

Quantifizierung IL-4- und IFN- $\gamma$ -bildender  
Lymphozyten im peripheren Blut zur Diagnostik  
einer T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance beim Pferd

**NINA KELBER**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Christian Menge

**und**

dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Pferde, Innere Medizin,  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuerin: PD Dr. Kerstin Fey

**Quantifizierung IL-4- und IFN- $\gamma$ -bildender  
Lymphozyten im peripheren Blut zur Diagnostik  
einer T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance beim Pferd**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Nina Kelber**

Tierärztin aus Hamburg

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof Dr. Martin Kramer

Gutachter/in:

Prof. Dr. C. Menge

PD Dr. K. Fey

Tag der Disputation:

14.06.2011

*Für meine Eltern  
und Florian*

# Abkürzungsverzeichnis

+	positiv für ein bestimmtes Merkmal bzw. Antigen
-	negativ für ein bestimmtes Merkmal bzw. Antigen
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid (bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit)
bov	bovine
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungscluster)
COB	Chronisch Obstruktive Bronchi(oli)tis
CCR	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CXCR	Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EHV	Equines Herpes Virus
eq	equine
EU	Endotoxin-Units (Endotoxin-Einheiten)
Fa.	Firma
FACS	Flourescence activated cell sorting (Flouresenz basierte Zellsortierung)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
h	hora (Stunde)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kDA	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min.	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
ms	Maus

## Abkürzungsverzeichnis

---

n	Anzahl unabhängiger Versuche, auch Tierzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NK-Zellen	Natural killer cells (natürliche Killer-Zellen)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
(R-) PE	(R-) Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
R	Region
RAO	Recurrent Airway Obstruction
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotation per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standard deviation (Standardabweichung; $\pm$ )
SSC	Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Tab.	Tabelle
T-Bet	T-Box exprimiert in T-Zellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ (transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 1-Zelle	Subpopulation vom Typ 1 der T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 2-Zelle	Subpopulation vom Typ 2 der T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 17-Zelle	Subpopulation vom Typ 17 der T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
vTI	Johann Heinrich von Thünen-Institut
$x_a$	arithmetischer Mittelwert
$x_g$	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81m/sek <sup>2</sup> )
z. B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>2-Hypothese.....</b>	<b>2</b>
1.1	Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ).....	3
1.2	Interleukin-4 (IL-4) .....	4
<b>2</b>	<b>T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance.....</b>	<b>5</b>
2.1	Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB).....	5
2.2	Sommerekzem.....	7
2.3	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Imbalance bei Fohlen.....	9
<b>3</b>	<b>Immunmodulation.....</b>	<b>12</b>
3.1	Immunmodulatorische Effekte von Mykotoxinen.....	12
3.2	Immunmodulatorische Effekte von Lipopolysaccharid (LPS) .....	16
3.3	Immunmodulatorische Effekte von Glucocorticoiden .....	20
<b>4</b>	<b>Arbeitshypothese.....</b>	<b>23</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>1</b>	<b>Tiere und Blutentnahme .....</b>	<b>24</b>
1.1	Vorversuche.....	24
1.2	Hauptversuche.....	25
<b>2</b>	<b>Isolation und <i>In vitro</i>-Provokation equiner PBMC.....</b>	<b>27</b>
2.1	Isolation .....	28
2.2	Bestimmung der absoluten Zellzahl .....	28
2.3	<i>In vitro</i> -Provokation .....	29
<b>3</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>30</b>
3.1	Etablierung der Methode .....	30
3.2	Doppelfluoreszenzfärbung von CD4 und IFN- $\gamma$ .....	31
3.3	Einfachfluoreszenzfärbung von IL-4.....	32

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4	Analyse der Proben.....	33
3.5	Statistische Auswertung.....	36
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>1</b>	<b>Methodenetablierung .....</b>	<b>38</b>
1.1	Etablierung des IL-4-Nachweises .....	38
<b>2</b>	<b>Vorversuche .....</b>	<b>39</b>
2.1	Gliotoxin.....	39
2.2	Patulin.....	42
2.3	LPS.....	43
2.4	Dexamethason.....	45
<b>3</b>	<b>Hauptversuche .....</b>	<b>49</b>
3.1	Mediumkontrollen .....	49
3.2	Gliotoxin.....	50
3.3	Patulin.....	54
3.4	LPS.....	57
3.5	Dexamethason.....	60
3.6	Vergleich der Noxen.....	63
<b>V</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>1</b>	<b><i>In vitro</i>-Provokation.....</b>	<b>64</b>
1.1	Durchflusszytometrische Detektion equiner T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen.....	64
1.2	Auswahl der Noxen und Konzentrationsbereiche .....	67
1.3	Immunmodulatorisches Potential der Noxen.....	70
1.4	Reproduzierbarkeit der <i>In vitro</i> -Provokation.....	74
<b>2</b>	<b>Einfluss der Einstreu .....</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>78</b>
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>81</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>83</b>

<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>IX</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>111</b>
<b>1</b>	<b>Reagentien .....</b>	<b>111</b>
<b>2</b>	<b>Puffer, Medien und Lösungen .....</b>	<b>112</b>
2.1	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	112
2.2	Puffer, Medien und Lösungen für die Zellkulturtechniken .....	113
2.3	Puffer, Medien und Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	113
<b>3</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen.....</b>	<b>115</b>
<b>4</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen .....</b>	<b>117</b>

# I Einleitung

Voraussetzung für das Überleben eines höheren tierischen Organismus ist neben der Funktionsfähigkeit auch die Ausgewogenheit spezifischer Immunantworten. Diese lassen sich je nach hauptsächlich involvierten T-Zellpopulationen, wie z. B. T-Helferzellen ( $T_H$ ) des Typs 1, 2 und 17 oder regulatorische T-Zellen, in Subtypen unterteilen. Symptomatische Phasen rezidivierender, immunvermittelter Erkrankungen des Pferdes werden mit einer Störung des  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewichts in Verbindung gebracht. So werden beim Sommerexzem des Islandpferdes und bei der Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) überschießende  $T_H2$ -Immunantworten beobachtet (31, 65, 95). Provokationsversuche mit Stäuben an Versuchspferden ergaben zwar keine einheitliche Aussage hinsichtlich des dominierenden Zytokinprofils bei COB, die dabei induzierten akuten Exazerbationen treten in der normalen Pferdehaltung jedoch nur selten auf (2, 31, 70, 85, 95). Eine Untersuchung an klinischem Patientenmaterial mit milden Verläufen der COB stellte dagegen prätherapeutisch ein  $T_H2$ -geprägtes Zytokinmuster fest. Posttherapeutisch stieg der Anteil  $IFN-\gamma^+$ -Zellen zugunsten einer  $T_H1$ -Immunantwort in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) betroffener Pferde an (53).

Die Beurteilung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses und damit der Ausprägung einer jeweiligen Immunantwort erfolgt beim Pferd bislang überwiegend auf Basis transkriptioneller Prozesse. Posttranskriptionelle Modifikationen der Zytokinsekretion und damit Divergenzen zwischen dem Nachweis einer bestimmten mRNA und der Bildung des zugehörigen Zytokins werden meist nicht berücksichtigt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch *In vitro*-Provokation equiner Lymphozyten mittels verschiedener immunmodulatorisch wirkender Substanzen anhand einer Blutprobe eine möglichst genaue Aussage über das individuelle  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis und damit über die Immunlage eines Pferdes treffen zu können. Das entwickelte Testsystem wurde exemplarisch zum Nachweis potentieller Einflüsse eines externen Umweltfaktors (Einstreu) auf das equine Immunsystem angewandt. Dazu erfolgte nach Konfrontation equiner Lymphozyten mit den Mykotoxinen Gliotoxin und Patulin sowie mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) und Dexamethason eine durchflusszytometrische Quantifizierung der  $CD4^+/IFN-\gamma^+$ - und der  $IL-4^+$ -Zellen und darauf basierend die Kalkulation des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses der Pferde in Abhängigkeit von der Haltungsform.

# II Literaturübersicht

## 1 T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>2-Hypothese

Die spezifische Immunantwort, auch adaptive oder erworbene Immunantwort genannt, ist für die Abwehr von intra- und extrazellulären Pathogenen verantwortlich und wird in eine humorale und zelluläre Immunantwort unterteilt. Während die zelluläre Immunantwort intrazelluläre Erreger (z. B. Viren oder Bakterien) beseitigt, wehrt die humorale Immunantwort vor allem extrazelluläre Erreger durch Bildung spezifischer Antikörper ab. Entscheidend für die Ausbildung der jeweiligen Immunantwort ist die Stimulation naiver T-Helferzellen (T<sub>H</sub>0-Zellen), welche sich wie die weiteren Subtypen der T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) durch ein CD4-Antigen (CD4<sup>+</sup>) auf ihrer Zelloberfläche auszeichnen. Unter Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-12 differenzieren sich T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen, während IL-4 zur Ausbildung von T<sub>H</sub>2-Zellen führt (111). Diese T-Helferzellen produzieren je nach Typ ein charakteristisches Zytokinmuster. Während nach Aktivierung von T<sub>H</sub>1-Zellen, auch T<sub>H</sub>1-Immunantwort genannt, vor allem IFN- $\gamma$ , IL-2 und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) sezerniert werden, produzieren T<sub>H</sub>2-Zellen im Rahmen einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort vor allem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Ein T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil aktiviert vor allem die zelluläre Immunität, ein T<sub>H</sub>2-Profil die humorale Immunität. Gleichzeitig supprimieren diese Zytokine die Ausbildung des jeweilig anderen Subtyps von T-Helferzellen (115, 169).

Potenzielle schädliche Wirkungen der T<sub>H</sub>-Zellen (z. B. allergische oder autoimmune Reaktionen) werden durch eine zusätzliche Population von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, den regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>), supprimiert. Diese Hemmung erfolgt ebenfalls durch Ausschüttung von spezifischen Zytokinen, wie z. B. vom transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder von IL-10 (33, 168). Ein kürzlich entdeckter weiterer Subtyp der T-Helferzellen sind die durch IL-17-Sekretion charakterisierten T<sub>H</sub>17-Zellen. Dieser Zelltyp fördert u. a. das Rekrutieren neutrophiler Granulozyten und die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6 oder IL-8) und induziert somit z. B. akut entzündliche Prozesse zur Abwehr bakterieller Pathogene (147, 148). Während die Existenz von equinen T<sub>reg</sub>-Zellen gezeigt werden konnte, wurden T<sub>H</sub>17-Zellen für das Pferd bislang nicht beschrieben (183).

Die Zuordnung einer Immunantwort zu einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-dominierten Antwort gelingt vor allem beim Menschen und bei der Maus. Bislang ist nicht eindeutig geklärt, ob diese Unterscheidung auch beim Pferd möglich ist (161). Die Beteiligung einer T<sub>H</sub>1-dominierten Immunantwort, beispielsweise an der Pathogenese der Equinen Rezidivierenden

Uveitis (59), deutet aber darauf hin, dass das Pferd zur Ausbildung einer klassischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Immunantwort fähig ist (69). Im Folgenden werden als Leitzytokine für die T<sub>H</sub>1-Antwort IFN- $\gamma$  sowie für die T<sub>H</sub>2-Antwort IL-4 näher erläutert. Diese Zytokine wurden auch in den eigenen Untersuchungen als Indikatoren für eine T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Immunantwort genutzt.

### 1.1 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Humanes IFN- $\gamma$  besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDA und bildet in der biologisch aktiven Form ein Homodimer, welche als einzige Konformation eine Dimerisation des IFN- $\gamma$ -Rezeptors hervorrufen kann (49). Das Protein wird im Genom durch vier Exons kodiert (162), die in ihrer Nukleotidsequenz zu 78 % mit equinem IFN- $\gamma$  übereinstimmen. Die Homologie des equinen zum murinen IFN- $\gamma$  beträgt lediglich 57 % (161).

In CD4<sup>+</sup>-Zellen wird die Expression von T-Bet, einem regulatorischen Protein zur spezifischen Genexpression, als Schlüsselereignis für die T<sub>H</sub>1-Differenzierung angesehen (164). Hauptquelle von IFN- $\gamma$  sind neben T<sub>H</sub>1-Zellen natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen. Weitere Subtypen der T-Zellen, wie T<sub>H</sub>0-Zellen, T<sub>reg</sub>-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und auch NK-T-Zellen, sowie Makrophagen, dendritische Zellen und sogar B-Zellen sind ebenfalls in der Lage, IFN- $\gamma$  zu produzieren (55, 165, 169, 181). 91 % der CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen adulter Pferde konnten in einer Untersuchung von WAGNER *et al.* (2010) den T<sub>H</sub>1-Zellen zugeordnet werden; 9 % bildeten darüber hinaus zusätzlich noch IL-10 und wurden somit zu den T<sub>reg</sub>-Zellen gezählt (181).

Rekombinantes equines IFN- $\gamma$  besitzt einen immunmodulatorischen Effekt auf Monozyten, welcher u. a. mit einer Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, die zur Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind, einhergeht (162). Neben der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und der Entwicklung eines T<sub>H</sub>1-Phänotyps fördert IFN- $\gamma$  bei gleichzeitiger Hemmung der IgE-Synthese die Produktion von IgG2a-Antikörpern durch B-Zellen (163, 169). Die Ausprägung antiviraler Effekte von rekombinantem equinen IFN- $\gamma$  wird kontrovers diskutiert: Während wiederholt antivirale Effekte des Zytokins gezeigt werden konnten (62, 154, 194), erwies es sich in Untersuchungen von STEINBACH *et al.* (2002) als unwirksam gegenüber verschiedenen Viren wie z. B. EHV-1 und -4 (162). Als Ursache für diese Diskrepanzen wird die Verwendung von verschiedenen Zelllinien zur Produktion von rekombinantem equinen IFN- $\gamma$  diskutiert. Equines IFN- $\gamma$ , welches aus Säugetierzellen gewonnen wurde, zeigte in Experimenten von GUTMANN *et al.* (2005), verglichen mit equinem IFN- $\gamma$  aus Blutleukozyten und Insektenzellen, einen um das 5- bis 7-fache niedrigeren antiviralen Effekt auf bovine Nierenzellen (62).

### 1.2 Interleukin-4 (IL-4)

Equines IL-4 wird in drei verschiedenen molekularen Größen (17,1/19,6/22,1 kDa) exprimiert. Diese Heterogenität beruht möglicherweise auf verschiedenen *Splicing*-Varianten oder Glykolisierungsformen des Proteins, die bereits für humanes, murines und bovines IL-4 beschrieben wurden (40, 116). Die Homologie der Nukleotidsequenz des equinen IL-4 beträgt 55 % zum murinen und 65 % zum humanen IL-4. Letzteres unterscheidet sich durch eine Insertion von 7-18 zusätzlichen Aminosäuren von equinem, bovinem, caninem bzw. murinem IL-4 (161).

IL-4 wird von T<sub>H</sub>2-Zellen, Mastzellen sowie basophilen und eosinophilen Granulozyten sezerniert (182). Innerhalb der IL-4<sup>+</sup>-Population im Blut adulter Pferde konnten in Untersuchungen von WAGNER *et al.* (2008, 2010) 87 % den T<sub>H</sub>2-Zellen (CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>), 5 % den basophilen Granulozyten (IgE<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>) sowie weitere 5 % den T<sub>reg</sub>-Zellen (IL-10<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>) zugeordnet werden (181, 183).

Neben der Induktion eines T<sub>H</sub>2-Phänotyps stimuliert IL-4 Wachstum, Reifung und Differenzierung von B-Zellen und besitzt multiple immunregulatorische Effekte auf Monozyten und dendritische Zellen, aber auch auf Endothelzellen und Fibroblasten. IL-4 ist in Human- und Mausmodellen das Hauptzytokin, das für den Wechsel zur IgE-Bildung verantwortlich ist, fördert aber auch die Produktion von IgG1 (163, 169, 182). Rekombinantes equines IL-4 steigert sowohl in equinen peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC) als auch in alveolären Makrophagen die Genexpression von CD23, einem Rezeptor für IgE (76). Durch equines IL-4 hervorgerufene morphologische Veränderungen werden nicht nur an neutrophilen Granulozyten (104), sondern auch an alveolären Makrophagen beobachtet. Diese gelten aufgrund zusätzlich reduzierter Expression von mRNA für IL-8 und IL-12 (IL-12p40) als deaktiviert (76). Darüber hinaus steigert rekombinantes equines IL-4 die Proliferation von T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>), ohne das Verhältnis dieser Zellen zueinander zu verändern. Im Gegensatz dazu besitzt es weder einen proliferativen Effekt auf B-Zellen noch induziert es einen Isotypwechsel während der Antikörperbildung durch diese Zellen. Dadurch unterscheidet sich die biologische Funktion des equinen IL-4 zumindest *in vitro* von jenem des Menschen und der Maus (40). Rekombinantes equines IL-4 erhöht *in vitro* die Expression von mRNA für Chemokine (CXCL-8, VEGF) und Adhäsionsmoleküle (E-Selektin) in arteriellen, pulmonalen Endothelzellen und potenziert diese Effekte nach Stimulation mit LPS und TNF- $\alpha$ . Hierdurch ließen sich Migrationen von neutrophilen Granulozyten in pulmonales Gewebe, wie es z. B. im Rahmen einer COB *in vivo* beobachtet wird, erklären (72, 73).

## 2 T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance

Das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht ist maßgeblich an der Entwicklung einer adäquaten Immunantwort beteiligt. Im Laufe der Pathogenese von Erkrankungen, aber auch innerhalb physiologischer Prozesse (z. B. Schwangerschaft, Wachstum) kann es zu Störungen des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Gleichgewichtes kommen. Die Pathogenese allergischer Erkrankungen ist beim Menschen beispielsweise mit einer gesteigerten T<sub>H</sub>2-Antwort assoziiert und könnte auf die Abwesenheit einer adäquaten T<sub>H</sub>1-Antwort zurückzuführen sein (169). Im Folgenden wird die Bedeutung der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance beim Pferd beispielhaft anhand gängiger, equiner Erkrankungen (COB, Sommerekzem), aber auch anhand der juvenilen Entwicklung des spezifischen Immunsystems näher betrachtet.

### 2.1 Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB)

COB, im englischen Sprachraum Recurrent Airway Obstruction (RAO), beschreibt eine chronische, reversible, entzündliche Obstruktion der tiefen Atemwege. Sie betrifft vor allem erwachsene Pferde ab einem Alter von fünf Jahren mit zunehmender Prävalenz bei steigendem Alter (97). COB ist die häufigste Lungenerkrankung erwachsener Pferde und tritt besonders in der nördlichen Hemisphäre auf, da hier einerseits die Stallhaltung üblich und andererseits die Heu- und Strohqualität aufgrund von nassen Witterungsbedingungen oft mangelhaft ist. Betroffene Pferde zeigen meist milde Symptome in Form einer Leistungsinsuffizienz, Husten, Nasenausfluss und Dyspnoe, die sich jedoch innerhalb kürzester Zeit dramatisch verschlechtern können (Exazerbation). Ursache dieser Symptomatik ist eine respiratorische Hyperreagibilität der betroffenen Tiere auf Staub, deren Folge eine Obstruktion der tiefen Atemwege ist. Diese wiederum beruht auf einem Bronchospasmus, einer Dyskrinie sowie einer Schleimhautschwellung. Charakteristisch für die entzündliche Reaktion ist ein Influx von neutrophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen und damit ein vermehrter Gehalt dieser Zellen in der BALF (97, 140).

Während der Phänotyp der Erkrankung gut definiert ist, werden die immunpathologischen Vorgänge in der Literatur kontrovers diskutiert (Tab. 1). Sowohl LAVOIE *et al.* (2001) als auch CORDEAU *et al.* (2004) konnten nach Heu- und Strohexposition bei erkrankten Tieren eine erhöhte Transkription von mRNA für IL-4 und IL-5 mit einhergehender Reduktion der mRNA für IFN- $\gamma$  nachweisen (31, 95). HOROHOV *et al.* (2005) postulieren dagegen ein von der Phase der COB abhängiges, gemischtes Zytokinprofil. Mit zunehmender Dauer und Chronizität der Erkrankung wandelt sich das Bild einer klassischen T<sub>H</sub>2-Immunantwort hin zu einer vermehrten Bildung von IFN- $\gamma$  und IL-8 (70).

## Literatur

---

AINSWORTH *et al.* (2003) konnten im Gegensatz zu den anderen Arbeitsgruppen keine vermehrte Bildung von mRNA für IL-4 bei COB-erkrankten Pferden in der akuten, symptomatischen Phase nachweisen. Stattdessen zeigten die Autoren zum einen, dass die Tiere in einem symptomfreien Stadium im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um die Hälfte verringerte Expression von IL-13 aufwiesen. Zum anderen war in der chronischen Phase der Erkrankung die Transkription für IFN- $\gamma$  in der Gruppe der Kranken 2½-mal höher. Dies wurde als weiterer Hinweis für ein T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil in der genannten Krankheitsphase gewertet (2). KLEIBER *et al.* (2005) konnten 48 h nach Beginn der Staubexposition Krankheitsschübe provozieren, die jedoch nicht von einem bestimmten Zytokinprofil begleitet waren. Die mRNA-Expression aller untersuchten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- $\gamma$ ) war stattdessen sowohl im Blut als auch in der BALF generell inhibiert (85).

Die divergierenden Ergebnisse beruhen möglicherweise auf unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Detektion des jeweiligen Zytokinprofils (Tab. 1) (104, 131). Posttranskriptionelle Modifikationen und nicht die Transkription von Genen an sich könnten beispielsweise für Unterschiede in der Zytokinexpression verantwortlich sein, weshalb von KLEIBER *et al.* (2005) ein direkter Nachweis der Zytokine gefordert wird (85). Des Weiteren wurden in den Experimenten die häufig vorkommenden milden Formen der COB nicht berücksichtigt. Eine Untersuchung an klinischem Patientengut der Pferdeklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover konnte jedoch zeigen, dass zwischen drei unterschiedlich stark erkrankten Tiergruppen keine deutlichen Unterschiede im Zytokinmuster bestanden. Häufig wurde sowohl in pulmonalen Zellen als auch in PBMC eine gleichzeitige Transkription von mRNA für IL-4 als auch von IFN- $\gamma$  vorgefunden (12). Dieses gemischte T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil konnte von RÄTHEL (2007) in histopathologischen Untersuchungen der Lunge von 15 COB erkrankten Pferden bestätigt werden (136).

Durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem Nachweis von Zytokinproteinen auf Einzelzellebene zeigten, dass COB-Patienten, die in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Giessen vorgestellt wurden, prätherapeutisch überwiegend ein T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil in der BALF aufwiesen (53). Eine 7-tägige Therapie (staubarme Aufstallung, Dexamethason, Clenbuterol und Dembrexin) der Tiere führte zu einem Anstieg der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Lymphozyten und des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses (Quotient aus IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- und IL-4<sup>+</sup>-Zellen). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die klinisch inapparente Phase der COB mit einem T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil einhergeht (53). Nach zusammenfassender Betrachtung aller vorgestellten Daten wurde 2008 auf dem HAVEMEYER WORKSHOP in Island ebenfalls eine in der Erkrankungsphase der COB ausgeprägte T<sub>H</sub>2-Immunantwort befürwortet (104).

**Tab. 1: Übersicht über die Ergebnisse von Studien zur Immunpathogenese der COB**

Jahr	Autoren	Methode	Material	AnzahlTiere (erkrankt/ gesund)	Ergebnis	
					T <sub>H</sub> 1	T <sub>H</sub> 2
2000	BERENDONK (12)	RT-PCR	BALF, PBMC	27	↑	↑
2001	LAVOIE <i>et al.</i> (95)	ISH <sup>1</sup>	BALF	12 (7/5)	↓	↑
2003	AINSWORTH <i>et al.</i> (2)	RT-PCR	BALF	16 (8/8)	↑	↔
2003	CORDEAU <i>et al.</i> (31)	ISH <sup>1</sup>	BALF	12 (6/6)	↓	↑
2005	HOROHOV <i>et al.</i> (70)	RT-PCR	BALF, PBMC	12 (6/6)	↑	↑
2005	KLEIBER <i>et al.</i> (85)	RT-PCR	BALF, PBMC	12 (7/5)	↓	↓
2006	FRANZ (53)	DZ <sup>2</sup>	BALF	48 (46/2)		↑ <sup>3</sup>
2007	PIETRA <i>et al.</i> (131)	RT-PCR	BALF	9 <sup>4</sup> (5/4)	(↑) <sup>5</sup>	↑ <sup>5</sup>
2007	RÄTHEL <sup>6</sup> (136)	PCR	Lunge	25 (15/10)	↑	↑

<sup>1</sup>ISH (In situ-Hybridisierung), <sup>2</sup>DZ (Durchflusszytometrie); <sup>3</sup>zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse: posttherapeutisch Anstieg Quotient IFN- $\gamma$  zu IL-4 (in Richtung T<sub>H</sub>1) bei COB-Patienten; <sup>4</sup>alle Pferde waren COB-erkrankt, Kontrolle durch verschiedene Haltungsbedingungen (5 Pferde Stall-, 4 Pferde Weidehaltung); <sup>5</sup>nur kurzzeitiger Anstieg von mRNA für IFN- $\gamma$ , Nachweis von mRNA für IL-4 wurde nicht geführt; <sup>6</sup>Post Mortem-Studie; ↓ = Reduktion; ↑ = Anstieg; ↔ = gleichbleibender Gehalt der T<sub>H</sub>1- und/oder T<sub>H</sub>2-spezifischen Zytokine (z. B. IFN- $\gamma$  für T<sub>H</sub>1 und IL-4 für T<sub>H</sub>2)

## 2.2 Sommerekzem

Das Sommerekzem ist eine saisonal rezidivierende allergische Dermatitis von Pferden, die mit einer Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp auf Mückenstiche von Weibchen der Gattung *Culicoides spp.* reagieren. Drei Viertel aller gegen *Culicoides spp.* sensitiven Pferde zeigten in einer Studie von BASELGA *et al.* (2006) zusätzlich eine Sensibilisierung gegen *Simulium spp.*, weswegen eine Kreuzreaktion zwischen Epitopen der Insekten nicht ausgeschlossen wird (8). Dennoch konnten die allergenen Epitope bislang nicht identifiziert werden. WILSON *et al.* (2001, 2008) zeigten wiederholt, dass erkrankte Pferde IgE-Antikörper gegen Proteine aus der Speicheldrüse von *Culicoides spp.* bilden, während dies bei gesunden Kontrollpferden nicht nachgewiesen werden konnte (188, 189). Des Weiteren isolierten die Autoren mehrere Proteine aus dem Speichel von *Culicoides nubeculosus*, die positive Reaktionen mit Serum von betroffenen Pferden im Westernblot hervorriefen. Aufgrund der Tatsache, dass die Anzahl und das molekulare Gewicht von Proteinen aus dem Speichel, die im Western-Blot mit IgE reagierten, im Vergleich zu Proteinen aus dem gesamten Thorax der Mücke vermindert waren, ist eine Beteiligung von extraglandulären Proteinen nicht auszuschließen (189).

## Literatur

---

Klinische Symptome des Sommerekzems treten bei Präsenz der aktiven Mücke während der Frühlings- und Sommermonate auf und lassen während des Winters nach. Betroffene Tiere zeigen einen starken Juckreiz, der vor allem Mähne und Schweif betrifft, und daraus resultierende Exkoriationen, multifokale Alopezien, exsudative Erosionen und Lichenifikation der geschuerten Areale. Je nach untersuchter Population und Region variiert die Prävalenz des Sommerekzems zwischen 3 und 70 % (Tab. 2). Das Sommerekzem ist unter importierten Islandpferden weit verbreitet, auf Island gehaltene Pferde erkranken jedoch nicht (21, 24, 63, 99, 179). Werden adulte Tiere auf das Festland verbracht, tritt das Sommerekzem mit einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von etwa 30 % auf (15, 24, 63). Die ersten Symptome werden mit einer hohen Prävalenz von 50 % zwei bis drei Jahre nach dem Export sichtbar (15). Im Gegensatz dazu erkranken lediglich ca. 8 % der Tiere, die auf dem Festland geboren wurden (24, 63). Die Ursachen für diese Unterschiede sind unklar. Eine genetische Prädisposition des Sommerekzems konnte 2009 in den Niederlanden für Shetland Ponies gezeigt werden (152).

**Tab. 2: Prävalenz des Sommerekzems**

---

<b>Jahr</b>	<b>Autoren</b>	<b>Region</b>	<b>Tiere</b>	<b>Rasse</b>	<b>Prävalenz (%)</b>
1983	BRAVERMAN <i>et al.</i> (21)	Israel	723	keine Angaben	21,8
1984/ 1987	UNKEL (175,176)	Deutschland	1040	Islandpferde	18,4
1987	BROSTRÖM <i>et al.</i> (24)	Schweden	441	Islandpferde	15 <sup>1</sup>
1991	HALLDÓRDSÓTTIR <i>et al.</i> (63)	Norwegen	391	Islandpferde	17,6 <sup>2</sup>
1998	LITTLEWOOD <i>et al.</i> (99)	Großbritannien	1088	Shirehorses	11,6
1998	LITTLEWOOD <i>et al.</i> (99)	Deutschland	77	Shirehorses	37,7
2004	LANGE (91)	Deutschland	490	Islandpferde	29,8
2006	BJÖRNSDÓTTIR <i>et al.</i> (15)	Deutschland, Dänemark, Schweden	330	Islandpferde (Import)	34,5
2007	VAN GREVENHOF <i>et al.</i> (179)	Niederlande	6108	Shetlandponies, Friesen	13 <sup>3</sup>
2009	SCHURINK <i>et al.</i> (152)	Niederlande	6073	Shetlandponies	8,8

---

<sup>1</sup>Importierte Pferde zeigten eine Prävalenz von 26,2 %, während in Schweden geborene Isländer eine Prävalenz von 6,7 % besaßen; <sup>2</sup>importierte Pferde zeigten eine Prävalenz von 26,9 %, während in Norwegen geborene Isländer eine Prävalenz von 8,2 % besaßen; <sup>3</sup>die Prävalenz variierte je nach Region zwischen 0 und 71,4 %.

Ergebnisse von HAMZA *et al.* (2007) deuten darauf hin, dass eine frühe Allergenexposition, wie es im Gegensatz zu importierten Pferden bei auf dem Festland geborenen der Fall ist, zu einer Suppression der T<sub>H</sub>2-Immunantwort durch IL-10-produzierende Zellen führen könnte. Die Arbeitsgruppe untersuchte Blutproben von 63 erkrankten und gesunden Islandpferden, die entweder importiert (1. Generation) oder als Nachkommen der 1. Generation in der Schweiz geboren wurden (2. Generation), durchflusszytometrisch auf die Bildung von T<sub>H</sub>1- (IFN- $\gamma$ ), T<sub>H</sub>2- (IL-4, IL-5, IL-13) sowie T<sub>reg</sub>-Zytokinen (IL-10). Die Autoren stellten fest, dass es im Sommer bei klinisch erkrankten Tieren der 1. Generation sowohl zu einem Abfall der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen als auch zu einem Anstieg der IL-4-produzierenden Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren kam. Dieser Unterschied konnte im Winter nicht festgestellt werden, weswegen während der symptomatischen Phase des Sommerkzems ein T<sub>H</sub>2-geprägtes Zytokinmuster postuliert wird. In der 2. Generation wurde hingegen eine geringere IL-4-Produktion und ein gleichzeitiger Anstieg von IL-10 beobachtet. Dies gilt als Ursache für die geringe Prävalenz des Sommerkzems bei Pferden der 2. Generation (65). In einer weiteren Studie konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die IL-4-Produktion *in vitro* durch eine synergistische Wirkung von IL-10 und TGF- $\beta$ 1 herunter reguliert werden kann. Die Autoren nehmen daher an, dass diese Zytokine auch *in vivo* auf IL-4-produzierende T<sub>H</sub>2-Zellen einen hemmenden Einfluss nehmen und über diese Suppression der T<sub>H</sub>2-Immunantwort die Anfälligkeit zur Entwicklung des Sommerkzems vermindert wird (66).

### 2.3 T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Imbalance bei Fohlen

Das Verständnis für die Entwicklung der spezifischen Immunantwort bei Fohlen ist bislang lückenhaft. Ein T<sub>H</sub>1-Defizit bei Neonaten wurde bereits mehrfach sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für Menschen und Mäuse beschrieben. Unter neutralen Stimulationsbedingungen *in vitro* sind murine Neonaten häufig in Richtung eines T<sub>H</sub>2-geprägten Zytokinprofils polarisiert. Dennoch sind auch neonatale T-Zellen in der Lage, T<sub>H</sub>1-Zytokine in vergleichbaren Mengen wie adulte T-Zellen zu bilden, sofern die verwendete Costimulation im Vergleich zur Stimulation adulter T-Zellen gesteigert wird. Vollständig ausgereifte T<sub>H</sub>1-Immunantworten konnten überdies *in vivo* bei menschlichen Neugeborenen beobachtet werden (1).

Eine herabgesetzte Ausprägung des T<sub>H</sub>1-Zytokinprofils wurde bisher für Fohlen in den ersten Lebenswochen angenommen. Die Expression von mRNA für IFN- $\gamma$  steigt in stimulierten PBMC innerhalb der ersten vier Lebenswochen um das 2 $\frac{1}{2}$ -fache, während die

## Literatur

---

Expression von mRNA für IL-4 innerhalb dieses Zeitraumes unverändert bleibt (18). Sowohl PBMC als auch pulmonale Lymphozyten von neugeborenen Fohlen bilden im Vergleich zu heranwachsenden Fohlen (56 Tage), aber auch zu adulten Tieren signifikant weniger IFN- $\gamma$ -mRNA und IFN- $\gamma$ -Protein aus. In der weiteren Entwicklung von Fohlen steigert sich die Produktion von IFN- $\gamma$  dieser Zellen stetig, bis ab einem Alter von drei Monaten annähernd IFN- $\gamma$ -Spiegel von erwachsenen Kontrolltieren erreicht werden (22, 100). Die mangelhafte Bildung von IFN- $\gamma$  in den ersten Lebenswochen beruht jedoch nicht nur auf dem Fehlen von ausgereiften T-Effektorzellen, sondern auch auf der mangelnden Produktion von IFN- $\gamma$  der Einzelzelle, wie BREATHNACH *et al.* (2006) durchflusszytometrisch zeigen konnten (22). Da sowohl die altersabhängige Genexpression von IFN- $\gamma$  als auch die Bildung des Proteins positiv korrelieren, wird die Ursache dieser T<sub>H</sub>1-Defizienz auf Basis der Gentranskription vermutet (22, 100). Darüber hinaus werden als weiterer Grund für das IFN- $\gamma$ -Defizit inadäquate Signale von Antigen-präsentierenden Zellen diskutiert. Untersuchungen von MÉRANT *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  bei Fohlen nicht durch eine Reduktion der von dendritischen Zellen sezernierten T<sub>H</sub>1-Zytokine (IL-12, IL-15, IL-18) erklärt werden kann. Eine gesteigerte Produktion von T<sub>H</sub>2-induzierenden Zytokinen (IL-10, TGF- $\beta$ ) durch dendritische Zellen konnte ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden. Stattdessen konnte die Arbeitsgruppe einen Abfall von TNF- $\alpha$  beobachten, ein Zytokin, welches die Bildung von IFN- $\gamma$  induzieren kann. Zusatz von Lipopolysaccharid (LPS) konnte *in vitro* zwar die Produktion von TNF- $\alpha$  steigern, es bleibt dennoch anzunehmen, dass *in vivo* eine vollständige adaptive Immunantwort auf bakterielle Infektionen bei Fohlen verzögert ist (109).

Das Fehlen einer adäquaten T<sub>H</sub>1-Immunantwort in den ersten Lebenswochen könnte eine Ursache für die hohe Empfänglichkeit von Fohlen für intrazelluläre Erreger wie z. B. *Rhodococcus equi* darstellen. JACKS *et al.* (2007) konnten jedoch zeigen, dass Fohlen im Alter von 7-10 Tagen ähnlich wie Neonaten von Menschen und Mäusen in der Lage sind, adäquate T<sub>H</sub>1-Immunantworten nach einem ausreichenden Stimulus auszubilden. Während auch in dieser Studie gesunde Fohlen signifikant weniger mRNA für IFN- $\gamma$  als adulte Kontrollpferde exprimierten, konnte zwei Wochen nach intrabronchialer Infektion mit *Rhodococcus equi* die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Antwort bei Fohlen gezeigt werden. Das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis dieser Fohlen, ein Quotient, welcher aus der mRNA für IFN- $\gamma$  und IL-4 gebildet wurde, war im Vergleich zu infizierten und nicht infizierten adulten Kontrolltieren signifikant erhöht. Postmortal isolierte Zellen aus bronchialen Lymphknoten der Fohlen reagierten nach Stimulation mit einem löslichen *Rhodococcus equi*-Antigen *in vitro* mit einem

## Literatur

---

Anstieg der mRNA für IFN- $\gamma$  auf das Niveau gesunder Kontrolltiere, während es gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion der mRNA für IL-4 von infizierten Fohlen im Vergleich zu infizierten und nicht infizierten adulten Pferden kam (74).

In den bisher aufgeführten Untersuchungen wurde mehrfach davon ausgegangen, dass ein Mangel an IFN- $\gamma$  und dessen mRNA eine mangelnde T<sub>H</sub>1-Immunantwort repräsentiert. Analysen der IFN- $\gamma$ -bildenden Populationen wurden dabei jedoch nicht durchgeführt, obwohl IFN- $\gamma$  von verschiedenen Zelltypen und nicht allein durch CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen gebildet wird (s. Kap. II 1.1). Ein in diesen Untersuchungen vorgefundener Mangel an IFN- $\gamma$  muss daher nicht zwingend mit einer verminderten Produktion von IFN- $\gamma$  durch T<sub>H</sub>1-Zellen einhergehen. WAGNER *et al.* (2010) analysierten erstmals T<sub>H</sub>1- (CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), T<sub>H</sub>2- (CD4<sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup>) und T<sub>reg</sub>-Zellen (CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>) von Fohlen (Tag 1-2 und 5, Woche 6 und 12 nach Geburt) und erwachsenen Tieren mit Hilfe einer durchflusszytometrisch durchgeführten Doppelmarkierung von intrazellulären Zytokinen und CD4-Oberflächenantigenen. Die Ergebnisse zeigen, dass, obwohl auch in dieser Studie die Produktion von IFN- $\gamma$ , aber auch der anderen Zytokine von Geburt an quantitativ vermindert waren, equine Neonaten und Fohlen dennoch in den ersten Lebenswochen eine Polarisierung in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort zeigen. Während die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse der ersten Lebenstage interessanterweise jenen erwachsener Pferde entsprachen, konnten in einem Alter von 6 und 12 Wochen signifikante Anstiege der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse bei Fohlen im Vergleich zu erwachsenen Tieren beobachtet werden. Ursache hierfür war ein reduzierter Anteil an T<sub>H</sub>2-Zellen. Neonatale T<sub>H</sub>1-Zellen bildeten bereits am fünften Tag nach der Geburt annähernd in gleichen Maßen IFN- $\gamma$  wie adulte T<sub>H</sub>1-Zellen, während der Anteil an T<sub>H</sub>2-Zellen in den ersten drei Lebensmonaten zwar stetig anstieg, die IL-4-Produktion jedoch generell deutlich niedriger als die erwachsener Pferde war. Interessanterweise ging die IL-4-Synthese in den ersten Lebenstagen vor allem von basophilen Granulozyten aus (181).

Nach Ansicht der Autoren sind jedoch quantitative Analysen der Zytokinproduktion nach Stimulation der Lymphozyten mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin *in vitro* nicht notwendigerweise mit einer Antigen-spezifischen T-Zellaktivierung *in vivo* zu vergleichen. Resultate der *In vitro*-Untersuchungen gehen daher nicht zwingend mit einer mangelnden Immunantwort und damit mit einer erhöhten Empfänglichkeit des Fohlens für Infektionen einher (181).

### 3 Immunmodulation

Immunmodulatorisch wirkende Substanzen üben einen suppressiven oder stimulierenden Einfluss auf das Immunsystem aus. Mit den Mykotoxinen Gliotoxin und Patulin sowie mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) und Dexamethason werden im Folgenden verschiedene, immunsuppressiv wirkende Stoffe vorgestellt, die in den eigenen Untersuchungen Anwendung fanden.

#### 3.1 Immunmodulatorische Effekte von Mykotoxinen

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die bereits in geringen Dosen toxisch wirken (11). Die Exposition zu Schimmelpilzen und deren Metaboliten in Gebäuden ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Allergien. Im Rahmen der Leipziger Allergierisiko Studie (LARS) konnte 2002 gezeigt werden, dass Kontakt zu *Penicillium*-Sporen einerseits die Inzidenz für Atemwegserkrankungen bei Kindern erhöht und eine Exposition zu *Aspergillus spp.* andererseits mit der Ausbildung einer allergischen Rhinitis, der vermehrten Bildung von IgE und einer Reduktion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) im Blut assoziiert ist (117). Untersuchungen von WICHMANN *et al.* (2002) konnten einen immunsuppressiven Einfluss auf humane mononukleäre Blutzellen anhand von drei Mykotoxinen (Citrinin, Gliotoxin und Patulin) *in vitro* nachweisen. Neben einer Hemmung der Zellproliferation führte die Inkubation mit jedem der drei Mykotoxine konzentrationsabhängig zu einer Reduktion des Anteiles IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- und IL-4<sup>+</sup>-Zellen. Dabei inhibierten die Mykotoxine IFN- $\gamma$  in deutlich geringeren Konzentrationen als IL-4. Die Produktion von IFN- $\gamma$  wurde bereits in Konzentrationen gehemmt, die keinen oder sogar einen stimulierenden Einfluss auf die IL-4-Sekretion und die Zellvitalität besaßen (186). IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen scheinen folglich stärker durch Mykotoxine beeinflusst zu werden, wofür laut Autoren ein vermehrt zytotoxischer Effekt auf diese Zellart wahrscheinlicher ist als eine verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  der Einzelzelle an sich. Folge dieses IFN- $\gamma$ -Defizits ist nicht nur ein T<sub>H</sub>2-geprägtes Zytokinprofil, sondern darüber hinaus auch eine gesteigerte IgE-Synthese *in vitro* (186, 187). Demzufolge ist ein erhöhtes Allergierisiko nach Exposition zu Mykotoxinen auch *in vivo* denkbar, was vor dem Hintergrund, dass eine Kombination mehrerer Mykotoxine selbst bei effektschwachen Einzeldosen die beschriebenen Effekte auf humane PBMC *in vitro* potenzieren kann, umso wahrscheinlicher erscheint (87, 166).

### 3.1.1 Gliotoxin

Gliotoxin wurde 1943 durch JOHNSON *et al.* (78) beschrieben und wird durch eine Vielzahl von Pilzen (78, 83, 93, 184), wie auch *Aspergillus spp.* (z. B. *Aspergillus fumigatus*) (60, 88, 93), *Penicillium spp.* (79, 118) oder *Candida spp.* (156) gebildet. Gliotoxin gehört zu den Epipolythiodioxopiperazin-Verbindungen, die sich durch einen chinoiden Rest und eine Disulfidbrücke über einem Piperazinring auszeichnen. Es besitzt immunsuppressive und zytotoxische Eigenschaften (184). Das Toxin hemmt *in vitro* die Phagozytose und bakterizide Aktivität von murinen alveolären und peritonealen Makrophagen bereits in Konzentrationen, die nicht toxisch auf die Zellvitalität wirken (43). In polymorphkernigen Leukozyten (neutrophile Granulozyten) führt das Toxin ebenfalls zu einer Reduktion der Chemotaxis und Phagozytose. Gliotoxin exponierte Granulozyten sind *in vitro* nicht in der Lage, *E. coli* zu eliminieren (155). Im Gegensatz zu mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) führte die Inkubation mit Gliotoxin in Untersuchungen von SHAH *et al.* (1998) zu einer Degeneration der polymorphkernigen Leukozyten (in Form einer Abnahme der Größe und Granularität der Zellen) und zu einer erhöhten Aufnahme von Propidium-Iodid, einem Indikator für tote Zellen (155). Aufgrund der hohen eingesetzten *In vitro*-Konzentration (500 µg Gliotoxin/ml) bleibt die Relevanz *in vivo* jedoch fraglich. Anhand eines *In vivo*-Modells an Ratten mit induzierter Leberfibrose konnten WRIGHT *et al.* (2001) durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von Gliotoxin eine auch *in vivo* bestehende, apoptotische Wirkung von Gliotoxin auf Kupffersche Sternzellen zeigen und gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Fibrose hervorrufen (192). STANZANI *et al.* (2005) beobachteten in ihren Untersuchungen *in vitro* einen durch Apoptose bedingten Zelltod von Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten und dendritische Zellen), der mit einer deutlichen Abnahme des Verhältnisses von Monozyten zu Lymphozyten einherging. Der verminderte Anteil Antigen-präsentierender Zellen wird von den Autoren als Ursache für eine verminderte Funktion von stimulierten T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen nach Inkubation mit Gliotoxin angesehen (160). Sowohl CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen als auch CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen bildeten *in vitro* analog zu den Ergebnissen von WICHMANN *et al.* (2002, 2003) nach Inkubation mit Gliotoxin konzentrationsabhängig weniger IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (160, 186, 187).

Die Zytotoxizität Gliotoxins konnte in einem zur Untersuchung der Funktionsweise humaner, respiratorischer Epithelzellen geeignetem *In vitro*-Modell mit einem eukaryotischen, einzelligen Organismus (*Tetrahymena pyriformis*) nicht durch einen inhibitorischen Effekt auf den Energiestoffwechsel erklärt werden (61). Vielmehr ist nach Ansicht der Autoren eine bereits mehrfach beschriebene Gliotoxin-induzierte Schädigung der DNA (19,

44, 120) oder der Mitochondrien (89) als Ursache für die Gliotoxin-induzierte Inhibition der Zellproliferation von *Tetrahymena pyriformis* zu vermuten (61).

### 3.1.2 Patulin

Patulin, ein ungesättigtes Lakton, wurde erstmals in den 40er Jahren aus *Penicillium griseofulvum* isoliert (11). Darüber hinaus sind weitere *Penicillium spp.*, wie beispielsweise *Penicillium clavigerum* und *Penicillium terreus*, aber auch *Aspergillus spp.*, wie *Aspergillus giganteus*, in der Lage, Patulin zu bilden (51). Patulin lässt sich regelmäßig in fauligen Früchten und deren Säften nachweisen, kommt aber auch in Futtermitteln für Nutztiere vor (11, 143). Toxische Wirkungen auf Versuchstiere wurden mehrfach für Patulin beschrieben (47, 48). Patulin wirkt sowohl teratogen in aviären Embryonen (29) als auch mutagen in Hefen und in Kulturzellen des Hamsters (105, 151). In Ratten führten subkutane Injektionen von Patulin über 60 Wochen zur Ausbildung von Sarkomen um die Injektionsstelle (39), während in anderen Langzeitstudien an Ratten nach oraler Applikation kein carcinogener Effekt nachgewiesen werden konnte (9, 122).

Patulin besitzt einen zytotoxischen Effekt auf Leukozyten und Makrophagen (17, 159). Nach oraler und intraperitonealer Applikation rief Patulin in Untersuchungen von ESCOULA *et al.* (1988) in Mäusen und Kaninchen nicht nur eine vor allem die B-Zellen betreffende Lymphopenie, sondern auch eine herabgesetzte Lymphozytenfunktion in Form von verminderter Immunglobulinbildung (IgG, IgA und IgM) hervor (48). Dagegen führten hohe Patulinkonzentrationen (1,26 und 2,56 mg/kg) nach 28-tägiger oraler Exposition bei der Maus zwar zu einer Abnahme der Leuko- und Lymphozyten im Blut, dies jedoch ohne Effekt auf die humorale oder zelluläre Immunantwort (101). Niedrige Dosierungen von Patulin (< 100 ng/ml) waren in einer Untersuchung von LUFT *et al.* (2008) *in vitro* jedoch nicht mit einer Abnahme der Zellvitalität humaner PMBC verbunden. Sie polarisierten stattdessen über eine stärkere Inhibition der IFN- $\gamma$ -Sekretion die Zytokinbildung in Richtung eines T<sub>H</sub>2-Zytokinprofils. Diese Hemmung konnte nicht durch eine gesteigerte Produktion von IL-10, ein auf T<sub>H</sub>1-Zellen suppressiv wirkendes Zytokin, erklärt werden, sondern wurde im Zusammenhang mit einer Depletion von intrazellulärem Glutathion beobachtet (102), welches als Antioxidans die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-geprägten Immunantwort in murinen Antigen-präsentierenden Zellen fördert (129).

### 3.1.3 Exposition von Pferden zu Mykotoxinen

Kenntnisse über die Exposition von Pferden zu Mykotoxinen liegen bislang nicht hinreichend vor. Kontamination von Futtermitteln mit Schimmelpilzen und eine daraus resultierende Exposition von Pferden zu diesen Schimmelpilzen und ihren Metaboliten sind dennoch nahe liegend (80). Der Gehalt an Schimmelpilzen und Hefen ist im Heu (geometrischer Mittelwert 27,05 KbE/l) verglichen mit einer kommerziell erhältlichen Grasanwelksilage (HorseHage<sup>®</sup>; geometrischer Mittelwert 1,31 KbE/l) hoch signifikant gesteigert (150). Eine Untersuchung von Silage in den Azoren ergab zudem, dass 69 % der getesteten Proben mit *Aspergillus fumigatus* kontaminiert waren, von denen 11 % der Isolate in der Lage waren, Gliotoxin zu bilden (41). In einer Studie aus Argentinien produzierten sogar 60 % der aus Pferdefutter isolierten *Aspergillus fumigatus*-Stämme Gliotoxin. Es stellte sich außerdem heraus, dass sich in diesen Proben, bestehend aus 60 % Getreide, 20 % Hafer und 20 % silierte Luzerne, im Vergleich zu Futtermitteln für andere Tierarten (Rinder, Geflügel, Schweine und Kleintiere) die höchsten Gliotoxin-Konzentrationen ( $209 \pm 30 \mu\text{g/g}$  Pferdefutter) nachweisen ließen. Insgesamt waren in den Untersuchungen von PENA *et al.* (2010) 40 % der Pferdefutter-Proben mit Gliotoxin kontaminiert (127). In einer weiteren Untersuchung von Pferdefutter ließen sich in 41 % der Proben *Aspergillus spp.*, in 18 % *Penicillium spp.* und in 16 % *Fusarium spp.* nachweisen. Kontamination dieser Futtermittel mit Mykotoxinen (Aflatoxin B<sub>1</sub>, Fumonisin B<sub>1</sub>) konnte ebenfalls gezeigt werden (81). Während die Bildung von Gliotoxin oder Patulin in dieser Studie nicht kontrolliert wurde, konnte Patulin in Belgien aus Rinderfutter isoliert und in Verbindung mit einer letalen Neurotoxikose dieser Tiere gebracht werden (143).

Neben einer oralen ist auch eine inhalative Exposition von Pferden zu Mykotoxinen denkbar. Pilzsporen, die aerogen übertragen werden, erwiesen sich als wichtige Toxinträger für Schimmelpilzarten wie z. B. *Aspergillus fumigatus* oder *Aspergillus niger* (124, 153). Mikroskopische Untersuchungen dreier Heustaub suspensionen zeigten, dass diese vorwiegend aus Schimmelpilzsporen bestanden, die nicht größer als 4  $\mu\text{m}$  waren (135). Da Partikel unter einer Größe von 5  $\mu\text{m}$  bis in die tiefen Atemwege vordringen können, ist eine Inhalation dieser Schimmelpilzsporen bis in die Lunge denkbar (26). Darüber hinaus konnte *Aspergillus spp.* sowohl in der Stallluft als auch in der BALF von Pferden nachgewiesen werden (50, 191). Inhalation mit *Aspergillus fumigatus*-Extrakt rief im Vergleich zu einer Placebokontrolle eine Steigerung neutrophiler Granulozyten in der BALF COB-erkrankter Pferde hervor (107, 134). Darüber hinaus wurden in zwei Studien signifikant mehr IgE und IgG gegen Antigen von *Aspergillus fumigatus* in der BALF COB-erkrankter Tiere im

Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt (64, 146). IgE gegen Milben- und Schimmelpilzextrakte, bestehend aus *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* und *Penicillium notatum*, war in einer weiteren Studie in Seren von gesunden und erkrankten Pferden nachweisbar. Allerdings bildeten lediglich, je nach getestetem Antigen, 8-30 % der untersuchten Tiere einen messbaren IgE-Spiegel gegen rekombinante Antigene von *Aspergillus fumigatus* und *Alternaria alternata* aus. COB-betroffene Pferde besaßen dabei nicht nur signifikant mehr IgE gegen rekombinante Antigene als gesunde Kontrollpferde, sondern waren darüber hinaus häufig gegen mindestens zwei rekombinante Antigene sensibilisiert (42).

### 3.2 Immunmodulatorische Effekte von Lipopolysaccharid (LPS)

Endotoxine wurden erstmals vor über 100 Jahren als Komponenten der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien beschrieben (138). Hauptbestandteil der Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), die aus biologisch aktivem, hydrophobem Lipid A und hydrophilen Polysaccharidketten (O-Antigene) bestehen. Diese amphiphile Struktur ermöglicht Endotoxinen die Zirkulation im Körper. Je nach kultureller Anzucht der gramnegativen Bakterien kann zwischen einer rough (R-) und einer smooth (S-) Form des LPS unterschieden werden. Die R-Form ist durch das Fehlen der O-spezifischen Polysaccharidkette gekennzeichnet, wodurch die diese Form bildenden gramnegativen Bakterien lediglich *in vitro* kultivierbar sind (5, 113).

LPS wird bei der Replikation oder dem Absterben von gramnegativen Bakterien frei und führt im Anschluss zur Induktion einer Entzündungsreaktion (67). Je nach Dosis, Applikationsart und Individuum wirkt LPS entweder als Adjuvans und verstärkt Antigen-spezifische Immunantworten oder führt zu pathologischen Symptomen wie im Rahmen einer Endotoxämie (5). Die Inhalation von LPS löst z. B. in gesunden Menschen eine systemische Entzündungsreaktion mit einhergehendem Anstieg der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten aus. Die systemische Reaktion geht jedoch nicht wie bei Asthmatikern mit respiratorischen Symptomen einher (110).

Gelangt LPS in den Blutkreislauf, bindet es an das LPS-bindende Protein, welches wiederum im Anschluss mit dem Oberflächenrezeptor CD14 interagiert. CD14 wird einerseits membrangebunden auf mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten) exprimiert und kommt andererseits auch in löslicher Form im Plasma vor. Zusammen mit dem Toll-like-Rezeptor-4 und einem mit dem Rezeptor assoziierten Protein (MD-2) führt die Bindung von LPS an CD14 zur intrazellulären

## Literatur

---

Signaltransduktion mit anschließender Synthese und Sekretion von Entzündungsmediatoren, wie z. B. Arachidonsäuremetaboliten, TNF- $\alpha$ , Thromboplastin oder IL-6 (28, 38, 67, 113). Gleichzeitig fördert LPS die Ausschüttung von antiinflammatorischen Mediatoren, wie z. B. IL-10 (113) und löst eine rasche Aktivierung des Komplementssystems aus. Über Bindung an das lösliche CD14 kann LPS auch CD14-negative Zellen, wie z. B. dendritische Zellen sowie Epithel- und Endothelzellen aktivieren (5, 180).

JACOBSEN *et al.* (2007) konnten zeigen, dass intravenöse Applikationen von LPS (100 oder 1000 ng LPS/kg) bei Rindern kurzzeitig zu einer signifikanten Abnahme der IFN- $\gamma$ -produzierenden Lymphozyten führten. 24 h nach der Injektion erreichten diese wieder ihre Ausgangswerte oder überschritten sie sogar. Hohe Konzentrationen (1000 ng/kg) führten außerdem zu einem signifikanten Anstieg der IL-4<sup>+</sup>- und IL-10<sup>+</sup>-Lymphozyten. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen zeigte sich jedoch, dass sich eine proinflammatorische Antwort auf LPS ausbildete: Die Produktion von monozytären Entzündungsmediatoren (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) wurde einerseits gesteigert, andererseits nahm die Sezernierung von IL-4 durch Lymphozyten zugunsten einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort ab (77). LAUW *et al.* (2000) konnten nach Injektion von LPS (4 ng LPS/kg) bei gesunden Menschen eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung eines T<sub>H</sub>2-Profiles feststellen. Das Verhältnis von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- zu IL-4<sup>+</sup>-Lymphozyten nahm innerhalb von sechs Stunden nach der Injektion deutlich ab, wodurch eine herabgesetzte Funktion von Monozyten während einer Endotoxämie und Sepsis *in vivo* erklärt werden könnte (94). TULIC *et al.* (2000) beobachteten hingegen, dass die inhalative Applikation von LPS 24 h vor und bis zu vier Tage nach intraperitonealer Verabreichung von Ovalbumin die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern in Ratten hemmt und gleichzeitig IgG-Level im Serum steigert. Dies deutet auf eine vermehrte Produktion von Zytokinen der T<sub>H</sub>1-Antwort, insbesondere von IFN- $\gamma$  hin, wodurch eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort und damit eine allergische Reaktion durch LPS in der Sensibilisierungsphase verhindert wird (173). Untersuchungen von GEREDA *et al.* (2000) konnten zeigen, dass Kinder mit Allergien im Vergleich zu gesunden Kindern signifikant weniger Endotoxin-exponiert sind. Erhöhter Endotoxingehalt im Hausstaub korrelierte ebenfalls mit einem erhöhten Gehalt an T<sub>H</sub>1-Zellen. Daher wird von den Autoren ebenfalls postuliert, dass die frühe Exposition von Kindern zu Endotoxinen durch Steigerung der T<sub>H</sub>1-Antwort die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-Antwort inhibiert und damit die Entwicklung einer Allergie verhindert (57). Inhalativ mit Stall- bzw. Hausstaub induzierte T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Immunantworten in Mäusen konnten jedoch aufgrund eines nahezu identischen Endotoxingehaltes beider Staubarten in einer weiteren Studie nicht mit LPS in Verbindung gebracht werden (4).

Die divergierenden Ergebnisse könnten sich in der Intensität der LPS-Exposition begründen. EISENBARTH *et al.* (2002) konnten anhand eines murinen *In vivo*-Modells belegen, dass unterschiedliche LPS-Konzentrationen entweder in einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort resultieren. Intranasale Verabreichung einer relativ geringen Dosis LPS (0,1 µg) induzierte in Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort, während hohe Konzentrationen von LPS (100 µg) eine T<sub>H</sub>1-Antwort in den Atmungsapparaten der Mäuse hervorriefen (45). In Bestätigung dieser Ergebnisse stimulierten geringe Konzentrationen von LPS (0,1-1 ng/ml) in einer weiteren Untersuchung murine dendritische Vorläuferzellen zur Bildung von T<sub>H</sub>2-Zytokinen. Höhere Konzentrationen (10-100 ng/ml) induzierten stattdessen eine T<sub>H</sub>17-Immunantwort (128).

Darüber hinaus besitzt LPS aktivierende Eigenschaften auf B-Zellen (7, 27, 142, 173). Fünfwöchige Inhalation von LPS führte beispielsweise bei Meerschweinchen nicht nur zu einem Influx von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Lunge, sondern auch zu einer erhöhten IgG-Produktion und damit zu einer Aktivierung der B-Zellen (142). KIKU *et al.* (2003) konnten eine signifikante Zunahme von equinen IgM<sup>+</sup> B-Lymphozyten nach intravenöser Applikation von LPS bei gesunden Pferden beobachten und interpretierten dies als einen Hinweis auf die Ausbildung einer humoralen (T<sub>H</sub>2-) Immunantwort (82). Neben der mitogenen Wirkung auf B-Zellen ist LPS im Gegenzug *in vitro* in der Lage, über einen unbekanntem, indirekten Mechanismus CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu aktivieren (27), während jedoch *in vivo* mehrfach inhibitorische Effekte von LPS auf T-Zellen beobachtet werden konnten (27, 82, 94).

### 3.2.1 Exposition von Pferden zu LPS

Gramnegative Bakterien gehören zur physiologischen Darmflora des Pferdes. Bei einer Schädigung der intestinalen Barriere gelangen Bakterien und/oder LPS in die Blutbahn. Die resultierende Endotoxämie initiiert eine systemische inflammatorische Antwort (113, 114). Des Weiteren sind gramnegative Bakterien und Endotoxine als Komponenten des Staubes im Pferdestall nachweisbar (13, 108, 113, 132, 167). Der aerogene Gehalt an Endotoxinen ist im Stall verglichen zur Weide nachweislich um das 8- bis 15-fache erhöht (13, 108). Je nach Untersuchung variiert der Endotoxingehalt der Luft zwischen 1,6 und 19,8 x 10<sup>6</sup> ng/m<sup>3</sup>, von denen zwischen 3 bis 9 % inhalativ in die Tiefe der Lunge gelangen können (Tab. 3). Besonders bei Verwendung von Stroheinstreu ist der Gehalt an Endotoxinen erhöht (108, 167, 185), obwohl der Anteil gramnegativer Bakterien mit dem Gehalt anderer Einstreumaterialien (Papier oder Sägespäne) vergleichbar ist (167). Die große Spannweite in den gemessenen

## Literatur

---

Endotoxinkonzentrationen lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in den Versuchsdurchführungen zu erklären. Endotoxinbestimmungen sind hoch sensitiv gegenüber verschiedenen analytischen Methoden, der Beprobungstechnik und der Gestaltung des Experiments an sich (98, 171, 191). Bei Messungen mittels eines so genannten „Personal Samplers“, welche an den Tieren befestigt werden und so der Bestimmung des Staubgehaltes im Einatembereich dienen, führen darüber hinaus individuelle Verhaltensweisen der Pferde (Kopfhaltung, Bewegungs- und Fressaktivität) zu starken Schwankungen der Werte (13, 108, 132). Ferner können Unterschiede in der Ventilation der Stallanlagen und der Qualität des verwendeten Materials Differenzen zwischen den einzelnen Studien bewirken (30, 108).

LPS wird als Maß für den Anteil gram-negativer Bakterien in Futtermitteln und damit zur Beurteilung ihrer Qualität herangezogen. Ein LPS-Gehalt von  $>100 \mu\text{g/g}$  Heu/Stroh deutet auf eine starke Keimbelastung dieser Futtermittel hin, während Werte  $<35 \mu\text{g/g}$  für Raufutter als normal angesehen werden (80). 55 % des Heus ( $n=123$ ) sowie sogar 73 % des beprobten Strohs ( $n=45$ ) besitzen nach Angaben von WOLF *et al.* (2005) einen LPS-Gehalt  $>50 \mu\text{g/g}$ , während lediglich 29 % der untersuchten Heulage ( $n=17$ ) einen LPS-Gehalt  $>50 \mu\text{g/g}$  aufweisen (190).

PIRIE *et al.* (2001) untersuchten erstmalig bei gesunden und COB erkrankten Pferden die pulmonalen und systemischen Auswirkungen von inhaliertem LPS aus *Salmonella typhimurium*. Die Inhalation von LPS ( $2000 \mu\text{g}$ ) führte in beiden Tiergruppen zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten im Blut und induzierte eine konzentrationsabhängige ( $20, 200$  und  $2000 \mu\text{g}$ ) Neutrophilie in der BALF. Dabei lag der Grenzwert für die Induktion einer solchen respiratorischen Inflammation für die Gruppe der COB-Pferde niedriger ( $<20 \mu\text{g}$ ) als für die gesunde Kontrollgruppe ( $20-200 \mu\text{g}$ ) (133). Folgeuntersuchungen, in denen den oben genannten Tiergruppen Heustaub-Suspensionen und *Aspergillus fumigatus*-Extrakte mit und ohne LPS inhalativ verabreicht wurden, bestätigten eine mögliche ätiologische Beteiligung von LPS an der Entstehung einer COB. Sowohl die Depletion von LPS aus der Heustaub suspension als auch die Reduktion des LPS-Gehalts im *Aspergillus fumigatus*-Extrakt milderten die Neutrophilie in der BALF erheblich und verminderten die respiratorische Dysfunktion bei COB-Pferden (132, 134). Diese konnte nach nochmaligem Zusatz von LPS erneut hervorgerufen werden, jedoch in einem stärkeren Ausmaß als es durch die reine Inhalation mit LPS erwartet wurde. Andere organische Inhaltsstoffe des Staubes scheinen demnach die Wirkung von LPS zu potenzieren (132). In einer weiteren Studie führte die Inhalation von LPS bei COB-erkrankten Pferden zu einem signifikanten Anstieg der mRNA für TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-4. Die Transkription von mRNA für IFN- $\gamma$  blieb hingegen

Tab. 3: Aerogener Staub- und Endotoxin-Gehalt in Pferdeställen

Autoren	Einstreu/ Futter	Staubgehalt in der Luft (lungengängig <sup>1</sup> ) [mg/m <sup>3</sup> ]	Endotoxingehalt in der Luft (lungengängig <sup>1</sup> ) [ng/m <sup>3</sup> ]	Endotoxingehalt im Staub (lungengängig <sup>1</sup> ) [ng/m <sup>3</sup> ]
BERNDT <i>et al.</i> , 2010 (13) <sup>2</sup>	Stroh/ Heu	/	590 (/)	/
	Weide	/	70,8 (/)	/
McGORUM <i>et al.</i> , 1998 (108)	Stroh/ Heu	2,7 (1,1)	19,8 x 10 <sup>6</sup> (1,7 x 10 <sup>6</sup> )	7,6 (1,5)
	Späne/ Silage	0,8 (0,2)	3,9 x 10 <sup>6</sup> (1 x 10 <sup>7</sup> )	6,9 (0,7)
	Weide	0,2 (0,1)	1,3 x 10 <sup>6</sup> (1 x 10 <sup>7</sup> )	4,9 (1,1)
PIRIE <i>et al.</i> , 2003 (132)	Stroh/ Heu	1,2 (0,1)	156,0 (6,9)	83,0 (32,0)
PIRIE <i>et al.</i> , 2001 (133)	Stroh/Heu	2,8 (0,5)	160,0 (4,0)	56,0 (11,9)
TANNER <i>et al.</i> , 1998 (167) <sup>2</sup>	Stroh/ Heu	/	3,6 (/)	/
	Späne/ Heu	/	1,6 (/)	/
WOODS <i>et al.</i> , 1993 (191)	Stroh/ Heu	2,6 (0,4)	/	/
	Späne/ Pellets	0,7 (0,2)	/	/

<sup>1</sup>Als lungengängig werden Partikel bezeichnet, die aufgrund ihrer Größe, je nach Veröffentlichung <5 µm (132, 133) oder <7 µm (108), bis in die tiefen Atemwege vordringen können.

<sup>2</sup>Originalangaben in Endotoxinunits (EU)/m<sup>3</sup>, 12 EU entsprechen 1 ng (108); / = keine Angaben

unverändert. Die Autoren bezweifeln jedoch mit Ausnahme des Anstieg der mRNA für IL-10 die biologische Relevanz dieser Beobachtungen, da die durchschnittlichen mRNA-Spiegel für IL-4 und TNF-α und das beobachtete Ausmaß der Veränderungen zu gering erschienen (178).

### 3.3 Immunmodulatorische Effekte von Glucocorticoiden

Glucocorticoide zählen zu den Corticosteroiden, einer Klasse von Steroidhormonen, die nach Ausschüttung von hypophysärem ACTH in der Nebennierenrinde gebildet werden. Die *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde produziert hauptsächlich Cortisol (= Hydrocortison) und in geringerem Ausmaß Cortison (157). Pharmakologisch wird vor allem die anti-phlogistische, antiproliferative und immunsuppressive Wirkung von Glucocorticoiden genutzt. Dafür werden in ihrer Wirkung potenzierte, synthetisch hergestellte Corticosteroide, wie z. B. Dexamethason, eingesetzt (54). Dexamethason und Hydrocortison unterscheiden sich in Bezug auf ihr immunsuppressives Potential nur geringfügig, wohingegen das

## Literatur

---

antiphlogistische Potential von Dexamethason im Vergleich zu Hydrocortison um das 25-fache gesteigert und nahezu keine mineralocorticoide Wirkung mehr vorhanden ist (54, 92).

Nach Anwendung von Glucocorticoiden kommt es zunächst zu einem Anstieg der zirkulierenden, neutrophilen Granulozyten sowie zu einem Abfall der übrigen Leukozyten (vor allem von Lymphozyten und basophilen Granulozyten). Bei Rindern konnte dagegen ein erhöhter Anteil an  $CD4^+$ -Lymphozyten im Blut nach intramuskulärer Injektion von Dexamethason beobachtet werden (6).

Neben der Lymphozytenproliferation hemmen Glucocorticoide auch die Zytokinproduktion der T-Helferzellen, deren Ausprägung jedoch in der Literatur widersprüchlich beschrieben wird (145). Während einige Arbeitsgruppen in ihren Untersuchungen *in vitro* eine konzentrationsabhängige Abnahme sowohl von humanen  $T_H1$ - ( $IFN-\gamma$ ) und als auch von  $T_H2$ -Zytokinen (IL-4) sowie deren mRNA beobachteten (20, 52, 112, 158), konnten andere Arbeitsgruppen lediglich eine vor allem die  $T_H2$ -Zellen betreffende Inhibition feststellen (149) oder gar einen Anstieg von  $T_H2$ -Zytokinen (IL-4) durch Dexamethason hervorrufen (35). Für verschiedene Glucocorticoide (u. a. Hydrocortison, Fluticason, Beta- und Dexamethason) konnten *in vitro* eine stärkere, konzentrationsabhängige Inhibition der IL-4- und IL-5-Sezernierung im Vergleich zur jener von  $IFN-\gamma$  beobachtet werden (86, 158, 174). Ebenso wurde eine signifikante Erhöhung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses durch Dexamethason festgestellt (86). Aus einer stärkeren Suppression der  $T_H2$ -Zytokine erklären sich SCHMIDT *et al.* (1994) den erfolgreichen Einsatz von Glucocorticoiden in der Therapie von Asthma, in dessen Pathogenese  $T_H2$ -Zellen eine ausschlaggebende Rolle spielen (149).

Im Gegensatz hierzu wiesen FRANCHIMONT *et al.* (1998) eine im Vergleich zu IL-4 stärkere Suppression der  $IFN-\gamma$ -Produktion durch Dexamethason nach. Dexamethason ist demnach in der Lage, eine Verschiebung in Richtung einer  $T_H2$ -Immunantwort auszulösen, weswegen eine Anwendung dieses Corticoids bei chronisch allergischen Patienten von den Autoren in Frage gestellt wird (52). Eine Studie von ZIEG *et al.* (1994) konnte jedoch zeigen, dass sich die klinische Symptomatik nach Anwendung von Prednison bei Asthma-Patienten nicht verschlechterte, obwohl die  $IFN-\gamma$ -Synthese in  $CD3^+$ -T-Zellen und NK-Zellen abnahm und gleichzeitig die IgE-Produktion gesteigert war (196).

IL-2 fördert die Proliferation von T-Zellen. Die Abnahme der  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zytokine durch Glucocorticoide ist jedoch nicht durch eine alleinige Hemmung der IL-2-Produktion zu erklären. Sowohl physiologische (Hydrocortison) als auch synthetische (u. a. Dexamethason) Glucocorticoide führten zwar zu einer verminderten Ausschüttung von IL-2 (35, 149, 158),

die Zugabe von rekombinantem IL-2 konnte allerdings nur bedingt die IFN- $\gamma$ - und IL-4-Produktion wiederherstellen (158, 193).

Die Beeinflussung der Zytokine durch Dexamethason ist auch durch eine indirekte Einwirkung des Corticosteroids auf T-Zellen denkbar (16, 20, 35, 36). Sowohl am Beispiel von murinen Makrophagen der Milz als auch von humanen Monozyten konnte gezeigt werden, dass Dexamethason zu einer reduzierten Produktion von IL-12 dieser Zellen führt. IL-12 fördert die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Antwort, so dass die in den Untersuchungen induzierte Reduktion indirekt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Abnahme der IFN- $\gamma$ - und eine gleichzeitige Zunahme der IL-4-Produktion in T-Zellen bewirkte (16, 36). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Nickel-aktivierte dendritische Zellen nach Inkubation mit Glucocorticoiden (Hydrocortison, Dexamethason) signifikant weniger T<sub>H</sub>1-Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-12p70) bildeten. Die Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen (IL-10, CCL17) durch dendritische Zellen blieb dagegen unbeeinflusst (172). Demnach sind durch Glucocorticoide beeinflusste Antigen-präsentierende Zellen indirekt in der Lage, Zytokinprofile von T-Zellen zu modifizieren.

### 3.3.1 Anwendung von Dexamethason beim Pferd

Corticosteroide werden routinemäßig zur Therapie, wie beispielsweise zur Behandlung der COB, bei Pferden eingesetzt. Dexamethason führt sowohl nach intravenöser als auch nach intramuskulärer Applikation zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktion (34, 130, 141). Des weiteren verursacht Dexamethason eine signifikante Verminderung der neutrophilen Granulozyten sowie einen gleichzeitigen Anstieg der Lymphozyten in der BALF, wohingegen hämatologisch gegenteilige Effekte von Dexamethason auf diese Zellpopulationen beobachtet werden (34, 130, 141). Während ROBINSON *et al.* (2002) nach oraler Applikation von Dexamethason keine Verbesserungen der Lungenfunktion im Vergleich zur nicht-therapierten Kontrollgruppe feststellten (141), konnten CORNELISSE *et al.* (2004) einen klinisch sichtbaren Effekt von Dexamethason innerhalb von sechs Stunden unabhängig von der Applikationsart (oral/intravenös) beobachten. Vorausgesetzt, dass die Pferde im Vorfeld der Untersuchung für 12 h kein Futter erhielten, blieben diese klinisch sichtbaren Effekte bis zu 24 h nachweisbar (32). Darüber hinaus konnten signifikante Verbesserungen der Lungenfunktion nach oraler Applikation von Dexamethason selbst bei fortgesetzter Staubexposition der Pferde festgestellt werden (96).

Wirkungen der Corticosteroide auf das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis des Pferdes wurden bislang nur von GIGUÈRE *et al.* (2002) beschrieben. Inhalation von Fluticason, ein Corticosteroid,

welches routinemäßig in der Therapie von Asthma-Patienten in der Humanmedizin Anwendung findet, führte nach Induktion einer Exazerbation bei COB-Pferden nicht nur zu Verbesserungen der Lungenfunktion und einer Abnahme der Neutrophilie in der BALF, sondern darüber hinaus auch zu einer signifikanten Reduktion der mRNA für IL-4 und daher zu einem signifikanten Anstieg des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses (58).

## 4 Arbeitshypothese

Das  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewicht ist entscheidend an der Entwicklung einer adäquaten Immunantwort gegenüber Pathogenen beteiligt. Eine Störung dieses Gleichgewichts ist daher auch beim Pferd an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt. Eine Beurteilung des Immunsystems zur Bestimmung des Gesundheitszustandes eines Individuums ist jedoch bislang in der Praxis nicht üblich. Wissenschaftliche Analysen des Immunsystems erfolgen in der Regel auf Basis transkriptioneller Prozesse. Posttranskriptionelle Modifikationen der Zytokinproduktion werden zumeist nicht berücksichtigt. Ein Nachweissystem zur Bestimmung des Zytokinmusters, welches auf posttranskriptionellen Prozessen basierend Aussagen über die individuelle Immunlage erlaubt, existiert beim Pferd bislang nicht.

Da der Zytokingehalt im Blut von Pferden zu gering ist, um individuelle Unterschiede hervorzuheben, ist davon auszugehen, dass equine Lymphozyten erst nach Konfrontation mit immunmodulatorisch wirkenden Stoffen ein tierspezifisches  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil ausbilden, welches eine Interpretation der Immunlage ermöglicht. Ziel dieser Arbeit war es daher, *In vitro*-Tests an equinen Lymphozyten aus dem Blut zu etablieren, die die Immunlage von Pferden widerspiegeln. Hierbei diene das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis als Parameter zur Beurteilung des individuellen Immunstatus.

### III Material und Methoden

Der Ablauf des experimentellen Abschnitts der Dissertation gliederte sich in Vor- und Hauptversuche. In den Vorversuchen wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung für jede getestete Noxe (Gliotoxin, Patulin, LPS, Dexamethason) *in vitro* erstellt. In dieser Arbeit wird der Begriff Noxe für Prototypen von exogenen Einflussfaktoren verwendet, die aufgrund der Literatur eine immunmodulatorische Wirkung auf Lymphozyten des Pferdes besitzen. In den Hauptversuchen wurde der Effekt unterschiedlicher Haltungsbedingungen auf eine Noxenspezifische Veränderung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses *in vitro* untersucht. Dabei wurde ein in den Vorversuchen ermittelter Konzentrationsbereich der Noxen verwendet.

#### 1 Tiere und Blutentnahme

##### 1.1 Vorversuche

Für jede getestete Noxe wurden drei klinisch gesunde Pferde (A-C) im Alter von 13, 16 und 24 Jahren beprobt (Tab. 4). Pferd A wurde, außer für die Titration von Gliotoxin, zweimalig beprobt. Dies wurde durch die Bezeichnungen Pferd A<sub>1</sub> und Pferd A<sub>2</sub> gekennzeichnet. Pferd B und C wurden jeweils einmalig beprobt.

Die Probenentnahme erfolgte über die Punktion der *Vena jugularis*. Dabei wurden mit einer Kanüle (18 G), zur Schonung der Zellen langsam, 40 ml Blut entnommen, welches mit einer 3,8 %-igen sterilen Natriumcitrat-Lösung in einem Verhältnis von 1:5 zur Gerinnungshemmung versetzt wurde. Die gewonnenen Blutproben wurden innerhalb von 30 min. nach Entnahme ins Labor transportiert und wie unter Kap. III 2.1 beschrieben aufgearbeitet.

**Tab. 4: Informationen zu den beprobten Tieren der Vorversuche**

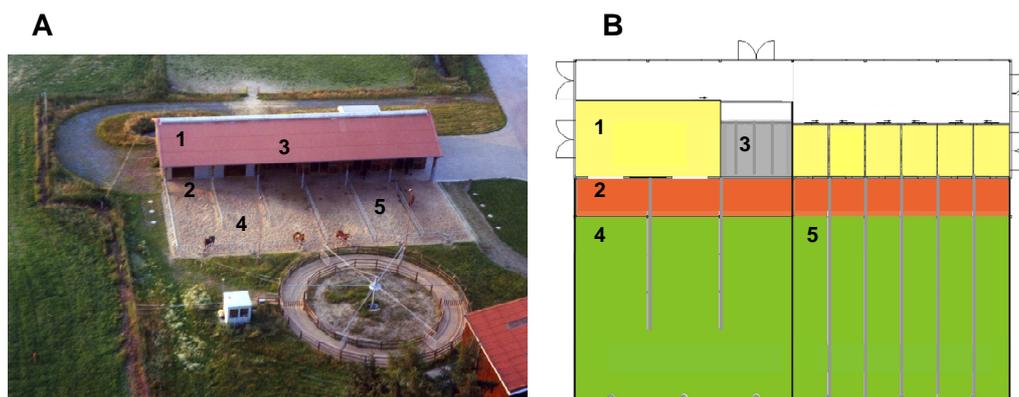
Pferd	Rasse	Geschlecht	Alter <sup>1</sup>	Eigentümer
A	Warmblut	Wallach	24 Jahre	Klinik für Pferde, Innere Medizin <sup>2</sup>
B	Polopony	Stute	13 Jahre	Klinik für Pferde, Innere Medizin <sup>2</sup>
C	Warmblut	Stute	16 Jahre	Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie <sup>2</sup>

<sup>1</sup> zum Zeitpunkt der Beprobung; <sup>2</sup>Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

### 1.2 Hauptversuche

Bei den beprobten Tieren der Hauptversuche handelte es sich eine Gruppe von sechs Warmblutstuten (Pferd 1-6) im Alter von zwei Jahren (Tab. 5). Die Herde wurde auf dem Gelände des Johann Heinrich von Thünen-Instituts (vTI) in Braunschweig während eines Zeitraumes von September 2007 bis August 2008 im Rahmen von Haltungs- und Verhaltensstudien in einer Mehrraum-Auslaufhaltung (Haltungsform mit mehreren Funktionsbereichen: Ruhe, Laufen, Trinken, Fressen) gehalten (Abb. 1). Ziel der dortigen Studien war es, den Einfluss des Einstreumaterials auf die Luftqualität im Pferdestall zu evaluieren. Das Projekt wurde von Prof. Dr. Ir. H. van der Weghe (Forschungs- und Studienzentrum für Veredelungswirtschaft Weser-Ems, Georg-August-Universität Göttingen) geleitet und in Braunschweig von Prof. Dr. F.-J. Bokisch (vTI) und Dr. G. Hoffmann (vTI) durchgeführt (177).

Die Tiere stammten von einem Pferdezüchter aus der Umgebung und wurden nur einmalig während des Wechsels nach Braunschweig in den Versuchsstall einer Umstellung der Haltungsbedingungen ausgesetzt. Mit Ausnahme von Pferd 3, sind sämtliche Tiere entweder 1. oder 2. Grades väterlicherseits miteinander verwandt (Tab. 5). Die Stuten wurden regelmäßig entwurmt sowie gegen Tetanus grundimmunisiert. Pferd 3 musste in der 15. Versuchswoche, Pferd 5 in der 19. Versuchswoche aufgrund einer Verletzung erneut gegen Tetanus geimpft werden.



**Abb. 1: Mehrraum-Auslaufhaltung des vTI Braunschweig**

Luftaufnahme (A) sowie Grundskizze (B) vom Stallgebäude; **1:** Ruhebereich (12 m<sup>2</sup>/Pferd) **2:** Vordach (9 m<sup>2</sup>/Pferd) **3:** Fressstände **4:** Gruppenauslauf (45 m<sup>2</sup>/Pferd) **5:** Einzelhaltungen (für die eigenen Untersuchungen nicht relevant); Aufnahme und Skizze freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. G. Hoffmann, vTI, Braunschweig

## Material und Methoden

**Tab. 5: Informationen zu den 2-jährigen<sup>1</sup> Warmblutstuten der Hauptversuche**

<b>Pferd</b>	<b>Zuchtlinie</b>	<b>Vater</b>	<b>Mutter</b>	<b>Muttervater</b>
1	Hannover	Escudo I	Welfin	Wandergesell
2	Hannover	Stolzenberg	Bodega	Bold Indian XX
3	Hesse	Ruehmann	White Lady	White Magic
4	Hannover	Escudo I	Sensation	Stakkato
5	Hannover	Stakkato	Baronesse	Bold Indian XX
6	Hannover	Escudo I	Widia	Werther

<sup>1</sup>zum Zeitpunkt der ersten Beprobung im Mai 2008

Die Studien des vTI beinhalteten verschiedene Formen der Einstreu im Ruhebereich der Auslaufhaltung (Abb. 2): Sieben Wochen lang erfolgte die Einstreu konventionell mit Weizenstroh, weitere sieben Wochen wurden die Pferde auf Holzspänen und abschließend für sieben Wochen auf Strohpellets gehalten. Pro Tag erhielten die Tiere computergesteuert über einen Transponder jeweils drei Mal für 120 min. Raufutter (trockenes Heu) sowie drei Mahlzeiten Kraftfutter (Hafer). Zusätzlich erhielten die Stuten täglich zwei Stunden Weidegang.

Die Stuten wurden dreimalig (Woche 7, 14 und 21) wenige Tage vor Ende einer jeden Aufstallungsperiode von Mai bis August 2008 beprobt (Abb. 2). Nach einer allgemeinen klinischen Untersuchung des Einzeltieres erfolgte die Beprobung analog der obigen Beschreibung (s. Kap. III 1) durch Punktion der *Vena jugularis*. Die klinische Untersuchung umfasste sowohl die Messung der Körperinnentemperatur, der Puls- und der Atemfrequenz als auch die Beurteilung der Schleimhäute, Mandibularlymphknoten und der Peristaltik. Außerdem wurde beobachtet, ob die Pferde Nasenausfluss zeigten und ob eine Depigmentierung der Nasenschleimhaut (Sekretrinne) vorhanden war. Es wurde auf spontanen Husten geachtet sowie eine Auskultation der Lunge durchgeführt. Keines der Tiere musste aufgrund einer schwerwiegenden Erkrankung von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

Nach der Gewinnung wurden die Proben in einer ungekühlten Styroporbox nach Gießen transportiert. Innerhalb von 4 h nach Probenentnahme wurden die Blutproben der Pferde 1-3, nach weiteren 3½ h die Proben der Pferde 4-6 verarbeitet.

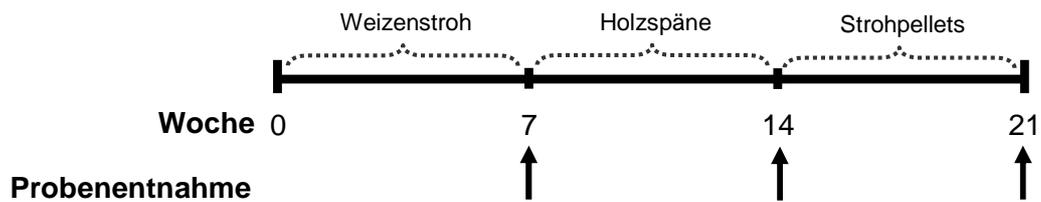


Abb. 2: Schema des Beprobungsplanes

## 2 Isolation und *In vitro*-Provokation equiner PBMC

Abb. 3 zeigt die schematische Vorgehensweise der Einzelversuche, die sowohl für die Vor- als auch für die Hauptversuche gilt. Als Mediumkontrolle ist dabei eine Probe definiert, die nicht mit einer Noxe inkubiert wurde, während die *In vitro*-Provokation eine Inkubation mit einer Noxe darstellt.

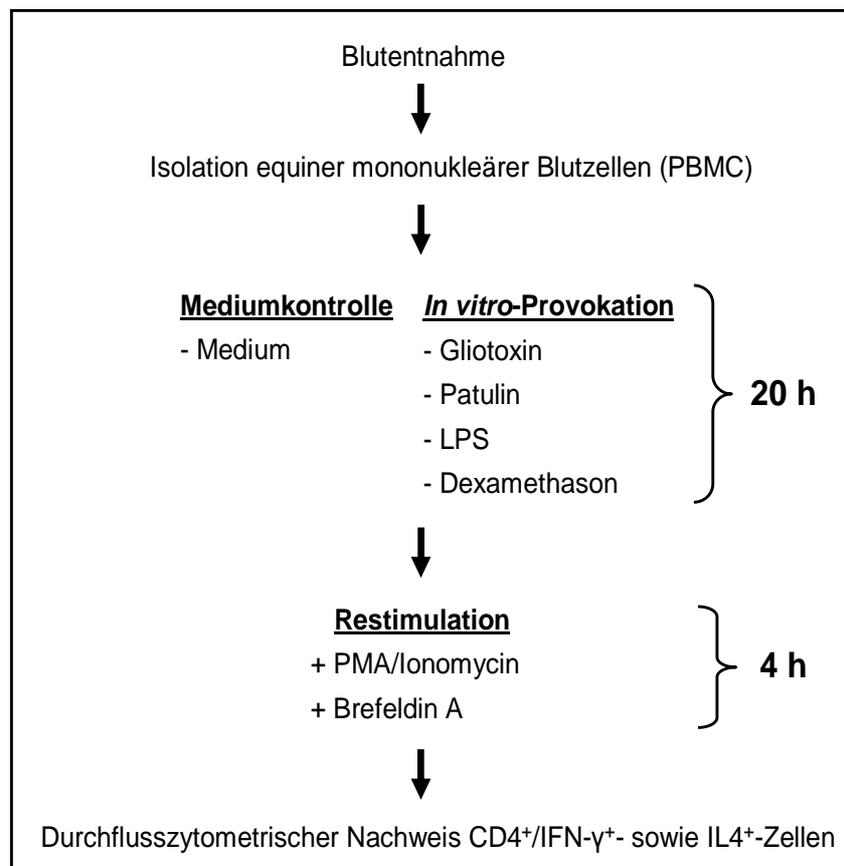


Abb. 3: Schema zur Vorgehensweise während der Vor- und Hauptversuche

## Material und Methoden

---

### 2.1 Isolation

Die Isolation der PBMC, zu denen sowohl Lymphozyten als auch Monozyten zählen, wurde mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 20 ml Citratblut in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) mit 17 ml PBS-EDTA vermischen
2. Citrat/PBS-EDTA-Blut auf 12 ml Ficoll-Paque<sup>®</sup> (RT) vorsichtig aufschichten
3. Zentrifugation (45 min., 799 x g, RT; Zentrifuge ungebremst auslaufen lassen)
4. Vorsichtiges Abpipettieren der Interphase und der Ringphase
5. Verdünnung der Zellsuspension durch Zugabe von PBS-EDTA (bis 45 ml eines 50 ml-Zentrifugenröhrchens gefüllt sind)
6. Zentrifugation (8 min., 250 x g, RT)
7. Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Reagenz resuspendieren
8. Inkubation für 5 min und anschließend Zugabe von 10 ml PBS-EDTA
9. Zentrifugation (7 min., 200 x g, RT)
10. Pellet in 10 ml PBS-EDTA resuspendieren
11. Zentrifugation (7 min., 200 x g, RT)
12. Pellet in 10 ml PBS resuspendieren
13. Zentrifugation (7 min., 200 x g, RT)
14. Pellet in 2 ml PBMC-Medium (s. Kap. III 2.3) resuspendieren

### 2.2 Bestimmung der absoluten Zellzahl

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer: 20 µl der vorsichtig resuspendierten Zellsuspension wurden zur Differenzierung der vitalen und toten Zellen mit 180 µl Trypanblau verdünnt (1:10). Im Anschluss wurde ein Aliquot der Lösung in die vorbereitete Zählkammer pipettiert. Die darauf folgende Auszählung der vier Gruppenquadranten, bestehend aus 16 Kleinstquadranten, wurde unter dem Lichtmikroskop mit 100-facher Vergrößerung durchgeführt und die so ermittelte Zellzahl in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Gesamtzellzahl pro } \mu\text{l} = (X/4) \times V \times 10^4$$

X = in den vier Gruppenquadranten ausgezählte Zellzahl

V = Verdünnungsstufe

### 2.3 *In vitro*-Provokation

Die PBMC wurden unmittelbar nach der Isolierung in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml PBMC-Medium in Suspensions-Kulturplatten mit 12 Vertiefungen ausplattiert. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung betrug 1 ml. Anschließend wurden die jeweiligen Noxen (Gliotoxin, Patulin, LPS oder Dexamethason) in ausgewählten Konzentrationen (Tab. 6) hinzugefügt und für 20 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 20 h wurden für weitere 4 h zur Stimulation der intrazellulären Zytokinbildung sowohl PMA (25 ng/ml) als auch Ionomycin (1 µg/ml) hinzugefügt. Dabei fördert das Kalzium-Ionophor Ionomycin vor allem die Transkriptions-Aktivität des IL-4 Promoters (123), während PMA in Anwesenheit von Ionophoren zu einem Anstieg der IFN-γ Produktion führt (46). Außerdem erhielten die Zellen zu demselben Zeitpunkt Brefeldin A (10 µg/ml) zur Vermeidung einer Sezernierung der gebildeten Zytokine (84).

Zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches, bei dem es zu einer Veränderung des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zytokinmusters kommt, wurden für jede Noxe im Rahmen der Vorversuche Titrationsreihen erstellt. Diese wurden pro Stoff dreimalig mit verschiedenen Tieren (Pferd A, B und C) wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Pferd A wurde für jede Noxe im Zweifachansatz getestet. Eine Ausnahme bildete die Titration von Gliotoxin, da aufgrund anfänglicher Änderungen des Protokolls auf eine Auswertung des ersten Tests von Pferd A verzichtet wurde. Anschließend wurden Konzentrationsbereiche definiert, welche als geeignet erschienen, eine Noxen-spezifische Veränderung des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses hervorrufen zu können (Tab. 6). Diese Konzentrationen wurden dann im Anschluss in den Hauptversuchen verwendet.

**Tab. 6: Bestimmung der Konzentrationsbereiche für die *In vitro*-Provokation**

Reagenz	Konzentrationsbereich der Vorversuche	Konzentrationsbereich der Hauptversuche	Titrationstufen
Gliotoxin	2,9 - 50 ng/ml	11,1 - 25 ng/ml	log 1,5
Patulin	2,5 - 640 ng/ml	62,5 - 250 ng/ml	log 2
LPS	1,6 - 25.000 ng/ml	10,0 - 250 ng/ml	log 5
Dexamethason	0,04 - 40.000 ng/ml	0,04 - 4 ng/ml	log 10

### 3 Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Zellen wurde ein mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattetes FACSCalibur™ Zytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Ein Argonlaser regt Zellen bei einer Wellenlänge von 488 nm an, während ein roter Diodenlaser zu einer Exzitation der Zellen bei 635 nm führt. Angeregt durch den Argonlaser können bei einer Emission des Lichts bei 488 nm durch zwei Detektoren das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen werden. Zusätzlich besitzt das Zytometer vier Fluoreszenzdetektoren, von denen drei im Folgenden verwendet wurden: Der zweite Detektor (FL2) misst den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE, emittierte Wellenlänge bei 575 nm), der dritte Detektor (FL3) misst 7-Aminoactinomycin D (7-AAD; emittierte Wellenlänge bei 655 nm) und der vierte Detektor (FL4) das Allophycocyanin (APC; emittierte Wellenlänge bei 660 nm).

#### 3.1 Etablierung der Methode

Im Rahmen von einleitenden Versuchen zur Etablierung der Methode wurden zur Bestimmung geeigneter Konzentrationen der verwendeten Antikörper Verdünnungsreihen erstellt (Tab. 7).

Zur Vermeidung falsch positiver Signale im Rahmen der Doppelfluoreszenzfärbung von CD4 und IFN- $\gamma$  wurde ein Blockierungsantikörper (Hybridomazellklon 1E8) verwendet, der ein Epitop der Phospholipase C von *Clostridium perfringens* detektiert. Er verhinderte durch Bindung an die Fab-Fragmente des anti-IgG1 APC-konjugierten Antikörpers, die nicht CD4 gebunden hatten, eine mögliche unspezifische Bindung des direkt markierten anti-bov IFN- $\gamma$ -Antikörpers. Wie vorherige Untersuchungen von FRANZ bestätigten, bindet der Antikörper 1E8 nicht unspezifisch an Oberflächenantigene equiner PBMC (53).

Für Negativkontrollen der CD4- und IL-4-Detektion wurde ein Kontroll-Antikörper des gleichen Isotyps wie der eigentliche Primärantikörper eingesetzt. Da es sich bei dem anti-bov IFN- $\gamma$ -Antikörper um einen direkt markierten Antikörper handelte, wurde ein solcher Isotyp-Kontroll-Antikörper für den IFN- $\gamma$ -Nachweis nicht verwendet.

## Material und Methoden

**Tab. 7: Gebrauchslösungen und Isotypen der verwendeten Antikörper**

Reagenz	Klon	Isotyp	Konzentration	Titrationbereich (log 2) <sup>1</sup>	Gebrauchsverdünnung
<u>Primärantikörper</u>					
Maus anti-eq CD4	CVS 4	IgG1	keine Angaben	1:16 - 1:256	1:20
Maus anti-bov IFN- $\gamma$ , PE-konjugiert	CC 302	IgG1	0,1 mg/ml	1:10 - 1:5120	1:200
Maus anti-bov IL-4 <sup>2</sup>	CC 303	IgG2a	1 mg/ml	1:10 - 1:640	/
Maus anti-eq IL-4 <sup>3</sup>	nicht bekannt	IgG1	nicht bekannt	1:2 - 1:64	1:25
<u>Sekundärantikörper</u>					
Ziege anti-ms IgG1, APC-konjugiert	/	/	0,5 mg/ml	1:25 - 1:800	1:500 <sup>4</sup> oder 1:400 <sup>5</sup>
Ziege anti-ms IgG1, PE-konjugiert	/	/	0,5 mg/ml	/	1:300
Ziege anti-ms IgG2a, PE-konjugiert	/	/	0,5 mg/ml	/	1:300
<u>Isotyp-Kontroll-Antikörper</u>					
Maus IgG1 negative control	/	IgG1	0,1 mg/ml	/	1:200
<u>Blockierungsantikörper</u>					
Maus anti-Phospholipase C von <i>Cl. perfringens</i>	1E8	IgG1	nicht bekannt	/	unverdünnt

<sup>1</sup>Es wurden lediglich Antikörper titriert, deren geeignete Endkonzentrationen nicht bekannt waren. <sup>2</sup>Verwendung eines PE-konjugierten sowie eines unkonjugierten Antikörpers des gleichen Klones und Herstellers; <sup>3</sup>freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Wagner (Cornell University, Ithaca; USA); <sup>4</sup>Fa. Southern Biotech; <sup>5</sup>Fa. Jackson Immuno Research

### 3.2 Doppelfluoreszenzfärbung von CD4 und IFN- $\gamma$

Soweit nicht anders angegeben, wurde die Präparation auf Eis durchgeführt. Sämtliche Konzentrationen für die Gebrauchslösungen der verwendeten Antikörper finden sich in Tab. 7. Zur Herstellung der Gebrauchslösungen wurde bis zum Fixierungsschritt Verdünnungspuffer und nach Fixierung der Zellen Leukoperm<sup>®</sup> Lösung B verwendet.

1. Resuspendierung der Zellen in den Vertiefungen der Inkubationsplatte für die Provokation
2. Überführung von  $2 \times 10^5$  Zellen (= 135  $\mu$ l) in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, V-Form, Greiner)

## Material und Methoden

---

3. Zentrifugationsschritt (400 x g, 3 min., 4°C) mit anschließendem Ausschlagen des Überstandes
4. Detektion von CD4
  - a) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl primärer Antikörperlösung; Negativkontrollen erhalten 50 µl der Isotypenkontrolllösung
  - b) Inkubation im Dunkeln für 15 min., anschließend Zentrifugationsschritt
  - c) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl sekundärer Antikörperlösung (enthält zusätzlich 7-AAD [1:50], s. Kap. III 3.4)
  - d) Inkubation im Dunkeln für 15 min., anschließend Zentrifugationsschritt
5. Fixierung der Zellen
  - a) Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
  - b) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl Leukoperm<sup>®</sup> Lösung A
  - c) Inkubation im Dunkeln für 15 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
  - d) Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
6. Detektion von IFN-γ
  - a) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl 1E8-Lösung
  - b) Inkubation im Dunkeln für 20 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
  - c) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl primärer Antikörperlösung, Negativkontrollen erhalten 50 µl Leukoperm<sup>®</sup> Lösung B
  - d) Inkubation im Dunkeln für 20 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
7. Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
8. Resuspendierung der Zellpellets mit 50 µl PBS und Überführung der Proben in Teströhrchen mit je 150 µl PBS

### 3.3 Einfachfluoreszenzfärbung von IL-4

Da für den IL-4-Nachweis im Gegensatz zum IFN-γ-Nachweis kein direkt markierter Primäantikörper zur Verfügung stand, musste aufgrund identischer Isotypen der Primäantikörper (anti-eq CD4 und anti-eq IL-4) auf eine Zweifarbenfluoreszenz verzichtet und das Protokoll folgendermaßen modifiziert werden:

1. Resuspendierung der Zellen in den Vertiefungen der Inkubationsplatte für die Provokation
2. Überführung von  $2 \times 10^5$  Zellen (= 135 µl) in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, V-Form, Greiner)
3. Zentrifugationsschritt (400 x g, 3 min., 4°C) mit anschließendem Ausschlagen des Überstandes

## Material und Methoden

---

4. Resuspendieren der Zellpellets in 50 µl 7-AAD-Lösung [1:50] (s. Kap. III 3.4)
5. Inkubation im Dunkeln für 15 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
6. Fixierung der Zellen
  - a) Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
  - b) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl Leukoperm<sup>®</sup> Lösung A
  - c) Inkubation im Dunkeln für 15 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
  - d) Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
7. Detektion von IL-4
  - a) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl primärer Antikörperlösung; Negativkontrollen erhalten 50 µl der Isotypenkontrolllösung
  - b) Inkubation im Dunkeln für 20 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
  - c) Resuspendierung der Zellpellets in 50 µl sekundärer Antikörperlösung
  - d) Inkubation im Dunkeln für 20 min. bei RT, anschließend Zentrifugationsschritt
8. Resuspendierung der Zellpellets mit 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
9. Resuspendierung der Zellpellets mit 50 µl PBS und Überführung der Proben in Teströhrchen mit je 150 µl PBS

### 3.4 Analyse der Proben

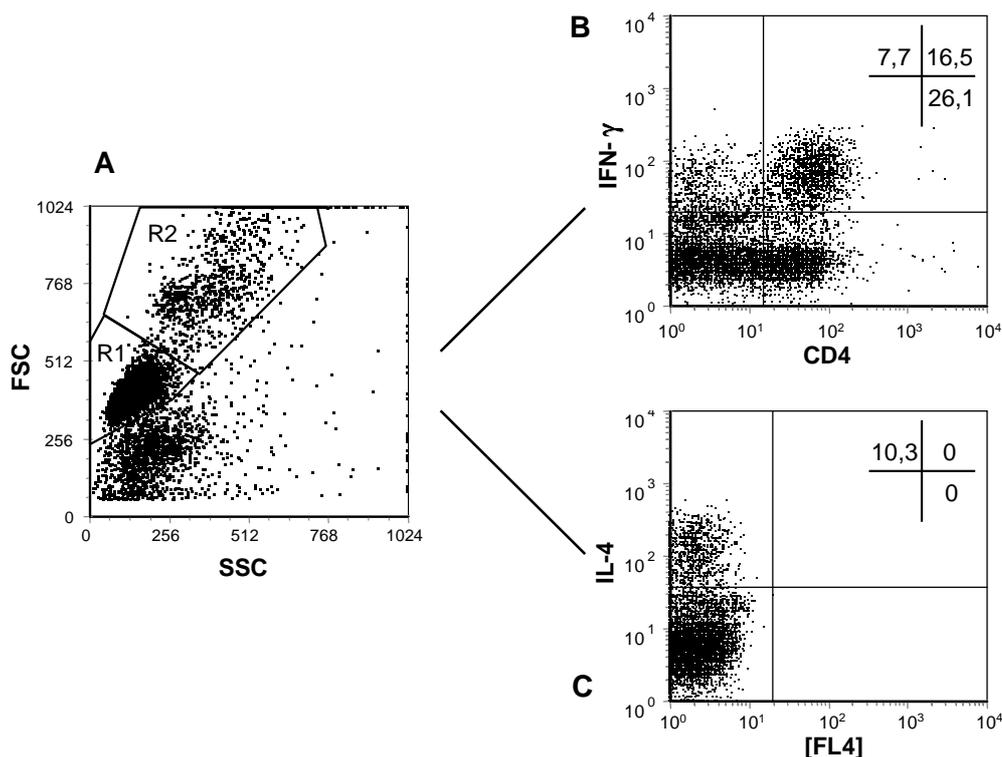
Die Einstellung der Messparameter (Detektoren) erfolgte anhand der Vorversuche, wurde in Form eines Standardprotokolls gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte durch das Computerprogramm CellQuest<sup>™</sup> Pro von Becton Dickinson. Die anschließende Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Computerprogramms FCS Express, Version 2 (DeNovo-Software, Ontario, Kanada) durchgeführt.

Es konnten anhand der Parameter Vorwärtsstreulicht (korreliert mit der Größe der Zellen) und Seitwärtsstreulicht (korreliert mit der Granularität der Zellen) unterschiedliche Populationen der PBMC differenziert werden: morphologisch intakte und damit als vital definierte Lymphozyten und Lymphoblasten sowie morphologisch degenerierte Zellen einschließlich Zelldebris (Abb. 4). Um die vitalen Populationen getrennt analysieren zu können, wurden elektronische Auswertungsfenster gesetzt. In den Vorversuchen wurden je Probe im Doppelansatz stichprobenartig 10000 Ereignisse aller gemessenen Ereignisse analysiert. Diese Zahl wurde in den Hauptversuchen auf 5000 Ereignisse aller als vital definierten Ereignisse reduziert, um eine möglichst zügige Messung aller Proben zu gewährleisten.

## Material und Methoden

Die vitalen Lymphozyten und Lymphoblasten wurden im Verlauf der Auswertung auf das Vorhandensein des Oberflächenantigens CD4 sowie der Zytokine IFN- $\gamma$  oder IL-4 untersucht (Abb. 4). Eine getrennte Auswertung der Lymphozyten- bzw. der Lymphoblastenpopulation ergab keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn. Aufgrund des sehr geringen Anteils an Lymphoblasten und der daraus resultierenden geringen Zahl an auswertbaren Ereignissen ließen sich keine aussagekräftigen Resultate erzielen, so dass im folgenden Lymphozyten und Lymphoblasten gemeinsam analysiert wurden.

Zur Analyse der IFN- $\gamma$ - bzw. IL-4-Produktion wurde ein weiteres, elektronisches Auswertungsfenster so definiert, dass weniger als 2 % der Zellen der Mediumkontrolle (Probe, die nicht *in vitro* mit einer Noxe provoziert und außerdem mit einer Isotypenkontrolle desselben Isotyps wie der Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper angefärbt wurde) eine Fluoreszenzintensität innerhalb des Fensters aufwiesen. Die bis zu 2 % Zellen mit einem Fluoreszenzsignal oberhalb des Schwellenwertes wurden als falsch positive Zellen bewertet.

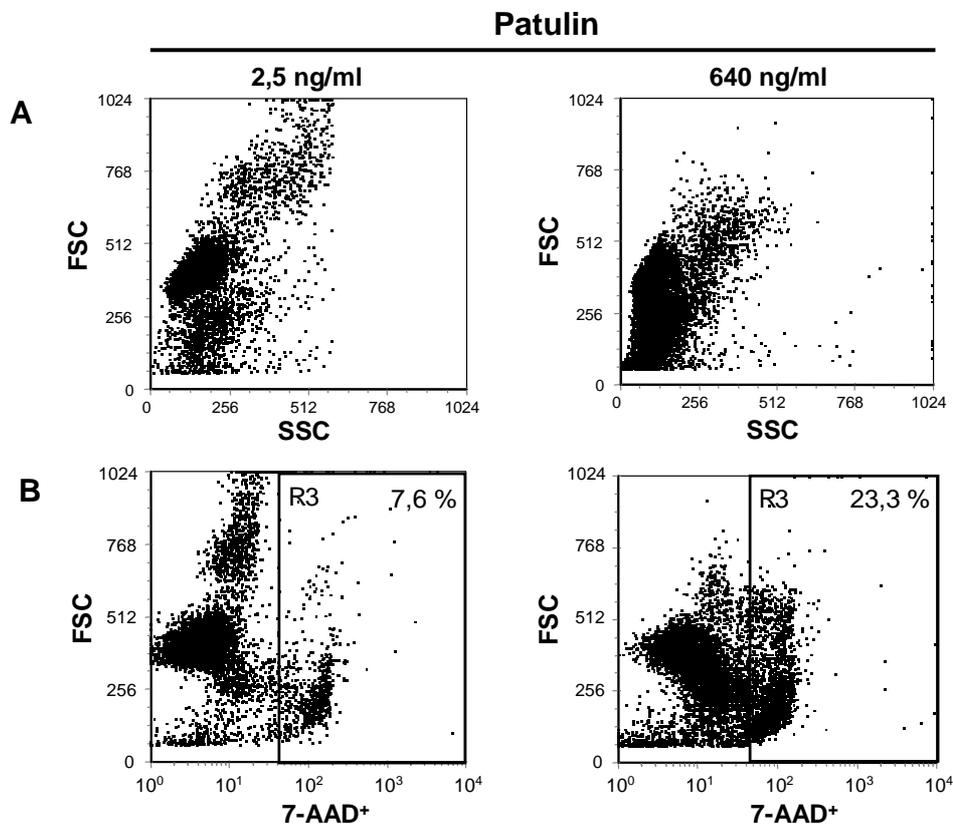


**Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse equiner PBMC**

**A:** Darstellung der Messereignisse im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) und Einteilung der Ereignisse in Regionen (R): Lymphozyten innerhalb R1, Lymphoblasten innerhalb R2, Zelldebris wurde so von der weiteren Analyse ausgeschlossen; **B:** Nachweis von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen in R1 und R2: rechtes oberes Fenster CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen, linkes und rechtes oberes Fenster IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen, rechtes oberes und unteres Fenster CD4<sup>+</sup>-Zellen; **C:** Nachweis von IL-4 in R1 und R2: linkes oberes Fenster IL-4<sup>+</sup>-Zellen; der prozentuale Anteil der Zellen an allen Ereignissen aus R1 und R2 ist im jeweiligen Fenster mit Hilfe des Datenkreuzes im rechten oberen Abschnitt des Messdiagramms angegeben

## Material und Methoden

Durch Zusatz des Totfarbstoffes 7-AAD (1  $\mu\text{g/ml}$ ) konnten bei der Immunphänotypisierung die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff dringt aufgrund einer beschädigten Zellmembran bei toten Zellen in die Zelle ein und interkaliert mit der DNA. Dadurch verändert 7-AAD seine Fluoreszenzeigenschaften und kann durch FL3 Detektoren des Zytometers gemessen werden. Diese FL3<sup>+</sup>-Zellen wurden durch ein weiteres elektronisches Auswertungsfenster als „tote Zellen“ definiert (Abb. 5). Zur Analyse der toten Zellen wurden die Negativkontrollen herangezogen. Es ist jedoch zu beachten, dass dies nur einen Anteil der tatsächlich toten Zellen darstellt. Der reale Wert toter Zellen muss höher vermutet werden, da sich Zelldebris nicht als FL3<sup>+</sup> im Messdiagramm darstellt.



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Quantifizierung toter Zellen nach *In vitro*-Provokation mit Patulin**

**A:** Messereignisse im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC); **B:** 7-AAD<sup>+</sup>-Messereignisse im FSC (R3)

### 3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft® Office Excel 2003. Da die Messungen ausschließlich im Doppelansatz durchgeführt wurden, wurden zu Beginn der Auswertung zunächst die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung des Variationskoeffizienten. Stellte sich eine Variation innerhalb der Doppelmessungen über 30 % heraus, wurde das Verteilungsmuster der gemessenen Ereignisse in FCS Express beider Einzelmessungen überprüft. Bei einer deutlichen erkennbaren Verschiebung des Verteilungsmusters einer Einzelmessung, welche nur durch eine fehlerhafte Messung erklärt werden konnte, wurde diese von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Dies war in 3 % (Vorversuche) bzw. 1 % (Hauptversuche) der Einzelmessungen der Fall.

Zur Beurteilung der Immunlage eines jeweiligen Tieres wurde das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis, ein aus dem in R1 und R2 gemessenen prozentualen Anteil  $CD4^+/IFN-\gamma^+$ - und  $IL-4^+$ -Zellen gebildeter Quotient, herangezogen.

Innerhalb der Hauptversuchsreihe kam es dreimalig zu Messfehlern bei den Mediumkontrollen: Bei Pferd 4 und Pferd 5 konnten im 2. Hauptversuch (Woche 14) weder ein Signal für  $IFN-\gamma$  noch für  $IL-4$  gemessen werden, während bei Pferd 1 im 1. Hauptversuch (Woche 7) allein das  $IFN-\gamma$ -Signal der Mediumkontrolle ausblieb. Als Ersatz für die fehlenden Werte wurde der arithmetische Mittelwert der Mediumkontrollen der jeweils gelungenen zwei weiteren Hauptversuche aus den Anteilen der  $CD4^+/IFN-\gamma^+$  (Pferd 1, Pferd 4, Pferd 5) und der  $IL-4^+$ -Zellen (Pferd 4, Pferd 5) gebildet. Daraufhin wurden die  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse in der bereits beschriebenen Weise ermittelt.

Die anschließende Datenauswertung erfolgte unter Leitung von Herrn Dr. rer. nat. K. Failing durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierfür wurde das Statistikprogramm BMDP, Ausgabe 8.1, verwendet. Die bei einer Untersuchung gewonnenen Einzelwerte wurden zunächst auf ihre Normalverteilung überprüft. Lag diese vor, wurden zur Beschreibung der Daten der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Bei schiefer Verteilung (dies lag lediglich beim  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis vor) wurde eine logarithmische Datentransformation durchgeführt. Die Deskription der Werte erfolgte ebenfalls mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung. Zur statistischen Prüfung der Daten auf Signifikanz wurde im Anschluss eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

## Material und Methoden

---

Zur statistischen Analyse der individuellen Unterschiede zwischen den Pferden wurde zusätzlich eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS<sup>®</sup> für Windows, Version 17.0 (Fa. SPSS Inc., Illinois, USA), durch Herrn PhD P. S. Bridger (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen) vorgenommen. Hierzu wurde der arithmetische Mittelwert aus sämtlichen, in den Hauptversuchen auswertbaren Konzentrationen einer jeden Noxe (s. Kap. IV 3) unabhängig von der Art der verwendeten Einstreu für jedes Pferd berechnet. Dies ermöglichte einen individuellen Vergleich der Pferde für jeden Parameter (Vitalität, CD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und log T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis).

Statistisch signifikante Einflüsse der drei verwendeten Einstreumaterialien auf die Mediumkontrollen der Pferde wurden mit SPSS<sup>®</sup> und einem allgemeinen linearen Modell untersucht. Hierzu wurde der arithmetische Mittelwert aus allen Pferden für jedes Einstreumaterial nach Inkubation mit Medium verwendet. Dies ermöglichte einen paarweisen Vergleich der Einstreumaterialien für jeden Parameter (siehe oben).

Für grafische Darstellungen wurden die Programme Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003 und Microsoft<sup>®</sup> Office PowerPoint 2003 benutzt.

Die statistische Signifikanzgrenze für die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) ist bei  $\leq 0,05$  definiert. Zur Angabe der Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

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

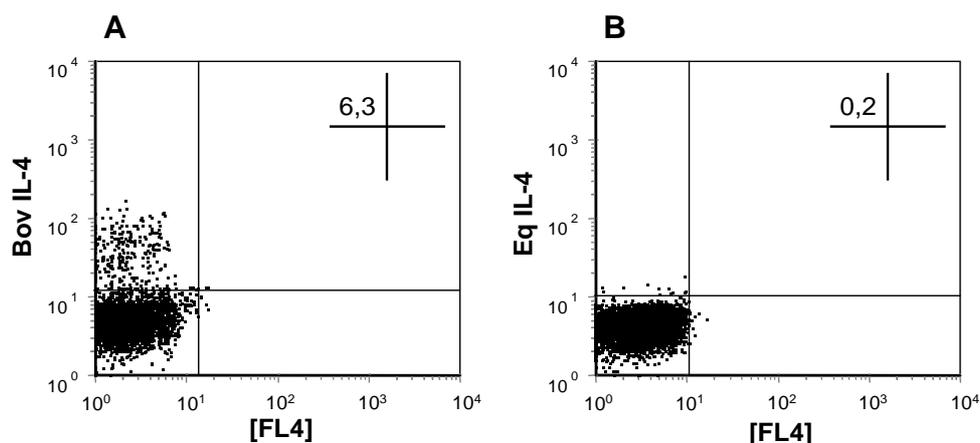
## IV Ergebnisse

### 1 Methodenetablierung

Während der Methodenetablierung wurden geeignete Konzentrationen für die in den Vor- und Hauptversuchen verwendeten Antikörper ermittelt.

#### 1.1 Etablierung des IL-4-Nachweises

Die vom Hersteller angegebene Kreuzreaktivität des anti-bov IL-4-Antikörpers (Klon CC 303, AbD Serotec) konnte in den Vorversuchen für die bezogene Charge nicht bestätigt werden (Abb. 6). Trotz hoher eingesetzter Konzentrationen des Primärantikörpers (1:10-1:640) und verschiedenen Sekundärantikörpern (FITC- oder PE-konjugiert) bis hin zum Versuch der Signalverstärkung über eine Biotin-Streptavidin-Markierung konnte kein equines IL-4 detektiert werden. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Antikörpercharge wurde der anti-bov IL-4-Antikörper an bovinen PBMC nach dem Protokoll der Vor- und Hauptversuche getestet. Mit einer Konzentration des Primärantikörpers von 1:50 bzw. 1:400 sowie einem FITC-konjugierten anti-IgG2a Sekundärantikörper (Southern Biotech, [1:300]) konnten 6,3 % bzw. 4,3 % IL-4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei gleichen Versuchsbedingungen mit equinen PBMC kein IL-4 gemessen werden (Abb. 6). Die Detektion von equinem IL-4 ist stattdessen mit Hilfe eines monoklonalen, nicht kommerziell erhältlichen anti-eq IL-4-Antikörpers möglich, der von Frau Prof. Dr. B. Wagner (Cornell University, Ithaca, USA) entwickelt und freundlicherweise für die hier dargestellten Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde (182).



**Abb. 6:** Nachweis von IL-4 in bovinen (A) und equinen PBMC (B) unter Verwendung des anti-bov IL-4-Antikörpers (AbD Serotec, [1:50])

Detektion durch FITC-konjugierten anti-IgG2a Antikörper (Southern Biotech, [1:300]); der prozentuale Anteil der Zellen ist im jeweiligen Fenster mit Hilfe des Datenkreuzes im rechten oberen Abschnitt des Messdiagramms angegeben.

## 2 Vorversuche

Als Grundlage für die späteren Hauptversuche wurde durch Titrationsversuche mit PBMC von drei Pferden der Konzentrationsbereich der einzelnen Noxen (Gliotoxin, Patulin, LPS, Dexamethason) ermittelt, in dem sich ein Noxen-spezifischer Effekt auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis von Pferden am deutlichsten messen ließ.

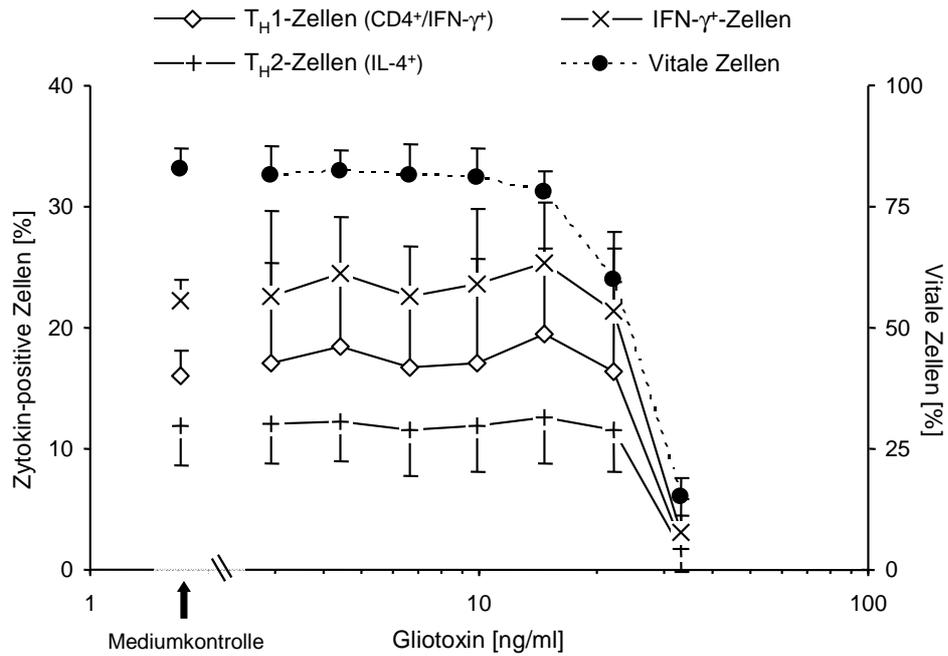
### 2.1 Gliotoxin

Gliotoxin wurde in einem Konzentrationsbereich von 2,9 bis 50 ng/ml in insgesamt acht Stufen (log 1,5 Titration) getestet. Bis zu einer Konzentration von 14,8 ng/ml war bei keinem der Pferde ein Einfluss des Toxins auf den Anteil vitaler Zellen feststellbar. Bei einer Konzentration von 22,2 ng/ml konnte ein Abfall des Anteils vitaler Zellen mit gleichzeitiger Zunahme des Anteils 7-AAD<sup>+</sup>-Ereignisse (= tote Zellen) beobachtet werden. Ab einer Gliotoxin-Konzentration von 33,3 ng/ml waren kaum noch vitale Zellen messbar und somit eine zuverlässige Beurteilung der Proben bzw. Kulturansätze nicht möglich (Abb. 7-Abb. 9). Dieser Konzentrationsbereich ( $\geq 33,3$  ng/ml) wurde daher im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

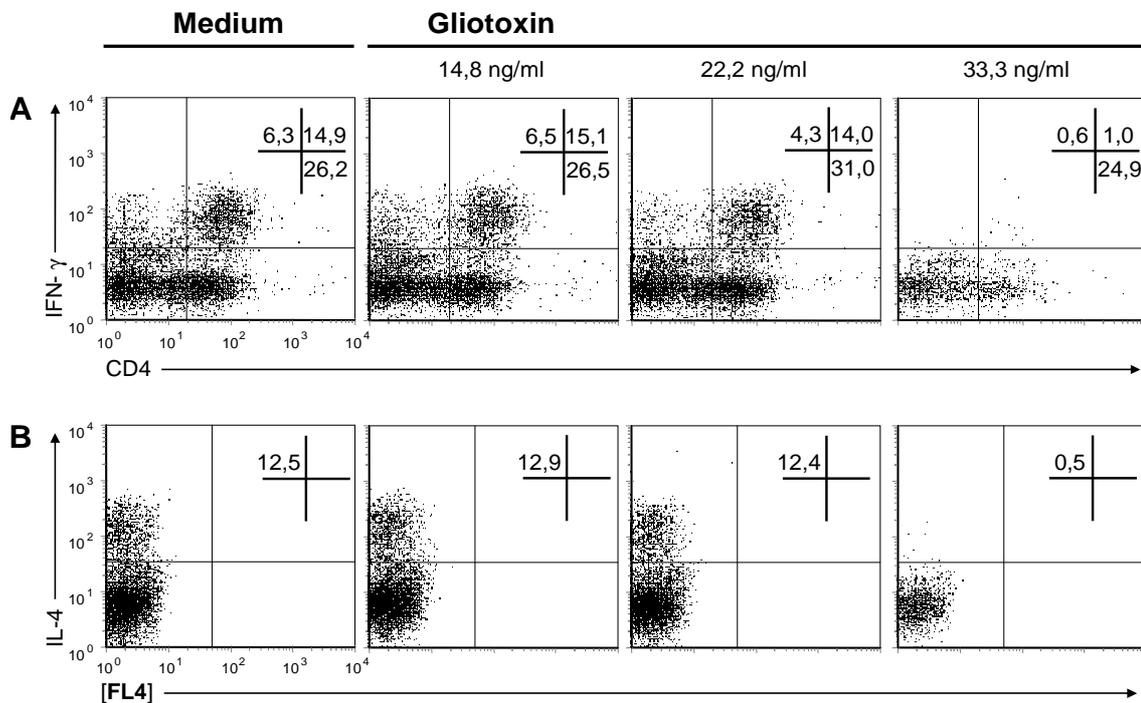
Inkubation mit Gliotoxin führte im Mittel bis zu einer Konzentration von 22,2 ng/ml zu keiner Änderung des Anteils  $CD4^+$ -,  $IFN-\gamma$ -bildender,  $CD4^+/IFN-\gamma^+$ - (=  $T_H1$ -) und  $IL-4$ -bildender (=  $T_H2$ -) Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 7).

Pferd C besaß im Vergleich zu den Pferden A und B initial insgesamt mehr  $CD4^+$ - und  $T_H1$ -Zellen, während gleichzeitig der geringste Anteil an  $T_H2$ -Zellen bei diesem Tier zu beobachten war (vgl. Mediumkontrollen). Resultat dessen war ein erhöhtes  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis dieses Pferdes im Vergleich zu den Pferden A und B. Dieser Unterschied konnte durch Zugabe von Gliotoxin bis zu einer Konzentration von 22,2 ng/ml zusätzlich verstärkt werden, da lediglich ein Anstieg der  $IFN-\gamma^+$ - und  $T_H1$ -Zellen, nicht aber der  $T_H2$ -Zellen festgestellt wurde (Abb. 9).

Da in subletalen Konzentrationen am ehesten Veränderungen der  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse zu erwarten waren, wurde ein Konzentrationsbereich von 11,1 bis 25 ng/ml in einer log 1,5 Titration für die *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin verwendet.



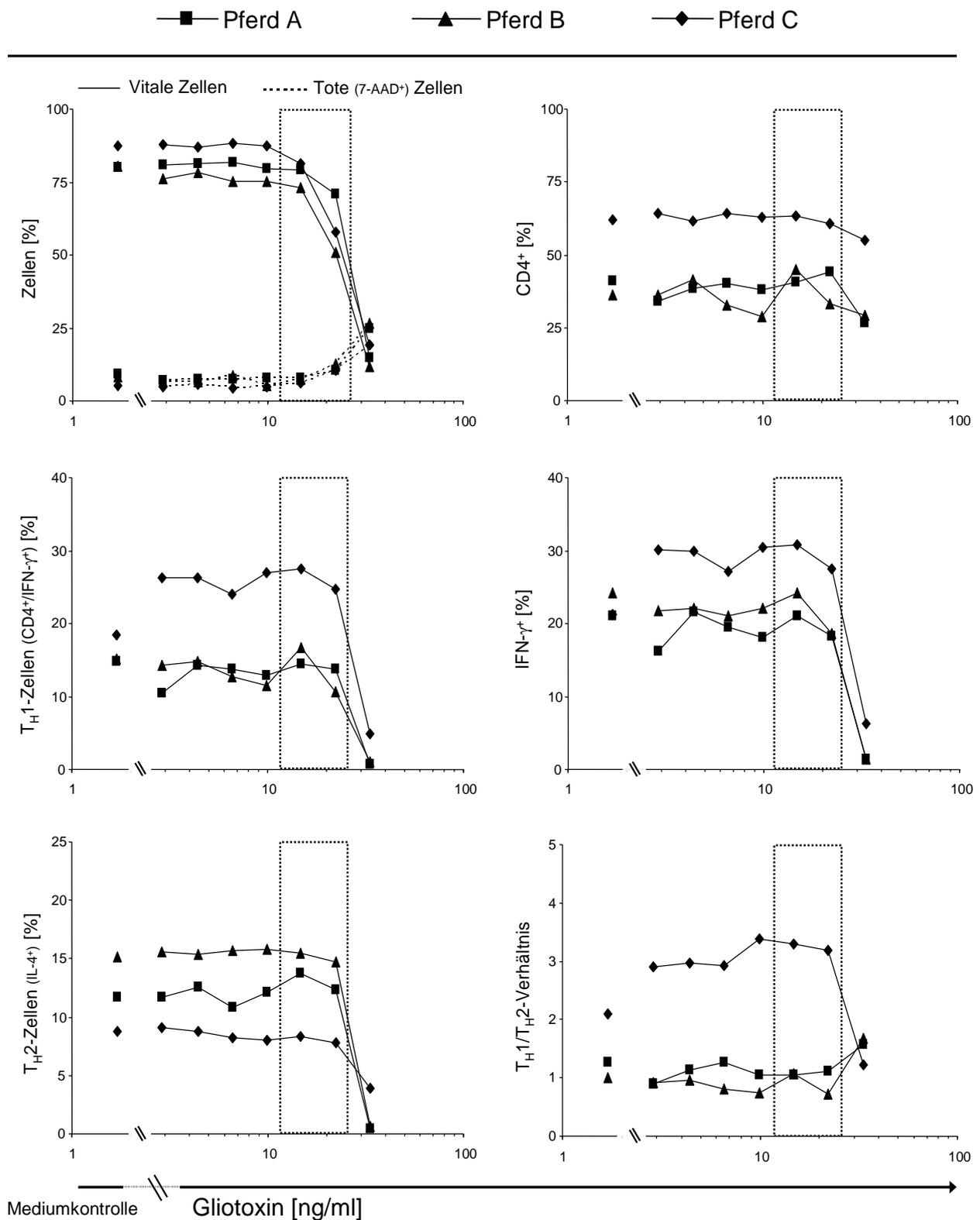
**Abb. 7: Prozentualer Anteil der IFN-γ<sup>+</sup>-, der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin**  
Arithmetischer Mittelwert (± SD) aller Versuche (n=3)



**Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse equiner PBMC nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin am Beispiel von Pferd A**

**Reihe A:** Nachweis von T<sub>H</sub>1-Zellen: rechter oberer Quadrant CD4<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>-</sup> (=T<sub>H</sub>1-) Zellen, linkes und rechtes oberes Fenster IFN-γ<sup>+</sup>-Zellen, rechtes oberes und unteres Fenster CD4<sup>+</sup>-Zellen; **Reihe B:** Nachweis von T<sub>H</sub>2-Zellen: linker oberer Quadrant IL-4<sup>+</sup> (=T<sub>H</sub>2-) Zellen; der prozentuale Anteil der Zellen ist mit Hilfe des Datenkreuzes angegeben.

# Ergebnisse



**Abb. 9:** Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4<sup>+</sup>-, IFN-γ<sup>+</sup>-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie individuelle T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin

Mediumkontrolle = Inkubation ohne Gliotoxin-Zugabe; der Rahmen stellt den für die Hauptversuche gewählten Bereich der Gliotoxin-Konzentrationen dar.

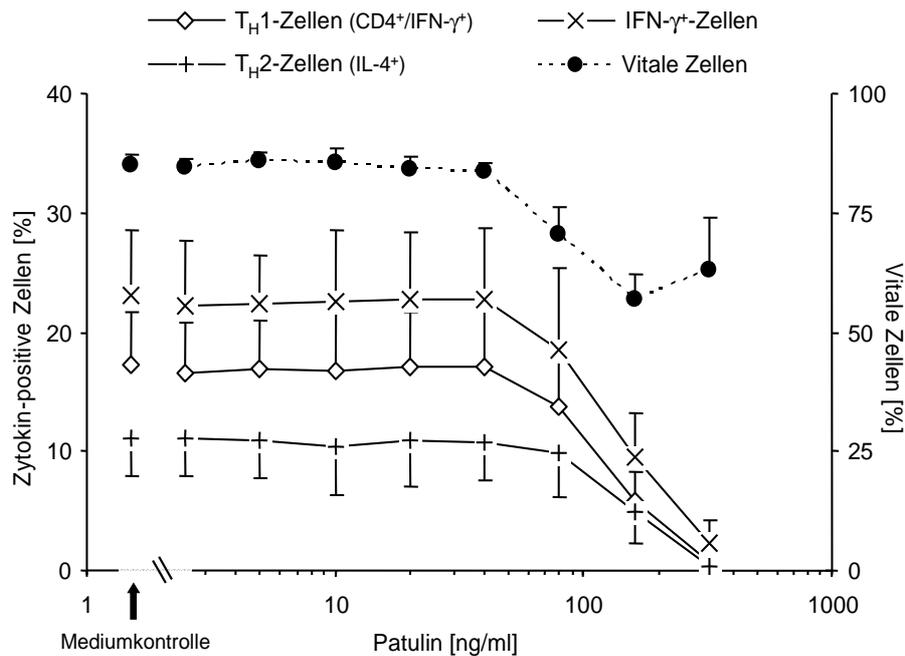
### 2.2 Patulin

Patulin wurde in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 640 ng/ml in insgesamt neun Stufen (log 2 Titration) getestet. Bis zu einer Konzentration von 40 ng/ml konnten bei keinem der Pferde ein Effekt des Toxins auf den Anteil vitaler Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10, Abb. 11). Bei einer Konzentration von 80 ng/ml bis 160 ng/ml ließ sich ein Abfall der Anteile vitaler Zellen und eine gleichzeitige Zunahme der Anteile toter Zellen feststellen, während ab einer Konzentration von 320 ng/ml sowohl die Anteile der toten als auch der vitalen Zellen anstiegen (Abb. 11). Diese scheinbare Erhöhung der vitalen Zellen ist vermutlich auf einen vollständigen Zerfall toter Zellen zurückzuführen, die damit durch die Messung nicht mehr erfasst werden. Daraus folgt eine Verschiebung des Verhältnisses von den als vital definierten Ereignissen im Vergleich zu den gesamt gemessenen Ereignissen. Aus diesem Grund wurden Daten ab einer Konzentration von 320 ng/ml für die Auswahl eines geeigneten Konzentrationsbereiches nicht weiter berücksichtigt.

Die Anteile der CD4<sup>+</sup>-Zellen veränderten sich mit Zugabe von Patulin bis zu einer Konzentration von 160 ng/ml im Vergleich zur Mediumkontrolle nur wenig (Abb. 11).

Nach *In vitro*-Provokation mit Patulin konnte im Mittel bis zu einer Konzentration von 40 ng/ml keine Wirkung des Toxins auf die Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- sowie der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 80 ng/ml reduzierten sich die Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- und T<sub>H</sub>1-Zellen, während die Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen erst ab der folgenden Konzentration (160 ng/ml) erkennbar abfielen (Abb. 10).

Pferd B wies nach Inkubation mit Patulin bis zu einer Konzentration von 80 ng/ml einen erhöhten Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen im Vergleich zu den anderen Tieren auf. Ab einer Patulin-Konzentration von 160 ng/ml fielen diese Zellpopulationen bei Pferd A und B ab, was bei Pferd C bereits ab einer Konzentration von 80 ng/ml zu beobachten war. Pferd C besaß im Vergleich zu den Pferden A und B nicht nur einen höheren Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen, sondern auch ein höheres T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis (vgl. Mediumkontrolle). Nach Zugabe von Patulin konnte bei einer Konzentration von 10 (Pferd A<sub>1</sub>) bzw. 40 ng/ml (Pferd C) ein auf diese Konzentrationen beschränkter Anstieg des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses um das 1,5-fache im Vergleich zur jeweiligen Mediumkontrolle beobachtet werden. Dieser Anstieg konnte im Wiederholungsversuch bei Pferd A nicht reproduziert werden. Es konnten keine weiteren individuellen Unterschiede der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse im Vergleich zu den Mediumkontrollen beobachtet werden (Abb. 11).



**Abb. 10: Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-, der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach *In vitro*-Provokation mit Patulin**

Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) aller Versuche (n=4)

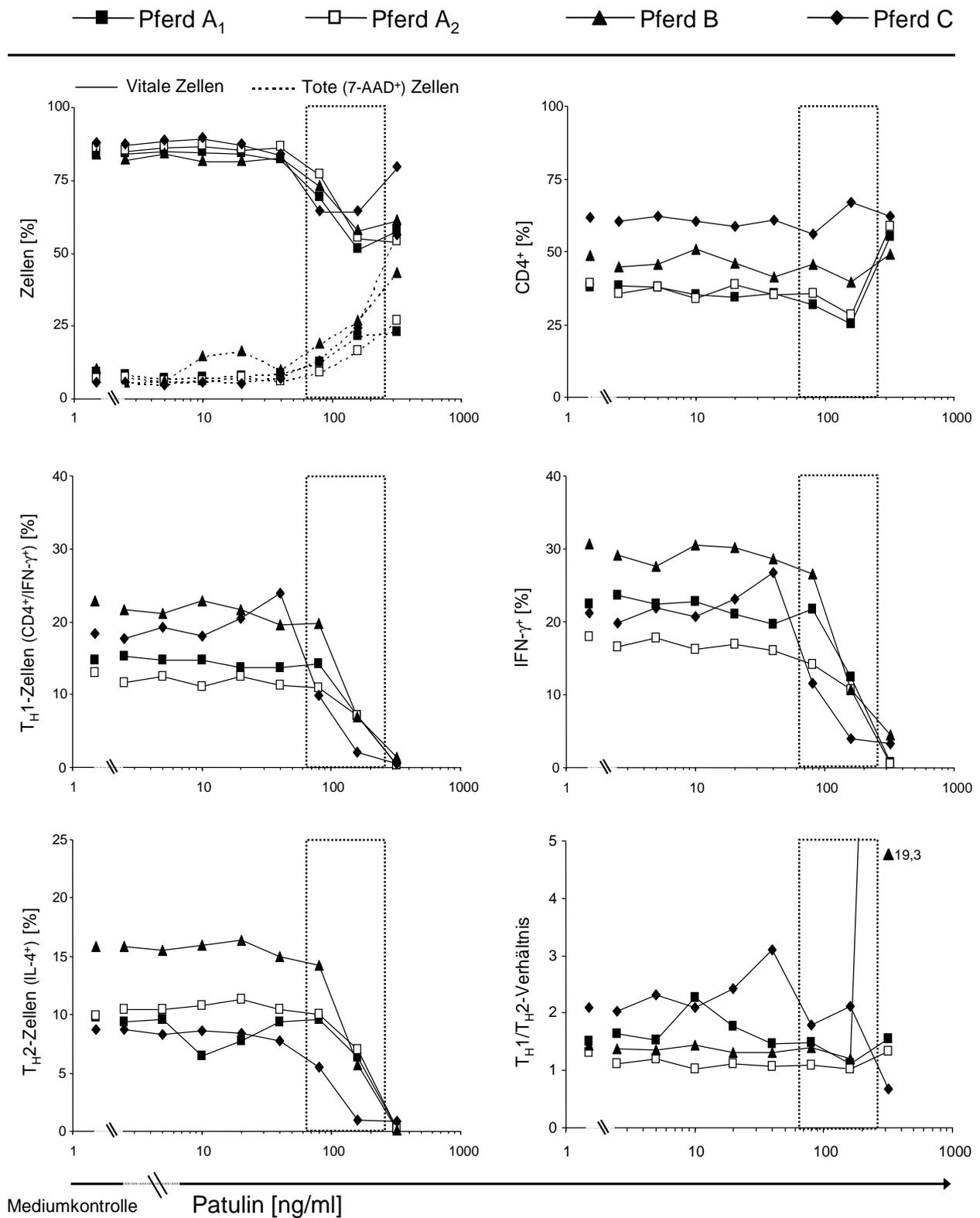
Da in subletalen Konzentrationen am ehesten Veränderungen der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse zu erwarten waren, wurde ein Konzentrationsbereich von 62,5 bis 250 ng/ml in einer log 2 Titration für die *In vitro*-Provokation mit Patulin verwendet.

### 2.3 LPS

LPS wurde in einem Konzentrationsbereich von 1,6 bis 25.000 ng/ml in insgesamt sieben Stufen (log 5 Titration) getestet. Eine Steigerung der LPS-Konzentration führte zu keinen Änderungen des Anteiles vitaler und toter Zellen. Der Anteil CD4<sup>+</sup>-Zellen blieb ebenfalls konstant (Abb. 13). Inkubation mit LPS führte stattdessen bei einer durchschnittlichen Konzentration von 8 ng/ml zu einem Abfall der Anteile IFN- $\gamma$ -produzierender und der T<sub>H</sub>1-Zellen. Auf Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen besaß LPS keinen Einfluss (Abb. 12).

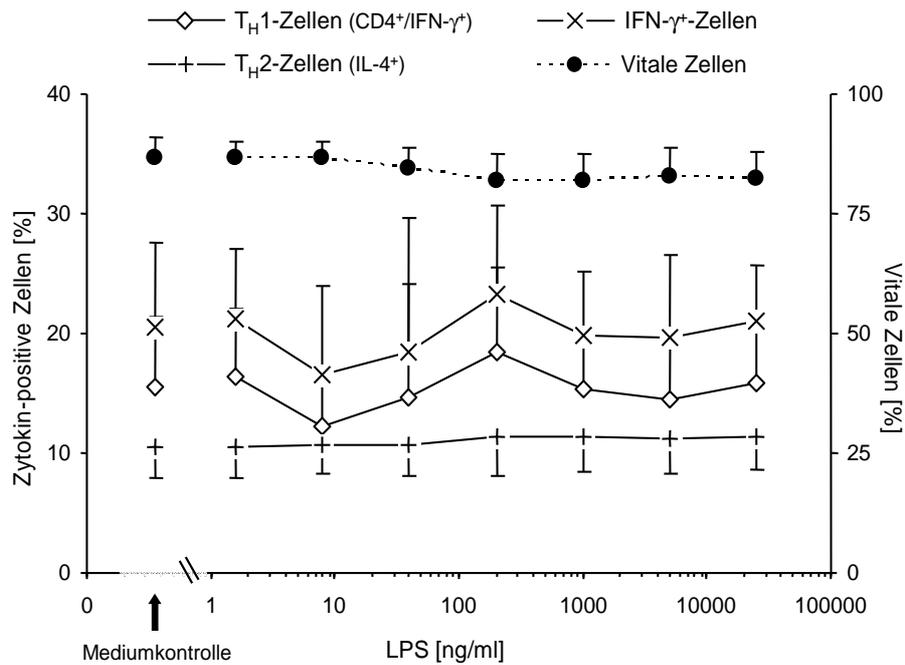
Ein starker Abfall der Anteile IFN- $\gamma$ -produzierender und der T<sub>H</sub>1-Zellen ohne Beeinflussung der Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen wurde sowohl bei Pferd A reproduzierbar bei einer Konzentration von 40 ng/ml als auch bei Pferd C bei einer Konzentration von 8 ng/ml beobachtet. Bereits in der jeweils folgenden LPS-Konzentration (200 bzw. 40 ng/ml) entsprachen die Anteile wieder jenen der Mediumkontrollen. Pferd C zeigte mit Steigerung der LPS-Konzentrationen ab einer Konzentration von 1.000 ng/ml einen zweiten, weniger stark ausgeprägten Abfall der Anteile IFN- $\gamma$ -bildender und T<sub>H</sub>1-Zellen (Abb. 13).

## Ergebnisse



**Abb. 11: Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup>, TH1- und TH2-Zellen) sowie individuelle TH1/TH2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Patulin**

Pferd A wurde zweimalig getestet (Pferd A<sub>1</sub> und Pferd A<sub>2</sub>); Mediumkontrolle = Inkubation ohne Patulin-Zugabe; der Rahmen stellt den für die Hauptversuche gewählten Bereich der Patulin-Konzentrationen dar.



**Abb. 12: Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma^+$ -, der T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen sowie der vitalen Zellen nach *In vitro*-Provokation mit LPS**

Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) aller Versuche (n=4)

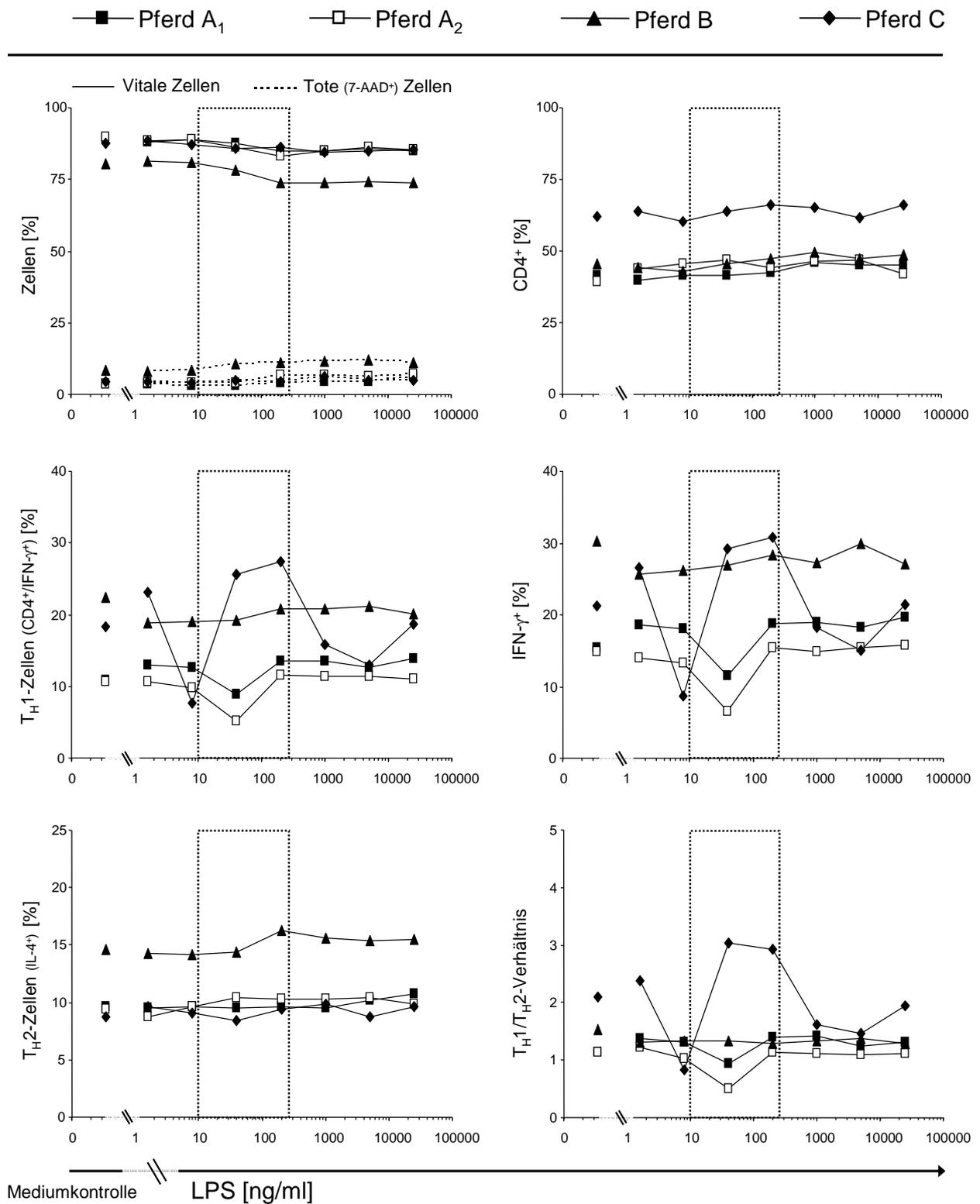
Im Gegensatz zu den anderen beiden Tieren blieben die Anteile der T<sub>H1</sub>- und IFN- $\gamma^+$ -Zellen bei Pferd B unbeeinflusst. Auffällig war stattdessen ein erhöhter Anteil an T<sub>H2</sub>-Zellen dieses Pferdes. Pferd C wies einerseits ein höheres T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>-Verhältnis im Vergleich zu den Pferden A und B auf (vgl. Mediumkontrollen). Die Zugabe von LPS in einem Konzentrationsbereich von 40 bis 200 ng/ml verstärkte diesen Unterschied deutlich. Inkubation mit LPS führte bei eingesetzten Konzentrationen von 8 bzw. 40 ng/ml (Pferd C bzw. Pferd A) darüber hinaus sowohl bei Pferd A als auch bei Pferd C reproduzierbar zu einem Abfall des T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>-Verhältnisses (Abb. 13).

Aufgrund der individuellen Unterschiede wurde ein Konzentrationsbereich von 10 bis 250 ng/ml in einer log 5 Titration für die *In vitro*-Provokation mit LPS verwendet.

### 2.4 Dexamethason

Dexamethason wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,04 bis 40.000 ng/ml in insgesamt sieben Stufen (log 10 Titration) getestet. Die Inkubation mit Dexamethason führte ab einer Konzentration von 4 ng/ml zu einem geringen Abfall des Anteiles der vitalen Zellen, der sich bis zur maximalen Konzentration kontinuierlich fortsetzte. Gleichzeitig kam es, mit Ausnahme von Pferd C, zu einem Anstieg der toten Zellen. Die Anteile der CD4<sup>+</sup>-Zellen veränderten sich mit Zugabe von Dexamethason im Vergleich zur Mediumkontrolle mit Ausnahme jener initial abfallenden Anteile bei Pferd B lediglich geringfügig (Abb. 14, Abb. 15).

# Ergebnisse



**Abb. 13: Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie individuelle T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit LPS**

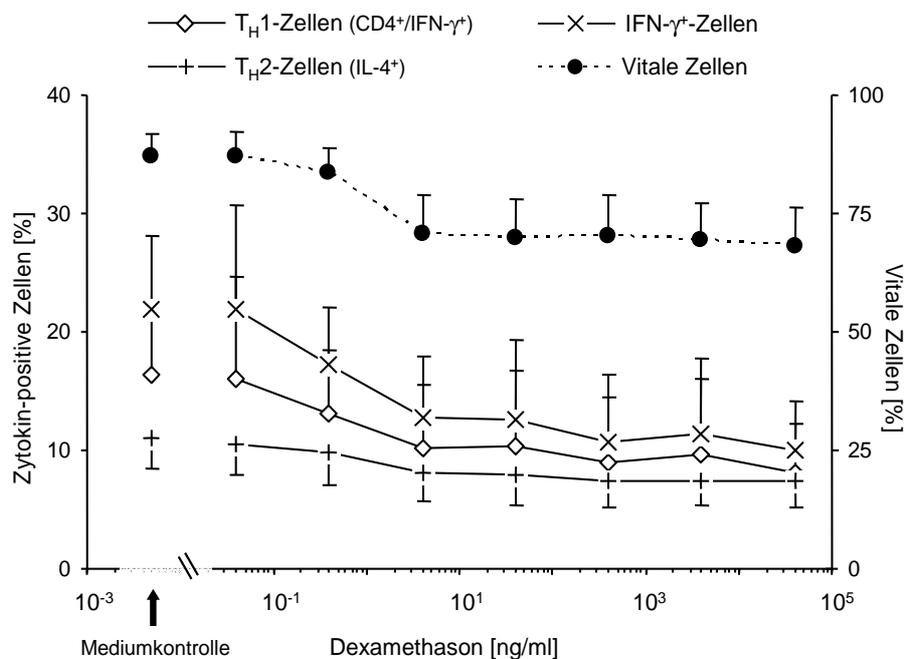
Pferd A wurde zweimalig getestet (Pferd A<sub>1</sub> und Pferd A<sub>2</sub>); Mediumkontrolle = Inkubation ohne LPS-Zugabe; der Rahmen stellt den für die Hauptversuche gewählten Bereich der LPS-Konzentrationen dar.

## Ergebnisse

Innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0,04 bis 4 ng/ml fielen die Mittelwerte der IFN- $\gamma$ -produzierenden und T<sub>H</sub>1-Zellen stark ab, während sich der Anteil an T<sub>H</sub>2-Zellen in diesem Bereich nur geringfügig reduzierte. Dieser Einfluss konnte ab einer Dexamethason-Konzentration von 4 ng/ml nicht weiter gesteigert werden (Abb. 14).

Pferd B besaß einen höheren Anteil an IFN- $\gamma$ -produzierenden sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen als die anderen beiden Tiere (vgl. Mediumkontrolle). Die Inkubation mit Dexamethason bewirkte sowohl bei Pferd B als auch reproduzierbar bei Pferd A einen Abfall der Anteile IFN- $\gamma$ -produzierender sowie der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. Dieser trat am stärksten in einem Konzentrationsbereich von 0,04 bis 4 ng/ml in Erscheinung. Pferd C reagierte hingegen bei niedrigen Konzentrationen mit einem Anstieg der T<sub>H</sub>1- und IFN- $\gamma$ -bildenden Zellen (vgl. Mediumkontrolle), welcher mit steigender Konzentration von einem Abfall gefolgt wurde. Das höhere T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis dieses Pferdes (vgl. Mediumkontrolle) wurde durch Zugabe von Dexamethason (0,04 bis 4000 ng/ml) noch deutlich verstärkt. Pferd A reagierte reproduzierbar bis zu einer Konzentration von 40 ng/ml mit einem Abfall des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses (Abb. 15).

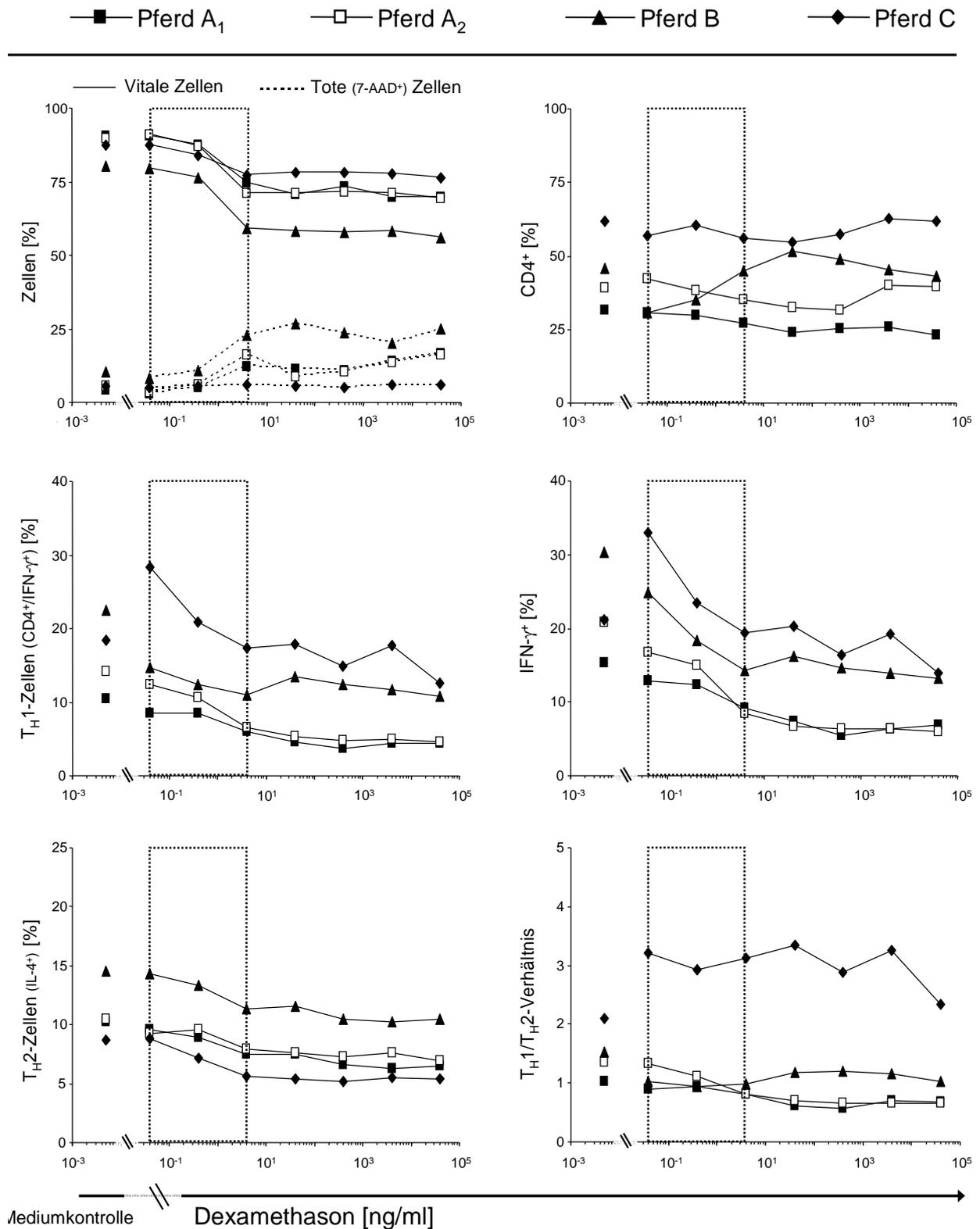
Aufgrund der Veränderungen der Zytokinsignale in geringen Konzentrationsstufen wurde ein Konzentrationsbereich von 0,04 bis 4 ng/ml in einer log 10 Titration für die *In vitro*-Provokation mit Dexamethason verwendet.



**Abb. 14: Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-, der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach *In vitro*-Provokation mit Dexamethason**

Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) aller Versuche (n=4)

# Ergebnisse



**Abb. 15: Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup> sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie individuelle T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Dexamethason**

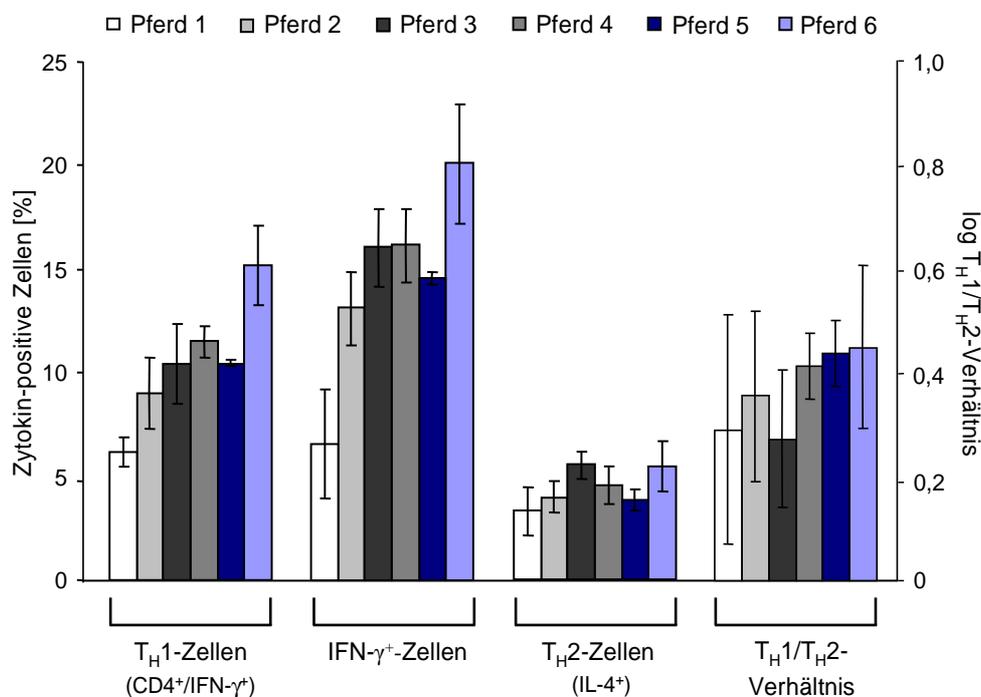
Pferd A wurde zweimalig getestet (Pferd A<sub>1</sub> und Pferd A<sub>2</sub>); Mediumkontrolle=Inkubation ohne Dexamethason-Zugabe; der Rahmen stellt den für die Hauptversuche gewählten Bereich der Dexamethason-Konzentrationen dar.

### 3 Hauptversuche

Basierend auf den in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationsbereichen, in denen sich ein Noxen-spezifischer Effekt auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis am deutlichsten zeigte, wurde ein möglicher Einfluss eines jeweils 7-wöchigen Aufenthaltes unter drei verschiedenen Einstreubedingungen (Stroh, Späne oder Strohpellets) auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis an sechs Warmblutstuten ermittelt.

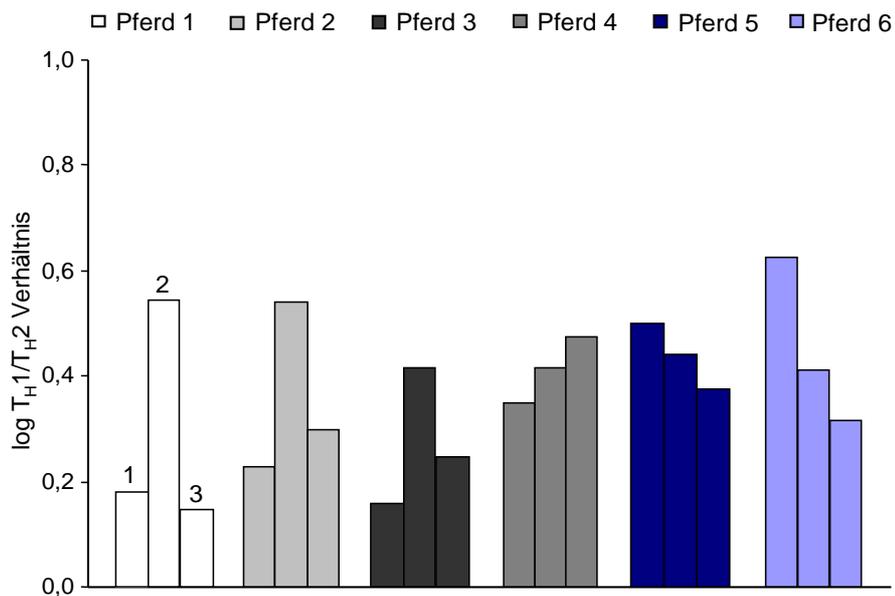
#### 3.1 Mediumkontrollen

Zur Überprüfung, inwieweit das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis tierspezifische Unterschiede aufweist und inwieweit sich die Haltungsbedingungen *per se* auf das Verhältnis auswirken, wurden zunächst sämtliche  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse der Mediumkontrollen miteinander verglichen. Trotz hoch signifikanter Unterschiede zwischen den individuellen Anteilen der  $T_H1$ - und  $IFN-\gamma$ -bildenden (jeweils  $p < 0,001$ ) Zellen konnten für die  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse der Pferde keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abb. 16). Obwohl zudem die Art des verwendeten Einstreumaterials keinen signifikanten Einfluss auf das spontane  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis der Pferde besaß, fiel dennoch ein Anstieg der  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse der Pferde 1, 2 und 3 um etwa das 2- bis 3-fache nach Verwendung der Einstreu Späne auf (Abb. 17).



**Abb. 16: Individuelle Anteile der  $T_H1$ -,  $IFN-\gamma$ -bildenden und der  $T_H2$ -Zellen sowie individuelle  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse**

Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) der drei Versuchszeitpunkte (Stroh, Späne, Strohpellets); Inkubation in Medium ohne Noxen-Zugabe



**Abb. 17:  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse nach Verwendung von drei verschiedenen Einstreuarten**

Beim jeweils 1. Balken einer Gruppierung wurde Stroh (1), beim jeweils 2. Späne (2) und beim jeweils 3. Balken einer Gruppierung Strohpellets (3) verwendet. Inkubation in Medium ohne Noxen-Zugabe

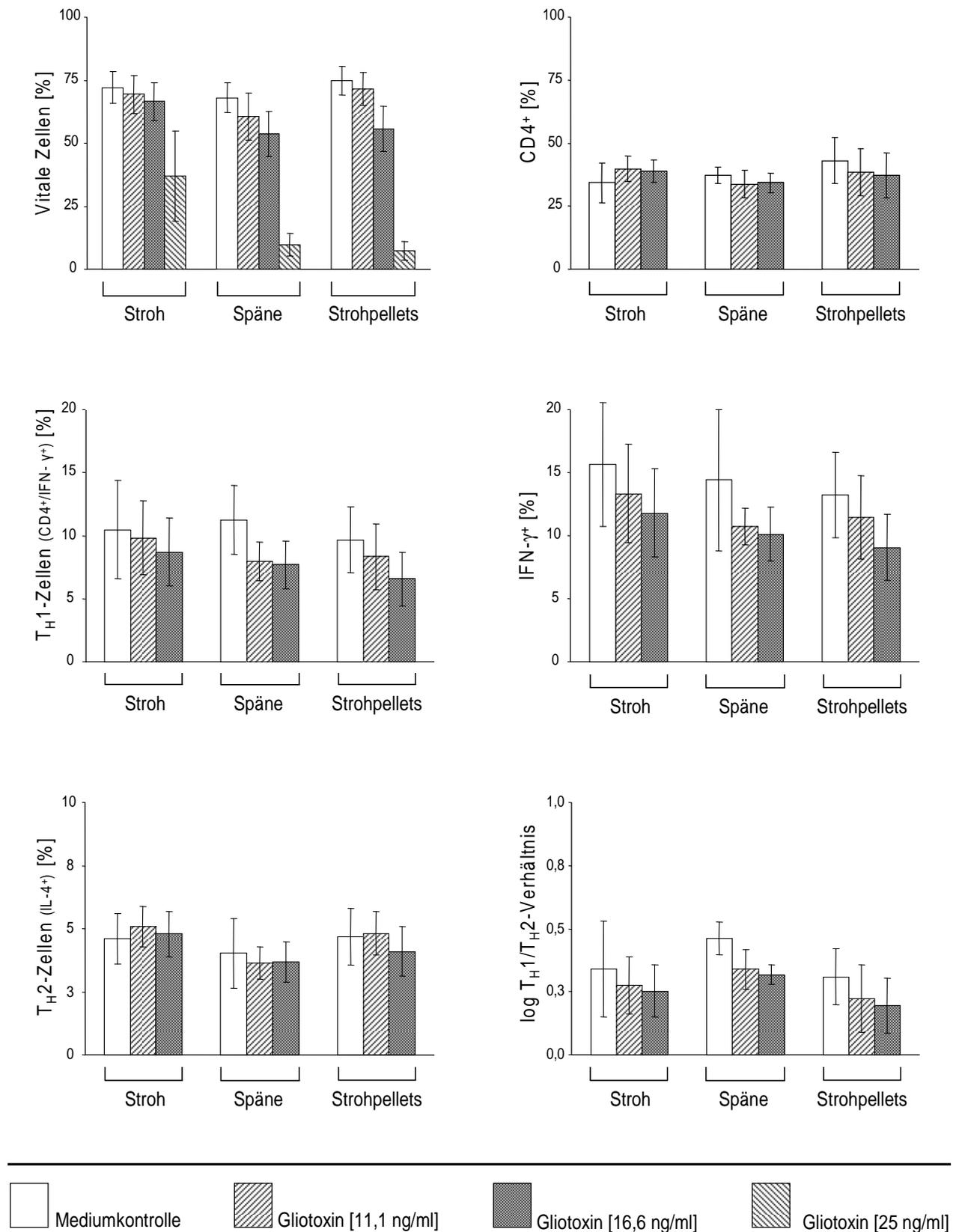
### 3.2 Gliotoxin

Gliotoxin wurde in einem Konzentrationsbereich von 11,1 bis 25 ng/ml in insgesamt drei Stufen (log 1,5 Titration) getestet. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches führte die Inkubation mit Gliotoxin konzentrationsabhängig zu einem hoch signifikanten Abfall ( $p < 0,001$ ) des Anteiles vitaler Zellen. Bei der maximalen Konzentration von 25 ng/ml waren kaum noch vitale Zellen messbar, so dass diese Proben bzw. Kulturansätze in der statistischen Auswertung nicht weiter berücksichtigt wurden.

Darüber hinaus konnte eine generelle Reduktion des Anteiles vitaler Zellen nach Verwendung der Einstreu Späne im Vergleich zu den anderen beiden Zeitpunkten festgestellt werden, welche sich mit steigender Gliotoxin-Konzentration hoch signifikant potenzierte ( $p < 0,001$ ).

Der Anteil  $CD4^+$ -Zellen blieb nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin, unabhängig von der verwendeten Konzentration, unverändert (Abb. 18, Tab. 8).

## Ergebnisse



**Abb. 18:** Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4<sup>+</sup>-, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Gliotoxin  
Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) der sechs getesteten Pferde

## Ergebnisse

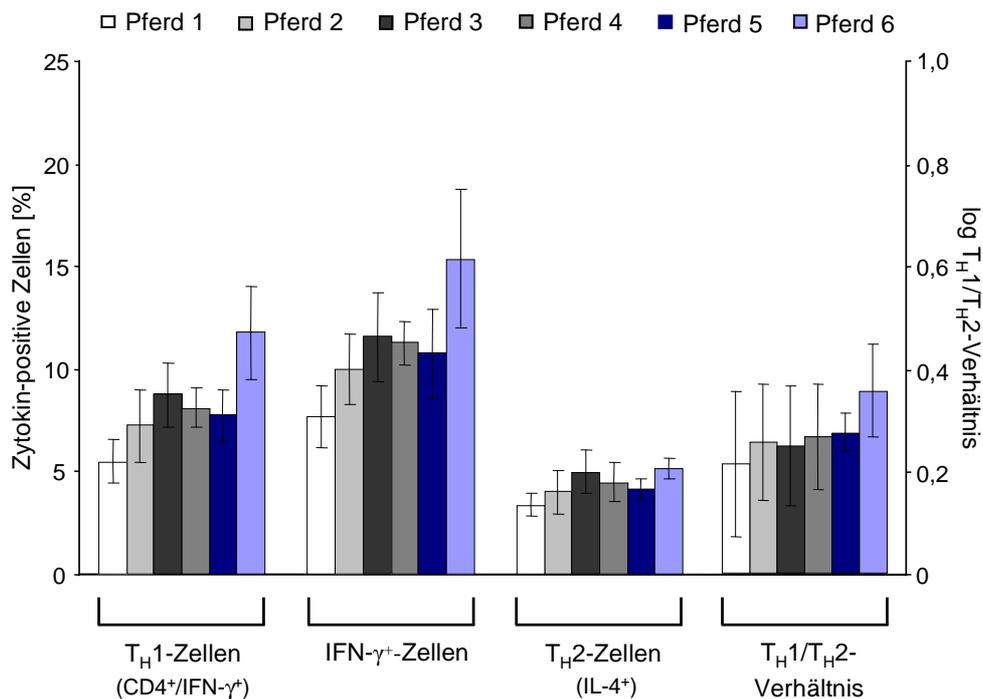
**Tab. 8: Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin**

Variable	Einstreu		Konzentration		Wechselwirkung <sup>1</sup>	
Zellvitalität	*	p=0,0234	***	p<0,0001	***	p=0,0004
CD4 <sup>+</sup> -Zellen	n.s.	p=0,2679	n.s.	p=0,6521	*	p=0,0176
T <sub>H</sub> 1-Zellen	n.s.	p=0,0998	***	p=0,0002	**	p=0,0097
T <sub>H</sub> 2-Zellen	*	p=0,0391	n.s.	p=0,1154	n.s.	p=0,0860
IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> -Zellen	*	p=0,0354	**	p=0,0014	n.s.	p=0,4609
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnis	n.s.	p=0,1303	***	p=0,0006	n.s.	p=0,7673

\* schwach signifikant, \*\* signifikant, \*\*\* hoch signifikant, n.s. nicht signifikant; <sup>1</sup>Wechselwirkung der Einstreu und Konzentration

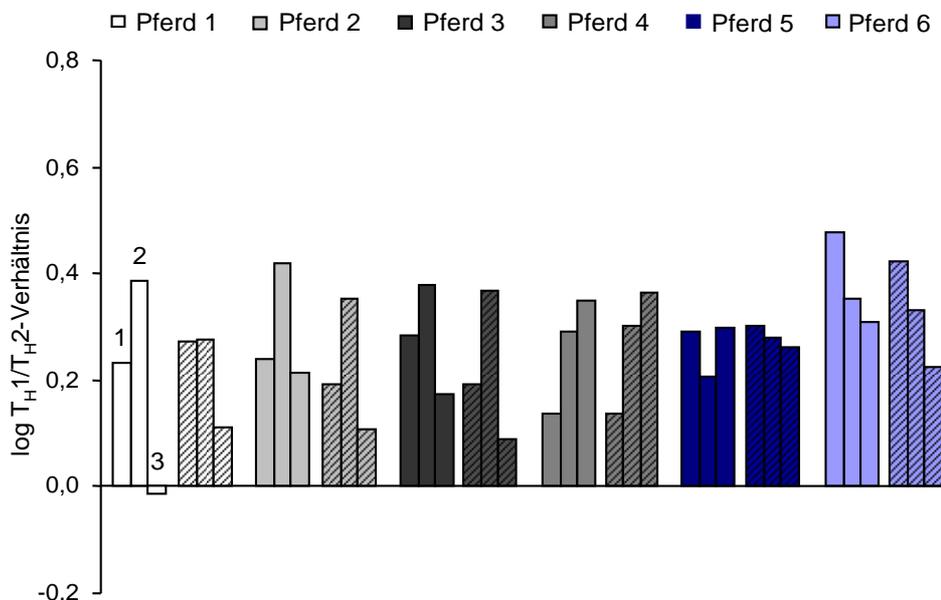
Das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis nahm mit steigender Gliotoxin-Konzentration hoch signifikant ab (p<0,001). Dieser Abfall beruhte auf einer hoch signifikanten Reduzierung der Anteile der T<sub>H</sub>1-Zellen (p<0,001), während die Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen unabhängig von der verwendeten Gliotoxin-Konzentration konstant blieben. Obwohl eine signifikante Wechselwirkung zwischen den eingesetzten Konzentrationen und der Einstreu auf die Anteile der T<sub>H</sub>1-Zellen (p=0,01) vorlag, besaß die Art der verwendeten Einstreu keinen statistisch nachweisbaren Effekt auf das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis (Abb. 18, Tab. 8).

Trotz hoch signifikanter bzw. signifikanter individueller Unterschiede in den Anteilen der T<sub>H</sub>1- und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen (jeweils p<0,001) bzw. der T<sub>H</sub>2-Zellen (p=0,006) konnte kein signifikanter Einfluss von Gliotoxin auf die individuellen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse der Pferde nachgewiesen werden (Abb. 19). Die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse der Pferde schwankten zwischen den einzelnen Versuchszeitpunkten zum Teil deutlich. Lediglich Pferd 5 bildete ähnliche T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse über den gesamten Versuchszeitraum aus. Ein eindeutiger Einfluss des Einstreumaterials auf das Gliotoxin-provozierte T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis ließ sich somit nicht nachweisen (Abb. 20).



**Abb. 19: Individuelle Anteile der TH1-, IFN-γ-bildenden und der TH2-Zellen sowie individuelle TH1/TH2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin**

Arithmetischer Mittelwert (± SD) der drei Versuchszeitpunkte (Stroh, Späne, Strohpellets) und der zwei auswertbaren Gliotoxin-Konzentrationen [11,1 ng/ml; 16,6 ng/ml]



**Abb. 20: TH1/TH2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Gliotoxin**

Dargestellt sind sowohl die auswertbaren Gliotoxin-Konzentrationen [11,1 ng/ml sowie 16,6 ng/ml (schraffiert)] als auch die eingesetzten Einstreuarten: Beim jeweils 1. Balken einer Gruppierung wurde Stroh (1), beim jeweils 2. Späne (2) und beim jeweils 3. Balken einer Gruppierung Strohpellets (3) verwendet.

### 3.3 Patulin

Patulin wurde in einem Konzentrationsbereich von 62,5 bis 250 ng/ml in insgesamt drei Stufen (log 2 Titration) getestet. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches führte die Inkubation mit Patulin konzentrationsabhängig zu einem hoch signifikanten Abfall ( $p < 0,001$ ) des Anteiles vitaler Zellen. Da bereits ab einer Patulin-Konzentration von 125 ng/ml unabhängig von der Art der verwendeten Einstreu kaum noch vitale Zellen zu messen waren, wurde lediglich die niedrigste Konzentrationsstufe in der statistischen Auswertung berücksichtigt (Abb. 21).

Da die Inkubation mit Patulin unabhängig von der Einstreu einen im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikanten Abfall sowohl der  $T_{H1}$ -Zellen ( $p=0,002$ ) als auch der  $T_{H2}$ -Zellen ( $p=0,002$ ) hervorrief, konnte kein statistisch signifikanter Effekt der *In vitro*-Provokation mit Patulin auf das  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnis nachgewiesen werden (Abb. 21, Tab. 9).

Signifikante Unterschiede zwischen den individuellen  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnissen konnten trotz schwach signifikanter Unterschiede zwischen den Anteilen der  $T_{H1}$ - ( $p=0,011$ ) und  $IFN-\gamma^+$ -Zellen ( $p=0,038$ ) sowie der  $T_{H2}$ -Zellen ( $p=0,029$ ) nicht festgestellt werden (Abb. 22).

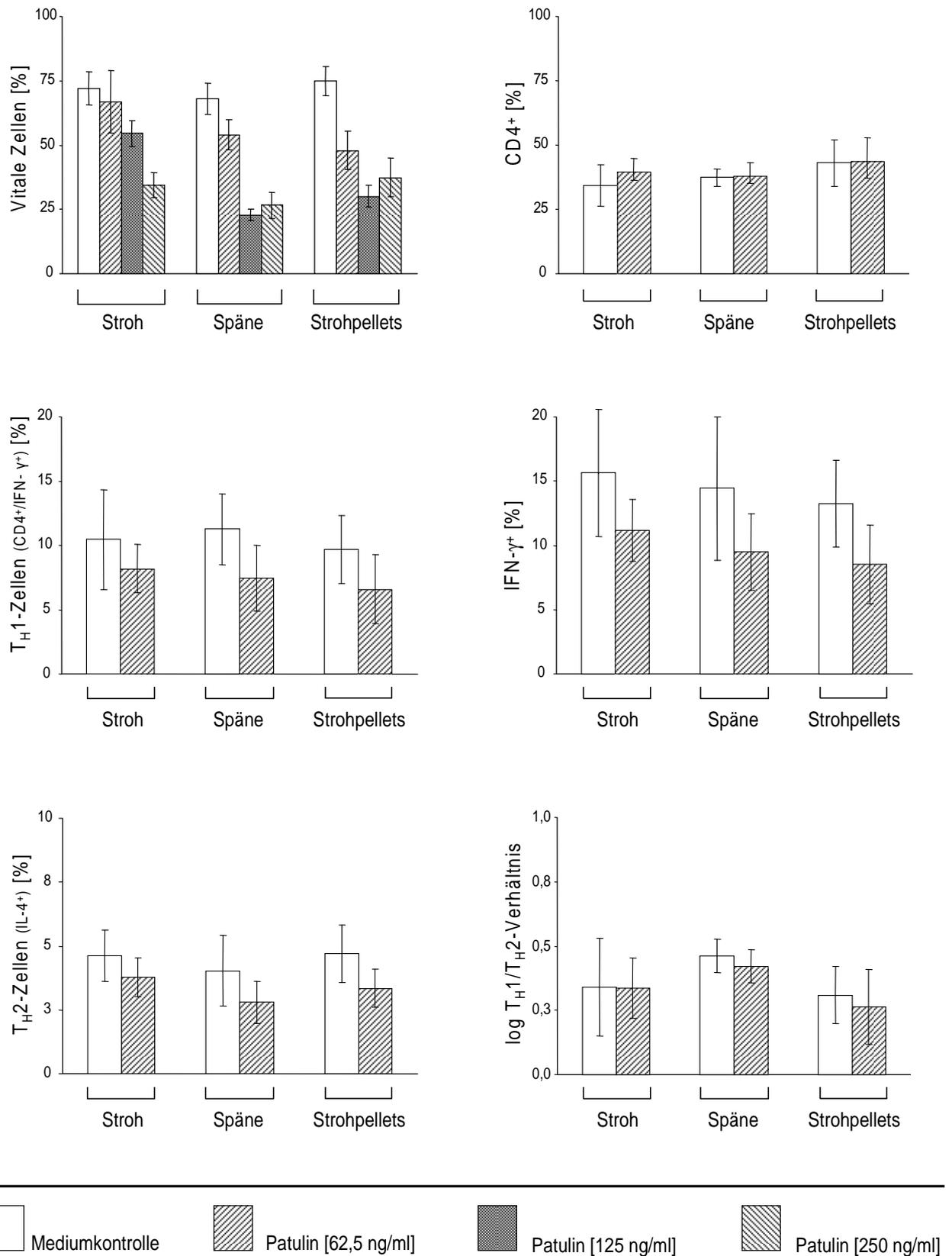
Obwohl zudem die Art des verwendeten Einstreumaterials keinen signifikanten Einfluss auf das  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnis der Pferde ausübte, fiel dennoch ein deutlicher Anstieg der  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisse der Pferde 1, 2 und 3 um etwa das 2- bis 3-fache nach Verwendung der Einstreu Späne auf (Abb. 23).

**Tab. 9: Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach *In vitro*-Provokation mit Patulin**

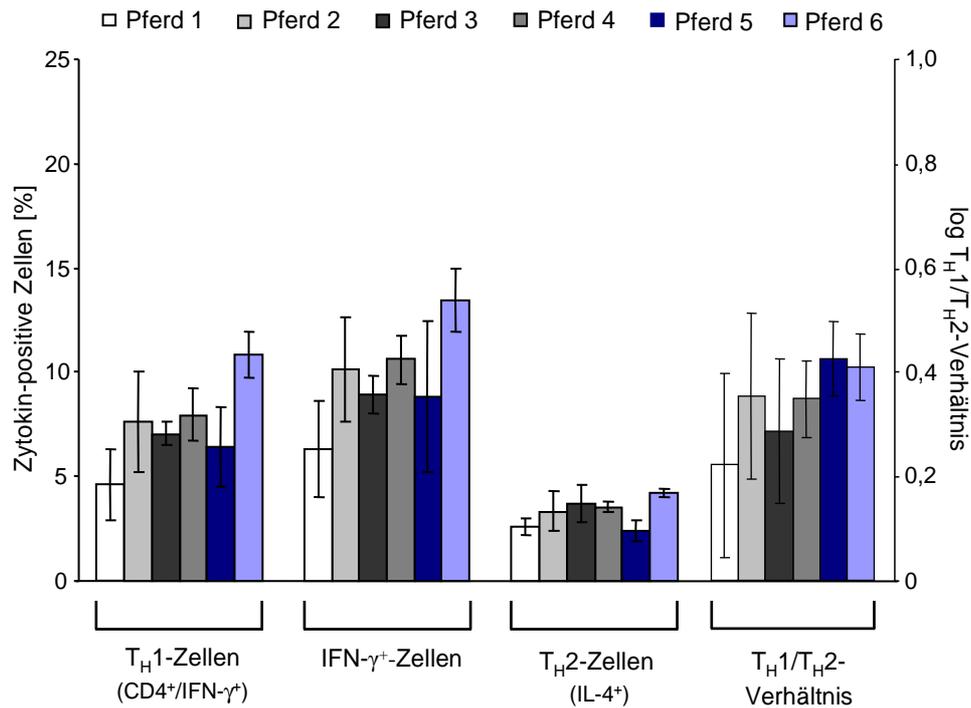
Variable	Einstreu		Konzentration		Wechselwirkung <sup>1</sup>	
Zellvitalität	n.s.	$p=0,0615$	***	$p=0,0003$	**	$p=0,0044$
CD4 <sup>+</sup> -Zellen	*	$p=0,0198$	n.s.	$p=0,2808$	n.s.	$p=0,3849$
$T_{H1}$ -Zellen	n.s.	$p=0,1112$	**	$p=0,0021$	n.s.	$p=0,3962$
$T_{H2}$ -Zellen	n.s.	$p=0,1177$	**	$p=0,0018$	n.s.	$p=0,5347$
$IFN-\gamma^+$ -Zellen	*	$p=0,0166$	**	$p=0,0069$	n.s.	$p=0,9608$
$T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnis	n.s.	$p=0,0837$	n.s.	$p=0,0786$	n.s.	$p=0,7315$

\* schwach signifikant, \*\* signifikant, \*\*\* hoch signifikant, n.s. nicht signifikant; <sup>1</sup>Wechselwirkung der Einstreu und Konzentration

## Ergebnisse

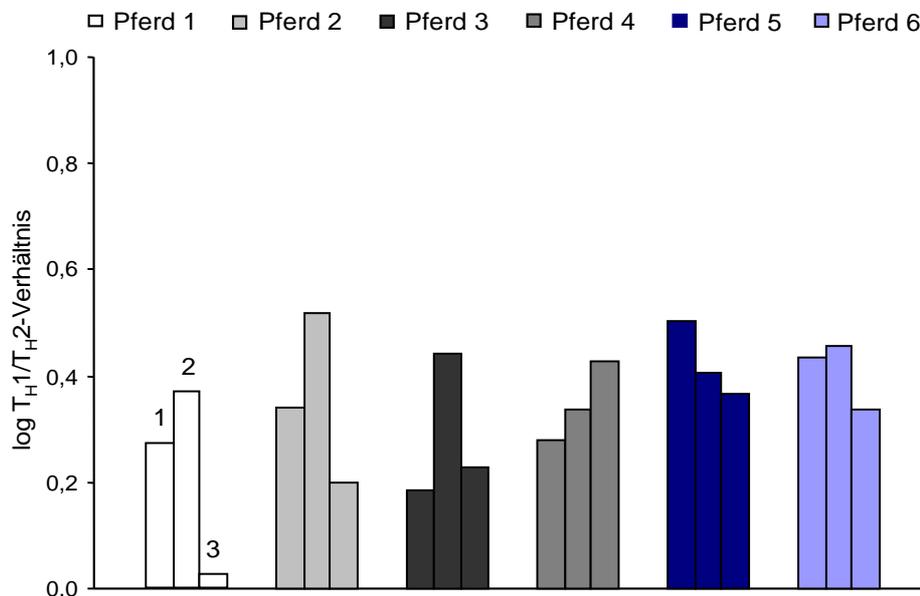


**Abb. 21: Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Patulin**  
Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) der sechs getesteten Pferde



**Abb. 22: Individuelle Anteile der TH1-, IFN-γ-bildenden Zellen und der TH2-Zellen sowie individuelle TH1/TH2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Patulin**

Arithmetischer Mittelwert (± SD) der drei Versuchszeitpunkte (Stroh, Späne, Strohpellets) und der einzigen auswertbaren Patulin-Konzentration [62,5 ng/ml]



**Abb. 23: TH1/TH2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Patulin**

Dargestellt ist die auswertbare Patulin-Konzentration [62,5 ng/ml] und die eingesetzten Einstreuarten: Beim jeweils 1. Balken einer Gruppierung wurde Stroh (1), beim jeweils 2. Späne (2) und beim jeweils 3. Balken einer Gruppierung Strohpellets (3) als Einstreu verwendet.

### 3.4 LPS

LPS wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 250 ng/ml in insgesamt drei Stufen (log 5 Titration) getestet. LPS besaß innerhalb dieses Konzentrationsbereiches keinen nachteiligen Effekt auf die Vitalität der Zellen, so dass sämtliche Konzentrationen in der statischen Auswertung Berücksichtigung fanden (Abb. 24).

Bei Betrachtung des  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisses konnte eine konzentrationsunabhängige, statistisch schwach signifikante Zunahme des Verhältnisses ( $p=0,02$ ) nach Verwendung der Einstreu Späne festgestellt werden. Dieser Effekt beruhte auf einem signifikanten Abfall der  $T_{H2}$ -Zellen ( $p=0,008$ ) zu diesem Zeitpunkt, ohne dass ein weiterer Einfluss des LPS auf die übrigen Zellpopulationen ( $CD4^+$ ,  $IFN-\gamma^+$ ,  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ) festgestellt werden konnte (Abb. 24, Tab. 10).

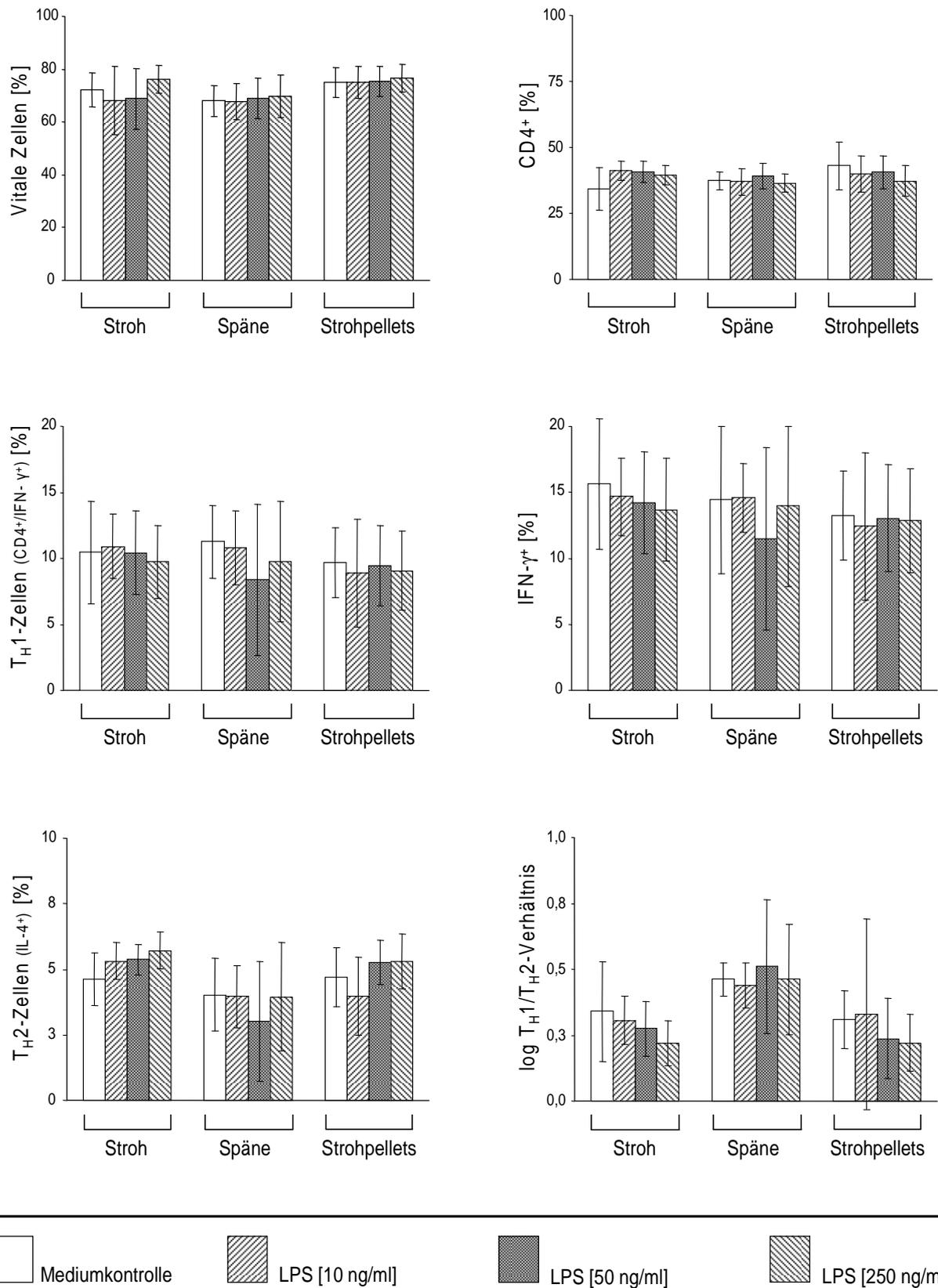
Obwohl sowohl hoch signifikante Unterschiede zwischen den individuellen Anteilen der  $T_{H1}$ - und  $IFN-\gamma^+$ -Zellen (jeweils  $p<0,001$ ) als auch schwach signifikante Unterschiede zwischen den individuellen Anteilen der  $T_{H2}$ -Zellen ( $p=0,046$ ) vorlagen, unterschieden sich die  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisse zwischen den Pferden nicht signifikant (Abb. 25). Dennoch konnten auf Basis der Einzelwerte erhebliche Unterschiede der  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisse sowohl zwischen den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten als auch zwischen den LPS-Konzentrationen festgestellt werden. Lediglich Pferd 6 bildete ähnliche  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisse über den gesamten Versuchszeitraum nach *In vitro*-Provokation mit LPS aus (Abb. 26).

**Tab. 10: Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach *In vitro*-Provokation mit LPS**

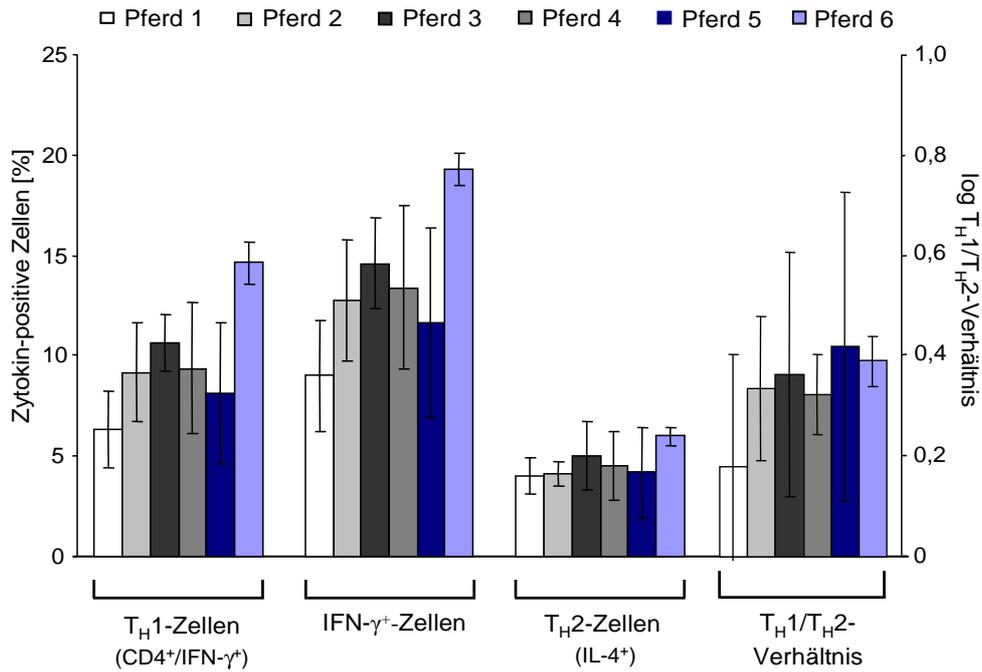
Variable	Einstreu		Konzentration		Wechselwirkung <sup>1</sup>	
Zellvitalität	n.s.	$p=0,1439$	**	$p=0,0097$	n.s.	$p=0,0585$
$CD4^+$ -Zellen	n.s.	$p=0,2541$	n.s.	$p=0,1963$	**	$p=0,0076$
$T_{H1}$ -Zellen	n.s.	$p=0,5791$	n.s.	$p=0,3149$	n.s.	$p=0,2820$
$T_{H2}$ -Zellen	**	$p=0,0075$	n.s.	$p=0,3805$	n.s.	$p=0,1452$
$IFN-\gamma^+$ -Zellen	n.s.	$p=0,4946$	n.s.	$p=0,3951$	n.s.	$p=0,5949$
$T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnis	*	$p=0,0217$	n.s.	$p=0,4715$	n.s.	$p=0,8117$

\* schwach signifikant, \*\* signifikant, \*\*\* hoch signifikant, n.s. nicht signifikant; <sup>1</sup>Wechselwirkung der Einstreu und Konzentration

## Ergebnisse

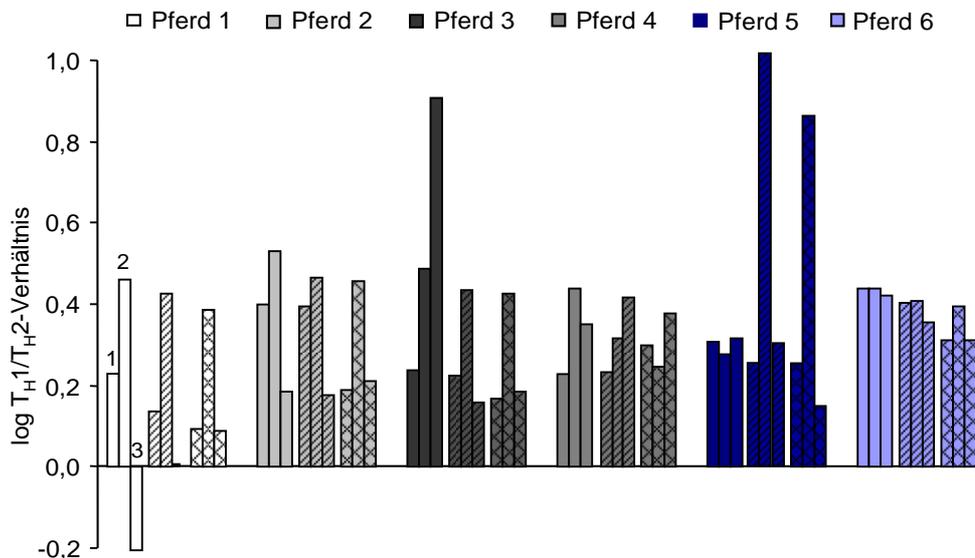


**Abb. 24: Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit LPS**  
Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) der sechs getesteten Pferde



**Abb. 25: Individuelle Anteile der TH1-, IFN-γ-bildenden Zellen und der TH2-Zellen sowie individuelle TH1/TH2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit LPS**

Arithmetische Mittelwert (± SD) der drei Versuchszeitpunkte (Stroh, Späne, Strohpellets) und sämtlicher LPS-Konzentrationen [10 ng/ml; 50 ng/ml; 250 ng/ml]



**Abb. 26: TH1/TH2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit LPS**

Dargestellt sind sowohl die auswertbaren LPS-Konzentrationen [10 ng/ml; 50 ng/ml (schraffiert) sowie 250 ng/ml (kariert)] als auch die eingesetzten Einstreuarten: Beim jeweils 1. Balken einer Gruppierung wurde Stroh (1), beim jeweils 2. Späne (2) und beim jeweils 3. Balken einer Gruppierung Strohpellets (3) verwendet.

### 3.5 Dexamethason

Dexamethason wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,04 bis 4 ng/ml in insgesamt drei Stufen (log 10 Titration) getestet. Sämtliche verwendeten Konzentrationen konnten für die statische Auswertung genutzt werden. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches führte die Inkubation mit Dexamethason konzentrationsabhängig zu einem hoch signifikanten Abfall ( $p < 0,001$ ) des Anteiles vitaler Zellen (Abb. 27) sowie zu einer schwach signifikanten Abnahme des Anteiles  $CD4^+$ -Zellen ( $p = 0,04$ ). Darüber hinaus konnte eine generelle Reduktion sowohl des Anteiles vitaler Zellen als auch der  $CD4^+$ -Zellen nach Verwendung der Einstreu Späne im Vergleich zu den anderen beiden Einstreumaterialien beobachtet werden. Dieser Abfall potenzierte sich mit zunehmender Dexamethason-Konzentration signifikant bzw. schwach signifikant (Tab. 11).

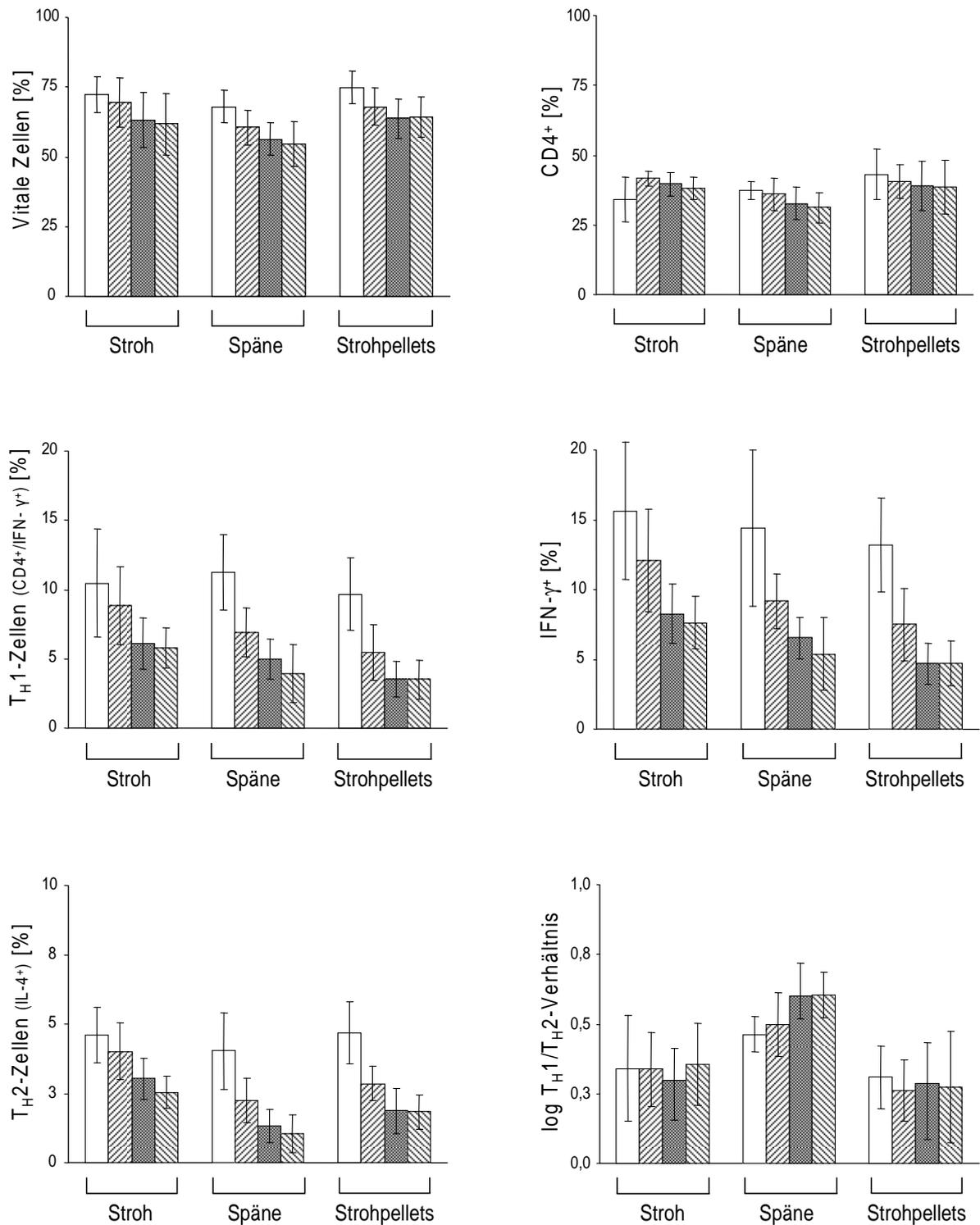
Da sich sowohl die Anteile der  $T_H1$ - als auch der  $T_H2$ -Zellen (jeweils  $p < 0,001$ ) mit steigender Dexamethason-Konzentration hoch signifikant reduzierten, war das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis nicht von der Höhe der Konzentration abhängig. Stattdessen konnte eine schwach signifikante Zunahme des Verhältnisses ( $p = 0,01$ ) nach Verwendung der Einstreu Späne festgestellt werden. Dieser Anstieg wurde mit zunehmender Konzentration von Dexamethason noch weiter gesteigert ( $p = 0,02$ ). Als mögliche Ursache dieser Zunahme konnte eine signifikante Reduzierung der  $T_H2$ -Zellen ( $p = 0,005$ ) zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden, welche ebenfalls eine schwach signifikante Wechselwirkung ( $p = 0,02$ ) mit der verwendeten Konzentration zeigten (Abb. 27, Tab. 11).

**Tab. 11: Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach *In vitro*-Provokation mit Dexamethason**

Variable	Einstreu	Konzentration	Wechselwirkung <sup>1</sup>
Zellvitalität	* $p = 0,0215$	*** $p < 0,0001$	* $p = 0,0134$
$CD4^+$ -Zellen	* $p = 0,0494$	* $p = 0,0361$	* $p = 0,0180$
$T_H1$ -Zellen	** $p = 0,0076$	*** $p < 0,0001$	** $p = 0,0030$
$T_H2$ -Zellen	** $p = 0,0049$	*** $p < 0,0001$	* $p = 0,0203$
$IFN-\gamma^+$ -Zellen	** $p = 0,0028$	*** $p < 0,0001$	n.s. $p = 0,3801$
$T_H1/T_H2$ -Verhältnis	* $p = 0,0115$	n.s. $p = 0,2482$	* $p = 0,0158$

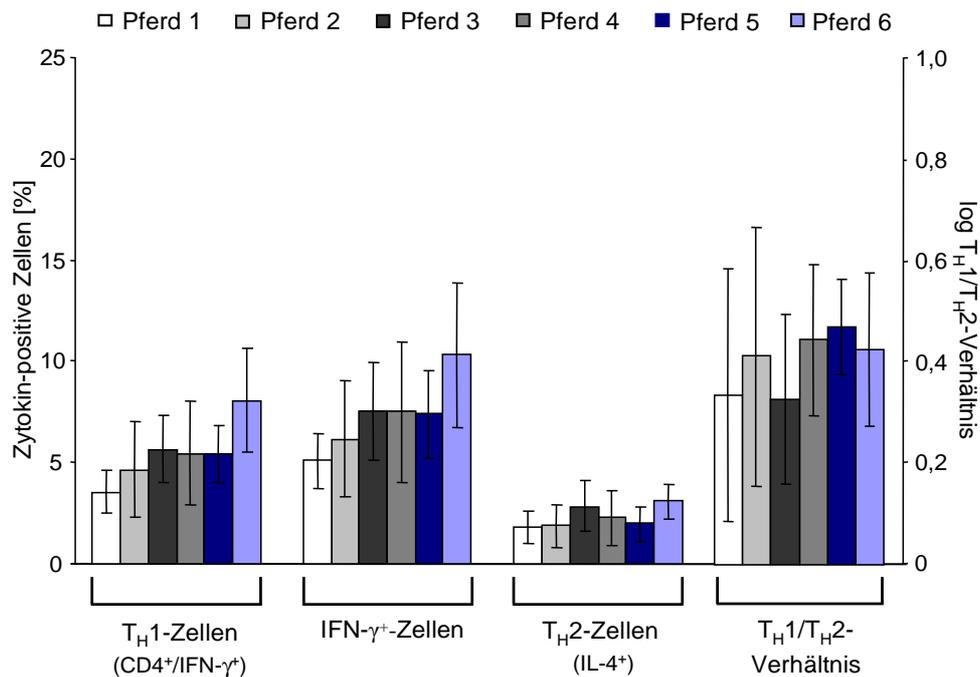
\* schwach signifikant, \*\* signifikant, \*\*\* hoch signifikant, n.s. nicht signifikant; <sup>1</sup>Wechselwirkung der Einstreu und Konzentration

## Ergebnisse

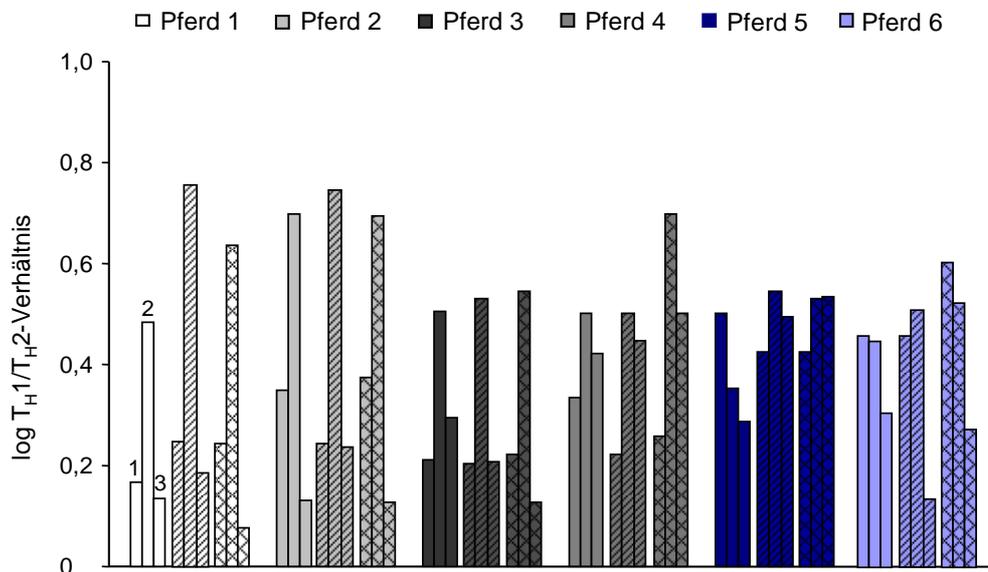


**Abb. 27: Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup> sowie T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen) sowie T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Dexamethason**

Arithmetischer Mittelwert (± SD) der sechs getesteten Pferde



**Abb. 28: Individuelle Anteile der TH1-, IFN-γ-bildenden Zellen und der TH2-Zellen sowie individuelle TH1/TH2-Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit Dexamethason**  
Arithmetischer Mittelwert (± SD) der drei Versuchszeitpunkte (Stroh, Späne, Strohpellets) und sämtlicher Dexamethason-Konzentrationen [0,04 ng/ml; 0,4 ng/ml; 4 ng/ml]



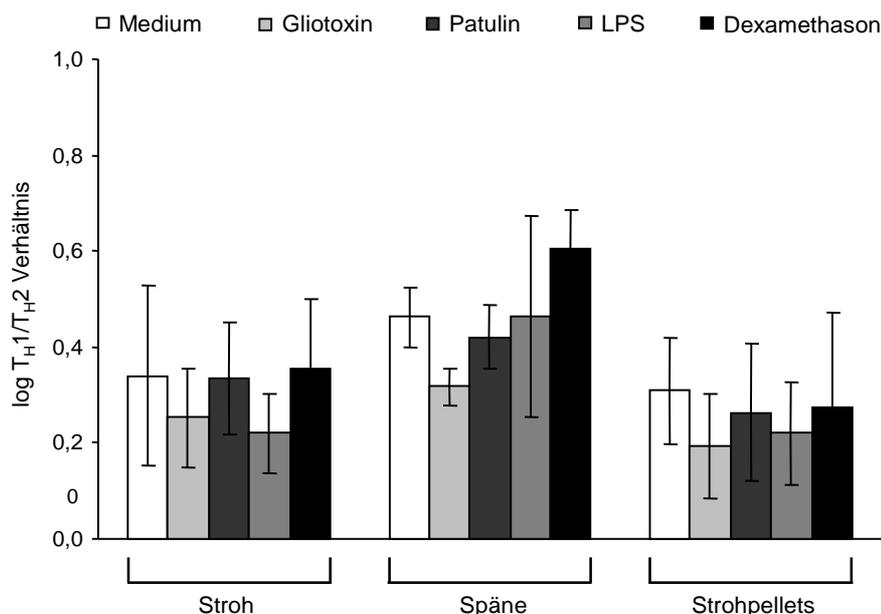
**Abb. 29: TH1/TH2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und *In vitro*-Provokation von PBMC mit Dexamethason**  
Dargestellt sind sowohl die auswertbaren Dexamethason-Konzentrationen [0,04 ng/ml; 0,4 ng/ml (schraffiert) sowie 4 ng/ml (kariert)] als auch die eingesetzten Einstreuarten: Beim jeweils 1. Balken einer Gruppierung wurde Stroh (1), beim jeweils 2. Späne (2) und beim jeweils 3. Balken einer Gruppierung Strohpellets (3) verwendet.

## Ergebnisse

Trotz hoch signifikanter bzw. signifikanter Unterschiede zwischen den Anteilen der  $T_H1$ - ( $p=0,001$ ) bzw. der  $IFN-\gamma^+$ -Zellen ( $p=0,007$ ) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den individuellen  $T_H1/T_H2$ -Verhältnissen festgestellt (Abb. 28). Dennoch konnte auf Basis der Einzelwerte gezeigt werden, dass vor allem die Verhältnisse der Pferde 1, 2 und 3 zum 2. Versuchszeitpunkt nach Verwendung der Einstreu Späne erheblich anstiegen. Das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis des Pferdes 6 (und des Pferdes 5 in geringster Konzentration) fiel dagegen zum 3. Versuchszeitpunkt nach Verwendung der Einstreu Strohpellets deutlich ab. Unterschiede in den  $T_H1/T_H2$ -Verhältnissen zwischen den einzelnen verwendeten Konzentrationen der drei Versuchszeitpunkte waren dagegen insgesamt gering ausgeprägt (Abb. 29).

### 3.6 Vergleich der Noxen

Um zu bestimmen, welche der verwendeten Noxen die deutlichsten Effekte auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis von Pferden besaß, wurden die Noxen in der jeweils höchsten, für die statistische Auswertung verwendeten Konzentration empirisch miteinander verglichen. Diese betrug für Gliotoxin 16,6 ng/ml, für Patulin 62,5 ng/ml, für LPS 250 ng/ml sowie für Dexamethason 4 ng/ml. Dexamethason rief die jeweils höchsten  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse hervor, während nach Verwendung von Gliotoxin der Quotient am geringsten ausgeprägt war. Dabei fiel besonders auf, dass die Verwendung der Einstreu Späne bei allen Noxen und der Mediumkontrolle zu einer Zunahme des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses führte. Dieser Anstieg war nach Verwendung von Dexamethason am stärksten ausgeprägt (Abb. 30).



**Abb. 30:**  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse nach *In vitro*-Provokation mit der maximal verwendeten Konzentration einer Noxe (Gliotoxin [16,6 ng/ml], Patulin [62,5 ng/ml], LPS [250 ng/ml], Dexamethason [4 ng/ml])

Arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SD) der sechs Pferde

# V Diskussion

Voraussetzung für eine erfolgreiche Eliminierung von Pathogenen ist ein funktionierendes Immunsystem. Eine Beurteilung des Immunsystems zur Bestimmung des Gesundheitszustandes eines Individuums ist jedoch bislang in der Praxis nicht üblich. In wissenschaftlichen Studien dienen Analysen von Zytokinprofilen nicht nur der Erforschung immunologischer Reaktionen, sondern liefern darüber hinaus wichtige Informationen zur Pathogenese von Erkrankungen. Dafür werden meist transkriptionelle und nur selten posttranskriptionelle Prozesse herangezogen. Ein Nachweissystem zur Bestimmung des Zytokinmusters, welches auf posttranskriptionellen Prozessen basierend Aussagen über die individuelle Immunlage erlaubt, existiert beim Pferd bislang nicht. Der vorliegenden Arbeit lag daher die Hypothese zugrunde, dass es in Form der *In Vitro*-Provokation möglich ist, die individuelle Immunlage von Pferden zu beurteilen und darüber hinaus Einflüsse von Umweltfaktoren auf das Immunsystem nachweisen zu können. Als Parameter wurde hierfür das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis, ein aus  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen gebildeter Quotient, herangezogen. Die eigenen Ergebnisse belegen nicht nur, dass die Bestimmung von IFN- $\gamma$ - und IL-4-bildenden Zellen aus dem Blut von Pferden nach *In vitro*-Konfrontation mit Hilfe eines immunmodulatorisch wirkenden Stoffes möglich ist, sondern bestätigen darüber hinaus exemplarisch anhand des Einstreumaterials einen bestehenden Einfluss von Umweltfaktoren auf das Immunsystem des Pferdes. Einerseits besaß jede der verwendeten Noxen Gliotoxin, Patulin, LPS oder Dexamethason *in vitro* immunmodulatorische Fähigkeiten, andererseits wies vor allem die *In vitro*-Provokation mit Dexamethason auf eine umweltbedingte Modulation des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses hin.

## 1 *In vitro*-Provokation

### 1.1 Durchflusszytometrische Detektion equiner $T_H1$ - und $T_H2$ -Zellen

Da posttranskriptionelle Prozesse Divergenzen zwischen dem Vorhandensein einer bestimmten mRNA und der tatsächlichen Existenz eines Zytokins hervorrufen können, forderten KLEIBER *et al.* (2005) zur Bestätigung vielfach in Studien gemessener zytokinspezifischer mRNA eine direkte Analyse von Zytokinproteinen in der equinen BALF COB-betroffener Pferde (85). Ergebnisse der Untersuchungen von KRUMM (2006) unterstützen diese Forderung: Anhand humaner PBMC konnte gezeigt werden, dass Mykotoxin-induzierte Einflüsse auf die mRNA-Synthese für IFN- $\gamma$  und IL-4 nicht vollständig auf Proteinebene sichtbar werden. Während die Transkription von mRNA für IL-4

## Diskussion

---

durch Mykotoxine stimuliert wurde, verminderte sich stattdessen die Sekretion des Zytokins auf Proteinebene (87). Zur Beurteilung der Immunantwort ist daher ein direkter Zytokinnachweis sinnvoll. In diesem Sinn erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Detektion equiner  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen mittels Durchflusszytometrie. Als spezifische Markerzytokine dienten  $IFN-\gamma$  für  $T_H1$ - und  $IL-4$  für  $T_H2$ -Zellen. Um  $T_H1$ -Zellen von anderen, ebenfalls  $IFN-\gamma$ -produzierenden Zellpopulationen wie  $CD8^+$ -T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen unterscheiden zu können, wurde eine Doppelmarkierung von  $IFN-\gamma$  und  $CD4$  durchgeführt. Dennoch zählen in dieser Arbeit auch die  $IL-10$ -bildenden  $T_{reg}$ -Zellen, die einen Anteil von etwa 9 % der  $CD4^+/IFN-\gamma^+$ -Zellen equiner PBMC bilden, zu der als  $T_H1$ -Zellen bezeichneten Population (181, 183). Auf eine Doppelmarkierung von  $CD4$  und  $IL-4$  wurde nicht nur aufgrund methodischer Sachverhalte (s. Kap. III 3.3), sondern auch aufgrund einer geringen Anzahl weiterer potentiell  $IL-4$ -bildender Zellpopulationen in equinen PBMC verzichtet. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse sind lediglich etwa 5 % der  $IL-10$ -produzierenden equinen  $T_{reg}$ -Zellen in der Lage,  $IL-4$  zu bilden. Eine Doppelmarkierung von  $CD4$  und  $IL-4$  hätte gleichwohl diese Zellpopulation nicht vollständig ausschließen können, da etwa 80 % der  $IL-10$ -produzierenden Lymphozyten das  $CD4$ -Molekül auf ihrer Oberfläche tragen (183).

Die in dieser Arbeit festgestellten  $CD4^+$ -Anteile equiner PBMC unterscheiden sich von jenen, die bereits 1991 im Leukozytenworkshop (54-70 %) und später von BENDALI-AHCÈNE *et al.* (1995) ( $55,4 \pm 2$  %) sowie von AKENS *et al.* (1997) (50,2-70,8 %) beschrieben wurden (3, 10, 90). Die Mediumkontrollen, lediglich mit PMA und Ionomycin stimuliert, wiesen einen geringeren Anteil von 31,4 bis 61,9 % bzw. 23,8 bis 56,5 %  $CD4^+$ -Zellen in den Vor- bzw. Hauptversuchen auf. Eine Erklärung hierfür könnte eine sowohl für humane als auch für equine PBMC beschriebene Reduzierung der  $CD4$ -Expression auf der T-Zelloberfläche nach Exposition der Zellen gegenüber PMA sein (14, 137, 195). Eine 4-stündige Inkubation equiner Lymphozyten bei  $37^\circ C$  mit PMA (100 ng/ml) führte in Untersuchungen von ZHANG *et al.* (1994) zu einem Verlust von über 75 % der  $CD4$ -Moleküle einer Zelle. Dieser Verlust war bei fortschreitender Inkubation mit PMA innerhalb von 24 Stunden reversibel (195). Nach Einwirkung einer geringeren, mit der in den eigenen Untersuchungen eingesetzten übereinstimmenden Konzentration von PMA (25 ng/ml) wiesen equine Lymphozyten ebenfalls nach 4-stündiger Inkubation mit einem durchschnittlichen Anteil von 31,4 % ( $\pm 5,1$ ) 44 % weniger  $CD4^+$ -Zellen im Vergleich zu unstimulierten PBMC auf (181). Trotzdem ist die Verwendung von PMA zur Stimulierung der Zytokinbildung von T-Zellen essentiell (46, 53, 181). Für die Doppelmarkierung von  $CD4$  und  $IFN-\gamma$  wurde,

## Diskussion

---

basierend auf kinetischen Untersuchungen, eine Inkubationsdauer mit PMA von 4 Stunden als geeignet für equine PBMC angesehen (181), welches die eigenen Untersuchungen bestätigen.

GUTMANN *et al.* (2005) wiesen einen Anteil von bis zu 20 % IFN- $\gamma^+$ -Zellen in entsprechend stimulierten equinen Blutleukozyten nach (62). 14 % IFN- $\gamma^+$ -Zellen adulter Pferde wurden in einer weiteren Untersuchung von BREATHNACH *et al.* (2006) nicht überschritten (22). Eine weitere Differenzierung der IFN- $\gamma^+$ -Population erfolgte in diesen Untersuchungen jedoch nicht (22, 62). Eine erstmalig an equinen Zellen durchgeführte Doppelmarkierung von CD4 und IFN- $\gamma$  ergab deutliche individuelle Unterschiede in dem Vorhandensein von T<sub>H</sub>1-Zellen bei gesunden Pferden (18,1-47,2 %; n=5) (68). Ähnliche Variationen der Anteile IFN- $\gamma^+$ -Zellen konnten sowohl in einer zweiten Studie (181) als auch in der eigenen Arbeit festgestellt werden. Mediumkontrollen der Vorversuche wiesen 14,8 bis 30,7 % IFN- $\gamma^+$ -Zellen auf; 10,5 bis 22,9 % der gemessenen Zellen waren außerdem positiv für CD4 und wurden demzufolge den T<sub>H</sub>1-Zellen zugeordnet.

Trotz der von verschiedenen Autoren mehrfach bestätigten Kreuzreaktivität des anti-bovinen IL-4-Antikörpers mit equinem IL-4 (53, 65, 126) erwies sich dieser Antikörper in den eigenen Untersuchungen für die Detektion von equinen IL-4-produzierenden T<sub>H</sub>2-Zellen als ungeeignet. T<sub>H</sub>2-Zellen wurden stattdessen mit Hilfe eines von WAGNER *et al.* (2006) entwickelten anti-equinen IL-4-Antikörpers detektiert (182). Während die Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen in den eigenen Untersuchungen in einem Bereich von 2,0 bis 15,8 % deutlich schwankten, gaben WAGNER *et al.* (2006, 2010) einen Bereich von 2 bis 8 % IL-4<sup>+</sup>-Zellen für das Pferd an (181, 182).

Die im Vergleich zu den Vorversuchen jüngeren Tiere wiesen in den Hauptversuchen sowohl einen niedrigeren Anteil an IFN- $\gamma^+$ - (7,7-23,3 %; Vorversuche 14,8-30,7 %) und T<sub>H</sub>1-Zellen (5,5-17,1 %; Vorversuche 10,5-22,9 %) als auch an T<sub>H</sub>2-Zellen (2,0-6,4 %; Vorversuche 8,7-15,8 %) auf. Basierend auf den Ergebnissen von WAGNER *et al.* (2010), nach denen Fohlen in einem Alter von drei Monaten quantitativ weniger IFN- $\gamma$  und IL-4 als adulte Pferde bilden (181), könnte vermutet werden, dass Pferde in einem Alter von zwei Jahren ebenfalls keine ausgereifte Zytokinbildung besitzen. Da jedoch, wie BREATHNACH *et al.* (2006) zeigen konnten, die IFN- $\gamma$ -Produktion ab einem Lebensalter von etwa drei Monaten das Niveau von adulten Tieren erreicht (22) und der Anteil IL-4-produzierender Zellen in einer Untersuchung von HAMZA *et al.* (2008) nicht altersabhängig war (66), sind vielmehr individuelle Faktoren als Ursache für das niedrige Niveau der gemessenen Zytokine in den Hauptversuchen zu vermuten. Denkbar ist auch eine versuchsbedingte Reduzierung der Zytokinbildung, da im Vergleich zu den Vorversuchen die Zellen nicht direkt im Anschluss

an die Blutentnahme kultiviert werden konnten, sondern stattdessen für mehrere Stunden transportiert werden mussten und somit die Zellen weiteren, potentiell schädlichen Einflüssen ausgesetzt wurden.

Ergebnisse dieser Arbeit deuten außerdem darauf hin, dass im Blut vorgefundene hohe Anteile einer T-Zellart im Gegensatz zu lokal begrenzten immunologischen Reaktionen (z. B. pulmonal oder intestinal) nicht unbedingt mit einer entsprechenden Erniedrigung der jeweils anderen Zellart einhergehen. So besaß Pferd B in den Vorversuchen beispielsweise einen hohen Anteil von 15,1 %  $T_{H2}$ -Zellen, jedoch mit 15,2 % keinen entsprechend niedrigen Anteil an  $T_{H1}$ -Zellen. Eine genauere Aussage zur lokalen  $T_{H1}/T_{H2}$ -Balance wäre nur durch lokale Beprobungen möglich. Diese sind jedoch entweder *intra vitam* nicht durchführbar oder mit hohem Aufwand und Belastungen für das Tier verbunden. Das Blut spiegelt dagegen die Gesamtheit aller lokal spezifischen Immunreaktionen wider und kann damit zur Beurteilung des  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisses eines gesamten Individuums benutzt werden.

### 1.2 Auswahl der Noxen und Konzentrationsbereiche

Mykotoxine begünstigen die Polarisierung in Richtung einer  $T_{H2}$ -Immunantwort und demzufolge die Ausbildung von Allergien beim Menschen (117). Kenntnisse über die Exposition von Mykotoxinen und deren Auswirkung auf das equine Immunsystem liegen bislang nicht hinreichend vor. Es existieren jedoch sowohl Hinweise auf eine potentiell mögliche Kontamination von Futtermitteln mit Schimmelpilzen und deren Stoffwechselprodukten als auch darauf, dass Antigene von Schimmelpilzen bei Pferden eine  $T_{H2}$ -Immunantwort begünstigen und zur vermehrten Bildung von IgE und IgG führen können (s. Kap. II 3.1.3). Pilzsporen erwiesen sich darüber hinaus als wichtige Toxinträger (124), so dass bei einer maximalen Größe von 5  $\mu\text{m}$  auch eine mykotoxikologische Belastung der Atemwege denkbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Konfrontation equiner Lymphozyten mit Mykotoxinen *in vitro* durchgeführt. Basierend auf Untersuchungen an humanen PBMC fanden hierfür die Mykotoxine Gliotoxin und Patulin Anwendung, welche konzentrationsabhängig  $T_{H1}/T_{H2}$ -Verhältnisse und die zelluläre Proliferation modulieren können (87, 102, 186). Während Gliotoxin bei humanen PBMC ab einer Konzentration von 31,25 ng/ml zu einer Minderung der vitalen Zellen führte, wurde dies bei Patulin bereits ab einer Konzentration von 3,9 ng/ml beobachtet. Der Anteil vitaler Zellen wurde durch Patulin erst bei einer Konzentration von 2086 ng/ml auf 50 % reduziert, durch Gliotoxin bereits bei einer Konzentration von 143,7 ng/ml. Gliotoxin ist demzufolge verglichen mit Patulin

## Diskussion

---

zytotoxischer für humane PBMC (87). Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass Mykotoxine auch auf equine PBMC zytotoxisch wirken. Gliotoxin reduzierte die Anteile vitaler Zellen ab einer Konzentration von 22,2 ng/ml, Patulin ab 160 ng/ml. Bereits darauf folgende Konzentrationsstufen (Gliotoxin 33,3 ng/ml, Patulin 320 ng/ml) ergaben keinerlei auswertbare Zellzahlen mehr. Konzentrationen, welche zu einer Reduktion der Zellvitalität um mehr als 50 % führen, werden demzufolge sowohl für Gliotoxin als auch für Patulin bei equinen PBMC im Vergleich zu humanen PBMC deutlich früher erreicht. Proliferationsfördernde Effekte auf humane PBMC, wie sie WICHMANN *et al.* (2002) für geringe Konzentrationen der beiden Mykotoxine (Gliotoxin 0,3-1 ng/ml; Patulin 0,3-3 ng/ml) beobachtete (186), konnten an equinen PBMC nicht nachvollzogen werden. Da jedoch die Zytotoxizität dieser Mykotoxine auf equine Zellen im Vergleich zu humanen PBMC erhöht ist, ist ein eventuell vorhandener, proliferationsfördernder Effekt in ebenfalls niedrigeren Konzentrationen zu erwarten. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht getestet, wodurch ein solcher Effekt von Mykotoxinen auf equine PBMC nicht ausgeschlossen werden kann.

In den Hauptversuchen zeigten sowohl Gliotoxin als auch Patulin einen stärkeren zytotoxischen Effekt, als es die Ergebnisse der Vorversuche erwarten ließen. Die Beurteilung des immunmodulatorischen Potentials von Mykotoxinen erfolgte daher in den Hauptversuchen basierend auf zwei (Gliotoxin) bzw. einer (Patulin) Konzentration. Eine Ursache für die höhere Toxizität könnte im Altersunterschied zwischen den getesteten Pferden der Vor- und der Hauptversuche liegen. Immunzellen jüngerer Pferde könnten im Vergleich zu jenen adulter Pferde sensitiver auf die Einflüsse von Mykotoxinen reagieren. Darüber hinaus unterlagen die jungen Pferde bislang nur einem einzigen Umgebungswechsel, was in einer geringeren Immunkompetenz ihrer Immunzellen resultiert haben könnte.

Pferde werden *in vivo* ubiquitär mit LPS konfrontiert. Neben der Bildung von LPS nach Absterben gramnegativer Bakterien in der eigenen, physiologischen Darmflora, können Endotoxine regelmäßig aerogen in Pferdeställen nachgewiesen werden (s. Kap. II 3.2.1). Obwohl darüber hinaus eine ätiologische Bedeutung von LPS an der Entstehung der COB diskutiert wird (s. Kap. II 3.2.1) und LPS außerdem wiederholt in *In vitro*-Studien zur Stimulation verschiedener Zellarten eingesetzt wurde (73, 76, 106, 119), fehlen bislang Erkenntnisse zur Auswirkung von LPS auf das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht von Pferden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein durchflusszytometrischer Nachweis der Zytokinexpression zur Charakterisierung der Immunmodulation nach Konfrontation equiner PBMC mit LPS durchgeführt. Ein großzügig gewählter Konzentrationsbereich sollte dabei

## Diskussion

---

möglichst umfassend zeigen, ob und bei welchen Konzentrationen LPS einen Einfluss auf das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis besaß. Zytotoxische Effekte von LPS auf equine PBMC konnten nicht beobachtet werden. Somit wurde in den Hauptversuchen ein Konzentrationsbereich verwendet, der bei zwei der drei getesteten Pferde in den Vorversuchen eine Reduktion des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses hervorrief.

Dexamethason findet regelmäßig Anwendung in der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd. Dabei werden vor allem die antiphlogistischen Wirkungen von Dexamethason genutzt. Obwohl Dexamethason auch immunsuppressives Potential zugeschrieben wird (92), werden die Auswirkungen dieser Substanz auf die Zytokinproduktion von T-Zellen in der Literatur kontrovers diskutiert (s. Kap. II 3.3) und sind beim Pferd bislang unbekannt. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit eine Konfrontation equiner PBMC mit Dexamethason *in vitro* durchgeführt. Der verwendete Konzentrationsbereich führte zu vergleichsweise gering ausgeprägten Reduktionen der Zellvitalität um maximal 30 % im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der parallel stattfindende Anstieg des Anteils der toten Zellen in den eigenen Untersuchungen um das, verglichen mit der Mediumkontrolle, maximal 5-fache deutet dennoch auf Dexamethason-induzierte, apoptotische Vorgänge in equinen Lymphozyten hin, welche zuvor für humane PBMC ausgeschlossen wurden: Selbst eine, verglichen mit der in den Hauptversuchen verwendeten Maximalkonzentration von 4 ng/ml 100-fach höhere Dexamethason-Konzentration rief in einer Untersuchung an humanen PBMC lediglich Zelleinbußen von <10 % hervor (71). Als Ursache hierfür kann neben tierartspezifischen Differenzen auch ein unterschiedlicher Einfluss des Dexamethasons auf verschiedene Entwicklungsstadien von T-Zellpopulationen in Betracht gezogen werden. Humane, naive T-Zellen werden im Vergleich zu ausgereiften T-Gedächtniszellen wesentlich stärker durch Dexamethason in ihrer Proliferation inhibiert. 10<sup>-8</sup> M (entspricht 4 ng/ml in den eigenen Untersuchungen) Dexamethason reduzierten beispielsweise in Untersuchungen von NIJHUIS *et al.* (1995) die Proliferation naiver T-Zellen um 88 %, während sich T-Gedächtniszellen lediglich um 43 % verminderten. Interessanterweise konnte diese Suppression naiver T-Zellen durch Zugabe von 60 ng/ml PMA vollständig aufgehoben werden (121). Demzufolge könnte PMA auch in der vorliegenden Arbeit suppressive Effekte des Dexamethasons auf naive, equine T-Zellen auf ein Minimum reduziert oder gar aufgehoben haben mit der Folge, dass die Suppression der Zellproliferation überwiegend durch bereits geprimte T-Zellen zustande gekommen wäre. Darüber hinaus könnten Zytokine ausgereifter T-Zellen naive T-Zellen in der Zellkultur frühzeitig beeinflussen und somit die

Empfindlichkeit der nicht separierten T-Zellpopulation auf Dexamethason herabsetzen. Unterstützend hierfür ist eine Beobachtung an humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, dass nach 6-tägiger Zellkultur 99 % der kultivierten Zellen als T-Gedächtniszellen und lediglich 1 % der Zellen als naive T-Zellen charakterisiert werden konnten (174).

### 1.3 Immunmodulatorisches Potential der Noxen

Die Mykotoxine Gliotoxin und Patulin können humane PBMC sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene immunmodulatorisch beeinflussen. Sie supprimieren die Sekretion des T<sub>H</sub>1-spezifischen Zytokins IFN- $\gamma$  stärker als die des T<sub>H</sub>2-spezifischen Zytokins IL-4. Geringe Konzentrationen (Gliotoxin <10 ng/ml; Patulin <3 ng/ml) riefen in Untersuchungen an humanen PBMC darüber hinaus neben einer Suppression der IFN- $\gamma$ -Produktion sogar Steigerungen der IL-4-Sekretion hervor und verstärkten so das T<sub>H</sub>2-geprägte Profil humaner PBMC *in vitro* (87, 186, 187).

Die Provokation equiner PBMC mit Gliotoxin rief auch in den eigenen Untersuchungen *in vitro* eine stärkere Suppression der Anteile IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu jenen der IL-4<sup>+</sup>-Zellen hervor. Resultat dessen war eine hoch signifikante Abnahme des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses in den Hauptversuchen. Nach *In vitro*-Provokation mit Patulin konnte hingegen keine Alteration des Verhältnisses der Anteile von IFN- $\gamma$ -bildenden T<sub>H</sub>1- zu IL-4-bildenden T<sub>H</sub>2-Zellen beobachtet werden. Da beide Zellpopulationen signifikant abnahmen, ist entgegen den Ergebnissen an humanen PBMC von einer gleichmäßigen Suppression dieser Zytokine durch Patulin bei equinen PBMC auszugehen.

Dennoch weisen die Ergebnisse der Vorversuche darauf hin, dass equine T<sub>H</sub>1-Zellen nicht nur nach Exposition zu Gliotoxin, sondern auch nach Exposition zu Patulin empfindlicher auf die Toxine als T<sub>H</sub>2-Zellen reagieren. Während die Anteile der T<sub>H</sub>1-Zellen bereits bei einer Patulin-Konzentration von 80 ng/ml abfielen, wurden Anteile der T<sub>H</sub>2-Zellen erst bei der folgenden Konzentrationsstufe supprimiert. Da entgegen den Erwartungen besonders Patulin in den Hauptversuchen einen starken zytotoxischen Effekt zeigte und infolgedessen lediglich eine einzige Konzentration für die statistische Analyse zur Verfügung stand, sollten die Auswirkungen von Patulin auf eine Suppression equiner IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-T-Zellpopulationen nochmals bei geringeren Konzentrationen überprüft werden.

Eine Suppression oder gar Stimulierung der Zytokinbildung in niedrigen, nicht zytotoxisch wirkenden Konzentrationen der Mykotoxine konnte zwar für humane, aber nicht für equine PBMC gezeigt werden (87, 102, 186). Die Inhibition der equinen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-spezifischen Zytokine erfolgte durch beide getesteten Toxine in bereits zytotoxischen

## Diskussion

---

Konzentrationsbereichen. Die Ursache dieser Erniedrigung ist in Analogie zu humanen PBMC (186) wahrscheinlich auch bei equinen PBMC eher in einem Absterben immunkompetenter Zellen zu vermuten als in der Verminderung der Zytokinproduktion einer einzelnen Zelle an sich.

Equine wie humane  $T_H1$ -Zellen scheinen sensibler als  $T_H2$ -Zellen auf die Toxine zu reagieren. Insbesondere die *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin führte zu einer Polarisierung in Richtung eines  $T_H2$ -Zytokinprofils mit einhergehender Abnahme des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses. Es ist daher anzunehmen, dass Mykotoxine auch *in vivo* bei Pferden immunsuppressiv wirken, in dem sie Defizite in der Zytokinsekretion immunkompetenter Zellen verursachen.

Der Nachweis von IL-4 nach Inkubation mit LPS erwies sich entgegen vorheriger Ergebnisse von WAGNER *et al.* (2006), nach denen LPS-stimulierte equine PBMC kein IL-4 bildeten, als unproblematisch. Ursache für die scheinbar mangelhafte IL-4-Produktion in dieser Untersuchung ist vermutlich das Fehlen einer Inhibition der Zytokinsekretion (182). Infolgedessen würde in Kultur produziertes IL-4 sezerniert und stünde somit der durchflusszytometrischen Messung nicht zur Verfügung. Die Verwendung von Brefeldin A in den eigenen Untersuchungen führte stattdessen zu einer Inhibition der Sekretion der gebildeten Zytokine, wodurch eine erfolgreiche Messung von IL-4 nach *In vitro*-Provokation mit LPS ermöglicht wurde.

In den getesteten Konzentrationen besaß LPS kaum immunmodulatorische Wirkungen auf equine T-Helferzellen. Lediglich vereinzelt rief die Konfrontation mit LPS, basierend auf einer Reduktion der Anteile der  $T_H1$ -Zellen, einen Abfall des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses hervor. Die Anteile der  $T_H2$ -Zellen blieben in der Regel durch LPS unbeeinflusst. Die Empfänglichkeit equiner PBMC für immunmodulatorische Effekte von LPS schien *in vitro* individuell unterschiedlich ausgeprägt zu sein. Möglicherweise besaßen diejenigen Pferde, bei denen ein Abfall des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses und damit eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung einer  $T_H2$ -Antwort beobachtet wurde, im Vorfeld der Untersuchung durch Exposition zu LPS aktivierte dendritische Zellen und durch diese geprimte T-Zellen. Erst nach Exposition zu geringen Konzentrationen von LPS (0,1-1 ng/ml) waren gegen Ovalbumin sensibilisierte, murine dendritische Vorläuferzellen in einer kürzlich veröffentlichten Studie von PETERS *et al.* (2010) in der Lage, murine Lymphozyten zur Bildung von  $T_H2$ -Zytokinen anzuregen und dadurch eine allergische Reaktion in den Atemwegen der Mäuse zu provozieren. Hohe LPS-Konzentrationen (10-100 ng/ml) stimulierten interessanterweise jedoch nicht die Bildung von  $T_H2$ -Zytokinen, sondern induzierten stattdessen eine  $T_H17$ -

## Diskussion

---

Immunantwort (128). Ähnliches konnte bereits zuvor durch EISENBARTH *et al.* (2002) gezeigt werden. Inhalation von hohen LPS-Konzentrationen induzierte in Mäusen eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort, während geringe Dosen in Analogie zu den Ergebnissen von PETERS *et al.* (2010) ebenfalls zu einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort führten (45). Individuelle Unterschiede in der Reaktion der PBMC verschiedener Pferde könnten demnach auf einer unterschiedlichen Sensibilität für LPS-Konzentrationen und deren zum Teil gegenläufigen immunologischen Wirkungen beruhen.

Auswirkungen von Dexamethason auf die Zytokinbildung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen des Pferdes sind bislang unbekannt. GIGUÈRE *et al.* (2002) konnten nach Inhalation von Fluticason eine Verschiebung des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort beobachten, die auf einer Abnahme der Expression von mRNA für IL-4 beruhte (58). Inwieweit die Proteinexpression dieser Zytokine durch Fluticason beeinflusst wird, lässt diese Studie zwar offen, es konnte jedoch in einer Untersuchung an humanen PBMC gezeigt werden, dass Fluticason ein hoch potenter Inhibitor der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und -5 ist (174).

Geringe Konzentrationen von Dexamethason (0,04-4 ng/ml) riefen in den eigenen Untersuchungen eine hoch signifikante Abnahme sowohl der Anteile der T<sub>H</sub>1- als auch der T<sub>H</sub>2-Zellen hervor. Steigerungen der Konzentrationen führten zu keiner weiteren Suppression. Da das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis nicht signifikant beeinflusst wurde, ist eine recht gleichmäßige Abnahme beider Zelltypen belegt. Ähnlich stark ausgeprägte Suppressionen der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokine konnten auch an humanen T-Zellen mehrfach festgestellt werden (20, 112, 158). Interessanterweise führte Hydrocortison an humanen, Nickel-aktivierten PBMC zwar ebenfalls zu einer gleichmäßigen Reduktion von T<sub>H</sub>1- (IFN- $\gamma$ ) und T<sub>H</sub>2-Zytokinen (IL-5), reduzierte jedoch dabei lediglich die Expression von Chemokin-Rezeptoren der T<sub>H</sub>1-Zellen (CCR10 und CXCR3). Rezeptoren der T<sub>H</sub>2-Zellen (CCR4) blieben unbeeinflusst (112).

Trotz dieser Beobachtungen wird der Einfluss von Glucocorticoiden auf humane T-Zellen kontrovers diskutiert (s. Kap. II 3.3). Neben konzentrationsabhängigen Abnahmen humaner T<sub>H</sub>1- (IFN- $\gamma$ ) und T<sub>H</sub>2-Zytokine (IL-4) (20, 52, 112, 158) wurden sowohl Glucocorticoid-induzierte T<sub>H</sub>1-geprägte (86, 149, 158, 174) als auch T<sub>H</sub>2-geprägte (35, 52) Zytokinprofile beschrieben. Unklar ist jedoch, inwiefern methodische Unterschiede in der Durchführung der Stimulation von T-Zellen (mittels Mitogenen, monoklonalen Antikörpern oder Antigenen) *in vitro* die Zytokinexpression dieser Zellen modulieren. Eine vergleichende Interpretation der Daten der verschiedenen Studien ist daher erschwert (20).

## Diskussion

---

Eine weitere denkbare Ursache der divergierenden Untersuchungsergebnisse könnte eine vom Entwicklungsstand der T-Zelle abhängige variable Zytokinexpression sein. In einer Studie von BRINKMANN *et al.* (1995) induzierten Glucocorticoide in ausgereiften T-Zellen, welche sich aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen humaner PBMC *in vitro* weiter differenzierten, eine gesteigerte IL-4- und IL-10-Synthese. Gleichzeitig erfolgte eine Suppression von IFN- $\gamma$  und IL-5. Dagegen reagierten direkt aus humanen PBMC separierte T-Gedächtniszellen mit einem nahezu vollständigen Abfall (80-98 %) der IL-4-, IL-5- und IL-10-Synthese. Selbst eine 100-fach gesteigerte Konzentration der Glucocorticoide konnte die IFN- $\gamma$ -Produktion lediglich um maximal 50 % reduzieren. Die untersuchten T-Zellpopulationen exprimierten beide CD45RO, einen Marker für T-Gedächtniszellen. Aufgrund des identischen Phänotyps der Zellen folgerten die Autoren, dass die T-Gedächtniszellen *in vivo* zusätzliche Signale erfahren haben mussten, die unterschiedlich ausgeprägte Zytokinprofile hervorriefen (23).

Monoklonale Antikörper zur Identifizierung von equinem CD45 fehlen bislang (25, 103). Eine durchflusszytometrische Unterscheidung equiner PBMC in naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen bei Pferden ist somit noch nicht möglich. Unterschiedliche Empfänglichkeiten der verschiedenen Entwicklungsstadien von T-Zellen für suppressive Einflüsse von Glucocorticoiden und daraus resultierende variierende Zytokinmuster sind jedoch auch für equine T-Zellen denkbar. Variationen in den Verhältnissen naiver zu geprimten T-Zellen könnten ferner das Vorhandensein individueller Unterschiede erklären.

Darüber hinaus bleibt zu bedenken, dass die Untersuchungen überwiegend an PBMC und damit an gemischten Zellpopulationen erfolgten. Neben einem damit einhergehenden variablen Verhältnis von naiven zu geprimten T-Zellen sind mögliche Effekte von Glucocorticoiden auf andere Zellarten nicht ausgeschlossen. Folglich ist auch eine Beeinflussung der zu messenden Zytokinproduktion durch diese Zellpopulationen und divergierende Ergebnisse sowohl zwischen einzelnen Individuen als auch zwischen Untersuchungen denkbar.

Hydrocortison stimuliert in sehr geringen Konzentrationen ( $10^{-10}$ - $10^{-9}$  M) die Bildung von IL-4 durch humane T<sub>H</sub>2-Zellen (158). Trotz Verwendung entsprechender Konzentrationen konnte eine solche Stimulierung bei equinen T-Zellen in den eigenen Untersuchungen durch Dexamethason nicht beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür bietet neben tierartspezifischen Differenzen die unterschiedliche Wirkungspotenz beider Glucocorticoide. Dexamethason besitzt im Vergleich zu Hydrocortison ein um den Faktor 2,2 gesteigertes immunsuppressives Potential (92). In Bezug auf das Vermögen, die Reaktionsfähigkeit von T-Zellen *in vitro* zu supprimieren, sind Konzentrationen von  $10^{-8}$  M

Dexamethason (entspricht 4 ng/ml in den eigenen Untersuchungen) genauso wirksam wie doppelt konzentriertes Hydrocortison (112). Vor diesem Hintergrund ist daher denkbar, dass auch Dexamethason wie Hydrocortison stimulierende Einflüsse auf die Produktion von equinen  $T_H2$ -Zytokinen besitzt, diese jedoch in weitaus niedrigeren Konzentrationen zu erwarten sind.

### 1.4 Reproduzierbarkeit der *In vitro*-Provokation

Wie die eigenen Untersuchungen zeigen, variieren die gemessenen  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse bei Einzeltieren, wenn sie anhand von Proben bestimmt werden, die in einem Abstand von sieben Wochen gewonnen werden. Externe (Umwelt), aber auch interne (Gesundheitszustand, Alter) Faktoren erfordern eine situative Adaptation des Immunsystems. Neben der Art des verwendeten Einstreumaterials (s. Kap. V 2) sind weitere Faktoren wie Stress, Temperaturunterschiede oder auch UV-Einstrahlung in der Lage, das  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewicht eines Individuums zu beeinflussen (56, 125, 144). Dagegen deuten die Ergebnisse des einzigen, innerhalb eines kurzen Zeitraumes (24 h) wiederholt gemessenen Pferdes (Pferd A, Vorversuche) darauf hin, dass insbesondere nach Konfrontation mit LPS und Dexamethason reproduzierbare  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse erzielt werden können.

Die verwendete Methode eignet sich somit weniger für diagnostische, sondern vielmehr für experimentelle Fragestellungen, bei denen externe Einflüsse auf das Immunsystem durch Gruppenmittel nachgewiesen werden sollen. Aussagen über den Immunstatus von Einzeltieren können hingegen bei wiederholter Beprobung von Tieren und dementsprechenden Verlaufskontrollen getroffen werden.

## 2 Einfluss der Einstreu

Externe Einflüsse der Umwelt bestimmen maßgeblich die Reifung eines individuellen Immunsystems und damit dessen Fähigkeit, dauerhaft adäquat auf diese Reize reagieren zu können. Direkt aus peripherem Blut gewonnene ausgereifte T-Zellen bildeten z. B. durch früheren Antigenkontakt nach Restimulierung *in vitro* ein anderes Zytokinmuster aus als T-Zellen, die aus naiven T-Zellen kultiviert wurden und deren primärer Antigenkontakt in Kultur stattfand (23). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen sollte daher exemplarisch anhand von verschiedenen Einstreumaterialien getestet werden, ob ein Einfluss dieses für Pferde externen Umweltfaktors auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis durch die *In vitro*-Provokation festzustellen ist. Die Ergebnisse belegen einen derartig existierenden Einfluss auf das equine Immunsystem. Ein signifikanter Einfluss der Einstreu auf die Mediumkontrollen konnte nicht

## Diskussion

---

festgestellt werden. In Bestätigung der Arbeitshypothese ließ erst die Zugabe von Noxen einen von dem verwendeten Einstreumaterial abhängigen, statistisch nachweisbaren Effekt auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis der Pferde zu. Nach 7-wöchiger Verwendung der Einstreu Späne konnten sowohl nach Konfrontation equiner PBMC mit LPS ( $p=0,02$ ) als auch mit Dexamethason ( $p=0,01$ ) schwach signifikante Anstiege der  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse induziert werden. Diese Polarisierung in Richtung eines  $T_H1$ -Zytokinprofils beruhte in beiden Fällen auf einer Abnahme der Anteile der  $T_H2$ -Zellen. Der externe Einfluss der Einstreu Späne scheint demnach die Bildung des  $T_H2$ -Zytokins IL-4 zugunsten einer  $T_H1$ -Immunantwort herabzusetzen. Diese Beobachtung geht mit der generellen, tierärztlichen Empfehlung konform, Pferde mit Symptomen einer COB zur Reduzierung der Staubexposition auf Späne anstatt auf Stroh aufzustallen.

Die Dissertation von FRANZ zeigte, dass sich das Zytokinprofil von aus COB-Patienten gewonnenen BALF-Zellen von einem zunächst  $T_H2$ -geprägtem Muster nach Therapie dieser Pferde in ein  $T_H1$ -geprägtes Profil wandelt. Das Verhältnis zwischen  $IFN-\gamma^+$ - und  $IL-4^+$ -Lymphozyten aus der BALF stieg bei den meisten Pferden posttherapeutisch signifikant an. Die therapeutischen Maßnahmen beinhalteten je nach Therapiegruppe entweder eine 7-tägige Applikation von Clenbuterol, Dembrexin und Dexamethason oder eine im 2-tägigen Abstand durchgeführte, ebenfalls insgesamt sieben Tage andauernde Laserakupunktur. Neben Inhalation mit Emser Sole wurde darüber hinaus das Haltungsmanagement sämtlicher therapierter Pferde verbessert (Aufstallung in gut belüfteten Boxen mit einem Späne/Torf-Gemisch, Fütterung von nassem Heu). Interessanterweise konnten keine statistischen Unterschiede zwischen den Therapiegruppen ermittelt werden (53). Die Veränderung des Zytokinmusters in Richtung eines  $T_H1$ -Zytokinprofils muss daher auf einem beiden Gruppen gemeinsamen Faktor beruhen. In Anbetracht der eigenen Ergebnisse scheint hierfür die Vermeidung staubreicher Futtermittel und Einstreumaterialien am wahrscheinlichsten zu sein. Das gängige Vorgehen in Studien, Pferde zur Provokation einer COB für mehrere Wochen in schlecht belüfteten, stroheingestreuten Ställen aufzustallen und ihnen Schimmelpilz-belastetes, trockenes Heu zu verfüttern, unterstützt diese Ansicht ebenso, wie die Tatsache, dass Weidehaltung zur Remission klinischer Symptome führt (37, 75, 141). Bereits Staubvermeidung durch Managementoptimierungen bewirkt bei COB-betroffenen Pferden eine Verbesserung der Klinik und auch der Lungenfunktion (37, 75, 170). Die Umstellung eines einzelnen Pferdes auf Späne und Heucobs führte trotz fortgesetzter Stroheinstreu und Heufütterung in benachbarten Boxen bereits innerhalb der ersten Woche zu signifikanten Verbesserungen der Atemwegsfunktionen. Diese konnten durch eine

## Diskussion

---

anschließende, vierwöchige Weidehaltung dieser Tiere weiter gesteigert werden (75). Zusammen mit der Beobachtung, dass eine orale Applikation von Prednisolon zu keinen weiteren Verbesserungen der Atemwegsfunktionen führte (75), werden hierdurch indirekt eigene Erkenntnisse eines positiven Einflusses einer Späne-basierten Einstreu auf das Immunsystem des Pferdes bestätigt.

Staub ist eine Sammelbezeichnung für in der Atmosphäre verteilte, feste Partikel, deren Zusammensetzung in Tierställen vor allem durch Quellen wie Futter, Fäkalien, Pilzen, Pollen, Insekten oder Mineralien bestimmt wird. An Staubpartikeln haften Bakterien, Pilze, Viren, Milben oder auch Protozoen, wodurch Staub eine Trägerfunktion zukommt (153). Nach Verwendung der Einstreu Späne ist nicht nur die totale Partikelkonzentration, sondern auch die Fraktion lungengängiger Partikel im Vergleich zur Einstreu Stroh deutlich reduziert (s. Tab. 3 in Kap. II 3.2.1). WOODS *et al.* (1993) konnten darüber hinaus eine signifikante Zunahme von Aeroallergenen (u. a. *Aspergillus fumigatus*) nach herkömmlicher Aufstallung (Stroh/Heu) im Vergleich zu einem staubarmen Haltungssystem (Späne/pelletierte Fütterung) feststellen. Zudem belegen Messungen dieser Arbeitsgruppe, die mittels eines „Personal Samplers“ tiergebunden erfolgten, dass die Partikelkonzentrationen am Tier nach Verwendung von Stroh um ein Vielfaches (Gesamtpartikel 7-fach, lungengängige Partikel 21-fach) höher liegen als bei stationären Messungen der Stallluft. Partikelkonzentrationen nach Verwendung von Spänen sind hingegen sowohl am Tier als auch im Stall vergleichbar und im Vergleich zu Stroh insgesamt vermindert. Tatsächlich werden bei direkten Messungen am Tier nach staubarmer Haltung lediglich 3 % des nach herkömmlicher Aufstallung gemessenen Staubgehaltes erreicht. Dies trifft sowohl für den Gesamtgehalt als auch für die lungengängige Fraktion des Staubes zu (191). Ergebnisse des Projektes, welches zur Untersuchung der Luftqualität zeitgleich zu den eigenen Beprobungen auf dem Gelände des vTI in Braunschweig durchgeführt wurde, bestätigen vorherige Untersuchungen. In einem Zeitraum von jeweils sieben Wochen betrug der durchschnittliche Gehalt an Partikeln  $<10 \mu\text{m}$  nach Verwendung von Stroh  $54,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und unterschied sich damit signifikant von der Partikelkonzentration nach Verwendung von Spänen ( $34,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Die Verwendung von Strohpellets führte zu den niedrigsten, durchschnittlichen Partikelkonzentrationen ( $24,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (177).

Neben Endotoxinen sind auch Pilzsporen im Staub nachweisbar. Pilzsporen sind wichtige Toxinträger für Schimmelpilzarten wie *Aspergillus fumigatus* oder *Aspergillus niger* (124). Da sowohl Pilzsporen als auch Endotoxine zu den lungengängigen Bestandteilen des Staubes ( $<5 \mu\text{m}$ ) zählen können, sind nicht nur toxikologische Belastungen der Atemwege,

## Diskussion

---

sondern auch immunmodulatorische Effekte dieser Stoffe denkbar (153). Vor dem Hintergrund höherer Partikelkonzentrationen durch Stroh bleibt zu vermuten, dass die in dieser Arbeit untersuchten Pferde nach Verwendung dieses Einstreumaterials im Vergleich zu Spänen stärkeren Belastungen von immunmodulatorischen Substanzen ausgesetzt wurden. Resultat wäre demnach ein  $T_H2$ -geprägtes Zytokinprofil der Tiere.

Obwohl die Verwendung von Strohpellets in den Braunschweiger Untersuchungen die niedrigsten Partikelkonzentrationen hervorrief, konnte in den eigenen Untersuchungen zwar ein schwach signifikanter Unterschied des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses zu Spänen, aber nicht zu Stroh beobachtet werden. Ein mikrobiologisches Monitoring der Einstreu nach sieben Wochen ergab, dass Späne im Vergleich zu den beiden anderen Einstreumaterialien nicht nur die niedrigste Gesamtkeimzahl ( $1,1 \times 10^9$  KbE/g Späne versus  $5,9 \times 10^9$  KbE/g Stroh und  $3,0 \times 10^9$  KbE/g Strohpellets), sondern auch mit Abstand den geringsten Gehalt an Schimmelpilzen ( $2,9 \times 10^3$  KbE/g Späne versus  $1,1 \times 10^5$  KbE/g Stroh und  $6,1 \times 10^5$  KbE/g Strohpellets) aufwies (177). Die qualitative Zusammensetzung der lungengängigen Staubpartikel scheint demnach eine bedeutendere Rolle hinsichtlich des Einflusses der Einstreu auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis zu spielen als die quantitative Aufnahme von Staubpartikeln bei der Respiration. In Bestätigung dieser Annahme weist die BALF gesunder Pferde nach 45-tägiger Verwendung von Spänen verglichen mit Stroh eine höhere Gesamtpartikelkonzentration auf. Trotzdem wurde nach Verwendung von Stroh neben einem höheren bakteriellen Gehalt auch ein höherer mykologischer Gehalt (Schimmelpilzsporen, vor allem *Aspergillus spp.*) in der BALF festgestellt. Da der lungengängige Anteil beider Einstreuarten mindestens 90 % der gesamten gemessenen Partikel betrug, wurde ein Einfluss der inhalierten Partikel auf die Zellzusammensetzung der BALF nicht ausgeschlossen (50).

Es bleibt außerdem zu bedenken, dass nicht nur die Zusammensetzung der Mikroflora sich zwischen Substraten erheblich unterscheiden kann. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Quantität der Bildung von Toxinen durch Bakterien oder Schimmelpilze vom dem verfügbaren Substrat beeinflusst wird.

Untersuchungen von ALENIUS *et al.* (2009) zeigten, dass Hausstaub bei Mäusen, denen über einen Zeitraum von drei Wochen zweimal wöchentlich Staubsuspensionen inhalativ verabreicht wurden, eine  $T_H2$ -Immunantwort auslöste. Inhalation von Stallstaub rief hingegen eine  $T_H1$ -Immunität hervor. Analog hierzu führten humane, dendritische Zellen nach Exposition zu Stall- bzw. Hausstaub *in vitro* zur Generierung von  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Zellen. Eine Analyse der beiden Staubarten ergab, dass Stallstaub trotz eines ähnlichen Keim- und LPS-Gehaltes eine wesentlich höhere bakterielle Vielfalt als Hausstaub besaß. Das daraus

resultierende größere Angebot an antigenen Komponenten stimuliere laut Autoren dendritische Zellen zur Ausbildung einer  $T_H1$ -Immunität (4). Eine hohe bakterielle Diversität des Stallstaubes, dem die getesteten Pferde exponiert waren, sowie ein daraus resultierendes  $T_H1$ -Zytokinprofil könnten somit auch für die eigenen Untersuchungen zu erwarten sein. Demnach müssten Späne eine höhere mikrobielle Vielfalt als Stroh und Strohpellets aufweisen, um den festgestellten, signifikanten Anstieg des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses hervorrufen zu können. Genaue Analysen der mikrobiellen Staubzusammensetzung wurden in der aktuellen Studie nicht vorgenommen. Die von ALENIUS *et al.* (2009) analysierten Stäube basierten allerdings auf Proben, die sich in entsprechenden Gebäuden von etwa zehn Jahren angesammelt haben (4). Diese Art von Stallstäuben, welche sicherlich auch in Scheunen von Pferdeställen existieren, ist jedoch im Vergleich zu jenen Staubpartikeln im direkten Einatembereich vermutlich für die inhalative Belastung des Respirationstraktes von Pferden weniger relevant. Darüber hinaus lassen auch tierartspezifische Differenzen eine Übertragung der Studie auf das Pferd fraglich erscheinen. Neben einer in der murinen BALF festgestellten Eosinophilie als Hinweis auf eine  $T_H2$ -geprägte Immunantwort interpretierten ALENIUS *et al.* (2009) eine durch Stallstaub induzierte Neutrophilie und Lymphozytose in der BALF als präventive Maßnahme des Körpers gegen eine Allergieentwicklung. Beim Pferd ist eine Eosinophilie in der BALF jedoch nicht mit einer erhöhten IL-4-Transkription verbunden (139). Stattdessen ist die akute Phase der COB sogar von einer massiven Neutrophilie in der BALF begleitet, ohne jedoch streng mit der Ausbildung einer  $T_H1$ -Immunantwort verknüpft zu sein (s. Kap. II 2.1).

In der vorliegenden Arbeit riefen nach Späne-basierter Einstreu LPS und Dexamethason, nicht aber die Mykotoxine Gliotoxin und Patulin eine Verschiebung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses in Richtung einer  $T_H1$ -Immunantwort hervor. Obwohl in der eigenen Arbeit nur die Provokation mit Gliotoxin nachweislich das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis verminderte, ist nicht auszuschließen, dass die Konfrontation mit Mykotoxinen *in vitro* den  $T_H1$ -fördernden Effekt von Spänen im Nachweissystem überdeckt hat.

### 3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, *in vitro* eine Bedingung zu finden, die das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis beim Einzeltier repräsentativ widerspiegelt. Es sollte einerseits anhand einer Einzelblutprobe eine möglichst genaue Aussage über die Immunlage von Pferden getroffen und andererseits ein potentieller Einfluss eines exemplarisch gewählten externen Umweltfaktors auf das equine Immunsystem nachgewiesen werden. Da der Zytokingehalt im Blut von Pferden als zu gering

## Diskussion

---

eingeschätzt wurde, um individuelle Unterschiede in den  $T_H1/T_H2$ -Verhältnissen nachweisen zu können, wurde davon ausgegangen, dass equine Lymphozyten erst nach Konfrontation mit einem immunmodulatorisch wirkenden Stoff ein spezifisches Zytokinprofil ausbilden. In Bestätigung dieser Annahme konnte erst die Zugabe von Noxen einen statistisch nachweisbaren Effekt des Einstreumaterials auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis der Pferde hervorheben.

Dexamethason, gefolgt von LPS, scheint hierfür von den getesteten Noxen am besten geeignet zu sein. Gliotoxin und Patulin besitzen in den getesteten Konzentrationen eine zu hohe Zytotoxizität für equine PBMC, so dass sich ihr Einsatz zur Erfassung experimenteller Einflüsse im Feld weniger eignet. Dennoch sollte bei der Wahl der Noxen für die *In vitro*-Provokation deren immunmodulatorisches Potential berücksichtigt werden. Wird z. B. im Rahmen einer Studie die Prädisposition von Pferden zur COB getestet, sollten hierfür auch die Mykotoxine in Betracht gezogen werden. Das Ausmaß der induzierten  $T_H2$ -Antwort könnte dann als Maß für eine schon bestehende Sensibilisierung gegenüber Mykotoxinen dienen und stünde möglicherweise mit der individuellen Entwicklung einer COB in Zusammenhang.

Generelle Einflüsse auf das equine Immunsystem lassen sich durch Analysen von Gruppendynamiken mit Hilfe der *In vitro*-Provokation bestimmen. Um die Aussagekraft dieser Methode auf das Einzeltier zu erweitern, sind jedoch engmaschige, kinetische Untersuchungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit einzelner  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse zwingend erforderlich. Dabei sollten Grenzwerte für  $T_H1$ - und  $T_H2$ -geprägte Zytokinprofile bestimmt werden, um den Einsatz als praktikables Diagnostikum für spezifische Immunantworten beim Pferd zu sichern. Vergleichsstudien an Patientenmaterial vor, während und nach Klinikaufenthalten unterstützten eine solche Evaluierung und könnten darüber hinaus Erkenntnisse über die Anpassungsfähigkeit des Immunsystems von Pferden vermitteln.

Die quantitative Bestimmung tatsächlich vorhandener Zytokine mit Hilfe der *In vitro*-Provokation stellt eine methodische Erleichterung dar. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung können Erkenntnisse der immunologischen Reaktionen bei Pferden künftig nicht nur basierend auf Erforschung lokaler Zellpopulationen (z. B. Gewinnung der BALF zur Erforschung der COB), sondern auch aus Blutuntersuchungen gewonnen werden.

Den Schlussfolgerungen von CLEMENTS *et al.* (2007), dass die Wahl des Raufutters der Wahl der Einstreu zur Reduzierung der lungengängigen Staubpartikelfraktion (Reduktion um 60-70 % bei Umstellung von Heu auf Heulage versus Reduktion um 23-32 % bei Umstellung von Stroh auf Späne) im Hinblick auf die respiratorische Gesundheit vorzuziehen

## Diskussion

---

ist (30), kann basierend auf den eigenen Ergebnissen nur bedingt zugestimmt werden. Die Wahl der Einstreu dient nicht nur der Vermeidung lungengängiger Staubpartikel, sondern fördert darüber hinaus nachweislich Zytokinprofile, die mit der Heilung chronischer Atemwegserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Ob Weidehaltung oder die Gabe staubfreien Raufutters zu einer weiteren Steigerung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses führt, müsste in zukünftigen Studien geklärt werden. Aus den eigenen Untersuchungen lässt sich folgern, dass hierfür die *In vitro*-Provokation mit Dexamethason in einer Konzentration von 0,04 bis 4 ng/ml, gefolgt von der *In vitro*-Provokation mit LPS in einer Konzentration von 10 bis 250 ng/ml am besten geeignet sein dürfte.

# VI Zusammenfassung

Das  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewicht ist entscheidend an der Entwicklung einer adäquaten Immunantwort beteiligt. Eine Störung dieses Gleichgewichts ist auch beim Pferd mit der Genese von Erkrankungen wie z. B. dem Sommerekzem verbunden, dessen symptomatische Phase von einer überschießenden  $T_H2$ -Immunantwort begleitet wird. Die Vermutung, dass auch die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes auf einer vermehrten Bildung von  $T_H2$ -Zytokinen beruht, wird kontrovers diskutiert. Die Aufklärung der Pathogenese dieser bedeutenden Pferdekrankheit wird dadurch erschwert, dass bislang ein einheitlich einsetzbares System zur Bestimmung des  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewichts fehlt.

Die vorliegende Arbeit folgte der Hypothese, dass es durch *In vitro*-Provokation equiner Lymphozyten mit verschiedenen Noxen und anschließender durchflusszytometrischer Quantifizierung von Zytokin-bildenden T-Zellpopulationen möglich ist, eine möglichst genaue Aussage über das individuelle  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis und damit über die Immunlage von Pferden anhand einer Blutprobe treffen zu können.

Als Noxen fanden neben den Mykotoxinen Gliotoxin und Patulin auch LPS und Dexamethason Anwendung. Jede einzelne Noxe wurde als Prototyp für potentiell immunmodulatorisch wirkende, exogene Einflussfaktoren auf das equine Immunsystem ausgewählt. Mittels Dichtezentrifugation (Ficoll-Paque<sup>®</sup>) isolierte, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden mit den jeweilig eingesetzten Noxen für 20 Stunden und für weitere vier Stunden zusätzlich mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Ionomycin und Brefeldin A inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung von  $CD4^+/IFN-\gamma^+$ - ( $T_H1$ -) und von  $IL-4^+$ - ( $T_H2$ -) Zellen, deren Anteile die Grundlage für die Berechnung des  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisses bildeten.

In Vorversuchen an drei klinisch gesunden, adulten Pferden wurden zunächst Konzentrationsbereiche ermittelt, in denen Noxen-spezifische, immunmodulatorische Effekte auf die  $T_H1/T_H2$ -Verhältnisse der Pferde am deutlichsten in Erscheinung traten. Dies war für Gliotoxin ein Bereich von 11,1 bis 25 ng/ml, für Patulin ein Bereich von 62,5 bis 250 ng/ml, für LPS ein Bereich von 10 bis 250 ng/ml und für Dexamethason ein Bereich von 0,04 bis 4 ng/ml. In den Hauptversuchen wurde dieses Testsystem angewandt, um potentielle Einflüsse eines exemplarisch gewählten, externen Umweltfaktors (unterschiedliche Einstreumaterialien) auf das  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis im equinen Immunsystem nachzuweisen. Hierfür wurde eine Gruppe von sechs gesunden Warmblutstuten in einem Alter von zwei Jahren beprobt, welche in einer Mehrraum-Auslaufhaltung gehalten wurden. Die Einstreu des

## Zusammenfassung

---

Ruhebereiches wurde in einem Abstand von sieben Wochen von Weizenstroh zu Holzspänen und anschließend zu Strohpellets gewechselt. Jeweils wenige Tage vor Ende einer jeden Periode erfolgte die Blutentnahme.

Jede der verwendeten Noxen besaß *in vitro* immunmodulatorische Fähigkeiten. Die *In vitro*-Provokation mit Gliotoxin rief eine auf Suppression der T<sub>H</sub>1-Zellen basierende Polarisierung equiner PBMC in Richtung eines T<sub>H</sub>2-Zytokinprofils hervor, während die *In vitro*-Provokation mit Patulin lediglich in den Vorversuchen eine Tendenz in diese Richtung zeigte. Die Inhibition der equinen T<sub>H</sub>1-Zellen erfolgte durch beide getesteten Toxine in bereits zytotoxisch wirkenden Konzentrationsbereichen. Die Empfänglichkeit equiner PBMC für immunmodulatorische Effekte von LPS *in vitro* schien unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Lediglich in Einzelfällen konnte ein auf einer Reduktion der T<sub>H</sub>1-Zellen beruhender Abfall des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses beobachtet werden, während T<sub>H</sub>2-Zellen in der Regel durch LPS unbeeinflusst blieben. *In vitro*-Provokation mit Dexamethason führte zu einer gleichmäßigen Abnahme sowohl von Anteilen der T<sub>H</sub>1- als auch der T<sub>H</sub>2-Zellen, ohne Auswirkungen auf das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis zu besitzen.

Mit Hilfe der *In vitro*-Provokation konnte während der Hauptversuche gezeigt werden, dass die Art des verwendeten Einstreumaterials generell das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis von Pferden beeinflussen kann. Für den Nachweis eignet sich insbesondere die *In vitro*-Konfrontation mit Dexamethason, gefolgt von LPS. Nach Verwendung von Spänen konnten schwach signifikante Anstiege der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse festgestellt werden, die auf einer Abnahme der T<sub>H</sub>2-Zellen beruhten. Gliotoxin und Patulin besaßen hingegen in den getesteten Konzentrationen eine zu hohe Zytotoxizität für die equinen PBMC der 2-jährigen Stuten.

Bestimmungen equiner T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse sind anhand einer Blutprobe mit Hilfe des angewandten Testsystems möglich. Engmaschige, kinetische Untersuchungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit individueller T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisse sind jedoch zwingend erforderlich, um die Eignung der Methode als praktikables Diagnostikum zu sichern. Durch Analyse von Gruppendynamiken konnte in dieser Arbeit ein positiver Einfluss der Einstreu Späne zugunsten eines T<sub>H</sub>1-geprägten Zytokinprofils bei Pferden gezeigt werden. Die Wahl der Einstreu dient demnach nicht nur der Vermeidung lungengängiger Staubpartikel, sondern fördert darüber hinaus T<sub>H</sub>1-Zytokinprofile, die mit der Heilung chronischer Atemwegserkrankungen in Verbindung gebracht werden.

# VII Summary

A balanced activity of  $T_H1$  and  $T_H2$  committed lymphocytes is essential for the development of adequate immune responses. In turn, a  $T_H1/T_H2$  dysbalance forms the centre of the pathogenesis of several equine diseases, as the symptomatic stage of the insect bite hypersensitivity (sweet itch) which is accompanied by an excessive  $T_H2$  response. The presumption of an increased production of  $T_H2$  cytokines during the course of recurrent airway obstruction (RAO) of the horse is discussed controversially. Standardised systems for determination of equine  $T_H1/T_H2$  ratios are currently lacking, a major obstacle for unveiling the pathologic processes of this common equine disease.

This doctoral thesis challenged the hypothesis, that provocation *in vitro* of equine peripheral blood lymphocytes with different substances allows evaluating the individual  $T_H1/T_H2$  balance and thus gives insights into the immune status of a single horse.

Two mycotoxins, Gliotoxin and Patulin, as well as LPS and Dexamethasone were used. Each substance represents environmental or iatrogenic factors that horses are exposed to and that are potentially capable of modulating the equine immune response. Density gradient centrifugation was used to obtain peripheral mononuclear blood cells (PBMC). Cells were incubated with each of the four substances for 20 hours, followed by another four hours of incubation with Phorbol-12-myristate-acetate (PMA), Ionomycin and Brefeldin A. Flow cytometric analysis was performed to analyse  $CD4^+/IFN-\gamma^+$  ( $T_H1$ ) and  $IL-4^+$  ( $T_H2$ ) populations. This single cell analysis formed the basis for the calculation of  $T_H1/T_H2$  ratios.

In the first part of the investigation, blood samples of three clinically healthy horses were used to determine substance-specific concentration ranges for the modulation of the  $T_H1/T_H2$  balance. Ranges established were 11.1-25 ng/ml for Gliotoxin, 62.5-250 ng/ml for Patulin, 10-250 ng/ml for LPS, and 0.04-4 ng/ml for Dexamethason. In a second series of experiments this testing system was applied to unveil potential influences on the equine  $T_H1/T_H2$  balance of different bedding materials, an environmental variable of known impact on the clinical condition of RAO horses. For this experiment a group of six healthy, two year old warmblood mares was tested. Every seven weeks the bedding material was replaced (from straw to wood shavings to straw pellets). A blood sample was taken from each horse a few days before the end of these periods.

Each substance used in the experiments had an immune modulatory activity *in vitro*. Incubation with Gliotoxin induced a polarisation of equine PBMC towards a  $T_H2$  cytokine profile based on a suppression of  $T_H1$  cells. *In vitro*-provocation with Patulin showed a

## Summary

---

similar tendency in the first part of the investigation only. Inhibition of T<sub>H</sub>1 cells by both mycotoxins was accompanied by cytotoxic effects. The susceptibility of equine PBMC to LPS varied individually. A reduction of the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 ratio based on a decline of T<sub>H</sub>1 cells was observed in some cases. T<sub>H</sub>2 cells remained unaffected by LPS. *In vitro*-provocation with Dexamethasone suppressed T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells equally leaving the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 ratio unaffected.

The second series of experiments clearly showed that the *in vitro*-provocation of equine PBMC is suitable to prove an influence of bedding material on the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 balance in horses. This notion particularly holds after use of Dexamethasone and, to a lesser degree, after use of LPS. Using wood shavings for bedding caused a decrease of T<sub>H</sub>2 cells resulting in a slightly significant increase of the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 ratio. Gliotoxin and Patulin exerted a pronounced cytotoxic effect in the tested concentrations and rendered these substances less suitable for this kind of studies.

Though individual differences were observed, equine T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 ratios can be detected by taking blood samples and applying the test system developed in this study. Kinetic investigations are mandatory for checking the reproducibility of single T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 ratios when the method is applied as a diagnostic tool. However, the system of *in vitro*-provocation and subsequent flow cytometry analysis will be of great use for experimental purposes. This thesis demonstrates that, when analysing dynamics within an animal population, an impact of wood shavings as a bedding material on the equine T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 balance becomes apparent. An appropriate choice of bedding material not only leads to a reduction of respirable dust particles but also seems to boost T<sub>H</sub>1 cytokine profiles which relate to the improvement of chronic respiratory diseases.

## VIII Literaturverzeichnis

1. **ADKINS, B.** (1999)  
T-cell function in newborn mice and humans.  
*Immunol Today* **20**:330-5
2. **AINSWORTH, D. M.; GRUNIG, G.; MATYCHAK, M. B.; YOUNG, J.; WAGNER, B.;  
ERB, H. N.; ANTCZAK, D. F.** (2003)  
Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and  
IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells.  
*Vet Immunol Immunopathol* **96**:83-91
3. **AKENS, M. K.; HOLZNAGEL, E.; FRANCHINI M.; BRACHER, V.** (1997)  
Comparative analysis of equine lymphocyte subsets in whole blood and gradient-  
purified samples.  
*Vet Immunol Immunopathol* **58**:231-7
4. **ALENIUS, H.; PAKARINEN, J.; SARIS, O.; ANDERSSON, M. A.; LEINO, M.;  
SIROLA, K.; MAJURI, M. L.; NIEMELA, J.; MATIKAINEN, S.; WOLFF, H.; VON  
HERTZEN, L.; MAKELA, M.; HAAHTELA, T.; SALKINOJA-SALONEN, M.** (2009)  
Contrasting immunological effects of two disparate dusts - preliminary observations.  
*Int Arch Allergy Immunol* **149**:81-90
5. **ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T.** (2001)  
Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity.  
*J Endotoxin Res* **7**:167-202
6. **ANDERSON, B. H.; WATSON, D. L.; COLDITZ, I. G.** (1999)  
The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle.  
*Vet Res Commun* **23**:399-413
7. **ANDERSSON, J.; SJOBERG, O.; MOLLER, G.** (1972)  
Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides.  
*Eur J Immunol* **2**:349-53
8. **BASELGIA, S.; DOHERR, M. G.; MELLOR, P.; TORSTEINSDOTTIR, S.; JERMANN, T.;  
ZURBRIGGEN, A.; JUNGI, T.; MARTI, E.** (2006)  
Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite  
hypersensitivity in horses.  
*Equine Vet J* **38**:40-6

9. **BECCI, P. J.; HESS, F. G.; JOHNSON, W. D.; GALLO, M. A.; BABISH, J. G.; DAILEY, R. E.; PARENT, R. A. (1981)**  
Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat.  
*J Appl Toxicol* **1**:256-61
10. **BENDALI-AHCÈNE, S.; MONIER, J. C.; FONTAINE, M.; GREENLAND, T.; CADORÉ, J. L. (1995)**  
Flow cytometric analysis of blood lymphocyte phenotypes in horses infected with the equine infectious anemia virus.  
*Journal of Equine Veterinary Science* **15**:360-364
11. **BENNETT, J. W.; KLICH, M. (2003)**  
Mycotoxins.  
*Clin Microbiol Rev* **16**:497-516
12. **BERENDONK, M. (2000)**  
**zitiert nach FRANZ, M. (2006) (s. 53)**  
Untersuchungen verschiedener Lymphozytensubpopulationen, entsprechender regulatorischer Zytokine und Immunglobulinisotypen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB).  
*Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.*
13. **BERNDT, A.; DERKSEN, F. J.; EDWARD ROBINSON, N. (2010)**  
Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture.  
*Vet J* **183**:54-7
14. **BIGBY, M.; WANG, P.; FIERRO, J. F.; SY, M. S. (1990)**  
Phorbol myristate acetate-induced down-modulation of CD4 is dependent on calmodulin and intracellular calcium.  
*J Immunol* **144**:3111-6
15. **BJÖRNSDÓTTIR, S.; SIGVALDADÓTTIR, J.; BROSTRÖM, H.; LANGVAD, B.; SIGURDSSON, A. (2006)**  
Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors.  
*Acta Vet Scand* **48**:3

16. **BLOTTA, M. H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. (1997)**  
Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes.  
*J Immunol* **158**:5589-95
17. **BOLLAG, W. (1949)**  
Die Wirkung von Patulin auf das myelo- und lymphopoetische System der Maus.  
*Experientia* **5**:447-448
18. **BOYD, N. K.; COHEN, N. D.; LIM, W. S.; MARTENS, R. J.; CHAFFIN, M. K.; BALL, J. M. (2003)**  
Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life.  
*Vet Immunol Immunopathol* **92**:75-85
19. **BRAITHWAITE, A. W.; EICHNER, R. D.; WARING, P.; MULLBACHER, A. (1987)**  
The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation.  
*Mol Immunol* **24**:47-55
20. **BRAUN, C. M.; HUANG, S. K.; BASHIAN, G. G.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M.; ESSAYAN, D. M. (1997)**  
Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses.  
*J Allergy Clin Immunol* **100**:400-7
21. **BRAVERMAN, Y.; UNGAR-WARON, H.; FRITH, K.; ADLER, H.; DANIELI, Y.; BAKER, K. P.; QUINN, P. J. (1983)**  
Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel.  
*Vet Rec* **112**:521-4
22. **BREATHNACH, C. C.; STURGILL-WRIGHT, T.; STILTNER, J. L.; ADAMS, A. A.; LUNN, D. P.; HOROHOV, D. W. (2006)**  
Foals are interferon gamma-deficient at birth.  
*Vet Immunol Immunopathol* **112**:199-209
23. **BRINKMANN, V.; KRISTOFIC, C. (1995)**  
Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4<sup>+</sup> effector T cells generated from CD45RO<sup>-</sup> and CD45RO<sup>+</sup> subsets.  
*J Immunol* **155**:3322-8
24. **BROSTRÖM, H.; LARSSON, A.; TROEDSSON, M. (1987)**  
Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: an epidemiological study.  
*Equine Vet J* **19**:229-36

25. **BULLIDO, R.; GOMEZ DEL MORAL, M.; DOMENECH, N.; ALONSO, F.; EZQUERRA, A.; DOMINGUEZ, J.** (1997)  
Monoclonal antibodies to a high molecular weight isoform of porcine CD45: biochemical and tissue distribution analyses.  
*Vet Immunol Immunopathol* **56**:151-62
26. **CARPENTER, G. A.** (1986)  
Dust in livestock buildings - Review of some aspects.  
*J agric Engng Res* **33**:227-241
27. **CASTRO, A.; BEMER, V.; NOBREGA, A.; COUTINHO, A.; TRUFFA-BACHI, P.** (1998)  
Administration to mouse of endotoxin from gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes.  
*Eur J Immunol* **28**:488-95
28. **CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; ; GOLENBOCK, D. W.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F.** (1999)  
Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction.  
*J Biol Chem* **274**:10689-92
29. **CIEGLER, A.; BECKWITH, A. C.; JACKSON, L. K.** (1976)  
Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine.  
*Appl Environ Microbiol* **31**:664-7
30. **CLEMENTS, J. M.; PIRIE, R. S.** (2007)  
Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems.  
*Res Vet Sci* **83**:256-62
31. **CORDEAU, M. E.; JOUBERT, P.; DEWACHI, O.; HAMID, Q.; LAVOIE, J. P.** (2004)  
IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves.  
*Vet Immunol Immunopathol* **97**:87-96
32. **CORNELISSE, C. J.; ROBINSON, N. E.; BERNEY, C. E.; KOBE, C. A.; BORUTA, D. T.; DERKSEN, F. J.** (2004)  
Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction.  
*Equine Vet J* **36**:426-30

33. **CORTHAY, A.** (2009)  
How do regulatory T cells work?  
*Scand J Immunol* **70**:326-36
34. **COUROUCE-MALBLANC, A.; FORTIER, G.; PRONOST, S.; SILIART, B.; BRACHET, G.** (2008)  
Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses.  
*Vet J* **175**:227-33
35. **DAYNES, R. A.; ARANEO, B. A.** (1989)  
Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4.  
*Eur J Immunol* **19**:2319-25
36. **DEKRUYFF, R. H.; FANG, Y.; UMETSU, D. T.** (1998)  
Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes by inhibiting IL-12 production.  
*J Immunol* **160**:2231-7
37. **DELUCA, L.; ERB, H. N.; YOUNG, J. C.; PERKINS, G. A.; AINSWORTH, D. M.** (2008)  
The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction.  
*J Vet Intern Med* **22**:427-35
38. **DENTENER, M. A.; BAZIL, V.; VON ASMUTH, E. J.; CESKA, M.; BUURMAN, W. A.** (1993)  
Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages.  
*J Immunol* **150**:2885-91
39. **DICKENS, F.; JONES, H. E.** (1961)  
Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances.  
*Br J Cancer* **15**:85-100
40. **DOHMANN, K.; WAGNER, B.; HOROHOV, D. W.; LEIBOLD, W.** (2000)  
Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4.  
*Vet Immunol Immunopathol* **77**:243-56

41. **DOS SANTOS, V. M.; DORNER, J. W.; CARREIRA, F.** (2003)  
Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage.  
*Mycopathologia* **156**:133-8
42. **EDER, C.; CRAMERI, R.; MAYER, C.; EICHER, R.; STRAUB, R.; GERBER, H.; LAZARY, S.; MARTI, E.** (2000)  
Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis.  
*Vet Immunol Immunopathol* **73**:241-53
43. **EICHNER, R. D.; AL SALAMI, M.; WOOD, P. R.; MULLBACHER, A.** (1986)  
The effect of gliotoxin upon macrophage function.  
*Int J Immunopharmacol* **8**:789-97
44. **EICHNER, R. D.; WARING, P.; GEUE, A. M.; BRAITHWAITE, A. W.; MULLBACHER, A.** (1988)  
Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA.  
*J Biol Chem* **263**:3772-7
45. **EISENBARTH, S. C.; PIGGOTT, D. A.; HULEATT, J. W.; VISINTIN, I.; HERRICK, C. A.; BOTTOMLY, K.** (2002)  
Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen.  
*J Exp Med* **196**:1645-51
46. **ENOMOTO, H.; YOUSEFI, S.; VAZIRI, N.; KHONSARI, S.; OCARIZ, J.; DELAVARIAN, M. G.; CESARIO, T.** (1998)  
The effect of calcium-related factors on the predominance of IFN-gamma or interleukin-4 in cultured mononuclear cells.  
*J Interferon Cytokine Res* **18**:841-50
47. **ESCOULA, L.; MORE, J.; BARADAT, C.** (1977).  
The toxins by *Byssochlamys nivea* Westling. I. Acute toxicity of patulin in adult rats and mice.  
*Ann Rech Vet* **8**:41-9
48. **ESCOULA, L.; THOMSEN, M.; BOURDIOL, D.; PIPY, B.; PEURIERE, S.; ROUBINET, F.** (1988)  
Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits.  
*Int J Immunopharmacol* **10**:983-9

49. **FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D.** (1993)  
The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.  
*Annu Rev Immunol* **11**:571-611
50. **FERRO, E.; FERRUCCI, F.; SALIMEI, E.; ANTONIN, M.; CODAZZA, D.; CANIATTI, M.** (2000)  
Relationship between the conditions of lower airways in healthy horses, environmental factors and air quality in stables.  
*Pferdeheilkunde* **16**:579-586
51. **FISCHER, G.; MÜLLER, T.; SCHWALBE, R.; OSTROWSKI, R.; DOTT, W.** (2000)  
Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste.  
*Int J Hyg Environ Health* **203**:105-16
52. **FRANCHIMONT, D.; LOUIS, E.; DEWE, W.; MARTENS, H.; VRINDTS-GEVAERT, Y.; DE GROOTE, D.; BELAICHE, J.; GEENEN, V.** (1998)  
Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures.  
*Regul Pept* **73**:59-65
53. **FRANZ, M.** (2006)  
Untersuchungen zu leukozytären Oberflächenantigenen und der Bildung von IFN-Gamma und IL-4 bei Zellen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Pferden mit COB;  
*Gießen, Justus-Liebig-Universität, vet. med. Diss.*
54. **FREY, H.-H.; LÖSCHER, W.** (2002)  
Glucocorticoide  
*In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Auflage, S.322ff; Enke Verlag, Stuttgart*
55. **FRUCHT, D. M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J. J.; KOYASU, S.** (2001)  
IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge.  
*Trends Immunol* **22**:556-60

56. **GARSSEN, J.; VANDEBRIEL, R. J.; DE GRUIJL, F. R.; WOLVERS, D. A.; VAN DIJK, M.; FLUITMAN, A.; VAN LOVEREN, H.** (1999)  
UVB exposure-induced systemic modulation of Th1- and Th2-mediated immune responses.  
*Immunology* **97**:506-14
57. **GEREDA, J. E.; LEUNG, D. Y.; THATAYATIKOM, A.; STREIB, J. E.; PRICE, M. R.; KLINNERT, M. D.; LIU, A. H.** (2000)  
Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma.  
*Lancet* **355**:1680-3
58. **GIGUÈRE, S.; VIEL, L.; LEE, E.; MACKAY, R. J.; HERNANDEZ, J.; FRANCHINI, M.** (2002)  
Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate.  
*Vet Immunol Immunopathol* **85**:147-58
59. **GILGER, B. C.; MALOK, E.; CUTTER, K. V.; STEWART, T.; HOROHOV, D. W.; ALLEN, J. B.** (1999)  
Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis.  
*Vet Immunol Immunopathol* **71**:17-28
60. **GLISTER, G. A.; WILLIAMS, T. I.** (1944)  
Production of Gliotoxin by *Aspergillus fumigatus* mut. *helvola* Yuill.  
*Nature* **153**:651
61. **GRÄBSCH, C.; WICHMANN, G.; LOFFHAGEN, N.; HERBARTH, O.; MÜLLER, A.** (2006)  
Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*.  
*Environ Toxicol* **21**:111-7
62. **GUTMANN, S.; ZAWATZKY, R.; MÜLLER, M.** (2005)  
Characterisation and quantification of equine interferon gamma.  
*Vet Immunol Immunopathol* **104**:105-15
63. **HALLDÓRDSÓTTIR, S.; LARSEN, H. J.** (1991)  
An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway.  
*Equine Vet J* **23**:296-9

64. **HALLIWELL, R. E.; MCGORUM, B. C.; IRVING, P.; DIXON, P. M.** (1993)  
Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease.  
*Vet Immunol Immunopathol* **38**:201-15
65. **HAMZA, E.; DOHERR, M. G.; BERTONI, G.; JUNGI, T. W.; MARTI, E.** (2007)  
Modulation of allergy incidence in icelandic horses is associated with a change in IL-4-producing T cells.  
*Int Arch Allergy Immunol* **144**:325-37
66. **HAMZA, E.; WAGNER, B.; JUNGI, T. W.; MIRKOVITCH, J.; MARTI, E.** (2008)  
Reduced incidence of insect-bite hypersensitivity in Icelandic horses is associated with a down-regulation of interleukin-4 by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ 1.  
*Vet Immunol Immunopathol* **122**:65-75
67. **HEUMANN, D.; ROGER, T.** (2002)  
Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria.  
*Clin Chim Acta* **323**:59-72
68. **HINES, S. A.; STONE, D. M.; HINES, M. T.; ALPERIN, D. C.; KNOWLES, D. P.; NORTON, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C.** (2003)  
Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.  
*Clin Diagn Lab Immunol* **10**:208-15
69. **HOROHOV, D. W.** (2000)  
Equine T-cell cytokines. Protection and pathology.  
*Vet Clin North Am Equine Pract* **16**:1-14
70. **HOROHOV, D. W.; BEADLE, R. E.; MOUCH, S.; POURCIAU, S. S.** (2005)  
Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction.  
*Vet Immunol Immunopathol* **108**:237-45
71. **HU, X.; LI, W. P.; MENG, C.; IVASHKIV, L. B.** (2003)  
Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids.  
*J Immunol* **170**:4833-9

72. **HUANG, H.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; LAVOIE, J. P.** (2009)  
Cholinergic stimulation attenuates the IL-4 induced expression of E-selectin and vascular endothelial growth factor by equine pulmonary artery endothelial cells.  
*Vet Immunol Immunopathol* **132**:116-21
73. **HUANG, H.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; MORAN, K.; LAVOIE, J. P.** (2007)  
IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells.  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**:L1147-54
74. **JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; CRAWFORD, P. C.; CASTLEMAN, W. L.** (2007)  
Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction.  
*Clin Vaccine Immunol* **14**:669-77
75. **JACKSON, C. A.; BERNEY, C.; JEFCOAT, A. M.; ROBINSON, N. E.** (2000)  
Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves).  
*Equine Vet J* **32**:432-8
76. **JACKSON, K. A.; STOTT, J. L.; HOROHOV, D. W.; WATSON, J. L.** (2004)  
IL-4 induced CD23 (Fc<sub>ε</sub>RII) up-regulation in equine peripheral blood mononuclear cells and pulmonary alveolar macrophages.  
*Vet Immunol Immunopathol* **101**:243-50
77. **JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H.; AASTED, B.** (2007)  
The cytokine response of circulating peripheral blood mononuclear cells is changed after intravenous injection of lipopolysaccharide in cattle.  
*Vet J* **174**:170-5
78. **JOHNSON, J. R.; BRUCE, W. F.; JAMES, D. D.** (1943)  
Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocadium fimbriatum*. I. Production, physical and biological properties.  
*J Am Chem Soc* **65**:2005-2009
79. **JOHNSON, J. R.; KIDWAI, A. R.; WARNER, J. S.** (1953)  
Gliotoxin. XI. A related antibiotic from *Penicillium terlikowski*: Gliotoxin monoacetate.  
*J Am Chem Soc* **75**:2110-2112

80. **KAMPHUES, J.** (2005)  
A systemic approach to evaluate the hygienic quality of feedstuffs for horses.  
*Pferdeheilkunde* **21**:15-18
81. **KELLER, K. M.; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A.; RIBEIRO, J. M.; CAVAGLIERI, L. R.; PEREYRA, M. L.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A.** (2007)  
The mycobiota and toxicity of equine feeds.  
*Vet Res Commun* **31**:1037-45
82. **KIKU, Y.; KUSANO, K.; MIYAKE, H.; FUKUDA, S.; TAKAHASHI, J.; INOTSUME, M.; HIRANO, S.; YOSHIHARA, T.; TORIBIO, R. E.; OKADA, H.; YOSHINO, T. O.** (2003)  
Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse.  
*J Vet Med Sci* **65**:857-63
83. **KIRBY, G. W.; ROBINS, D. J.; SEFTON, M. A.; TALEKAR, R. R.** (1980)  
Biosynthesis of Bisdethiobis(methylthio)gliotoxin, a new metabolite of *Gliocladium deliquescens*.  
*J Chem Soc, Perkin Transactions 1*:119-121
84. **KLAUSNER, R. D.; DONALDSON, J. G.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.** (1992)  
Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure.  
*J Cell Biol* **116**:1071-80
85. **KLEIBER, C.; MCGORUM, B. C.; HOROHOV, D. W.; PIRIE, R. S.; ZURBRIGGEN, A.; STRAUB, R.** (2005)  
Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction.  
*Vet Immunol Immunopathol* **104**:91-7
86. **KROUWELS, F. H.; VAN DER HEIJDEN, J. F.; LUTTER, R.; VAN NEERVEN, R. J.; JANSEN, H. M.; OUT, T. A.** (1996)  
Glucocorticosteroids affect functions of airway- and blood-derived human T-cell clones, favoring the Th1 profile through two mechanisms.  
*Am J Respir Cell Mol Biol* **14**:388-97
87. **KRUMM, B.** (2006)  
Immunmodulation durch Mykotoxine;  
*Leipzig, Universität Leipzig, rer. nat. Diss.*

88. **KUPFAHL, C.; MICHALKA, A.; LASS-FLORL, C.; FISCHER, G.; HAASE, G.; RUPPERT, T.; GEGINAT, G.; HOF, H.** (2008)  
Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains.  
*Int J Med Microbiol* **298**:319-27
89. **KWEON, Y. O.; PAIK, Y. H.; SCHNABL, B.; QIAN, T.; LEMASTERS, J. J.; BRENNER, D. A.** (2003)  
Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells.  
*J Hepatol* **39**:38-46
90. **KYDD, J.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R.; BARBIS, D.; BUTCHER, G.; DAVIS, W.; DUFFUS, W. P.; EDINGTON, N.; GRÜNIG, G.; HOLMES, M. A.; LUNN, D. P.; MCCULLOCH, J.; O'BRIAN, A.; PERRYMAN, L.E.; TAVERNOR, A.; WILLIAMSON, S.; ZHANG, C.** (1994)  
Report of the first international workshop on equine leucocyte antigens, Cambridge, UK, July 1991.  
*Vet Immunol Immunopathol* **42**:3-60
91. **LANGE, S.** (2004)  
Untersuchung zur Vererbung des Sommerkzems beim Islandpferd.  
*Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.*
92. **LANGHOFF, E.; OLGAARD, K.; LADEFOGED, J.** (1987)  
The immunosuppressive potency in vitro of physiological and synthetic steroids on lymphocyte cultures.  
*Int J Immunopharmacol* **9**:469-73
93. **LARSEN, T. O.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. A.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.** (2007)  
Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*.  
*Med Mycol* **45**:225-32
94. **LAUW, F. N.; TEN HOVE, T.; DEKKERS, P. E.; DE JONGE, E.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN DER POLL, T.** (2000)  
Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin.  
*Infect Immun* **68**:1014-8

95. **LAVOIE, J. P.; MAGHNI, K.; DESNOYERS, M.; TAHA, R.; MARTIN, J. G.; HAMID, Q. A.** (2001)  
Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile.  
*Am J Respir Crit Care Med* **164**:1410-3
96. **LECLERE, M.; LEFEBVRE-LAVOIE, J.; BEAUCHAMP, G.; LAVOIE, J. P.** (2010)  
Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure.  
*Equine Vet J* **42**:316-321
97. **LEGUILLETTE, R.** (2003)  
Recurrent airway obstruction-heaves.  
*Vet Clin North Am Equine Pract* **19**:63-86
98. **LIEBERS, V.; RAULF-HEIMSOETH, M.; LINSEL, G.; GOLDSCHIED, N.; DUSER, M.; STUBEL, H.; BRUNING, T.** (2007)  
Evaluation of quantification methods of occupational endotoxin exposure.  
*J Toxicol Environ Health A* **70**:1798-805
99. **LITTLEWOOD, J. D.** (1998)  
Incidence of recurrent seasonal pruritus ('sweet itch') in British and German shire horses.  
*Vet Rec* **142**:66-7
100. **LIU, T.; NERREN, J.; LIU, M.; MARTENS, R.; COHEN, N.** (2009)  
Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals.  
*Vaccine* **27**:674-83
101. **LLEWELLYN, G. C.; MCCAY, J. A.; BROWN, R. D.; MUSGROVE, D. L.; BUTTERWORTH, L. F.; MUNSON, A. E.; WHITE, JR. K. L.** (1998)  
Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F<sub>1</sub> mice.  
*Food Chem Toxicol* **36**:1107-15
102. **LUFT, P.; OOSTINGH, G. J.; GRUIJTHULJSEN, Y.; HOREJS-HOECK, J.; LEHMANN, I.; DUSCHL, A.** (2008)  
Patulin influences the expression of Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione.  
*Environ Toxicol* **23**:84-95

103. **LUNN, D. P.; HOLMES, M. A.; ANTCZAK, D. ; AGERWAL, N.; BAKER, J.; BENDALI-AHCÈNE, S.; BLANCHARD-CHANNELL, M.; BYRNE, K. M.; CANIZZO, K.; DAVIS, W.; HAMILTON, M. J.; HANNANT, D.; KONDO, T.; KYDD, J. H.; MONIER, M. C.; MOORE, P. F.; O'NEIL, T.; SCHRAM, B. R.; SHEORAN, A.; STOTT, J. L.; SUGIURA, T.; VAGNONI, K. E. (1998)**  
Report of the second equine leucocyte antigen workshop, Squaw Valley, California, July 1995.  
*Vet Immunol Immunopathol* **62**:101-143
104. **MARTI, E.; GERBER, V.; WILSON, A. D.; LAVOIE, J. P.; HOROHOV, D.; CRAMERI, R.; LUNN, D. P.; ANTCZAK, D.; BJÖRNSDÓTTIR, S.; BJÖRNSDÓTTIR, T. S.; CUNNINGHAM, F.; DÉRER, M.; FREY, R.; HAMZA, E.; HORIN, P.; HEIMANN, M.; KOLM-STARK, G.; ÓLAFSDÓTTIR, G.; RAMERY, E.; RUSSELL, C.; SCHAFFARTZIK, A.; SVANSSON, V.; TORSTEINSDÓTTIR, S.; WAGNER, B. (2008)**  
Report of the 3rd Havemeyer workshop on allergic diseases of the Horse, Holar, Iceland, June 2007.  
*Vet Immunol Immunopathol* **126**:351-61
105. **MAYER, V.; LEGATOR, M. (1969)**  
Production of Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by Patulin.  
*J. Agr. Food Chem.* **17**:454-456.
106. **MCFARLANE, D.; HOLBROOK, T. C. (2008)**  
Cytokine dysregulation in aged horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction.  
*J Vet Intern Med* **22**:436-42
107. **MCGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E. (1993)**  
Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens.  
*Equine Vet J* **25**:261-7
108. **MCGORUM, B. C.; ELLISON, J.; CULLEN, R. T. (1998)**  
Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems.  
*Equine Vet J* **30**:430-4

109. **MÉRANT, C.; BREATHNACH, C. C.; KOHLER, K.; RASHID, C.; VAN METER, P.; HOROHOV, D. W.** (2009)  
Young foal and adult horse monocyte-derived dendritic cells differ by their degree of phenotypic maturity.  
*Vet Immunol Immunopathol* **131**:1-8
110. **MICHEL, O.; DUCHATEAU, J.; PLAT, G.; CANTINIEAUX, B.; HOTIMSKY, A.; GERAIN, J.; SERGYSELS, R.** (1995)  
Blood inflammatory response to inhaled endotoxin in normal subjects.  
*Clin Exp Allergy* **25**:73-9
111. **MILLER, A. C.; RASHID, R. M.; ELAMIN, E. M.** (2007)  
The "T" in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients.  
*J Trauma* **63**:1407-1417
112. **MOED, H.; STOOF, T. J.; BOORSMA, D. M.; VON BLOMBERG, B. M.; GIBBS, S.; BRUYNZEEL, D. P.; SCHEPER, R. J.; RUSTEMEYER, T.** (2004)  
Identification of anti-inflammatory drugs according to their capacity to suppress type-1 and type-2 T cell profiles.  
*Clin Exp Allergy* **34**:1868-75
113. **MOORE, J. N.** (2005)  
An Update on Endotoxemia in Horses.  
*AAEP Focus Meeting*  
<http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2005/Moore2.pdf>
114. **MOORE, J. N.** (2001)  
A Perspective on Endotoxemia.  
*AAEP Proceedings* **47**:61-74  
<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2001/91010100061.pdf>.
115. **MOSMANN, T. R.; SAD, S.** (1996)  
The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.  
*Immunol Today* **17**:138-46
116. **MOUSSAY, E.** (2006)  
Effect of *Escherichia coli* Stx1 on the cytokine profile of bovine ileal intraepithelial lymphocytes.  
*Gießen, Justus-Liebig-Universität, rer. nat. Diss.*

117. **MÜLLER, A.; LEHMANN, I.; SEIFFART, A.; DIEZ, U.; WETZIG, H.; BORTE, M.; HERBARTH, O.** (2002)  
Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases to mould exposure: Results of the Leipzig Allergy Risk children Study (LARS).  
*Int. J. Hyg. Environ. Health* **204**:363-365
118. **MULL, R. P.; TOWNLEY, R. W.; SCHOLZ, C. R.** (1945)  
Production of gliotoxin and a second active isolate by *Penicillium obscurum*.  
*J Am Chem Soc* **67**:1626-1627
119. **NEATE, E. V.; GREENHALGH, A. M.; MCPHEE, D. A.; CROWE, S. M.** (1992)  
Bacterial lipopolysaccharide mediates the loss of CD4 from the surface of purified peripheral blood monocytes.  
*Clin Exp Immunol* **90**:539-44
120. **NIEMINEN, S. M.; MAKI-PAKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M.; VON WRIGHT, A.** (2002)  
Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems.  
*Mutat Res* **520**:161-70
121. **NIJHUIS, E. W.; HINLOOPEN, B.; VAN LIER, R. A.; NAGELKERKEN, L.** (1995)  
Differential sensitivity of human naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells for dexamethasone.  
*Int Immunol* **7**:591-5
122. **OSSWALD, H.; FRANK, H. K.; KOMITOWSKI, D.; WINTER, H.** (1978)  
Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice.  
*Food Cosmet Toxicol* **16**:243-7
123. **PALIOGIANNI, F.; HAMA, N.; MAVROTHALASSITIS, G. J.; THYPHRONITIS, G.; BOUMPAS, D. T.** (1996)  
Signal requirements for interleukin 4 promoter activation in human T cells.  
*Cell Immunol* **168**:33-8
124. **PALMGREN, M. S.; LEE, L. S.** (1986)  
Separation of mycotoxin-containing sources in grain dust and determination of their mycotoxin potential.  
*Environ Health Perspect* **66**:105-8

125. **PALUMBO, M. L.; CANZOBRE, M. C.; PASCUAN, C. G.; RIOS, H.; WALD, M.; GENARO, A. M.** (2010)  
Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure.  
*J Neuroimmunol* **218**:12-20
126. **PEDERSEN, L. G.; CASTELRUIZ, Y.; JACOBSEN, S.; AASTED, B.** (2002)  
Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species.  
*Vet Immunol Immunopathol* **88**:111-22
127. **PENA, G. A.; PEREYRA, C. M.; ARMANDO, M. R.; CHIACCHIERA, S. M.; MAGNOLI, C. E.; ORLANDO, J. L.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A.; CAVAGLIERI, L. R.** (2010)  
*Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina.  
*Lett Appl Microbiol* **50**:77-81
128. **PETERS, M.; DUDZIAK, K.; STIEHM, M.; BUFE, A.** (2010)  
T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells.  
*Immunol Cell Biol.* **88**: 537-544
129. **PETERSON, J. D.; HERZENBERG, L. A.; VASQUEZ, K.; WALTENBAUGH, C.** (1998)  
Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3071-6
130. **PICANDET, V.; LEGUILLETTE, R.; LAVOIE, J. P.** (2003)  
Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves').  
*Equine Vet J* **35**:419-24
131. **PIETRA, M.; PELI, A.; BONATO, A.; DUCCI, A.; CINOTTI, S.** (2007)  
Equine bronchoalveolar lavage cytokines in the development of recurrent airway obstruction.  
*Vet Res Commun* **31 Suppl 1**:313-6

132. **PIRIE, R. S.; COLLIE, D. D.; DIXON, P. M.; MCGORUM, B. C.** (2003)  
Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma).  
*Clin Exp Allergy* **33**:676-83
133. **PIRIE, R. S.; DIXON, P. M.; COLLIE, D. D.; MCGORUM, B. C.** (2001)  
Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses.  
*Equine Vet J* **33**:311-8
134. **PIRIE, R. S.; DIXON, P. M.; MCGORUM, B. C.** (2003)  
Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses.  
*Clin Exp Allergy* **33**:1289-96
135. **PIRIE, R. S.; MCLACHLAN, G.; MCGORUM, B. C.** (2002)  
Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS.  
*Equine Vet J* **34**:332-6
136. **RÄTHEL, S.** (2007)  
Die COB des Pferdes im Zusammenhang mit viralen Infektionen und im Vergleich mit dem allergischen Asthma des Menschen.  
*Berlin, Freie Universität, vet. med. Diss.*
137. **RICHE, E. R.; MCENTIRE, B.; PHILLIPS, J.; ALLISON, J. P.** (1988)  
Altered expression of lymphocyte differentiation antigens on phorbol ester-activated CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells.  
*J Immunol* **140**:4115-22
138. **RIETSCHEL, E. T.; CAVAILLON, J. M.** (2003)  
Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin.  
*Microbes Infect* **5**:1407-14
139. **RIIHIMÄKI, M.; LILLIEHÖÖK, I.; RAINE, A.; BERG, M.; PRINGLE, J.** (2008)  
Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia.  
*Res Vet Sci* **85**:52-5

140. **ROBINSON, N. E.** (2001)  
International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000.  
*Equine Vet J* **33**:5-19
141. **ROBINSON, N. E.; JACKSON, C.; JEFcoat, A.; BERNEY, C.; PERONI, D.; DERKSEN, F. J.** (2002)  
Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves.  
*Equine Vet J* **34**:17-22
142. **RYLANDER, R.; HOLT, P. G.** (1998)  
(1→3)-β-D-glucan and endotoxin modulate immune response to inhaled allergen.  
*Mediators Inflamm* **7**:105-10
143. **SABATER-VILAR, M.; MAAS, R. F.; DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; FINK-GREMMELS, J.** (2004)  
Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle.  
*Mycopathologia* **158**:419-26
144. **SALAK-JOHNSON, J. L.; MCGLONE, J. J.** (2007)  
Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle.  
*J Anim Sci* **85**:E81-8
145. **SCHLEIMER, R. P.** (1993)  
An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions.  
*Eur J Clin Pharmacol* **45 Suppl 1**:S3-7
146. **SCHMALLENBACH, K. H.; RAHMAN, I.; SASSE, H. H.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E.; MCGORUM, B. C.; CRAMERI, R.; MILLER, H. R.** (1998)  
Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).  
*Vet Immunol Immunopathol* **66**:245-56
147. **SCHMIDT-WEBER, C. B.** (2008)  
Th17 and Treg cells innovate the Th1/Th2 concept and allergy research.  
*Chem Immunol Allergy* **94**:1-7
148. **SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A.** (2007)  
Th17 cells in the big picture of immunology.  
*J Allergy Clin Immunol* **120**:247-54

149. **SCHMIDT, J.; FLEISSNER, S.; HEIMANN-WEITSCHAT, I.; LINDSTAEDT, R.; POMBERG, B.; WERNER, U. ; SZELENYI, I.** (1994)  
Effect of corticosteroids, cyclosporin A, and methotrexate on cytokine release from monocytes and T-cell subsets.  
*Immunopharmacology* **27**:173-9
150. **SCHÜTZ, M.** (1999)  
Vergleich der Fütterung von Heu und einer Grasanwelksilage (HorseHage) hinsichtlich der Staubfreisetzung sowie des Krankheitsverlaufs von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB).  
*Gießen, Justus-Liebig-Universität, vet. med. Diss.*
151. **SCHUMACHER, D. M.; METZLER, M.; LEHMANN, L.** (2005)  
Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione.  
*Arch Toxicol* **79**:110-21
152. **SCHURINK, A.; VAN GREVENHOF, E. M.; DUCRO, B. J.; VAN ARENDONK, J. A.** (2009)  
Heritability and repeatability of insect bite hypersensitivity in Dutch Shetland breeding mares.  
*J Anim Sci* **87**:484-90
153. **SEEDORF, J.; HARTUNG, J.** (2002)  
Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung  
*KTBL-Schrift 393, 1. Auflage, Landwirtschaftsverlag*  
*Herausgeber: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL), Darmstadt*
154. **SENTSUI, H.; WU, D.; MURAKAMI, K.; KONDO, T.; MATSUMURA, T.** (2010)  
Antiviral effect of recombinant equine interferon-gamma on several equine viruses.  
*Vet Immunol Immunopathol* **135**:93-9
155. **SHAH, D. T.; JACKMAN, S.; ENGLE, J.; LARSEN, B.** (1998)  
Effect of gliotoxin on human polymorphonuclear neutrophils.  
*Infect Dis Obstet Gynecol* **6**:168-75
156. **SHAH, D. T.; LARSEN, B.** (1991)  
Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance.  
*Mycopathologia* **116**:203-8

157. **SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A.** (2007)  
Biosynthese der Steroidhormone  
*In: Taschenatlas Physiologie, 7. Auflage, S. 296 ff; Thieme Verlag, Stuttgart*
158. **SNIJDEWINT, F. G.; KAPSENBERG, M. L.; WAUBEN-PENRIS, P. J.; BOS, J. D.** (1995)  
Corticosteroids class-dependently inhibit in vitro Th1- and Th2-type cytokine production.  
*Immunopharmacology 29:93-101*
159. **SORENSEN, W. G.; SIMPSON, J.; CASTRANOVA, V.** (1985)  
Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages.  
*Environ Res 38:407-16*
160. **STANZANI, M.; ORCIUOLO, E.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARTINS, S. L.; ST JOHN, L. S.; KOMANDURI, K. V.** (2005)  
*Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes.  
*Blood 105:2258-65*
161. **STEINBACH, F.; DEEG, C.; MAUEL, S.; WAGNER, B.** (2002)  
Equine immunology: offspring of the serum horse.  
*Trends Immunol 23:223-5*
162. **STEINBACH, F.; MAUEL, S.; BEIER, I.** (2002)  
Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity.  
*Vet Immunol Immunopathol 84:83-95*
163. **STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; VITETTA, E. S.** (1988)  
Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells.  
*Nature 334:255-8*
164. **SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H.** (2000)  
A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.  
*Cell 100:655-69*
165. **SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.; GLIMCHER, L. H.** (2003)  
Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses.  
*Annu Rev Immunol 21:713-58*

166. **TAMMER, B.; LEHMANN, I.; NIEBER, K.; ALTENBURGER, R.** (2007)  
Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function.  
*Toxicol Lett* **170**:124-33
167. **TANNER, M. K.; SWINKER, A. M.; BEARD, M. L.; COSMA, G. N.;  
TRAUB-DARGATZ, J. L.; MARTINEZ, A. B.; OLENCHOCK, S. A.** (1998)  
Effect of phone book paper versus sawdust and straw bedding on the presence of  
airborne gram-negative bacteria, fungi and endotoxin in horse stalls.  
*Journal of Equine Veterinary Science* **18**:457-461
168. **TAYLOR, A.; VERHAGEN, J.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A.** (2006)  
Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth  
factor- $\beta$ : the role of T regulatory cells.  
*Immunology* **117**:433-42
169. **TEIXEIRA, L. K.; FONSECA, B. P.; BARBOZA, B. A.; VIOLA, J. P.** (2005)  
The role of interferon-gamma on immune and allergic responses.  
*Mem Inst Oswaldo Cruz* **100 Suppl 1**:137-44
170. **THOMSON, J. R.; MCPHERSON, E. A.** (1984)  
Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with  
chronic obstructive pulmonary disease.  
*Equine Vet J* **16**:35-8
171. **THORNE, P. S.; REYNOLDS, S. J.; MILTON, D. K.; BLOEBAUM, P. D.; ZHANG, X.;  
WHITTEN, P.; BURMEISTER, L. F.** (1997)  
Field evaluation of endotoxin air sampling assay methods.  
*Am Ind Hyg Assoc J* **58**:792-9
172. **TOEBAK, M. J.; DE ROOIJ, J.; MOED, H.; STOOF, T. J.; VON BLOMBERG, B. M. ;  
BRUYNZEEL, D. P.; SCHEPER, R. J.; GIBBS, S.; RUSTEMEYER, T.** (2008)  
Differential suppression of dendritic cell cytokine production by anti-inflammatory  
drugs.  
*Br J Dermatol* **158**:225-33
173. **TULIC, M. K.; WALE, J. L.; HOLT, P. G.; SLY, P. D.** (2000)  
Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to  
bacterial lipopolysaccharide.  
*Am J Respir Cell Mol Biol* **22**:604-12

174. **UMLAND, S. P.; NAHREBNE, D. K.; RAZAC, S.; BEAVIS, A.; PENNLINE, K. J.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M.** (1997)  
The inhibitory effects of topically active glucocorticoids on IL-4, IL-5, and interferon-gamma production by cultured primary CD4<sup>+</sup> T cells.  
*J Allergy Clin Immunol* **100**:511-9
175. **UNKEL, M.** (1984)  
**zitiert nach LANGE S.** (2004) (s. 91)  
Epidemiologische Erhebung zum sogenannten Sommerekzem bei Islandpferden.  
*Prakt. Tierarzt* **65**: 656-663
176. **UNKEL, M.; SIMON, D.; MAYER, M.; SOMMER, H.** (1987)  
**zitiert nach LANGE S.** (2004) (s. 91)  
Zur genetischen Fundierung des Sommerekzems beim Islandpferd.  
*J. Anim. Breed. Genet.* **104**:217-230
177. **VAN DEN WEGHE, I.H.; BOKISCH, F. J.; ENGEL F. HESSEL; FLEMING, K.; HOFFMAN, G.** (2006-2008)  
Alternative Einstreumaterialien zur Reduzierung der gas- und partikelförmigen Emmissionen in der Pferdehaltung und Prävention von Atemwegserkrankungen bei Pferden  
*unveröffentlichter Schlussbericht des Forschungsvorhabens 06UM001/W1*  
*Georg-August-Universität Göttingen, Johann Heinrich von Thünen-Institut Braunschweig*
178. **VAN DEN HOVEN, R.; DUVIGNEAU, J. C.; HARTL, R. T.; GEMEINER, M.** (2006)  
Clenbuterol affects the expression of messenger RNA for interleukin 10 in peripheral leukocytes from horses challenged intrabronchially with lipopolysaccharides.  
*Vet Res Commun* **30**:921-8
179. **VAN GREVENHOF, E. M.; DUCRO, B.; HEUVEN, H. C.; BIJMA, P.** (2007)  
Identification of environmental factors affecting the prevalence of insect bite hypersensitivity in Shetland ponies and Friesian horses in The Netherlands.  
*Equine Vet J* **39**:69-73

180. **VERHASSELT, V.; BUELENS, C.; WILLEMS, F.; DE GROOTE, D.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; GOLDMAN, M.** (1997)  
Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway.  
*J Immunol* **158**:2919-25
181. **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<sub>R</sub>1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals.  
*Vet Res* **41**:47 (Epub 2010 Apr 9)
182. **WAGNER, B.; HILLEGAS, J. M.; ANTCZAK, D. F.** (2006)  
A monoclonal antibody to equine interleukin-4.  
*Vet Immunol Immunopathol* **110**:363-7
183. **WAGNER, B.; HILLEGAS, J. M.; BRINKER, D. R.; HOROHOV, D. W.; ANTCZAK, D. F.** (2008)  
Characterization of monoclonal antibodies to equine interleukin-10 and detection of T regulatory 1 cells in horses.  
*Vet Immunol Immunopathol* **122**:57-64
184. **WARING, P.; BEAVER, J.** (1996)  
Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines.  
*Gen Pharmacol* **27**:1311-6
185. **WICHERT, B.; NATER, S.; WITTENBRINK, M. M.; WOLF, P.; MEYER, K.; WANNER, M.** (2008)  
Judgement of hygienic quality of roughage in horse stables in Switzerland.  
*J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**:432-7
186. **WICHMANN, G.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I.** (2002)  
The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells.  
*Environ Toxicol* **17**:211-8
187. **WICHMANN, G.; KRUMM, B.; DRÖBLER, K.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I.** (2003)  
The Effect of Gliotoxin and Patulin on Human T Cell Function.  
*Indoor and Built Environ* **12**:255-258

188. **WILSON, A. D.; HARWOOD, L. J.; BJÖRNSDÓTTIR, S.; MARTI, E.; DAY, M. J.** (2001)  
Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch).  
*Equine Vet J* **33**:707-13
189. **WILSON, A. D.; HEESOM, K. J.; MAWBY, W. J.; MELLOR, P. S.; RUSSELL, C. L.** (2008).  
Identification of abundant proteins and potential allergens in *Culicoides nubeculosus* salivary glands.  
*Vet Immunol Immunopathol* **122**:94-103
190. **WOLF, P.; COENEN, M.; KAMPHUES, J.** (2005)  
A survey on the hygienic standards of feeds for horses associated with diseases.  
*Pferdeheilkunde* **21**:24-25
191. **WOODS, P. S.; ROBINSON, N. E. ; SWANSON, M. C.; REED, C. E.; BROADSTONE, R. V.; DERKSEN, F. J.** (1993)  
Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems.  
*Equine Vet J* **25**:208-13
192. **WRIGHT, M. C.; ISSA, R.; SMART, D. E.; TRIM, N. ; MURRAY, G. I.; PRIMROSE, J. N.; ARTHUR, M. J.; IREDALE, J. P.; MANN, D. A.** (2001)  
Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats.  
*Gastroenterology* **121**:685-98
193. **WU, C. Y.; FARGEAS, C.; NAKAJIMA, T.; DELESPESE, G.** (1991)  
Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes.  
*Eur J Immunol* **21**:2645-7
194. **WU, D.; MURAKAMI, K.; LIU, N.; INOSHIMA, Y.; YOKOYAMA, T.; KOKUHO, T.; INUMARU, S.; MATSUMURA, T.; KONDO, T.; NAKANO, K.; SENTSU, H.** (2002)  
Expression of biologically active recombinant equine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae.  
*Cytokine* **20**:63-9
195. **ZHANG, C. H.; GRÜNIG, G.; DAVIS, W.; ANTCZAK, D. F.** (1994)  
Down-regulation followed by re-expression of equine CD4 molecules in response to phorbol myristate acetate.  
*Vet Immunol Immunopathol* **42**:71-82

## Literaturverzeichnis

---

196. **ZIEG, G.; LACK, G.; HARBECK, R. J.; GELFAND, E. W.; LEUNG, D. Y.** (1994)  
In vivo effects of glucocorticoids on IgE production.  
*J Allergy Clin Immunol* **94**:222-30

## IX Anhang

### 1 Reagentien

**Tab. 12: Übersicht über die verwendeten Reagentien**

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma Aldrich GmbH	A9400
Brefeldin A	Sigma Aldrich GmbH	B6542
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA	K41-001
Blockierungsantikörper 1E8 (IgG1, Maus, Hybridomüberstand)	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Giessen	Eigenherstellung
Dexamethason	Sigma Aldrich GmbH	D4902
Fab-Fragment of anti-ms IgG (H+L), FITC-konjugiert	Acris Antibodies	R1389F
Ficoll-Paque	GE Healthcare	17-1440-03
Gliotoxin	Sigma Aldrich GmbH	G9893
Ionomycin	Sigma Aldrich GmbH	I0634
Leukoperm (Lösung A und B)	AbD Serotec	BUF09C
LPS	Sigma Aldrich GmbH	L4130
Maus anti-ms IgG2a, Biotin-konjugiert	BD Biosciences	553502
Maus anti-bov IFN- $\gamma$ , PE-konjugiert (Klon CC302)	AbD Serotec	MCA1783PE
Maus anti-bov IL-4 (Klon CC303)	AbD Serotec	MCA1820
Maus anti-bov IL-4, PE-konjugiert (Klon CC303)	AbD Serotec	MCA1820PE
Maus anti-eq CD4 (Klon CVS 4)	AbD Serotec	MCA1078
Maus anti-eq IL-4	Prof. Dr. B. Wagner, Cornell University, Ithaca, USA	Eigenherstellung
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH	M7522
Mouse IgG1 negative control	Abd Serotec	MCA928
Natriumazid	Merck	6688
Natriumcitrat (Tri-Natriumcitrat-dihydrat)	Fluka	71406
Patulin	Sigma Aldrich GmbH	P1639
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA	P11-010
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich GmbH	P1585

## Anhang

---

RPMI 1640-Medium mit Glutamin	PAN Biotech GmbH	P04-18500
Streptavidin APC	Southern Biotech	7100-11M
Ziege anti-ms IgG1, APCkonjugiert	Jackson Immuno Research, Southern Biotech	115-135-205 1070-11
Ziege anti-ms IgG1, PEkonjugiert	Southern Biotech	1070-09
Ziege anti-ms IgG2a, FITCkonjugiert	Southern Biotech	1080-02
Ziege anti-ms IgG2a, PEkonjugiert	Southern Biotech	1080-09

---

## 2 Puffer, Medien und Lösungen

### 2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### **PBS (pH 7,4)**

PBS-Stammlösung	100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### **PBS-EDTA-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)**

NaCl	80,0 g
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	20,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
KCl	2,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### **PBS-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)**

NaCl	100,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
KCl	2,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### **Natriumazid-Lösung (10 %)**

NaN <sub>3</sub>	5,0 g
NaCl-Lösung 0,89 %	ad 50,0 ml

### 2.2 Puffer, Medien und Lösungen für die Zellkulturtechniken

#### Erythrozyten-Lyse-Reagenz

NH <sub>4</sub> Cl	8,26 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,09 g
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,037 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

#### Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,2 g
NaCl-Lösung 0,89 %	ad 1000 ml

#### PBMC-Medium

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin (PAN Biotech)	900 ml
FCS	100 ml
Merkaptoethanol (1mM)	3 ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 IE/ml)	10 ml

#### Gebrauchslösungen der Noxen

s. Tab. 13

### 2.3 Puffer, Medien und Lösungen für die Durchflusszytometrie

#### PBS/1% BSA-Lösung

BSA	5 g
PBS-Lösung (1-fach)	ad 500 ml

#### Antikörperverdünnungspuffer

NaN <sub>3</sub>	10 µl
PBS/1% BSA-Lösung	ad 10 ml

## Anhang

**Tab. 13: Gebrauchslösungen der einzelnen Noxen**

	Stammlösung	1. VV <sup>1</sup>	2. VV <sup>1</sup>	3. VV <sup>1</sup>
<b>Gliotoxin</b>				
Vorversuche	2,5 mg/ml	25 µg/ml	1 µg/ml	/
	Gliotoxin 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 10 µl	1. VV 40 µl	
	Methanol ad 2 ml	PBS <sup>3</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	
Hauptversuche	2,5 mg/ml	25 µg/ml	500 ng/ml	/
	Gliotoxin 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 10 µl	1. VV 20 µl	
	Methanol ad 2 ml	PBS <sup>3</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	
<b>Patulin</b>				
Vorversuche	5 mg/ml	50 µg/ml	12,8 µg/ml	/
	Patulin 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 10 µl	1. VV 256 µl	
	Methanol ad 1 ml	PBS <sup>3</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	
Hauptversuche	5 mg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	/
	Patulin 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 10 µl	1. VV 100 µl	
	Methanol ad 1 ml	PBS <sup>3</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	
<b>LPS</b>				
Vorversuche	10 µg/µl	500 µg/ml	/	/
	LPS 100 mg	Stamm <sup>2</sup> 50 µl		
	NaCl <sup>5</sup> ad 10 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml		
Hauptversuche	10 µg/µl	1 µg/µl	5 µg/ml	/
	LPS 100 mg	Stamm <sup>2</sup> 100 µl	1. VV 5 µl	
	NaCl <sup>5</sup> ad 10 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	
<b>Dexa<sup>6</sup></b>				
Vorversuche	5 mg/ml	400 µg/ml	/	/
	Dexa <sup>6</sup> 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 80 µl		
	Ethanol ad 1 ml	Medium <sup>3</sup> ad 1 ml		
Hauptversuche	5 mg/ml	400 µg/ml	4 µg/ml	80 ng/ml
	Dexa <sup>6</sup> 5 mg	Stamm <sup>2</sup> 80 µl	1. VV 10 µl	2. VV 20 µl
	Ethanol ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml	Medium <sup>4</sup> ad 1 ml

<sup>1</sup>VV (Vorverdünnung); <sup>2</sup>Stamm (Stammlösung); <sup>3</sup>PBS-Lösung, 1-fach, pH 7,4; <sup>4</sup>PBMC-Medium; <sup>5</sup>NaCl-Lösung, 0,89%; <sup>6</sup>Dexa (Dexamethason); die jeweils letzte angegebene Lösung wurde als Gebrauchslösung für die jeweiligen Titrationsreihen verwendet.

### 3 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Mehrraum-Auslaufhaltung des vTI Braunschweig	25
Abb. 2	Schema des Beprobungsplanes	27
Abb. 3	Schema zur Vorgehensweise während der Vor- und Hauptversuche	27
Abb. 4	Durchflusszytometrische Analyse equiner PBMC	34
Abb. 5	Durchflusszytometrische Quantifizierung toter Zellen nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Patulin	35
Abb. 6	Nachweis von IL-4 in bovinen und equinen PBMC unter Verwendung des anti-bov IL-4-Antikörpers	38
Abb. 7	Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma^+$ -, der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Gliotoxin	40
Abb. 8	Durchflusszytometrische Analyse equiner PBMC nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Gliotoxin am Beispiel von Pferd A	40
Abb. 9	Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma^+$ -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Gliotoxin	41
Abb. 10	Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma^+$ -, der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Patulin	43
Abb. 11	Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma^+$ -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Patulin	44
Abb. 12	Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma^+$ -, der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach <i>In vitro</i> -Provokation mit LPS	45
Abb. 13	Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma^+$ -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit LPS	46
Abb. 14	Prozentualer Anteil der IFN- $\gamma^+$ -, der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie der vitalen Zellen nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Dexamethason	47
Abb. 15	Individuelle Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, tot, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma^+$ -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Dexamethason	48
Abb. 16	Individuelle Anteile der T <sub>H</sub> 1-, IFN- $\gamma^+$ - bildenden und der T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse	49

Abb. 17	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Verwendung von drei verschiedenen Einstreuarten	50
Abb. 18	Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Gliotoxin	51
Abb. 19	Individuelle Anteile der T <sub>H</sub> 1-, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> - bildenden und der T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Gliotoxin	53
Abb. 20	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Gliotoxin	53
Abb. 21	Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Patulin	55
Abb. 22	Individuelle Anteile der T <sub>H</sub> 1-, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> - bildenden und der T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Patulin	56
Abb. 23	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Patulin	56
Abb. 24	Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit LPS	58
Abb. 25	Individuelle Anteile der T <sub>H</sub> 1-, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> - bildenden und der T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit LPS	59
Abb. 26	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit LPS	59

Abb. 27	Prozentuale Anteile verschiedener Zellpopulationen (vital, CD4 <sup>+</sup> -, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> -, T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen) sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Dexamethason	61
Abb. 28	Individuelle Anteile der T <sub>H</sub> 1-, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> - bildenden und der T <sub>H</sub> 2-Zellen sowie individuelle T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Dexamethason	62
Abb. 29	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach Haltung von Pferden auf verschiedenen Einstreumaterialien und <i>In vitro</i> -Provokation von PBMC mit Dexamethason	62
Abb. 30	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Verhältnisse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit der maximal verwendeten Konzentration einer Noxe	63

## 4 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Übersicht über die Ergebnisse von Studien zum Immunpathogenese der COB	7
Tab. 2	Prävalenz des Sommerrekzems	8
Tab. 3	Aerogener Staub- und Endotoxingehalt in Pferdeställen	20
Tab. 4	Informationen zu den beprobten Tieren der Vorversuche	24
Tab. 5	Informationen zu den 2-jährigen Warmblutstuten der Hauptversuche	26
Tab. 6	Bestimmung der Konzentrationsbereiche für die <i>In vitro</i> -Provokation	29
Tab. 7	Gebrauchslösungen und Isotypen der verwendeten Antikörper	31
Tab. 8	Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Gliotoxin	52
Tab. 9	Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Patulin	54
Tab. 10	Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit LPS	57
Tab. 11	Übersicht über die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach <i>In vitro</i> -Provokation mit Dexamethason	60
Tab. 12	Übersicht über die verwendeten Reagentien	111
Tab. 13	Gebrauchslösungen der einzelnen Noxen	114

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit maßgeblich unterstützt haben:

Meinen beiden Betreuern, Herrn **Prof. Dr. C. Menge** und Frau **Dr. K. Fey** für die beste Betreuung, die man sich als Doktorand wünschen kann! Immer allzeit diskussionsbereit und mit vielen fachlich sehr konstruktiven Hilfestellungen haben sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen;

Herrn **PhD P. S. Bridger** für seinen Ideenreichtum und seinen unermüdlichen Einsatz;

Frau **Prof. Dr. B. Wagner**, Cornell University, USA, für die sehr freundliche Bereitstellung Ihres equinen IL-4-Antikörpers, ohne den die Detektion von IL-4 nicht möglich war, und die damit entscheidend das Gelingen dieser Arbeit beeinflusst hat;

Herrn **Prof. Dr. Ir. H. van der Weghe** vom Forschungs- und Studienzentrum für Veredelungswirtschaft Weser-Ems der Georg-August-Universität Göttingen sowie Herrn **Prof. Dr. agr. Habil. F.-J. Bokisch** vom vTI Braunschweig für die Erlaubnis zur Durchführung meiner Studie in Braunschweig und insondere auch Frau **Dr. G. Hoffmann** für Ihre freundliche Unterstützung sowohl vor Ort als auch im Anschluss bei der ausführlichen Beantwortung meiner Fragen;

All jenen, die mir im Labor geholfen haben: **Dr. Melanie Mohr** für Ihre geduldige Einweisung in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie, **Ursula Leidner** dafür, dass ich dank ihr nie den Überblick im Labor und bei Konzentrationsberechnungen verloren habe sowie **Hakun Bulun** und **Katharina Kerner** für Ihre tatkräftige Unterstützung und Unterhaltung während der Hauptversuchsreihen;

Herrn **Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer** für die Bereitstellung der diversen Verbrauchsmaterialien und Gerätschaften sowie Herrn **Dr. K. Failing und seinem Team** der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung für die zügige, statistische Analyse mitsamt geduldiger Hilfestellung bei deren Interpretation;

Ferner dem **Team der Klinik für Pferde, Innere Medizin**, für eine unvergessliche Assistentenzeit bei Euch;

**Meinen Eltern Petra und Willi Lusebrink** für die bedingungslose und liebevolle Unterstützung, die sie mir zeitlebens entgegen gebracht haben. Danke!

Und zu guter Letzt: **Meinem Ehemann Dr. Florian Kelber** für seine unendlich geduldigen, immerwährenden, bestens funktionierenden Aufmunterungen – ohne Dich wäre dieses Schriftstück jetzt nicht fertig!

Steinbach, 14.03.2011

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Nina Kelber



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5773-2



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 7 7 3 2 11