeiteffekt der Therapie mit einer immunologisch anhaltenden, evtl. sogar protrahiert-verzögerten Reaktion auf die lokale immunologische Modulation nach CpG-ODN Inhalation. Da die Haltung nicht verändert wurde und deshalb auch keinen Einfluss auf die Reduktion des proallergischen Zytokins haben konnte, kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt durch die Therapie erzielt wurde. Lediglich saisonale wetterabhängige Einflüsse sind zu berücksichtigen, so dass beispielsweise kältere Temperaturen und feuchtes Wetter mit weniger Staubbelastung der Luft in unserer Studie einen Einfluss sowohl auf die Klinik als auch die immunologischen Parameter haben könnten (ROBINSON, 2001; DEATON et al., 2006). Dies auszuschließen wäre nur bei einer kompletten Stallhaltung ohne Auslauf möglich und geht an der Zielsetzung der Studie vorbei.

Im Serum konnte man bei Zusammenfassung beider Gruppen den Abfall erst in der letzten Untersuchung erkennen. Betrachtet man die Allergengruppe sowohl im Serum als auch in der Trachealspülprobe jedoch getrennt, gab es keinen signifikanten Abfall der IL-4-Konzentrationen. Dies bedeutet, dass die kombinierte CpG-ODN Inhalation zusammen mit den Allergenen in dieser Studie keinen Hinweis auf einen immunologischen Vorteil im Vergleich zur unspezifischen Monotherapie gezeigt hat. Zu berücksichtigen sind, wie bereits weiter oben diskutiert, eine mögliche zu geringe Allergenkonzentration, eine zu kurze Dauer der Hyposensibilisierung und die Schwierigkeit der Überprüfung der klinischen Relevanz der positiven Testergebnisse der Allergietests (BOUSQUET et al., 1998; SENTI et

al., 2009). Die Ergebnisse können darüber hinaus durchaus als positiv gewertet werden bedenkt man die Schwierigkeit der korrekten Allergenidentifikation (BRUENNLEIN, 2001; GEIBEN, 2003; TRAUB, 2005). Somit steht, unabhängig von den kausalen geographisch sicherlich variierenden Allergenen, eine effektive, im Feld wirksame, allergenunabhängige, inhalative Immuntherapie mit immunologisch nachgewiesenem Langzeiteffekt über mindestens sechs Wochen bei therapieresistenten Pferden mit einer über Jahren chronischen Atemwegserkrankung zur Verfügung.

8. Konzentrationsentwicklung des IL-10

Das IL-10 als ein Vertreter der Treg-Zellen kann als antientzündliches und regulatorisches Zytokin sowohl die Th2- als auch die Th1-Immunantwort hemmen und somit auf klinischer Ebene die Allergie- und die Entzündungssymptome minimieren (TAYLOR et al., 2006; BELLINGHAUSEN et al., 1997). Die verschiedenen CpG-ODN-Klassen sind in der Lage spezielle Treg-Zellen zu aktivieren (unter anderem die CD4+, CD25+ Treg-Zellen) und vermehrt das IL-10 zu sezernieren (MOSEMAN et al., 2004).

Durch die Therapie mit den CpG-ODN sollte die Produktion von IL-10 angekurbelt werden und somit die Konzentration steigen. Auch die ASIT könnte dies bewirken, da in einer Studie bei Katzen mit felinem Asthma durch eine RIT solch ein Effekt nachgewiesen wurde (REINERO et al., 2007). Bei der Allergengruppe kam es in der vorliegenden Studie jedoch zu keiner signifikanten Konzentrationsänderung des IL-10. Dies war ebenfalls in der CpG-Gruppe zu beobachten. Betrachtete man jedoch alle Pferde zusammen, konnte man im Gegensatz zu Ergebnissen aus anderen Studien (KLIER, 2011) sogar als Langzeiteffekt nach sechs Wochen einen signifikanten Abfall der IL-10-Konzentrationen beobachten. Bei einzelnen Pferden stieg die Konzentration zwar an, dies war aber statistisch nicht signifikant. Dass die CpG-ODN in dieser Inhalationsstudie keinen IL-10-Anstieg bewirken konnten, sondern einen Abfall, könnte auf eine insuffiziente IL-10-Antwort hinweisen. Ähnliches wurde bereits bei humanem Asthma festgestellt, bei dem die betroffenen Individuen nicht in der Lage waren IL-10 vermehrt zu produzieren (BORISH et al., 1996). Da die COB einige immunologische Ähnlichkeiten mit dem humanen allergischen Asthma aufweist (unter anderem Typ-I Hypersensitivitätsreaktion), könnte diese eine mögliche Erklärung sein (HALLIWELL et al., 1993; MARTIN, 2001; HOROHOV et al., 2005). KLIER 2011 zeigte auch in seinem in-vitro-Versuch an BAL-Zellen ebenfalls, dass gesunde Pferde im Vergleich zu COB-erkrankten Pferden mehr IL-10 nach CpG-Stimulation sezernierten. Im Gegensatz dazu stiegen jedoch die IL-10-Konzentrationen bei COB-erkrankten Pferden (n = 4) in seinem in-vivo Versuch nach fünf CpG-Inhalationen signifikant an. Es gilt jedoch zu beachten, dass KLIER mit nur vier Pferden eine sehr kleine Patientengruppe getestet hat, sodass er im Gegensatz zu dieser Studie schon mit nur kleinen Veränderungen der IL-10-Konzentrationen durch die Inhalation signifikante Ergebnisse erzielen konnte. Dass in dieser Studie der signifikante Konzentrationsabfall erst in der letzten Probe nach sechs Wochen messbar war zeigt, dass die Reaktion der IL-10-Produktion auf die Inhalation erst sehr spät stattgefunden hat. Man weiß jedoch nicht, wie sich die Konzentrationsveränderungen innerhalb der sechs Wochen bis zur letzten Probenentnahme verhalten haben. Möglicherweise sind sie auch in der Zwischenzeit angestiegen und erst dann wieder abgesunken.

9. Konzentrationsentwicklung des IFN- γ

Das IFN- γ gehört zu den durch Th1-Zellen gebildeten Zytokinen. Das Auftreten des IFN- γ bei der COB ist noch nicht eindeutig geklärt. Teilweise wurde eine vermehrte IFN- γ -Produktion von BAL-Zellen in der akuten Krankheitsphase gemessen (GIGUERE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2003; HOROHOV et al., 2005), ebenso aber auch ein Konzentrationsabfall (LAVOIE et al., 2001; GORDEAU, 2004). Die CpG-ODN sollen die Th2-Immunantwort in Richtung der Th1-Immunantwort verschieben und die IFN- γ -Produktion tendenziell ankurbeln (BOHLE, 2001; KLIER, 2011). Auch eine ASIT bei einer Typ-I Hypersensitivität sollte eine vermehrte IFN- γ -Sekretion bewirken (KOHAMA et al., 1999, BOHLE, 2002; SHIDA et al., 2004; REINERO et al., 2007). Die CpG-ODN als Adjuvants bei einer ASIT können diesen Effekt dann noch verstärken bzw. auch schneller eintreten lassen (JAHN-SCHMID et al., 1999; REINERO et al., 2007; SENTI et al., 2009).

In dieser Studie konnte weder in der Gruppe, die nur mit CpG-ODN behandelt wurden, noch in der ASIT-Gruppe eine signifikant vermehrte IFN- γ -Konzentration in der Trachealspülprobe oder im Serum gemessen werden. Ein Ausbleiben des Anstieges des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ kann unter dem Gesichtspunkt der entzündlichen Pathogenese der Erkrankung als positiv gewertet werden (AARVAK et al., 1999). Der erwartete Th2/Th1-Shift konnte allerdings in der vorliegenden Studie in-vivo nicht nachvollzogen werden. Dass es systemisch zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinmuster gekommen war, ist als positiv zu werten, da eine deutliche systemische Wirkung bei der topischen Anwendung nicht erwünscht war. Insgesamt sanken sogar im Serum die Konzentrationen nach der letzten Inhalation und sechs Wochen nach der letzten Inhalation signifikant ab. In der Trachealspülprobe konnte man ebenso eine Konzentrationsabnahme zwischen der ersten und der letzten Probenentnahme feststellen. Dies spricht für eine Reduktion der entzündlichen Komponente mit einem Langzeiteffekt über sechs Wochen (BOHLE, 2002; TEIXEIRA et al., 2005; TAYLOR et al., 2006; KLIER, 2011).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die gemessenen Zytokine keinen Hinweis darauf ergaben, dass die ASIT kombiniert mit den CpG-ODN einen deutlichen immunologischen Effekt auslösen. Unter Berücksichtigung der komplexen immunologischen Mechanismen und der Schwierigkeit der Identifizierung geeigneter klinisch relevanter Allergene ist dieses Ergebnis als positiv zu werten, da eine immunmodulatorische Monotherapie sich einer deutlich schwieriger durchzuführenden ASIT in dieser Studie als gleichwertig effektiv, bezogen auf die bestimmten Parameter, erwiesen hat. Es lässt sich jedoch letzten Endes nicht eindeutig klären, warum hier die CpG-Therapie die Th1-Immunantwort nicht messbar hochreguliert hat. Lediglich bei neun von 20 (Trachealspülprobe) bzw. 10 von 19 Pferden (Serum) konnte ein geringer, statistisch nicht relevanter Anstieg des IFN- γ direkt zwei Tage nach der letzten Inhalation gemessen werden. Hierbei kann es sich allerdings auch um individuelle Schwankungen handeln. Im Gegensatz dazu konnte KLIER 2011 in seiner Studie einen deutlichen Anstieg der IFN- γ -Konzentration erzielen. Jedoch war seine getestete Patientenzahl mit nur vier Tieren sehr klein. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse in dieser Studie liegt in den unterschiedlichen Ergebnissen anderer Studien, bei denen COB-erkrankte Pferde in der akuten Phase zum Teil sehr unterschiedliche Zytokinprofile aufwiesen (LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002; GIGUERE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2003; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2005). Einige Pferde zeigten, wie bereits erwähnt, nach Allergenprovokation und akuten COB-Symptomen eine erhöhte IFN- γ -Konzentration. Dies würde erklären, warum in dieser Studie die Pferde nach Therapie geringere IFN- γ -Werte aufgewiesen haben als zuvor. Außerdem kann man in der Herunterregulation des Th1-Zytokins einen positiven Effekt sehen, da eine überschießende Th1-Immunantwort auch wieder eine

proinflammatorische Auswirkung hätte. Da einige antiallergische Effekte bereits durch die Unterdrückung der Th2-Immunantwort vorliegen, ist es auch als vorteilhaft zu sehen, dass die IFN- γ -Konzentration nicht angestiegen ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein langfristiger Abfall des proallergischen Th2-Zytokins IL-4 ohne gleichzeitigen Anstieg des proinflammatorischen IFN- γ als ein vielversprechendes Ergebnis einer immunmodulatorischen inhalativen Therapieform der COB zu werten ist. Die dabei nicht oder kaum vorhandenen systemischen Effekte sind als positiv einzustufen, da es sich mit Bedacht um eine topische Therapieform handelt und eine systemische immunologische Wirkung nicht angestrebt wird.

10. Konzentrationsentwicklung des IL-17

Das IL-17 wurde bei dieser Studie untersucht, da es als Th-17-Zytokin chemotaktisch und aktivierend auf die bei der COB maßgeblich vorhandenen und an der Pathogenese entscheidend beteiligten neutrophilen Granulozyten wirkt und auch die Schleimsekretion in den Bronchien anregt (KAWAGUCHI et al., 2004; DEBRUE et al., 2005; AINSWORTH et al., 2006). In dieser Studie wurde es lokal in der Trachealspülprobe mitgemessen. Zu untersuchen war, ob eine mögliche Korrelation mit dem prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen nachzuweisen sei (ROBINSON, 2001; DEBRUE et al., 2005). Es konnte bei den untersuchten Pferden kein einheitlicher Abfall des IL-17 nach den Inhalationen gemessen werden. Auch gab es keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen den Konzentrationsentwicklungen des IL-17 und dem prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS. Es gab in dieser Studie keinen Hinweis darauf, dass das IL-17 durch die CpG-ODN oder durch die Hyposensibilisierungstherapie lokal herunterreguliert werden konnte. Außerdem waren die Ausgangskonzentrationen des IL-17 lokal in der Trachea sehr variabel. Dies deckt sich mit den Erfahrungen der anderen untersuchten Zytokine, bezüglich des lokal sehr variierenden individuellen Zytokinmuster der COB-Pferde (LAVOIE et al., 2001; BOWLES et al., 2002; GIGUERE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2003; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2005), welches vermutlich durch das aktuelle Krankheitsstadium, die geographisch variierenden, individuellen Allergenzusammensetzungen und durch die zugrunde liegenden genetischen Komponenten beeinflusst wird.

11. Therapieerfolg der CpG-ODN Therapie in Kombination mit Allergenen

Die Kombination der CpG-ODN Inhalation zusammen mit zwei spezifisch ausgewählten Allergenen im Sinne einer ASIT hat in dieser Studie keinen Hinweis darauf ergeben, dass dies einen verstärkten Effekt auf immunologischer Ebene im Sinne eines Th2/Th1-Shifts hat. Eine Fragestellung der Studie war es, ob durch die Kombination der beiden inhalativen Komponenten ein stärkerer Effekt als mit der CpG-Monotherapie zu erreichen wäre (BOHLE, 2002; KRIEG, 2006; SENTI et al., 2009; KLIER, 2011). Dies war nicht der Fall. Da es sich hierbei um eine explorative Orientierungsstudie handelte war die Patientenzahl pro Gruppe jedoch verhältnismäßig gering. Bei keinem der gemessenen Zytokine wurde ein signifikanter Anstieg oder Abfall in der Allergengruppe festgestellt. Somit gab es keinen Hinweis, dass die inhalative Hyposensibilisierungstherapie in Kombination mit den CpG-ODN als Adjuvants gegenüber der CpG-Monotherapie immunologisch von Vorteil auf das lokale Immunsystem darstellt. Auch kann die COB nicht nur der Typ-I Hypersensitivitätsreaktion zugeordnet werden, bei welcher die ASIT klassischerweise eingesetzt wird, sondern sie enthält Merkmale von verschiedenen

Hypersensitivitätsreaktionen (LUNN und HOROHOV, 2010).

Des Weiteren könnte es sein, dass die gewählte Dosierung der Allergene und die Dosissteigerung zwischen den einzelnen Inhalationen zu gering gewesen ist, da hier eine niedrige Dosierung gewählt wurde, um mögliche anaphylaktische Überreaktionen oder einen akuten Bronchospasmus der Pferde zu vermeiden (BOUSQUET et al., 1998). In einer Folgestudie könnten hierzu an in-vitro-isolierten BAL-Zellen unterschiedliche Allergenkonzentrationen im Hinblick auf einen Effekt auf die Th2/Th1-Immunantwort bei höheren Allergenkonzentrationen getestet werden.

Außerdem stellt sich die Frage, ob ein anderer Applikationsweg der Allergene wie z.B. eine SCIT möglicherweise einen stärkeren systemischen Effekt auf das Immunsystem hätte, welchen man dann evtl. leichter evaluieren könnte (BOUSQUET et al., 1998). Hierbei geht allerdings der Gedanke der topischen, lokal weitgehend auf die Lunge bezogenen Anwendung zunehmend verloren. Auch wurde aufgrund der möglichen systemischen Nebenwirkungen in dieser Studie eine systemische Applikation abgelehnt, da die Pferde während der Studie in ihrer gewohnten Umwelt waren und nicht stationär in einer Klinik. Somit wäre es deshalb zu risikoreich gewesen, falls es zu anaphylaktischen oder anderen Unverträglichkeitsreaktionen gekommen wäre. Dies ist bei einer lokalen Applikation deutlich besser abzuschätzen.

12. Schlussfolgerung der Ergebnisse

Bisher wurde bei COB-erkrankten Pferden noch keine ASIT durch Inhalation der Allergene und eine anschließende Zytokinbestimmung durchgeführt. Es handelte sich deshalb bei dieser Studie um eine explorative Untersuchung. Es sollte getestet werden, ob ein positiver Effekt auf immunologischer Ebene erreicht werden kann. Allerdings muss beachtet werden, dass durch die Auswahl der Zytokine nur ein kleiner Teil des Immunsystems widerspiegelt wurde. Es gilt auch noch zu testen, ob eine ASIT dieser Art alleine ohne CpG-ODN überhaupt eine relevante Zytokinveränderung bzw. einen Th2/Th1-Shift bewirken kann.

Generell ergab das Messen der Zytokine sehr unterschiedliche Messwerte. Diese festgestellten Divergenzen sowohl der Ausgangskonzentrationen als auch der stark variierenden Veränderungen der Zytokinkonzentrationen sind bedingt durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Einflussfaktoren auf das Immunsystem.

Insbesondere diese festgestellten Divergenzen sind ein Hinweis darauf, dass zum Bestimmen von diesen Zytokinen ein in-vivo Versuch nicht optimal geeignet ist, da zu viele andere Einflussfaktoren das Immunsystem lokal und systemisch beeinflussen. Für klinische Studien, bei denen die klinischen Veränderungen erfasst und beurteilt werden eignet sich ein solcher in-vivo Versuch besser. Für weitere COB-Studien, bei denen die Entwicklung der Zytokinkonzentrationen gemessen werden, sollte deshalb ein in-vitro Versuch an isolierten BAL-Zellen stattfinden, da hier nur rein die CpG-ODN bzw. die Allergene einen Einfluss auf die Zytokinproduktion haben. Auch in der Studie von KLIER 2011 ergaben die in-vitro Untersuchungen im Gegensatz zu der in-vivo Studie eindeutigere Ergebnisse in Hinblick auf die gewünschten Zytokinveränderung. Die Bestimmung der Serumzytokinkonzentrationen erwies sich in dieser Studie auch aus den oben genannten Gründen der komplexen systemischen Vorgänge als nicht zweckmäßig. Auch war die Trachealspülprobe, welche alternativ zur BAL aus organisatorischen Gründen gewählt werden musste, möglicherweise nicht ideal und bei einer BAL wären etwas eindeutigere Messwerte zu erzielen gewesen (KLIER, 2011). In einem weiteren in-vitro Versuch ist es auch einfacher möglich eine größere Probandenzahl in die Studie aufzunehmen.

Eine standardisierte Untersuchung von Explants oder BAL-Zellen im Labor würde

diese Einflussfaktoren deutlich reduzieren, die praktische Übertragbarkeit auf das Pferd im Stallklima wäre damit aber kaum gegeben. Ziel dieser Studie war es jedoch eine immunologische Untersuchung mit allergeninhalierten und CpG-ODN inhalierten COB-Pferden unter ihren natürlichen Haltungsbedingungen mit bewusster Auseinandersetzung der dort vorherrschenden exogenen Einflussfaktoren (Staub, Schadgase, Temperatur, wechselnde Allergenzusammensetzungen usw.) auf ihre klinische Belastbarkeit und praktische Relevanz zu untersuchen.

Ein weiterer Grund warum in dieser Studie die Zytokine nicht die erwarteten Konzentrationsänderungen gezeigt haben, könnte sein, dass die COB eine multifaktorielle Krankheit darstellt (GERBER et al., 2008), bei der es deshalb schwierig ist eine Therapie zu finden, die alle Einflussfaktoren der Krankheit beeinflussen kann. Auch der FIT hat gezeigt, wie bereits bekannt, dass nicht alle Pferde eine klassische Typ-I Überempfindlichkeit gegenüber bestimmten Allergenen haben und somit möglicherweise bei diesen Probanden andere Immunreaktionen (Typ-III, -IV) oder möglicherweise auch nur nichtallergene Komponenten eine Rolle spielen.

Da man nicht bei allen Zytokinen direkt zwei Tage nach siebenmaliger Inhalationstherapie eine signifikante Konzentrationsänderung feststellen konnte, könnte man in weiteren Studien die Inhalation über einen längeren Zeitraum und mit evtl. höheren CpG-ODN-Dosen durchführen, auch eine größere Probandenzahl wäre sinnvoll um statistisch aussagekräftigere Informationen zu erhalten. Lediglich das IL-4 zeigte nach der Therapie eine signifikante Reduktion. Die Probenentnahme nach sechs Wochen ergab, dass es bei allen Zytokinen zu einer signifikanten Veränderung entweder im Vergleich zum Ausgangswert oder zum Wert nach der letzten Inhalation kam. Es konnte somit in dieser Studie gezeigt werden, dass die Inhalation eindeutig einen Effekt auf immunologischer Ebene erzielt hat. Man weiß hier jedoch nicht, wie sich die Zytokine innerhalb dieser sechs Wochen verändert haben und ob es sich wirklich um einen nachhaltigen Langzeiteffekt der Inhalationstherapie handelt. Es könnte möglich sein, dass es nur wenige Tage nach der letzten Inhalation zu anderen Effekten in der Zytokinproduktion gekommen ist, welche man evtl. dann verpasst hat. In weiteren Studien sollte man deshalb noch zusätzlich eine Probenentnahme nach drei oder vier Wochen einplanen, um einen Zwischenwert zu erhalten. Der Mehrwert dieser Information sollte allerdings die damit einhergehende zusätzliche Belastung der Patienten deutlich übersteigen.

VI Zusammenfassung

Ziel dieser in-vivo-Studie war es, den Einfluss einer CpG-ODN-Inhalation zusammen mit spezifisch ausgewählten Allergenen als lokale Hyposensibilisierung bei COB-erkrankten Pferden mit einer reinen CpG-ODN-Inhalation auf immunologischer Ebene explorativ zu vergleichen. Die Allergeninhalation sollte im Sinne einer lokalen Hyposensibilisierung (ASIT) durchgeführt werden, da die COB des Pferdes viele Merkmale einer Typ-I Hypersensitivitätsreaktion aufweist. Der Einsatz zusammen mit den CpG-ODN als Adjuvants hat bei anderen Hyposensibilisierungstherapien bereits Erfolge erzielt, wurde jedoch bei COB-erkrankten Pferden noch nicht getestet. Es sollte untersucht werden, ob die kombinierte ASIT-CpG-ODN-Therapie einen deutlicheren immunologischen Effekt bewirken könnte als die alleinigen CPG-ODN-Anwendung. Des Weiteren sollte gezeigt werden, ob die Therapie auch einen Langzeiteffekt nach Beendigung der Inhalation induzieren kann. Es gab bereits Studien, in denen die Wirkung und die Verträglichkeit der CpG-ODN A 2216 bei COB-erkrankten Pferden nachgewiesen wurde. Die Inhalation wurde im Unterschied zu vorrangegangenen Studien häufiger durchgeführt und die Patienten wurden sechs Wochen nach Therapieende erneut auf einen Langzeiteffekt hin untersucht.

Es wurden insgesamt 20 mittelgradig an COB erkrankte Pferde in diese Studie aufgenommen. Bei allen Probanden wurde unmittelbar vor Studienbeginn ein Allergietest (FIT) durchgeführt, um herauszufinden auf welche Allergene die Pferde sensibel reagierten. Bis auf drei Pferde reagierten alle auf mehrere Allergene, insbesondere auf die Milben (Hausstaubmilbe, Heumilbe, Mehlmilbe) und Schimmelpilzantigene positiv. Auch auf die eher in den Sommermonaten vorkommenden Allergene, wie Gräser und Baumpollen, sowie insbesondere der Raps, reagierten viele Pferde positiv im FIT.

Die Patienten wurden zufällig per Losverfahren in zwei Gruppen eingeteilt. Neun Pferde ließ man lediglich mit den CpG-ODN, gebunden an GNP als Trägersystem, inhalieren und 11 Pferden inhalierten zusätzlich (je nach FIT-Ergebnis) mit zwei spezifisch ausgewählte Allergene. Die Inhalation wurde siebenmalig im Abstand von zwei Tagen durchgeführt. Vor der ersten Inhalation, zwei Tage nach der letzten Inhalation und nach weiteren sechs Wochen wurden Serum- und Trachealspülproben zur Bestimmung des Zytokinstatus entnommen.

Mittels ELISA wurden in den Proben die Zytokine IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-17 quantitativ bestimmt. Wobei das IL-17 lediglich in der Trachealspülprobe untersucht wurde.

Man konnte bei keinem der gemessenen Zytokine einen signifikanten Effekt durch die zusätzliche Allergeninhalation nachweisen. Somit gaben die untersuchten Parameter keinen Hinweis darauf, dass die lokale Hyposensibilisierung auf immunologischer Ebene einen stärkeren Einfluss auf die COB hat als die Monotherapie mit CpG-ODN.

IL-4 wurde insgesamt signifikant herunterreguliert. In der Trachealspülprobe lag der Median des Konzentrationsabfalls von Beginn der Studie bis sechs Wochen nach der Inhalation bei 14 von 20 Pferden bei 49,7 %. Im Serum konnte man erst in der letzten Probe nach sechs Wochen einen signifikanten Abfall der Konzentration messen. Dieser lag ebenfalls bei 14 von 20 Pferden vor, war aber im Median mit 17,4 % eher niedrig. Eine Hochregulation des Th1-Zytokins IFN- γ und des regulatorischen IL-10 war nicht zu erkennen. Beide Zytokinkonzentrationen sanken im Verlauf der Untersuchungen mehr oder weniger stark ab. Der Abfall war bei beiden Zytokinen erst nach sechs Wochen zu verzeichnen. Beim IL-10 konnte man in der lokalen Trachealspülprobe keine einheitliche Entwicklung der Expression erkennen. Bei der Konzentrationsentwicklung des IL-17 war ebenfalls kein einheitlicher Abfall zu erkennen. Eine Korrelation mit dem prozentualen Anteil der

neutrophilen Granulozyten im TBS lag nicht vor.

Das entscheidende Ergebnis dieser Studie ist, dass eine immunologische Langzeitwirkung über mindestens sechs Wochen nach verhältnismäßig wenigen Inhalationen im Vergleich zu herkömmlichen inhalativen Therapieverfahren (z.B. mit Kortison oder einem Bronchodilatator) ohne weiterführende Therapie oder Haltungsveränderungen durch die Inhalation mit den CpG-ODN nachgewiesen werden konnte.

In weiterführenden Studien könnten die immunologischen Einflüsse der CpG-ODN A 2216 Inhalation an in-vitro isolierten BAL-Zellen von COB-erkrankten Pferden und an einer größeren Probandenzahl durchgeführt werden, um statistisch mehr Messwerte auswerten zu können. Der Erfolg einer ASIT mittels Inhalation bei COB-Pferden könnte alleine ohne CpG-Therapie überprüft werden, wobei hier zuerst in einer Dosis-Wirkungsstudie die optimale Allergenkonzentration zu ermitteln wäre. Auch eine Steigerung der Allergenkonzentration könnte in Erwägung gezogen werden. Hier würde sich evtl. ein anderer Verabreichungsweg empfehlen um der Gefahr eines Bronchospasmus zu vermeiden. Zu bedenken bleibt dabei nach wie vor die Schwierigkeit der Auswahl relevanter Allergene. Darüber hinaus ist eine Dosis-Wirkungsstudie der CpG-ODN-Inhalation ein sinnvolles Studienkonzept um die optimale Inhalationskonzentration herauszufinden. In Folgestudien können weiterführende Untersuchungen zum Inhalationsintervall und der Inhalationsdauer die Effektivität der inhalativen CpG-ODN-Anwendung verbessern.

VII Summary

Specific cytokine determination in tracheal lavage samples and in the serum of COB-affected horses after inhalative immunotherapy with nanoparticulate bound CpG-ODN and specific allergens

The aim of this in-vivo study was to exploratively compare the immunologic effect of a CpG-ODN-inhalation combined with specific selected allergens as a local hypo-sensitisation on COB-affected horses with a CpG-ODN-inhalation alone. The allergen inhalation should be executed in the sense of a local hypo-sensitisation (ASIT), because the COB of the horses has numerous characteristics of a type-I hypersensitivity reaction. The application together with the CpG-ODN as adjuvants has already led to successes in other hypo-sensitisations. But until now it was not tested on COB-diseased horses. In this study it should be investigated whether the combined ASIT-CpG-ODN therapy caused a more marked immunologic effect than the only CpG-ODN-application. Furthermore it should be shown whether the therapy could induce a long term effect after ceasing the inhalation. There were already some studies in which the effect and the tolerance of the CpG-ODN- A 2216 were established on COB-affected horses. In contrast to foreign studies the patients were subjected to inhalation therapy more frequently and were examined again after six weeks to determine a long term effect.

In total, 20 moderately COB-affected horses were included in this study. Immediately before the beginning of the study an allergy test (FIT) was carried out on all probands to determine to which allergens the horses reacted sensible. All except three horses reacted positive to several allergens, in particular to mites (dust mite, hay mite, flour mite) and mould antigens. In the FIT some patients reacted even sensitive to the allergens which are found more likely in the summer months, like various pollen of grasses, trees and rape. With a random selection the patients were divided into two groups. Nine horses were only inhaled with the CpG-ODN bound to gelatin nanoparticles as transport medium and eleven horses were, in addition to that, inhaled with two specific selected allergens (dependent on the results of the FIT). The probands were inhaled seven times in an interval of two days. Before the first time of inhalation, two days after the last inhalation and after another six weeks, serum and tracheal wash samples were taken to determine the levels of the different cytokines. By means of ELISA the cytokines IL-4, IL-10, IFN- γ and IL-17 were quantified in the samples. Whereas the IL-17 was quantified only in the tracheal wash samples.

For none of the measured cytokines a significant effect of the additionally inhaled allergens could be proven. Therefore the investigated parameters gave no indication that the local hyposensitisation on the immunological level had a better effect on the COB than the mono therapy with CpG-ODN. The IL-4 was significantly regulated down in total. Before the beginning of the study and until six weeks after in the tracheal lavage sample the median decrease of concentration with 14 of 20 horses lay around 49,7 %. In the serum a significant decrease of concentration could only be measured in the last sample after six weeks. This decrease of concentration was also present on 14 of 20 horses, but with a median of 17,4 % relatively low. An up-regulation of the Th-1-cytokine IFN- γ and the regulatory IL-10 could not be seen. During the examination period concentrations of both cytokines dropped more or less drastically. The decrease on both cytokines could only be reported after six weeks. A uniform development of the IL-10 expression in the tracheal lavage sample could not be seen. Also on the development of the concentration of the IL-17 no uniform decrease could be seen. There was no correlation with the percentage part of the neutrophil granulocytes in the TBS.

The key result of the study is, that an immunological long-term effect over at least six weeks with relatively few inhalations compared to conventional inhalative therapy methods (e.g. cortisone or bronchodilators) without further therapy or change in keeping conditions could be proven by inhalation with the CpG-ODN.

During further studies the immunological effect of the CpG-ODN A 2216 inhalation could be tested on in-vitro-isolated BAL-cells of COB-affected horses and on a larger amount of probands to evaluate more measured values statistically. The success of an ASIT on COB-affected horses using inhalation could be proven by itself without CpG-therapy by doing dose response studies at first to evaluate the optimal concentration of the allergen. Also an increase of concentration of the allergen could be considered. Therefore a different way of application would be advised to avoid the risk of an acute bronchospasm. The difficulty to choose the relevant allergens must still be kept in mind. Furthermore a dose response study of the CpG-ODN-inhalation will be an optimal study concept to find out the right concentration of the allergens. In separate studies further research could improve the effectiveness of the interval and the duration of inhalations of the inhalative CpG-ODN application.

VIII Literaturverzeichnis

Ainsworth DM, Appleton JA, Antczak DF, Santiago MA, Aviza G (2002): IgG antibody responses to an inhaled antigen in horses with "heaves" (recurrent airway obstruction). *Vet Immunol Immunopathol*, 84 (3-4): 169–180.

Ainsworth DM, Grünig G, Matychak MB, Young J, Wagner B, Erb HN, Antczak DF (2003): Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 96: 83-91.

Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grunig G, Erb HN, Tan J-Y (2006): Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 67 (4): 669–677.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B and Blaser K (1998): Role of Interleukin 10 in Specific Immunotherapy. *J Clin Invest*, 102 (1): 98–106.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801.

Aarvak T, Chabaud M, Miossec P and Natvig JB (1999): IL-17 Is Produced by Some Proinflammatory Th1/Th0 Cells But Not by Th2 Cells. *J Immunol*, 162:1246-1251.

Akkoc T, Akdis M und Akdis CA (2011): Update in the Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res*, 3 (1): 11–20.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC (2002): DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*, 59 (2): 241-57.

Beadle RE, Horohov DW, Gaunt SD (2002): Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses. *Equine Vet J* 2002, 34 (4): 389-94.

Beeler-Marfisi J, Clark ME, Wen X, Sears W, Huber L, Ackerley C, Viel L, Bienzle D (2010): Experimental induction of recurrent airway obstruction with inhaled fungal spores, lipopolysaccharide, and silica microspheres in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 71 (6): 682-689.

Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J (1997): Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*, 27: 1131-1139.

Bohle B (2002): CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*, 129: 198-203.

Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S (1996): Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 97 (6): 1288-1296.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Panel Members: Alvarez-Cuesta E, Canonica GW (1998): Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *World Health Paper*, 81: 401-405.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M and Vignola AM (2000): Asthma - From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. Am J Respir Crit Care Med. 16: 1720–1745.

Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW (2002): A novel model for equine recurrent airway obstruction. Veterinary Immunology and Immunopathology, 87: 385-389.

Bruennlein, G (2001): Funktioneller in-vitro-Test (FIT) für Typ I-Allergien beim Pferd. Tierärztl. Hochschule Hannover, Dissertation.

Coester C, Nayyar P, Samuel JH (2006): In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localization. Eur J Pharm Biopharm, 62 (3): 306-14.

Coley W (1991): The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases 1893. Clin Orthop Relat Res, 262: 3-11.

Coombs SL, Webbon PM (1986): Tracheal mucus transport in the horse following equine influenza vaccination. Vet Rec, 119 (24): 601-602.

Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie JP (2004): IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA-expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. Vet Immunol Immunopathol, 97: 87-96.

Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, Lavoie J-P (2007): ACVIM Consensus Statement: Inflammatory Airway Disease of Horses. J Vet Intern Med, 21: 356-361.

Cox JC and Coulter AR (1997): Adjuvants-a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15 (3): 246-256.

Deaton CM, Deaton L, Jose-Cunilleras E, Vincent TL, Baird, AW, Dacre K, Marlin DJ (2006): Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse (3). J Appl Physiol 102: 1071–1077.

Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP (2005): Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. Vet Immunol Immunopathol, 105: 25-31.

Deegen E und Klein H-J (1987): Interpleuraldruck- Interpleuraldruckmessung und Bronchospasmodysetest mit einem transportablen Ösophagusdruckmessgerät beim Pferd. Pferdeheilkunde 3, 213-221.

Derksen FJ, Scott JS, Miller DC, Slocombe RF, Robinson NE (1985): Bronchoalveolar lavage in ponies with Recurrent Airway Obstruction (Heaves). Am Rev Respir Dis, 132: 1066-1070.

Derksen FJ, Robinson NE, Scott JS, Stick JA (1988): Aerosolized Micropolyspora faeni antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). Am J Vet Res, 49 (6): 933–938.

Dixon PM, Railton DI, McGorum BC (1995): Equine pulmonary disease: a case

control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine Vet J*, 27 (6): 422-427.

Dütsch G (2008): Analyse von Asthma-Kandidatengenenen in der humanen chromosomalen Region 12q. Dissertation der naturwissenschaftlichen Universität Regensburg: 1-182.

Fenner A, Otto B (2002): Die obstruktive Bronchitis beim Pferd. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH. Aktualisierte Auflage: 4-13.

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

Fey K, Ohnesorge B (2009): Alles Routine oder doch Herausforderung? Diagnostik und Therapie chronischer Atemwegserkrankungen. Vortragsheft, Fortbildungsveranstaltung 2009, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH.

Frew AJ (2010): Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 125: 306-213.

Franchini M, Gill U, Fellenberg R, Bracher VD von (2000): Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res*, 61 (11): 1369-74.

Gehlen H, Niedermaier G, May A (2009): Was bringt die Röntgen- und Ultraschalluntersuchung bei Lungenerkrankungen des Pferdes? *Pferdeheilkunde*, 25: 288-301.

Gehlen H, May A (2011): COB-chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes. *CVE Pferd*, Veterinär-Verlag.

Geiben T (2003): Untersuchungen zum Sommerekzem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N ® auf die Typ-I Allergie der Pferde. Tierärztl. Hochschule Hannover, Dissertation.

Gell PGH u. Coombs RPA (1968): Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity disease. In: *Gell PGH u. Coombs RPA* (Hrsg.): *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications, 575–557.

Gerber V, Swinburne JE, Blott SC, Nussbaumer P, Ramseyer A (2008): Genetik der rezidivierenden Atemwegsobstruktion. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 115 (7): 271–275.

Gerber V, Ramseyer A, Laumen E, Nussbaumer P, Klukowska-Rötzler J, Swinburne JE, Marti E, Leeb T, Dolf G (2009): Genetics of equine RAO. Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Pabst Science Publishers: 34-36.

Gessner A, Mohrs K and Mohrs M (2005): Mast Cells, Basophils and Eosinophils Acquire Constitutive IL-4 and IL-13 Transcripts during Lineage Differentiation That Are Sufficient for Rapid Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 174: 1063-1072.

Giguère S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M (2002): Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with

inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol*, 85: 147-158.

Gonsior E, Henzgen M, Jörres RA, Kroidl RF, Merget R, Riffelmann F-W, Wallenstein G (2002): Leitlinien für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit Allergenen. *Pneumologie*, Thieme Verlag: 187-198.

Grabner A (2005a): Tracheobronchialsekret-Zytologie und bronchoalveoläre Lavage beim Pferd. In: *Kraft W, Dürr UM* (Herausgeber): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin* (sechste Auflage), Schattauer: 324-330.

Grabner A (2005b): Arterielle Blutgasanalyse. In: *Kraft W, Dürr UM* (Herausgeber): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin* (sechste Auflage), Schattauer: 429-430.

Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H (2008): The DNA sugar backbone 2`deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28: 315-323.

Halliwell REW, McGorum BC, Irving P, Dixon PM (1993): Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 38: 201-215.

Hoelzer, K, Shackelton Laura A, Parrish CR (2008): Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res*, 36 (9): 2825–2837.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD (1999): The role of allergy in the development of asthma. *Nature* (London), 402: B12-17.

Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS (2005): Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*, 108: 237-245.

Horohov DW, Mills WR, Gluck M (2009): Specific and innate immunity in the lung as it relates to equine RAO. *Tessier C, Gerber V* (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS), Pabst Science Publishers: 106-108.

Iwakura Y and Ishigame H (2006): The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (5): 1218-1221.

Jahn-Schmid B, Wiedermann U, Bohle B, Repa A, Kraft D, Ebner C (1999): Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 104 (5): 1015-23.

Kaul S (1998): Typ I–Allergien beim Pferd: prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in vitro–Nachweises. *Tierärztl. Hochsch. Hannover, Dissertation*: 1-144.

Kaup FJ, Drommer W and Deegen E (1990a): Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Alterations of the larger conducting airways. *Equine vet J*, 22: 343-348.

Kaup F-J, Drommer W, Damsch S and Deegen E (1990b): Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region.

Equine vet J, 22: 349-355.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S-K (2004): IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*, 114 (6): 1265-1272.

Klier J (2011): Neuer Therapieansatz zur Behandlung der COB des Pferdes durch Immunstimulation von BAL-Zellen mit verschiedenen CpG-Klassen. Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation: 1-143.

Klier J, May A, Fuchs S, Schillinger U, Plank C Winter G et al. (2011): Immunostimulation of bronchoalveolar lavage cells from recurrent airway obstruction-affected horses by different CpG-classes bound to gelatin nanoparticles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144: 79–87.

Klier J, Fuchs S, May A, Schillinger U, Plank C, Winter G et al. (2012): A Nebulized Gelatin Nanoparticle-Based CpG Formulation is Effective in Immunotherapy of Allergic Horses. *Pharm Res*, 29: 1650–1657.

Kline JN, Waldschmidt TJ (1998): Modulation of Airway Inflammation by CpG Oligodeoxynucleotides in a Murine Model of Asthma. *J Immunol*, 160: 2555-2559.

Kline JN (2007): Immunotherapy of asthma using CpG Oligodeoxynucleotides. *Immunol Res*, 39: 279-286.

Kohama Y, Akizuki O, Hagihara K, Yamada E, Yamamoto H (1999): Immunostimulatory oligodeoxynucleotide induces TH1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 1231–1238.

Kolls JK, Lindén A (2004): Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity Cell Press*, 21: 467–476.

Kraft AM (1987): Management of chronic obstructive lung disease. *Tierärztliche Praxis Suppl*, 2: 24-32.

Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374: 546-549.

Krieg AM (2001): Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine*, 19: 618–622.

Krieg AM (2002): CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 20: 709–760.

Krieg AM (2006): Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev*, 5: 471–484.

Künzle, F, Gerber, V, van der Haegen A, Wampfler, B, Straub, R, Marti, E (2007): IgE-bearing Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Allergen-specific IgE Levels in Sera from RAO-affected Horses. *J Vet Med Series A*, 54 (1): 40–47.

Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA (2001): Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 1410-1413.

Lavoie JP (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16-18 June 2000: Antibody and cytokine profiles: Equine Veterinary Journal, 33 (1): 11.

Lavoie JP (2007): Recurrent Airway Obstruction (Heaves) and Summer-pasture-associated Obstructive Pulmonary Disease: Equine respiratory medicine and surgery, 41: 565–589.

Lehmann B (2013): Therapeutischer Nutzen der Anwendung einer CpG-ODN/GNP-Inhalationslösung zur Behandlung der COB-Erkrankung des Pferdes : Eine klinische Feldstudie, einschließlich der Erhebung allgemeiner statistischer Daten zur COB-Erkrankung in Deutschland anhand eines Fragebogens. Tierärztliche Fakultät der FU Berlin, Dissertation.

Leibold W (2003): Allergien bei Pferden: Symptome, Mechanismen, Diagnostik und Therapeutische Möglichkeiten. 15. Tagung über Pferdekrankheiten, Seminar über Praxismanagement, Equitana 15: 92–93.

Link B, Ballas Z, Weisdorf D, Wooldridge JE, Shannon M, Rasmussen W, Krieg A, Weiner G (2006): Oligodeoxynucleotide CPG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin's lymphoma. J Immunother, 29: 558–568.

Loewenstein C, Mueller RS (2009): A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. ESVD and ACVD 20: 84–98.

Lunn P, Horohov D (2010): The equine immune system. Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (Herausgeber): Equine internal medicine (dritte Auflage), Saunders Elsevier: 2-56.

May A und Gehlen H (2009): Durchführung, Analyse und Aussagekraft von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei Pferden mit Lungenerkrankungen. Pferdeheilkunde 25 (4): 310-320.

Marti E (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16-18 June 2000: Genetics of equine chronic airway disease. Equine Veterinary Journal, 33 (1): 9-10.

Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J and Lazary S (1991): The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. Equine vet. J, 23: 457-460.

Marti E (2009): Role of IgE and perspectives on clinical allergy testing. Tessier C, Gerber V: 4th World Equine Airways Symposium (WEAS), Bern, Switzerland, Lengerich: Pabst Science Publishers: 109-111.

Martin J (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16–18 June 2000: Human asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Equine Veterinary Journal, 33: 5-6.

McGorum BC, Ellison J, Cullen RT (1998): Total and respirable airborne dust endotoxin concentration in three equine management systems. Equine Vet J, 30 (5): 430-434.

McGorum, BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993): Responses of horses affected with

chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J*, 25 (4): 261–267.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993): Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Vet Immunol Immunopathol*, 36 (3): 207–222.

McGorum BC, Dixon PM (1993): Evaluation of local endobronchial antigen challenges in the investigation of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J*, 25 (4): 269–272.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993): Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural (hay and straw) challenges: *Vet Immunol Immunopathol*, 36 (3): 223-237.

McPherson EA, Thomson JR (1983): Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: Nature of the disease. *Equine Vet J*, 15: 203-206.

Meurer DG, Wolf S (2006): *Allgemeine Pathologie: Kompendium für die Veterinärmedizin*. Schattauer Verlag, 161-172.

Miller AC, Rashid M, Elamin M (2007): The “T” in Trauma: the Helper T-cell Response and the Role of Immunomodulation in Trauma and Burn Patients (6). *J Trauma*, 63: 1407–1417.

Moran G, Folch H (2011): Recurrent airway obstruction in horses – an allergic inflammation: a review. *Veterinari Medicina*, 56 (1): 1–13.

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltzis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, Blazar BR, Chen W (2004): Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+ CD 25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 173: 4433-4442.

Mosmann TR and Sad S (2003): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Review Immunology Today*, 17 (3): 138-146.

Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA (2004): Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release*, 97: 1-17.

Niedermaier G, Gehlen H (2009): Möglichkeiten der Inhalationstherapie zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde*, 25: 327-332.

O’Garra A (1998): Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8: 275-283.

Olbrich AR, Schimmer S, Heeg K, Schepers K, Schumacher TN, Dittmer U (2002): Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J Virol*, 76: 11397–11404.

Pietra M, Cinotti S, Ducci A, Giunti M, Peli A (2011): Time-dependent changes of cytokines mRNA in bronchoalveolar lavage fluid from symptomatic Recurrent Airway

- Obstruction-affected horses. Polish Journal of Veterinary Sciences, 14 (3): 343-351.
- Pirie RS, Collie DDS, Dixon PM, McGorum BC* (2002): Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. Equine Vet J, 34 (4): 337–342.
- Pirie RS, Dixon PM Collie DD McGorum BC* (2003): Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). Clin Exp Allergy, 33 (9):1289-1296.
- Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Little-van den Hurk S* (2001): CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 11: 333-340.
- Rajan TV* (2003): The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. Trends in Immunology, 24 (7): 376–379.
- Reinero CR, Cohn LA, Delgado C, Spinka CM, Schooley EK, DeClue AE* (2008): Adjuvanted rush immunotherapy using CpG oligodeoxynucleotides in experimental feline allergic asthma. Veterinary Immunology and Immunopathology, 121: 241–250.
- Riihimäki M, Raine A, Art T, Lekeux P, Couëtil L, Pringle J* (2008): Partial divergence of cytokine mRNA expression in bronchial tissues compared to bronchoalveolar lavage cells in horses with recurrent airway obstruction (3-4). Veterinary Immunology and Immunopathology, 122: 256–264.
- Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA and Büchner-Maxwell VA* (1996): The Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease of Horse. British veterinary journal, 152: 283-306.
- Robinson NE* (2000): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16–18 June 2000, Equine Veterinary Journal, 33: 5.
- Robinson NE, Derksen FJ, Jackson CA, Peroni D, Gerber V* (2001): Management of heaves. Equine vet Educ, 13 (5): 247-259.
- Robinson NE* (2001): Recurrent airway obstruction (Heaves). Lekeux P. (Hrg), Equine Respiratory Diseases, International Veterinary Information Service.
- Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, Berney C, Peroni D, Derksen FJ* (2002): Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. Equine Vet J, 34 (1): 17-22.
- Rohwer J, Kobelt C, Leibold W* (2008): Aspekte zur Prävalenz und Persistenz des Sommerkeuzems beim Pferd: Vergleichende Betrachtung von klinischer Ausprägung und zellulärer Allergiediagnostik in vitro: Pferdeheilkunde, 24 (3): 411-418.
- Romagnani S* (1994): Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States. Annu. Rev Immunol, 12: 227-257.
- Rush BR, Hoskinson JJ, Davis EG, Matson CJ und Hakala JE* (1999): Pulmonary distribution of radioaerosol in horses with heaves after inhalation of single-dose albuterol sulfate. Am J Vet Res, 60: 764-769.

Rush BR, Raub ES, Thomsen MM, Davis EG, Matson CJ, Hakala JE (2000): Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc* 1, 217 (3): 359-364.

Sands H, Gorey-Feret LJ, Cocuzza AJ, Hobbs FW, Chidester D, Trainor GL (1994): Biodistribution and metabolism of internally ³H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Mol Pharmacol*, 45 (5): 932-943.

Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HHL, Dixon PM, Halliwell REW, McGorum BC, Cramer R, Miller HRP (1998): Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol*, 66: 245-256.

Schneberger D, Caldwell S, Singh SS, Singh B (2009): Expression of Toll-Like Receptor 9 in Horse Lungs. *Anat Rec*, 292: 1068-1077.

Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Müller P, Pfister T, Maurer P, Bachmann MF, Graf N, Kündig TM (2009): Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy*, 39: 562-570.

Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T (2004): Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 19–31.

Simonen-Jokinen T, Pirie RS, McGorum B, Maisi P (2005): Dose responses to inhalation of endotoxin, hay dust suspension and *Aspergillus fumigatus* extract in horses as measured by levels and activation of matrix metalloproteinase-9. *Equine vet J*, 37 (2): 155-160.

Slocombe R (2001): Pathology of the airways. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University 16–18 June 2000, *Equine Veterinary Journal*, 33: 6-7.

Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF (2004): Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol*, 172: 1777-1785.

Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA (2006): Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 117: 433–442.

Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, Viola JPB (2005): The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 137-144.

Traub PM (2005): Klinische und immunologische Untersuchungen zur Ausprägung der Chronisch Obstruktiven Bronchitis des Pferdes: Gibt es Hinweise auf eine hyperreagible und eine dyskrinische Form? *Tierärztl. Hochsch. Hannover*, Dissertation: 1-213.

Tremblay GM, Ferland, Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y (1993): Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses.

EquineVet J, 25 (3): 194-197.

Tseng C-L, Yueh-Hsiu W-S, Wang W-H, Peng C-L, Lin F-H, Lin C-C, Young T-H, Shieh M-J (2008): Targeting efficiency and biodistribution of biotinylated-EGF-conjugated gelatine nanoparticles administered via aerosol delivery in nude mice with lung cancer. *Biomaterials*, 29: 3014-3022.

Vollmer J, Krieg AM (2009): Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 195-204.

Wagner B, Burton A, Ainsworth D (2010): Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory T R 1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res*, 41 (4): 47.

Weiner GJ (2000): The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol*, 68: 455-463.

Wilson KD, de Jong SD, Tam YK (2009): Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 233-242.

Woods PS, Robinson NE Swanson MC Reed CE Broadstone RV Derksen FJ (1993): Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J*, 25 (3): 208-2013.

Zwioerek K, Bourquin C, Battiany J, Winter G, Endres S, Hartmann G, Coester C (2008): Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res*, 25: 551-562.

IX Anhang

1. Anamnesebogen


| |
|---|
| <p>Ist eine familiäre Prädisposition bekannt? _____</p> <p>Durch welche Untersuchungsmethoden wurde COB diagnostiziert und welche Therapie wurde eingeleitet? _____</p> <p>_____</p> <p>Welche Therapie war am effektivsten? _____</p> <p>_____</p> <p>Braucht das Pferde dauerhaft Medikamente? _____</p> <p>_____</p> <p>Kann das Pferd voll eingesetzt werden oder besteht eine Leistungsminderung? _____</p> <p>_____</p> <p>Hat sich die Erkrankung in den letzten Jahren verschlechtert? _____</p> <p>Wurde alternative Medizin eingesetzt? Mit welchem Erfolg? _____</p> <p>_____</p> <p>Wie wurde die Haltung optimiert? _____</p> <p>Wurde eine Verschlechterung seit Ausbruch der Krankheit beobachtet? _____</p> <p>_____</p> <p>Ist der Besitzer mit dem aktuellen Zustand zufrieden? _____</p> <p>Wurde die Krankheit schon beim Kauf diagnostiziert? _____</p> <p>Würden sie wieder ein COB krankes Pferd kaufen? _____</p> |
|---|

2. FIT Ergebnis

Beispielhaft ist hier das Ergebnis eines FIT dargestellt:

03-08-12 10:22 IMMUNOLOGIE TIHO ->0089394272 ECM S. 1

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
University of Veterinary Medicine Hannover



Arbeitsgruppe Immunologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Burkhard Kleinstecke
apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel. +49 511 856-7382/7383 (Diagnostik)
Fax +49 511 856-7682
immune@tiho-hannover.de

Dr. med. vet. John Klier
Klinik für Pferde der LMU
Veterinärstr. 13
80539 München

Befundmitteilung Diag-Nr. 1005324 Hannover, 03.08.2012

Patient: Tinker, Wallach, "Tom"
Besitzer:
Entnahme: 24.07.2012 Eingang: 25.07.2012

Sehr geehrte Frau Kollegin, sehr geehrter Herr Kollege,
das eingesandte Untersuchungsmaterial Ihres Patienten wurde am 25.07.2012
in einem funktionellen Allergietest (FIT) untersucht.

| Allergene | Ergebnis | Allergene | Ergebnis |
|---------------------|-------------|------------------------|-------------|
| Gräser-Mix (Pollen) | negativ | Haselnuss | negativ |
| Spätpollen-Mix | negativ | Reps | positiv 1 + |
| Schimmelpilz-Mix | positiv 2 + | Milben (Lep. destr.) | negativ |
| Gräser-Mix (Korn) | negativ | Milben (Derm. pteron.) | negativ |
| Baum-Mix (früh) | negativ | Milben (Acarus siro) | positiv 1 + |
| Baum-Mix (spät) | negativ | | |
| Birke | negativ | | |

Das Ergebnis dokumentiert den aktuellen funktionellen Sensibilisierungsgrad (aktuelle Reaktionsbereitschaft) der basophilen Granulozyten in der untersuchten Blutprobe.
Ein negatives Ergebnis macht eine allergische Typ I-Reaktion gegen die hier geprüfte(n) Allergenpräparation(en) sehr unwahrscheinlich. Ein eindeutig (1+) bis höchstgradig (4+) positives Ergebnis spricht für eine funktionell deutlich ausreichende bis höchstgradige Typ I-allergische Reaktionsbereitschaft gegen die hier eingesetzte(n) Allergenpräparation(en). Dies schließt auch Allergene von Insekten ein, die hier nicht vorkommen (z.B. Feuerameise) oder vermutlich keine direkten Verursacher der Symptome sind (z.B. Motte o. Eintagsfliege). Sie enthalten jedoch kreuzreagierende Allergene gegen hierauf allergieauslösende Insekten und werden zur Verbesserung der Diagnostik hier mituntersucht, solange keine definierten Allergene verfügbar sind. Diese Reaktionsbereitschaft kann bei Vorliegen hinreichender Mengen entsprechender Allergene am Ort sensibler Zellen zur klinischen Ausprägung einer Typ I-Allergie führen, muss aber nicht, wenn ausreichend potente Kontrollmechanismen wirksam werden. Mit 0,5+ bezeichnete Ergebnisse geben grenzwertig positive Reaktionen wieder, die von fraglicher biologischer Bedeutung sind.

Mit freundlichen Grüßen
Prof. Dr. med. vet. Hans-Joachim Schuberth

H. A. Rabe
www.tiho-hannover.de

3. Lungenscoringsystem

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

| Parameter | | Punkte | |
|--|---|---|---|
| p _a O ₂ in mmHg | > 95 | 0 | |
| | 90 – 95 | 1 | |
| | 80 – 90 | 2 | |
| | 65 – 80 | 3 | |
| | < 65 | 4 | |
| p _a CO ₂ in mmHg | ≤ 45 | 0 | |
| | > 45 | 2 | |
| A-aDO ₂ in mmHg | < 10 | 0 | |
| | 10 – 15 | 1 | |
| | 15 – 25 | 2 | |
| | > 25 | 3 | |
| ΔPpl max in cm H ₂ O | < 4,6 | 0 | |
| | 4,6 – 12,5 | 1 | |
| | 12,5 - 20,3 | 2 | |
| | > 20,3 | 3 | |
| Trachealsekretmenge | Scoring nach GERBER et al. | | |
| | < 1 | kein Sekret erkennbar | 0 |
| | 1 < 2 | kleine, vereinzelte Sekretflocken | 1 |
| | 2 < 3 | größere Sekretflocken, schmale unterbrochene Sekretstraße | 2 |
| | 3 ≤ 4 | durchgehende Sekretstraße | 3 |
| | > 4 - 5 | Sekretsee, extreme Menge an Sekret | 4 |
| Trachealsekretkonsistenz | serös, flüssig, fließend | 1 | |
| | serös bis viskös, nicht fließend | 2 | |
| | hochviskös, zäh | 3 | |
| Schleimhautschwellung | keine Schleimhautschwellung | 0 | |
| | ggr. bis mgr. Schwellung der <i>Bifurcatio tracheae</i> | 1 | |
| | hgr. Schwellung der <i>Bifurcatio tracheae</i> , kaum zu erkennende Trachealspangen | 2 | |

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

Einteilung anhand der Summer der erreichten Punktzahl in vier Erkrankungsgrade:

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

4. Verwendete Reagenzien, Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien

4.1 Verwendete Reagenzien

| | |
|--|--|
| Albumine from bovine serum | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Artuветrin (Allergenlösungen) | Artu Biologicals Europe BV, Lelystad, Niederlande. |
| BD OptEIA TMB Substrat Reagent Set | BD Biosciences, Santiago, USA |
| Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) der Klasse A 2216 | |
| Diff-Quick Staining Set | Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz |
| Dolorex (Butorphanol) 10 mg/ml - Injektionslösung für Pferde, Hunde und Katzen | Intervet Deutschland, Unterschleißheim |
| Domidine 10mg/ml Injektionslösung Detomidinhydrochlorid für Pferde und Rinder | Albrecht GmbH Aulendorf Deutschland |
| ELISA Development Kit, Equine IL-17 VetSet | Kingfisher Biotech, St. Paul, MN, USA |
| ELISA DuoSet kits für equine IL-10 , IL-4 und IFN- γ | R&D Systems, Minneapolis USA |
| Gelatinenpartikel, verschiedene Chargen | Hergestellt vom Department für Pharmazie und Pharmazeutische Technologie der LMU München |
| PBS Dulbecco | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Septoderm Haut | Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, Deutschland |
| Sulfuric acid 95-97 % | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| TMB Substrate Reagent Set | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |

4.2 Verwendete Geräte und spezielle Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Accu-Jet Pipettierhelfer | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Endoskop ETM Vet 175 | ETM Endoskopische Technik GmbH, München, Deutschland |
| Eppendorf Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Hera-Safe Sicherheitswerkbank | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Immunowash Model 1575 | Bio-rad laboratories, München, Deutschland |
| InoLab pH-Sonde | Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland |
| IRMA TruPoint Blood analysis system | ITC, Edison, NJ, USA |
| Magnetrührer IKA RET | IKA Werke, Staufen, Deutschland |
| Nunc cryo tube vials 1,8ml | Thermo Fisher scientific, Roskilde Site, Dänemark |
| Nunc immuno plate | Thermo Fisher scientific, Roskilde Site, Dänemark |
| Olympus CLV-U40, EVIS CV230 Endoskopieturm | Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Pipetman P20, P100, P200, P1000 | Gilson International B.V, Limburg-Offheim, Deutschland |
| Thermomixer | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Venti-graph Model PG100/REC | Böhringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland |
| Wallac Victor 1420 Multilabel Counter | Perkin Elmer, Fremont, CA, USA |
| Zentrifuge Typ 2002 | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |

5. Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen, die mir diese Arbeit erst ermöglicht hat und mich immer professionell mit Rat und Tat betreut hat. Allerdings wäre auch ohne meine Kollegin, Frau Sabine Geis, und meinen Betreuer, Herrn Dr. John Klier, diese Dissertation nie zu Stande gekommen. Vielen Dank liebe Sabine, dass wir gemeinsam diese Studie durchgeführt haben und uns bei allen Problemen und Fragestellungen immer unterstützt haben. Vielen Dank lieber Dr. John Klier für die stets intensive Betreuung vor Ort und das gemeinsame Meistern aller organisatorischen und auch sonstigen Schwierigkeiten. Ich möchte auch dem Rest des Pferdeklinteams der LMU München herzlich danken, insbesondere Frau Julia Beckmann, Frau Julia Wittschorek und Frau Dr. Anna May.

Auch ohne das Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum Rechts der Isar, in dessen Labor ich meine ELISA durchführen durfte, wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere Frau Dr. Ulrike Schillinger möchte ich hier ganz herzlich für die Unterstützung und Betreuung vor Ort danken. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Müller und Frau Amelie von Voigts-Rhetz von der Abteilung für Dermatologie der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München für das Bereitstellen der Allergene und bei Frau Dr. Weber für das Benutzen ihres Labors zur Herstellung der Inhalationsdispersionen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Herrn Prof Dr. Ammer des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie richten.

Vielen Dank auch an das Department für Pharmazie und Pharmazeutische Technologie der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Winter für das Herstellen der GNP. Besonders möchte ich hier Frau Alice Hirschmann danken.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sven Reese für das Unterstützen bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Zuletzt danke ich meiner lieben Familie, besonders meinen Eltern, die mir überhaupt erst das Studium und anschließend die Doktorarbeit ermöglicht haben und mich immer in allen Angelegenheiten unterstützt haben.

6. Selbstständigkeitserklärung

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

Freinsheim, den 14.04.2014

Jeanette Steuer