



**UNTERSUCHUNGEN ZU LEUKOZYTÄREN
OBERFLÄCHENANTIGENEN UND DER BILDUNG
VON IFN- UND IL-4 BEI ZELLEN AUS DER
BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGEFLÜSSIGKEIT
(BALF) VON PFERDEN MIT COB**

MANUELA FRANZ

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 2006

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.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Pferde mit Lehrschmiede, Innere Medizin und
dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: PD Dr. Kerstin Fey

**Untersuchungen zu leukozytären
Oberflächenantigenen und der Bildung von
IFN- γ und IL-4 bei Zellen aus der bronchoalveolären
Lavageflüssigkeit (BALF) von Pferden mit COB**

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

eingereicht von

MANUELA FRANZ
Tierärztin aus Reutlingen

Gießen 2006

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter/-in: PD Dr. Kerstin Fey

Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der Disputation: 19.12.2006

Meinen Eltern
Helga und Falk Franz
gewidmet

Felix qui potuit rerum cognoscere causas!
(Vergil, Georgica II, 490)

Abkürzungsverzeichnis

+	positiv für ein bestimmtes Merkmal bzw. Antigen
-	negativ für ein bestimmtes Merkmal bzw. Antigen
↑	Anstieg (einer Subpopulation)
↓	Abfall (einer Subpopulation)
Abb.	<u>Ab</u> bildung
A. dest.	<u>A</u> qua <u>dest</u> illata
AM	<u>A</u> lveolar <u>m</u> akrophage
BAL	<u>B</u> roncho <u>a</u> lveolar <u>L</u> avage (bronchoalveoläre Lavage)
BALC	<u>B</u> roncho <u>a</u> lveolar <u>L</u> avage <u>C</u> ells (Zellen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit)
BALF	<u>B</u> roncho <u>a</u> lveolar <u>L</u> avage <u>F</u> luid (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit)
BALL	<u>B</u> roncho <u>a</u> lveolar <u>L</u> avage <u>L</u> ymphocytes (Lymphozyten aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit)
BGA	Blutgasanalyse (hier ausschließlich arteriell)
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
°C	Grad <u>C</u> elsius
ca.	<u>c</u> irka
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation (Differenzierungscluster)
COB	<u>C</u> hronisch <u>O</u> bstructive <u>B</u> ronchi(oli)tis
COPD	<u>C</u> hronic <u>O</u> bstructive <u>P</u> ulmonary <u>D</u> isease (chronisch obstructive Lungenerkrankung)
CpG	unmethylierte <u>C</u> ytosinphosphat/ <u>G</u> uanosindinukleotide aus bakterieller DNA
DAA	<u>D</u> eutsche <u>A</u> kademie für <u>A</u> kupunktur
ECP	<u>E</u> osinophil <u>C</u> ationi <u>c</u> <u>P</u> rotein
EDN	<u>E</u> osinophil <u>D</u> erived <u>N</u> eurotoxin
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EHV	<u>e</u> quines <u>H</u> erpes <u>v</u> irus
Eos	eosinophile Granulozyten
EPO	<u>E</u> osinophile Peroxidase
Eq/eq	<u>e</u> quines
evtl.	<u>e</u> ventuell
f.	folgende (eine Seite)
ff.	folgende (mehrere Seiten)
Fa.	<u>F</u> irma
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum (fetales Kälberserum)
FITC	<u>F</u> luoreszei <u>n</u> - <u>I</u> sothio <u>z</u> yanat
g	<u>G</u> ramm
ggr.	<u>g</u> ering <u>g</u> radig
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
h	<u>h</u> ora (Stunde)
H	<u>H</u> eavy chain (schwere Kette des Immunglobulin-Moleküls)
hgr.	<u>h</u> och <u>g</u> radig
H+L	schwere (<u>H</u> =heavy) und leichte (<u>L</u> =light) Immunglobulin-Ketten
IAD	<u>I</u> nflammatory <u>A</u> irway <u>D</u> isease
IE	<u>i</u> nternationale <u>E</u> inheit
IF	<u>I</u> mmun <u>f</u> luoreszenztest
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IFN-γ	<u>I</u> nter <u>f</u> eron- <u>g</u> amma

Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IgA	<u>I</u> mmunglobulin <u>A</u>
IgD	<u>I</u> mmunglobulin <u>D</u>
IgE	<u>I</u> mmunglobulin <u>E</u>
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IgG(B)	equiner <u>I</u> mmunglobulinisotyp; Anstieg im Serum durch Immunisierung mit <u>B</u> akterien-Antigen aus Pneumokokken
IgG(T)	equiner <u>I</u> mmunglobulinisotyp; Anstieg im Serum durch Immunisierung mit <u>T</u> etanus-Toxoid
IgM	<u>I</u> mmunglobulin <u>M</u>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IL-4	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>4</u>
IPT	<u>I</u> mmunphänotypisierung
i. v.	<u>i</u> ntrayenös
k. A.	keine Angaben
Kap.	<u>K</u> apitel
kb	<u>K</u> ilobasen (10^3 Basen)
kDa	<u>K</u> ilodalton (10^3 Dalton)
kg	<u>K</u> ilogramm
KM	<u>K</u> örper <u>m</u> asse
L	<u>L</u> ight chain (leichte Kette des Immunglobulinmoleküls)
LFA-3	<u>L</u> ymphocyte <u>F</u> unction- <u>A</u> ssociated antigen- <u>3</u>
log	<u>L</u> ogarithmus
LTB ₄	<u>L</u> eukotrien <u>B</u> ₄
LTC ₄	<u>L</u> eukotrien <u>C</u> ₄
Ly	<u>L</u> ymphozyt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m	Steigung der Regressionsgeraden
M	Makrophage
mAk	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
Max.	<u>M</u> aximum
MBP	<u>M</u> ajor <u>B</u> asic <u>P</u> rotein
mg	<u>M</u> illigramm
mgr.	<u>m</u> ittelgradig
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
min.	<u>M</u> inuten
Min.	<u>M</u> inimum
MIP-2	<u>M</u> acrophage <u>I</u> nflammatory <u>P</u> rotein-2
ml	<u>M</u> illiliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	<u>M</u> atrixmetalloproteinase
mRNA	<u>m</u> essenger- <u>R</u> NA (Boten-RNA)
MVA	<u>m</u> odifiziertes <u>V</u> accinia Virus <u>A</u> nkara
MZ	<u>M</u> astzelle
n	Anzahl unabhängiger Versuche, auch Tierzahl
NaAzid	<u>N</u> atrium <u>a</u> zid
NF-κB	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>κ</u> B (Kernfaktor-κB)
NK	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzelle
n. s.	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
ns	<u>N</u> anosekunde

NT	<u>N</u> eu <u>r</u> alisat <u>i</u> onst <u>e</u> st
PAF	<u>P</u> latelet- <u>A</u> ctivating <u>F</u> actor
$p_{(A-a)}O_2$	Alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz
p_aCO_2	Kohlendioxid-Partialdruck im arteriellen Blut
p_aO_2	Sauerstoff-Partialdruck im arteriellen Blut
PBL	periphere Blutleukozyten
PBMC	peripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
PI	<u>P</u> ropidiumjodid
PMA	<u>P</u> horbol-12- <u>m</u> yristat-13- <u>a</u> acetat
PMN	polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten
PP	Prozentpunkte
RAO	<u>R</u> ecurrent <u>A</u> irway <u>O</u> bstruction
RG	durchflusszytometrische Granulozytenregion
RL	durchflusszytometrische Lymphozytenregion
RM	durchflusszytometrische Makrophagenregion
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid (Ribonukleinsäure)
R-PE	<u>R</u> - <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
rpm	<u>r</u> otation <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehung pro Minute)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	<u>S</u> ekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung („Standard Deviation“; \pm)
SF	Standardfehler (x/)
stim.	Zellen, die mit PMA und Ionomycin <u>s</u> timuliert wurden
s. u.	siehe <u>u</u> nten
Tab.	<u>T</u> abelle
TBS	<u>T</u> racheobronchialsekret
TELF	Tracheal Epithelial Lining Fluid (Flüssigkeitsfilm auf dem Trachealepithel)
TGF	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
T_H -Zelle	<u>T</u> - <u>H</u> elferzellen
T_{H1} -Zelle	Subpopulation von T-Helferzellen
T_{H2} -Zelle	Subpopulation von T-Helferzellen
TNF	<u>T</u> umornekrosefaktor
TNF- α	<u>T</u> umornekrosefaktor- <u>a</u> lpha
T_{reg}	regulatorische T-Zellen
U	<u>U</u> nit (Einheit)
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
unstim.	<u>u</u> nstimulierte Zellen
u. U.	<u>u</u> nter <u>U</u> mständen
well	Mikrotiterplattenvertiefung
x_a	arithmetischer Mittelwert
x_g	geometrischer Mittelwert
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81m/sek ²)
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
	<u>2.1 Das equine pulmonale Immunsystem</u>	3
	2.1.1 Makrophagen	3
	2.1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	4
	2.1.3 Eosinophile Granulozyten	5
	2.1.4 Mastzellen	5
	2.1.5 Lymphozyten	6
	2.1.6 Immunglobuline der pulmonalen Immunabwehr	9
	2.1.6.1 Immunglobulin G (IgG)	9
	2.1.6.2 Immunglobulin A (IgA)	10
	2.1.6.3 Immunglobulin M (IgM)	10
	2.1.6.4 Immunglobulin E (IgE)	11
	2.1.6.5 Immunglobuline in der BALF des Pferdes	11
	2.1.7 Zytokine der pulmonalen Immunabwehr	12
	2.1.7.1 Interleukin-4 (IL-4)	12
	2.1.7.2 Interferon- γ (IFN- γ)	13
	2.1.8 BAL-Zellen (BALC) des Pferdes	14
	2.1.8.1 Physiologie und Entwicklung bei Jungtieren	14
	2.1.8.2 Zusammensetzung und Funktion bei adulten Tieren	15
	2.1.8.2.1 Granulozyten und Makrophagen	15
	2.1.8.2.2 Lymphozyten und ihre Subpopulationen	16
	2.1.8.3 Charakterisierung von BALC mittels Oberflächen- Antigenen	16
	2.1.8.3.1 CD2	17
	2.1.8.3.2 CD4	17
	2.1.8.3.3 CD5	18
	2.1.8.3.4 CD8	18
	2.1.8.3.5 CD9	19
	2.1.8.3.6 CD13	19
	2.1.8.3.7 B-Zell-Marker	19

2.2	<u>Die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes</u>	21
2.2.1	Definition und Allgemeines	21
2.2.2	Inzidenz	21
2.2.3	Klinik	22
2.2.4	Ätiologie	23
2.2.5	Pathogenese	25
	2.2.5.1 Die Rolle der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten	25
	2.2.5.2 Immunphänotypisierung von BAL-Lymphozyten bei der COB des Pferdes	28
	2.2.5.3 T _H 1-/T _H 2-Hypothese in Bezug auf die equine COB	31
3	Material und Methoden	35
3.1	<u>Untersuchungen an den Probanden</u>	35
3.1.1	Pferde	35
3.1.2	Zeitpunkte der Untersuchungsblöcke/Probenahmen	35
3.1.3	Klinische Untersuchung	36
3.1.4	Arterielle Blutgasanalyse	38
3.1.5	Analyse einer venösen Blutprobe	39
3.1.6	Durchführung der medikamentellen Therapie	39
3.1.7	Durchführung der Laserakupunktur	40
3.1.8	Gewinnung der BALF	41
3.2	<u>Untersuchung der BALF</u>	42
3.2.1	Makroskopische Beurteilung	42
3.2.2	Bestimmung der Rückgewinnrate	42
3.2.3	Bestimmung der absoluten Zellzahl	42
3.2.4	Lichtmikroskopisches Differentialzellbild	43
3.2.5	Durchflusszytometrie	43
	3.2.5.1 Antikörpertitration	43
	3.2.5.2 Hämolyse	45
	3.2.5.3 Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz	46
	3.2.5.4 Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz	46
	3.2.5.5 Probenvorbereitung für die Bestimmung der Zytokin- Produktion	47
	3.2.5.6 Analyse der Proben	48
3.3	<u>Statistische Auswertung</u>	49

4	Ergebnisse	51
	<u>4.1 Ergebnisse der Erstuntersuchungen</u>	51
	4.1.1 Klinische Untersuchung des Respirationstraktes, Tracheobronchoskopie und arterielle Blutgasanalyse	51
	4.1.2 Konventionelle Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)	52
	4.1.2.1 Rückgewinnrate	52
	4.1.2.2 Lichtmikroskopisches Differentialzellbild	52
	4.1.3 Durchflusszytometrische Differenzierung der übergeordneten Zellpopulationen in der BALF	53
	4.1.4 Vergleich der durchflusszytometrischen mit der licht- mikroskopischen Zelldifferenzierung	58
	4.1.5 Immunphänotypisierung der BALC	59
	4.1.5.1 Lymphozyten in der Region der Lymphozyten	59
	4.1.5.2 Lymphozyten in den Regionen der Granulozyten und Makrophagen	67
	4.1.5.3 Andere Zellen in der Region der Granulozyten	71
	4.1.5.4 Andere Zellen in der Region der Makrophagen	74
	4.1.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-4 (IL-4) in der BALF	75
	4.1.7 Korrelationen der Durchflusszytometrie mit klinischen Parametern	81
	<u>4.2 Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung vor und nach Therapie</u>	82
	4.2.1 Klinische Untersuchung des Respirationstraktes, Tracheobronchoskopie und arterielle Blutgasanalyse	82
	4.2.2 Konventionelle Untersuchung der BALF	83
	4.2.2.1 Rückgewinnrate	83
	4.2.2.2 Lichtmikroskopisches Differentialzellbild	83
	4.2.3 Durchflusszytometrische Differenzierung der BALC	85
	4.2.4 Immunphänotypisierung der BALC	86
	4.2.4.1 Lymphozyten in den drei Messregionen	86
	4.2.4.2 Andere Zellen in den Regionen der Granulozyten und Makrophagen	87
	4.2.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung von IFN- γ und IL-4	89

5	Diskussion	92
	<u>5.1 Auswahl der Probanden</u>	93
	<u>5.2 Verlässlichkeit der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen</u>	95
	<u>5.3 PMN aus der equinen BALF</u>	98
	<u>5.4 Lymphozyten aus der equinen BALF</u>	99
	5.4.1 Lymphozytensubpopulationen	99
	5.4.2 Einfluss der medikamentellen Therapie auf die Lymphozyten aus der BALF	102
	<u>5.5 Durchflusszytometrische Analyse von IFN-γ und IL-4</u>	103
	<u>5.6 Rolle der Helferzellen und der T_H1- bzw. T_H2-Antwort bei der equinen COB</u>	104
	<u>5.7 Schlussfolgerungen und Ausblicke auf neue Therapieformen</u>	107
6	Zusammenfassung	110
7	Summary	112
8	Literaturverzeichnis	114
9	Anhang	141
	<u>9.1 Reagenzien</u>	141
	<u>9.2 Puffer, Medien und Lösungen</u>	144
	<u>9.3 Abbildungsverzeichnis</u>	145
	<u>9.4 Tabellenverzeichnis</u>	146

1 Einleitung

Bei im Stall gehaltenen Pferden gilt die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB) in Europa als häufigste Lungenerkrankung erwachsener Tiere (DIXON *et al.* 1995a). Obwohl die klinischen Erscheinungen dieser Erkrankung wie Husten, Nasenausfluss, expiratorische Dyspnoe und Leistungsschwäche bis hin zur Arbeitsunfähigkeit wohl bekannt sind (BEECH 1989a), beschränkt sich die Behandlung der Krankheit aufgrund mangelhafter Erkenntnis zur Pathogenese bis heute auf die Bekämpfung der Symptome.

Die equine COB weist in Bezug auf die Reversibilität der klinischen Symptomatik und das Ansprechen auf Glukokortikoide Gemeinsamkeiten mit dem atopischen Asthma des Menschen auf. Aus diesem Grund wurden von mehreren Autoren pathogenetische Parallelen vermutet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das beim Asthma dominierende Zytokinprofil der T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2) auch für die charakteristische Entzündungsreaktion der tiefen Atemwege beim Pferd verantwortlich ist. Die Rolle von Lymphozytensubpopulationen bzw. der von unterschiedlichen T-Helferzellen produzierten T_H1 - bzw. T_H2 -Zytokinmuster in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) COB-kranker Pferde war deshalb bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen (BERENDONK 2000; BEADLE *et al.* 2002; BOWLES *et al.* 2002; LAVOIE *et al.* 2001; GIGUÈRE *et al.* 2002; AINSWORTH *et al.* 2003; CORDEAU *et al.* 2004; HOROHOV *et al.* 2005; KLEIBER *et al.* 2005). Diese Arbeiten gelangten jedoch sowohl hinsichtlich der Bedeutung bestimmter Lymphozytensubpopulationen als auch hinsichtlich des vorherrschenden Zytokinprofils zu keinem einheitlichen Ergebnis. Bis auf eine Ausnahme (BERENDONK 2000) fanden die genannten Studien an Versuchspferden statt, bei denen durch Provokationsversuche mit Stäuben akute Krankheitsexazerbationen induziert wurden. Da beim größten Teil der COB-Patienten in der heutigen Zeit allerdings eher chronische Formen von geringerem Schweregrad vorherrschen, die hinsichtlich vieler routinemäßig untersuchter Parameter Differenzen zu einer exazerbierten Erkrankung aufweisen, bleibt die Vergleichbarkeit dieser Versuchspferde mit klinischen Patienten auf immunologischer Ebene fraglich. Als kritisch im Hinblick auf die Typisierung der Lymphozyten muss außerdem gelten, dass keine der Arbeiten die Genauigkeit der Identifikationsmerkmale für die verschiedenen Arten von Zellen aus der BALF bei durchflusszytometrischen Analysen überprüft hat. Die Merkmale wurden regelmäßig aus der Untersuchung von Blutzellen übernommen, obwohl bekannt ist, dass Zellen aus der BALF in ihrer Größe deutlich von Blutzellen abweichen (CRYSTAL *et al.* 1986; MOORE und COX 1996). Der Nachweis von Zytokinen in der BALF des Pferdes

wurde bislang ausschließlich über die Quantifizierung zytokinspezifischer mRNA geführt, obwohl posttranskriptionelle Modifikationen der Zytokinexpression Divergenzen zwischen dem Vorhandensein einer bestimmten mRNA und der tatsächlichen Anwesenheit des Proteins hervorrufen können (KLEIBER *et al.* 2005).

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Hypothese war deshalb, dass eine verbesserte phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Lymphozyten aus der BALF bei klinischen COB-Patienten lymphozytäre Veränderungen detektieren kann, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung erlauben. Ziel der Untersuchungen war es zu überprüfen, ob diese Verbesserung durch eine simultane Markierung mehrerer Antigene und die Verwendung von Aktivierungsmarkern erreicht werden kann. Dazu erfolgten vor und nach Therapie eine detaillierte durchflusszytometrische Analyse von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozytensubpopulationen und eine Überprüfung auf Divergenzen zur lichtmikroskopischen Differenzierung. Schließlich wurde der quantitative Nachweis der beiden Zytokine IFN- γ (T_H1-Profil) und IL-4 (T_H2-Profil) erstmals über eine direkte Markierung auf Einzelzellniveau geführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Das equine pulmonale Immunsystem

2.1.1 Makrophagen

Makrophagen kommen im luftführenden Teil des equinen Respirationstrakt als so genannte Alveolarmakrophagen (AM) vor. Daneben existieren sie in der Lunge als interstitielle und intravaskuläre Zellen. Sie dienen beim Pferd in den Atemwegen, in Analogie zu anderen Tierarten und zum Menschen, der zellvermittelten, lokalen, unspezifischen Immunabwehr (SIBILLE und REYNOLDS 1990). Die Größe der AM steigt mit zunehmendem Alter von ca. 12 μm auf bis zu 40 μm (mehrkernige Riesenzelle) an. Sie besitzen eine runde bis ovale Form mit einem typischerweise zentral- oder randständigen, nierenförmigen Kern (CRYSTAL 1991; McGORUM und DIXON 1994). Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Beseitigung von Mikroorganismen und anorganischen Partikeln. Neben Sauerstoffradikalen produzieren sie zu diesem Zweck, wie auch Granulozyten und bronchiale Drüsenzellen, Lysozym. Dieses proteolytische Enzym der biochemischen Abwehr lysiert Bakterien und fördert die Phagozytose (SIBILLE und REYNOLDS 1990; HERMANN 1984). Darüber hinaus besitzen Makrophagen durch die Sekretion unterschiedlicher Mediatoren die Fähigkeit zur Kommunikation mit anderen Abwehrzellen. So sind sie in der Lage, B-Lymphozyten und zytotoxische T-Zellen als Vertreter der spezifischen Abwehr anzulocken und das Immunsystem zu aktivieren, zu kontrollieren und gegebenenfalls auch zu hemmen. Diese Hemmung des Entzündungsgeschehens wird beispielsweise über den Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) und Prostaglandin E (PGE) bewerkstelligt und bezieht sich vor allem auf T-Helferzellen und B-Lymphozyten, aber auch auf neutrophile und basophile Granulozyten (CRYSTAL 1991). Neben der Beseitigung von Tumorzellen und der Reparatur von zerstörtem Lungengewebe präsentieren Makrophagen spezifischen Abwehrzellen Antigene (FELS und COHN 1986; CRYSTAL 1991).

Die Gruppe der AM vom Typ II spielt bei Säugern durch die Bildung von oberflächenaktiven Substanzen eine zusätzliche Rolle im pulmonalen Abwehrsystem. Die Aufgabe dieses so genannten Surfactants, einem Gemisch aus Phospholipiden und Proteinen, besteht zum einen in der Herabsetzung der Oberflächenspannung im Alveolarbereich. Andererseits heften sich Vertreter einer bestimmten Familie von Surfactant-Proteinen (Kollektine) bei Säugern an Atemwegspathogene und hüllen sie ein. Durch diese Opsonierung erfolgt eine Stimulation der Phagozytose von Pathogenen. Zusätzlich sind Kollektine in der Lage, die Zellen der adaptiven

Immunität, darunter beispielsweise dendritische Zellen und T-Lymphozyten, zu modulieren (BUFLER *et al.* 2004; WRIGHT 2004).

2.1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Mit einer physiologischen Obergrenze von weniger als 5% ist die relative (und die absolute) Anzahl der PMN (im folgenden auch kurz als „Neutrophile“ bezeichnet) in den Atemwegen lungengesunder Pferde gering (McGORUM *et al.* 1993). Neutrophile erreichen im ausgereiften Zustand eine Größe von 10-12 μm und besitzen polymorphe Kerne. Sie erfüllen ihre Aufgabe der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Pilzen und einigen behüllten Viren mit der Hilfe von zahlreichen Enzymen wie Elastase, Kollagenase und Myeloperoxidase, die in den zelltypischen neutrophilen Granula gespeichert werden. Die Myeloperoxidase ist ein entscheidender Faktor bei der Bildung verschiedener Sauerstoffradikaler zur Bekämpfung von Mikroorganismen (so genannter Oxidative-Burst) (LEHRER *et al.* 1988; ABRAMSON *et al.* 1991). Über Zytokine und Mediatoren, die teilweise von Makrophagen aber auch von T-Lymphozyten sezerniert werden [z. B. Leukotrien B₄ (LTB₄), Interleukin- (IL)-8 und Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF- α)], erfolgt ihre Anlockung und Aktivierung. Bevor Partikel von PMN phagozytiert werden können, muss eine Opsonierung durch den Überzug mit Antikörpern oder Komplement stattfinden (LEHRER *et al.* 1988).

Neben diesen physiologischen Funktionen können Neutrophile bei krankhaften Zuständen der Lunge größere Gewebeschäden anrichten. Für die Entstehung des Lungenemphysems des Menschen spielt insbesondere die Elastase eine wichtige Rolle (ABRAMSON *et al.* 1991), und bei der Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes wird zumindest ein Teil der entzündlichen Atemwegsveränderungen der vermehrten Anwesenheit von Neutrophilen zugeschrieben. Daneben ist sowohl bei der Inflammatory Airway Disease (IAD), die für mangelhafte Leistungsfähigkeit bei jungen Rennpferden verantwortlich gemacht wird, als auch bei bakteriellen Pneumonien eine Neutrophilie im Lungensekret und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) zu beobachten. Bei Infektionen durch Bakterien sind typischerweise degenerierte Neutrophile und Makrophagen mit phagozytierten Erregern nachzuweisen (LARSON und BUSCH 1985; DERKSEN *et al.* 1985; DIECKMANN und DEEGEN 1990a; WINDER *et al.* 1991; McGORUM und DIXON 1994; MOORE und COX 1996; FRANCHINI *et al.* 1998).

Auch lungengesunde Pferde zeigen nach Inhalation von Schimmelpilzextrakten einen Influx von PMN in die Lunge, der im Unterschied zu überreagiblen Tieren allerdings nicht von

klinischen Symptomen und Veränderungen der Lungenfunktion, und dabei insbesondere nicht von einer Erhöhung des Atemwegswiderstands, begleitet ist (DERKSEN *et al.* 1988).

2.1.3 Eosinophile Granulozyten

Morphologisch unterscheidet sich diese Zellart von den PMN durch den zweilappigen Kern und die zahlreichen, insbesondere beim Pferd sehr auffälligen, eosinophilen Granula. In ihnen sind diverse Proteine und Enzyme wie z. B. das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophil Cationic Protein (ECP) (BUTTERWORTH und DAVID 1981), das Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN) und die eosinophile Peroxidase (EPO) (GLEICH und ADOLPHSON 1991; HARE und VIEL 1998) enthalten. Einerseits dienen diese Stoffe dem Schutz insbesondere vor parasitären Infektionen, andererseits führen sie bei pathologischen Prozessen auch zu Schäden am körpereigenen Gewebe. Erhöhte Anzahlen von eosinophilen Granulozyten in den equinen Atemwegen treten im Zusammenhang mit der Lungenwanderung des Darmparasiten *Parascaris equorum* und bei *Dictyocaulus arnfieldi*-Infektionen auf. Zusätzlich ist eine pulmonale Eosinophilie bei Einzeltieren mit IAD beschrieben. Häufiger werden bei IAD-Patienten jedoch erhöhte Mastzellgehalte in der Lunge vorgefunden (McGORUM und DIXON 1994; MOORE und COX 1996; HARE und VIEL 1998; LAAN *et al.* 2001).

2.1.4 Mastzellen

Pulmonale Mastzellen, die einen Durchmesser von 10 bis 20 µm aufweisen, sind zum größten Teil an Blutgefäße, die Pleura oder kleine Atemwege gebunden und kommen somit in der BALF gesunder Individuen nur zu einem geringen Prozentsatz vor. Sie besitzen eine runde bis ovale Form und zahlreiche Granula (MAIR *et al.* 1988; WINDER und VON FELLEBERG 1990). Die von Mastzellen produzierten Mediatoren können in drei Gruppen unterteilt werden: erstens so genannte vorgefertigte Mediatoren, wie beispielsweise bronchokonstriktorisch wirksames Histamin und Serotonin, die in den sekretorischen Granula des Zytoplasmas gespeichert werden, zweitens Fettsäuremediatoren aus dem Arachidonsäurestoffwechsel (Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene) und drittens Zytokine wie z. B. IL-3, IL-4 und IL-5, Interferon- γ (IFN- γ) und Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF).

Nach dem Erstkontakt mit einem Antigen bilden Mastzellen zahlreiche Oberflächenrezeptoren für die Anheftung von Immunglobulin E- (IgE-) Antikörpern aus. Sie sind bei einem erneuten Kontakt mit dem passenden inhalierten Agens in der Lage, dieses

hochaffin zu binden. Über die zusätzliche Vernetzung der IgE-Oberflächenmoleküle („Bridging“) wird auch bei der Spezies Pferd die Degranulation der Zellen ausgelöst (HARE *et al.* 1999; WAGNER *et al.* 2002).

Bei der IAD des Pferdes spielen erhöhte absolute und relative Mastzellzahlen in der BALF eine wichtige Rolle. Sie können entweder separat oder in Kombination mit erhöhten Zahlen von eosinophilen Granulozyten auftreten (MOORE und COX 1996; VIEL 1997; LAAN *et al.* 2001). Die BALF COB-kranker Tiere enthält dagegen sehr unterschiedliche Prozentsätze an Mastzellen. Bei einigen an COB leidenden Pferden wurden Behandlungserfolge durch das Mastzellen-stabilisierende Medikament Disodiumcromoglycat erzielt, das die Degranulation verhindert (THOMSON und McPHERSON 1984).

2.1.5 Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten sind auch beim Pferd vergleichsweise kleine Zellen, die einen großen und dichten Zellkern besitzen (McGORUM und DIXON 1994). Da in der BALF absolute und relative Zahlen der Lymphozyten schon im physiologischen Zustand eine große Schwankungsbreite aufweisen (WINDER *et al.* 1991; LAPOINTE *et al.* 1994; McGORUM und DIXON 1994), ist es schwer, ihre Bedeutung bei Krankheitszuständen einzuschätzen. Als gesichert gilt jedoch, dass bei Pferden mit exazerbierter COB mit einem insgesamt verringerten Lymphozytenanteil zu rechnen ist, dessen Hauptursache in einer hochgradigen absoluten und prozentualen Zunahme der neutrophilen Granulozyten liegt (McGORUM *et al.* 1993a; McGORUM und DIXON 1994).

Wie Makrophagen und dendritische Zellen sind B-Zellen zur Expression des MHC II-Antigens und damit zur professionellen Antigen-Präsentation in der Lage. Außerdem werden sie vom Organismus zur Produktion von Antikörpern benötigt. In den oberen Atemwegen wird hauptsächlich IgA gebildet, wohingegen in den tieferen Atemwegen vor allem IgG vorkommt. Nach einem ersten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen, das über membranständige Antikörper gebunden wird, können B-Lymphozyten zu Plasmazellen umgebildet werden. Sie produzieren in der Lunge lokal die Immunglobulinklassen IgA, IgE und IgM, während IgG über das periphere Blut in die Atemwege gelangt. Andererseits kann die Umwandlung der B-Zellen zu Gedächtniszellen stattfinden. Diese sind im Falle eines erneuten Antigenkontaktes zu einer beschleunigten und effektiven Sekundärantwort (anamnestische Reaktion) in der Lage. So ist es möglich, dass in kürzerer Zeit eine viel größere Menge hochspezifischer Antikörper gebildet wird als beim Erstkontakt (HUNNINGHAKE 1979; KALTREIDER 1991; s. auch Kap. 2.1.6.1, S. 9 f.).

Im peripheren Blut gesunder Pferde machen B-Zellen 23-30% der Lymphozyten aus. In der BALF kommen sie hingegen nur zu einem Prozentsatz von ungefähr 2 bis 6% vor (McGORUM *et al.* 1993a; HINES *et al.* 1996). Lediglich BENDAHLI-AHCENE *et al.* (1995) geben für die BALF mit durchschnittlich 21,3% B-Zellen ähnliche Werte wie für das Blut an. Im Zusammenhang mit der equinen COB berichten einige Autoren von erhöhten Anteilen an B-Lymphozyten in der BALF im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren (McGORUM *et al.* 1993a, RAILTON 1994; WATSON *et al.* 1997).

T-Lymphozyten können anhand ihres T-Zellrezeptors (TZR) in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Es handelt sich dabei einerseits um die so genannten $\alpha\beta$ -T-Zellen, die beim Menschen und den meisten Tierarten den Hauptanteil in peripherem Blut und Geweben ausmachen. Andererseits existieren T-Lymphozyten, die aus einer γ - und einer δ -Kette zusammengesetzte TZR besitzen. Sie werden demnach als $\gamma\delta$ -T-Zellen bezeichnet und wurden bei allen Spezies nachgewiesen, die auch $\alpha\beta$ -T-Zellen besitzen. Beim Menschen und den häufigsten Labortieren stellen die $\gamma\delta$ -T-Zellen in Blut und lymphoiden Organen lediglich eine Minderheit dar. In der Haut und auf Schleimhautoberflächen von Mäusen ist diese Zellart die Hauptpopulation der T-Zellen. Ihre Rolle wird in der Erstabwehr von bestimmten Bakterien, Viren und parasitären Infektionen gesehen. Aufgrund der Tatsache, dass ihr T-Zellrezeptor deutlich von demjenigen der $\alpha\beta$ -T-Zellen abweicht, muss davon ausgegangen werden, dass sie sich auch bezüglich der Erkennung von Antigenen von diesen unterscheiden (HAAS 1993; JANEWAY und TRAVERS 2002). Im Folgenden beziehen sich die Ausführungen auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten.

Solche T-Lymphozyten werden vom Organismus in der Lunge physiologischerweise zum Schutz gegen Fremdanigene und Partikel aus der eingeatmeten Luft benötigt. Sie können aufgrund der Expression spezieller Oberflächenantigene und ihrer unterschiedlichen Aufgaben in zwei große Gruppen unterteilt werden: T-Helferzellen (T_H -Zellen) und zytotoxische T-Zellen (T_C -Zellen). T_H -Zellen sind über direkte Kontakte und über die Sekretion von Zytokinen in der Lage, mit anderen Zellen des Immunsystems zu kommunizieren und diese zu beeinflussen. Sie bilden das Oberflächenantigen CD4 aus, das im Rahmen der spezifischen Immunantwort als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors an MHC II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen bindet. Die Erkennung des T-Zell-Rezeptors in Kombination mit dem MHC II-Komplex und dem spezifischen Antigen führt zur Aktivierung der T-Helferzellen (MEUER *et al.* 1982; GRÜNIG *et al.* 1994). Dazu benötigen naive Helferzellen stärkere Anreize als solche, die schon zuvor in Kontakt mit ihrem Antigen oder Gedächtniszellen getreten sind. Zu den antigenpräsentierenden Zellen, die in Vesikeln größere

Antigene zu Peptiden abbauen, werden Makrophagen, dendritische Zellen und auch B-Lymphozyten gezählt. Im Gegensatz zu Mensch und Nagern finden sich beim Pferd MHC II-Antigene zusätzlich auf 40 bis 98% der T-Lymphozyten (HOLMES und LUNN 1994).

Für Helferzellen ist bei der Spezies Maus und etwas weniger distinkt auch beim Menschen eine weitere Unterteilung in T_{H1} - und T_{H2} -Zellen anhand gegenläufiger Zytokinprofile möglich, die für die jeweilige Subpopulation als charakteristisch angesehen werden können (MOSMANN *et al.* 1986; ROTTEVEEL *et al.* 1988; MOSMANN und COFFMAN 1989; MOSMANN *et al.* 1991; MOSMANN und SAD 1996). Dagegen existieren für andere Tierarten, darunter das Rind, anscheinend auch gemischte Zytokinprofile (BROWN *et al.* 1998; ESTES *et al.* 2002). Eine eindeutige Zuordnung der Spezies Pferd zur einen oder anderen Gruppe ist derzeit noch nicht möglich.

Beim T_{H1} -Zytokinmuster, das mit der Bekämpfung von intrazellulären Infektionen und mit der Hypersensitivität vom verzögerten Typ assoziiert wird, produzieren die Helferzellen IL-2, IFN- γ und TNF- β . Diese Mediatoren bewirken die Aktivierung von Makrophagen und eine Limitierung der B-Zell-Antwort auf Antikörper der IgG2a Unterklasse (STEVENS *et al.* 1988; FINKELMANN *et al.* 1990). Im Gegensatz dazu bilden T_{H2} -Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, wodurch eine Deaktivierung von Makrophagen ausgelöst wird. Außerdem werden Mastzellen stimuliert und die Bildung von IgG1 und IgE gefördert (STEVENS *et al.* 1988). Das T_{H2} -Zytokinprofil wird daher mit der Hypersensitivität von Typ I in Verbindung gebracht (MOSMANN *et al.* 1986; PALLISER *et al.* 1998; HUNTER und REINER 2000).

Den T-Helferzellen stehen die zytotoxischen T-Lymphozyten gegenüber. Ihr Charakteristikum ist das oberflächenständige Leukozytenantigen CD8, das wie CD4 als Co-Rezeptor für den T-Zell-Rezeptor dient. Mit Hilfe ihrer Granula, die zellschädigende Komponenten - darunter bestimmte Proteasen, Granzyme und Perforine - enthalten, sind sie zur direkten Lyse von Zielzellen in der Lage. Zusätzlich kann über unterschiedliche Mechanismen deren Apoptose ausgelöst werden. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen auch beim Pferd zellgebundenes Antigen über den so genannten MHC I-Komplex, an den der CD8-Rezeptor bindet, und der von den meisten körpereigenen, kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Durch diesen Vorgang werden Aktivierung und Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen in Gang gesetzt (O'BRIEN *et al.* 1991; McGUIRE *et al.* 1994; ALLEN *et al.* 1995).

Für humane T-Zellen steht fest, dass auch T_C -Lymphozyten Zytokinmuster bilden, die dem T_{H1} - und T_{H2} -Muster der Helferzellen entsprechen. Es wird daher gefordert, die Nomenklatur auf CD8 positive Lymphozyten auszudehnen und in T_{C1} - und T_{C2} -Zellen umzuwandeln, bzw. generell von T1- und T2-Zellen zu sprechen (CARTER und DUTTON 1996; LI *et al.* 1997).

2.1.6 Immunglobuline der pulmonalen Immunabwehr

Wie beim Menschen bestehen equine Antikörper aus Glykoproteinen mit zwei schweren (H-) Ketten und zwei leichten (L-) Ketten. Dabei bestimmen die fünf bekannten schweren Ketten (γ , μ , α , δ , ϵ), die Zuordnung des Moleküls zur jeweiligen Klasse IgG, IgM, IgA, IgD oder IgE. Über die Existenz von IgD bei der Spezies Pferd gibt es bis heute keine Berichte.

2.1.6.1 Immunglobulin G (IgG)

Equines IgG, das vor allem in den tiefen Atemwegen vorkommt, dient bei der pulmonalen Immunabwehr zur Bindung von Bakterien und Toxinen und im Weiteren auch zur Opsonierung (GREEN *et al.* 1977; KALTREIDER 1991). Im Gegensatz zu anderen Klassen, die in der Lunge überwiegend direkt vor Ort produziert werden, gelangt IgG mittels Transsudation aus dem Blut in das Lungengewebe (HUNNINGHAKE 1979; KALTREIDER 1991). Beim Pferd sind sechs Unterklassen des IgG beschrieben. Mit Hilfe ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in der Immunelektrophorese war es zunächst möglich, drei davon zu determinieren, die in der Folge als IgGa, IgGb und IgGc bezeichnet wurden (ROCKEY *et al.* 1964; KLINMAN *et al.* 1967; ROCKEY 1967). Allerdings erwies sich die Trennung von IgGa und IgGb aufgrund ihrer ähnlichen Ladung als schwierig. Erst SHEORAN und HOLMES (1996) konnten über die Bindung an bestimmte Staphylokokken- und Streptokokkenproteine in der Chromatographie eine Aufreinigung erreichen. Nach Untersuchungen über die Verteilung und den neonatalen Transfer von Immunglobulinen beim Pferd ist IgGa, das im Serum von Fohlen mit einer Halbwertszeit von 176 Tagen die langlebigste Klasse darstellt, in equinem Serum und in der kolostralen Milch auch das häufigste Immunglobulin. Bei neugeborenen Fohlen scheint bis zum 63. Tag nach der Geburt keine endogene Synthese dieses Typs stattzufinden (SHEORAN *et al.* 2000).

WIDDERS *et al.* (1986) identifizierten mittels Immunelektrophorese und Immundiffusion nach Aufreinigung das IgG(T), das als Untergruppe IgG-typische Antigene auf den H-Ketten aufweist. Funktionell betrachtet ist IgG(T) unter anderem an der spezifischen Immunantwort bei Cyathostomen-Infektionen des Pferdes beteiligt (DOWDALL *et al.* 2002). SHEORAN und HOLMES (1996) konnten über die Bindung an Bakterienproteine zwei Komponenten des Moleküls unterscheiden. Diese Befunde werden durch genetische Untersuchungen zu equinen H-Ketten unterstützt. Demnach existiert IgG(T) in zwei, auch genetisch definierbaren, Varianten (WAGNER *et al.* 1998b; OVERESCH 1998).

Über einen langen Zeitraum strittig war die Einordnung der heute als IgG(B) bezeichneten Unterklasse. Die Zuweisung zur IgG-Klasse durch MONTGOMERY (1973) und LUNN *et al.* (1995a) wurde durch spätere genetische Studien bekräftigt (WAGNER *et al.* 1998b).

Eine neuere Nomenklatur bezeichnet die oben beschriebenen IgG-Subklassen des Pferdes als IgG1 bis IgG6 (ROHWER *et al.* 2003). HOOPER-McGREVY *et al.* (2003) propagieren eine Verbindung von IgGb und IgG(T) mit dem T_H2-Zytokinprofil. Dagegen wird das T_H1-geprägte Muster mit einer verstärkten Produktion von IgGa in Zusammenhang gebracht (STEVENS *et al.* 1988).

2.1.6.2 Immunglobulin A (IgA)

Das IgA-Molekül liegt im equinen Serum analog zu den humanen Verhältnissen hauptsächlich in Dimer-Form vor. Außerdem treten Monomere, Trimere und Tetramere auf. Durch Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen humane α -Ketten und einem Immunglobulin aus Pferdeserum, konnte die Existenz des IgA beim Pferd gesichert werden (VAERMAN *et al.* 1971). Zusätzlich wurde sekretorisches IgA und eine freie sekretorische Komponente sowohl in Milch als auch in anderen Sekreten gefunden (McGUIRE und CRAWFORD 1972; PAHUD und MACH 1972). In der postkolostralen Milch von Stuten stellt es sogar das häufigste Immunglobulin dar (SHEORAN *et al.* 2000). WAGNER *et al.* konnten 1997 mit der Klonierung und Charakterisierung eines spezifischen Gens zeigen, dass beim Pferd nur eine Variante des IgA vorkommt. Zusätzlich charakterisierten sie die Nukleotidsequenz für die H-Kette des equinen Moleküls. Dabei wies das Gen für das sekretorische IgA rund 72% Homologie mit dem anderer Säugetierspezies auf, darunter Mensch, Schaf, Schwein und Hund (WAGNER *et al.* 2003).

Die Hauptaufgabe des IgA im Respirationstrakt des Pferdes liegt analog zu anderen Tierspezies und dem Menschen in der Neutralisation von Viren und der Agglutination von Mikroorganismen bereits an der Epithel-Luft-Grenze (GREEN *et al.* 1977; QUIE 1986).

2.1.6.3 Immunglobulin M (IgM)

Für das IgM-Molekül existieren ebenfalls keine Subtypen. Es besitzt wie bei anderen Spezies eine pentamere Struktur (McGUIRE *et al.* 1973), deren fünf Monomer-Einheiten auch einzeln zur Bindung von Antigenen befähigt sind (HILL und CEBRA 1965). Mit durchflusszytometrischen Doppelfluoreszenz-Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Hauptanteil der zirkulierenden B-Lymphozyten im peripheren Blut des Pferdes IgM exprimiert (LUNN *et al.* 1998). Im zeitlichen Ablauf der Abwehrreaktion sind Antikörper

vom IgM-Isotyp an der Primärantwort beteiligt. Erst nach dem Erstkontakt mit einem Antigen findet auch die Produktion anderer Immunglobulin-Klassen statt. Wie IgA und IgE wird IgM in der Lunge hauptsächlich lokal gebildet. Es ist dort für die Aktivierung des Komplementsystems und, ähnlich wie IgG, für die Bindung von Bakterien und Toxinen zuständig (GREEN *et al.* 1977; HUNNINGHAKE 1979; KALTREIDER 1991; QUIE 1986).

2.1.6.4 Immunglobulin E (IgE)

Die Anwesenheit von IgE im equinen Serum wurde erstmals von MATTHEWS (1983) bzw. SUTER und FEY (1983) beschrieben. Mittlerweile liegen die Charakterisierung der Nukleotidsequenz für die schwere Kette des Antikörpermoleküls und damit auch die Abfolge ihrer Aminosäuren vor (NAVARRO *et al.* 1995), die durch weiterführende genetische Studien von WAGNER *et al.* (1997) bestätigt wurden. SUTER und FEY (1983) zufolge erreicht der physiologische Prozentsatz an IgE im Serum von Pferden weniger als 0,1%. Seine Halbwertszeit wird mit zwei bis drei Tagen angegeben. Über die Bindung entsprechender Antigene sind IgE-Antikörper auf Mastzellen an deren Degranulation und damit an der Ausschüttung potenter Mediatoren wie z. B. Histamin beteiligt. Mit der Entwicklung rekombinanter Detektionsantikörper zur spezifischen Erkennung von IgE beim Pferd (WAGNER *et al.* 2003) stehen neue Möglichkeiten zur Allergieforschung bei dieser Tierart offen.

2.1.6.5 Immunglobuline in der BALF des Pferdes

MAIR *et al.* (1988) wiesen verschiedene Immunglobulin-Klassen, darunter IgA, IgG und IgM, in der BALF bei COB-kranken Pferden und lungengesunden Kontrollen nach. Bei sämtlichen Probanden war dabei das Verhältnis der gesamten Immunglobuline zu Albumin in der BALF signifikant höher als im parallel dazu untersuchten Serum. Zwar bestand auch bei Gesunden eine lokale Produktion von IgA in den tiefen Atemwegen, im Vergleich mit COB-Pferden wurden bei ihnen aber geringere Gehalte der genannten Immunglobuline ermittelt. BERENDONK gelang ebenfalls der Nachweis von IgA und IgM in der Lavageflüssigkeit gesunder Probanden und COB-kranker equiner Patienten. Die BALF der kranken Tiere enthielt, übereinstimmend mit den Ergebnissen von MAIR *et al.* (1988), signifikant mehr IgA. Antikörper der IgGa, IgGb und IgG(T) Unterklassen wurden in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede gefunden (BERENDONK 2000). HALLIWELL bestimmte in der BALF von Pferden allergenspezifisches IgE gegen *Aspergillus fumigatus* und *Micropolyspora faeni*. Auch hier erreichten Kontrolltiere quantitativ geringere Werte als COB-kranken Tiere

(HALLIWELL *et al.* 1993). In der Untersuchung von SCHMALLENBACH zeigten sowohl Gesunde als auch Kranke spezifische IgE- und IgG-Spiegel gegen ein Antigen von *Aspergillus fumigatus* in ihrer BALF. Wie in der Arbeit von HALLIWELL *et al.* (1993) waren diese bei den Kontrollen niedriger als bei COB-kranken Pferden (SCHMALLENBACH *et al.* 1998). Der Nachweis spezifischer Immunglobuline gegen das equine Herpesvirus (EHV) 1 und 4 bei COB-kranken Patienten, Fohlen und Rennpferden gelang WEINBRENNER mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IF) in 100% der Fälle sowohl im Serum als auch in der BALF. Wurde die Methodik des Neutralisationstests verwendet, sank der Prozentsatz für die Detektion von EHV 1- bzw. EHV 4-Antikörpern in der BALF auf 97% bzw. 91% bei adulten Pferden und auf 65 bzw. 0% in der Gruppe der Fohlen. Über die Klasse der beteiligten Immunglobuline macht die Autorin keine Angaben (WEINBRENNER 2004).

2.1.7 Zytokine der pulmonalen Immunabwehr

Auch für equine Helferzellen liegen Hinweise vor, dass zwei in ihrer Wirkung gegenläufige Zytokinprofile bestehen, die von unterschiedlichen Subpopulationen gebildet werden. Diese Indizien wurden u. a. im pathogenetischen Zusammenhang mit der COB des Pferdes überprüft, um neue Erkenntnisse zu zellulären und molekularen Vorgängen zu gewinnen (BERENDONK 2000; LAVOIE *et al.* 2001; GIGUÈRE *et al.* 2002; AINSWORTH *et al.* 2003; CORDEAU *et al.* 2004). Im Folgenden werden, repräsentativ für die T_H2-Antwort IL-4 und als „Schlüsselzytokin“ für das T_H1-Zytokinprofil IFN- γ näher erläutert. Sie wurden auch in den eigenen Untersuchungen als Indikatoren für eine T_H1- bzw. T_H2-Antwort genutzt. (Zu Zytokinen in der BALF des Pferdes s. Kap. 2.2.5.3, S. 31 ff.)

2.1.7.1 Interleukin-4 (IL-4)

Im aktivierten Zustand sind CD4 positive (CD4⁺) Lymphozyten neben Monozyten, basophilen Granulozyten und stimulierten Mastzellen zur Produktion von IL-4 in der Lage. Eine Funktion dieses Zytokins beim Menschen ist die teilungsfördernde Wirkung auf aktivierte B-Zellen. Darüber hinaus wurden im Mäusemodell eine Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen und die Produktion von IgG1 und IgE angeregt (PÈNE *et al.* 1988). VANDERGRIFFT *et al.* (1994) sequenzierten das equine IL-4, dessen Primärstruktur 62% Homologie zum Menschen aufweist, erstmalig mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und humanen Primern. Das IL-4 Molekül des Pferdes wird in drei unterschiedlichen Größen von 17,1 sowie 19,6 und 22,1 kDa exprimiert, deren Divergenz wahrscheinlich auf

Modifikationen durch Glykosylierung zurückzuführen ist (DOHMANN *et al.* 2000). Ob es sich dabei um so genannte splicing variants handelt, die beim Menschen teilweise die IL-4 Wirkung kompetitiv hemmen und die auch beim Rind beschrieben sind (WALDVOGEL *et al.* 2004), ist unbekannt. Bei funktionellen *in-vitro*-Studien zu den IL-4 Effekten auf equine mononukleäre Blutzellen war unter bestimmten Bedingungen eine starke Proliferation sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ Lymphozyten zu beobachten. Die Anzahl der B-Zellen konnte hingegen nicht gesteigert werden, so dass sich die biologische Funktion des equinen IL-4 zumindest *in-vitro* von Mensch und Maus unterscheidet (DOHMANN *et al.* 2000).

2.1.7.2 Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ wird von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert und beeinflusst maßgeblich die Immunantwort (CURRAN *et al.* 1994; HIMMLER und GRÜNIG 1997). Während es in der Humanmedizin aufgrund seiner antiviralen und antiallergischen Eigenschaften und der für Patienten positiven Wirkung auf Tumoren therapeutisch eingesetzt wird (YOUNES und AMSDEN 2002), erwies sich *in vitro* rekombinantes equines IFN- γ als unwirksam gegenüber unterschiedlichen Viren wie z. B. EHV 1 und 4. Es hatte jedoch einen immunmodulatorischen Effekt auf Monozyten (STEINBACH *et al.* 2002). Entsprechend seiner Aufgabe bei intrazellulären Infektionen ist IFN- γ *in vivo* in der Lage, Makrophagen zu aktivieren. Außerdem besitzt es mit einer im Wesentlichen auf IgG2a-Isotypen limitierten Antikörperproduktion die Fähigkeit zur Begrenzung der B-Zell-Antwort (STEVENS *et al.* 1988; FINKELMANN *et al.* 1990). Die Nukleotidsequenz des Gens beim Pferd stimmt zu 67% mit dem Äquivalent des Menschen und zu 78% mit dem des Rindes überein. Seine Größe liegt bei ungefähr 4 kb (CURRAN *et al.* 1994).

2.1.8 BAL-Zellen (BALC) des Pferdes

2.1.8.1 Physiologie und Entwicklung bei Jungtieren

Zusammensetzung und Anzahl der pulmonalen Abwehrzellen verändern sich als Antwort auf ständig neue Stimuli für das Immunsystem der Lunge im Laufe der ersten Lebensmonate eines Pferdes entscheidend. Bei Fohlen unter drei Wochen ist die aus der BALF bestimmte Gesamtleukozytenzahl im Vergleich mit Adulten signifikant erniedrigt (McKANE *et al.* 1993; MOORE *et al.* 1995; BALSON *et al.* 1997). Erst mit ungefähr drei Monaten erreichen Jungpferde ähnliche absolute Zellzahlen wie erwachsene Tiere (FLAMINIO *et al.* 2000). Die mit dem Alter ansteigende Gesamtzahl der Immunzellen in der Lunge wird zum einen von einer Zunahme des Lymphozyten-, zum anderen von einer Abnahme des Makrophagenanteils begleitet. Bis zum zweiten Lebensmonat bestehen die BALC typischerweise aus rund 80% Makrophagen. Die Zellzusammensetzung der BALF von Fohlen ähnelt demnach derjenigen anderer junger Säugetiere wie z.B. prä- und neonataler Kaninchen, die durchschnittliche Makrophagenprozentanteile von 95% erreichen (SIEGER 1978). Bei erwachsenen Pferden werden Anteile von ca. 60% als physiologisch erachtet (McGORUM *et al.* 1993; McKANE *et al.* 1993; MOORE *et al.* 1995). In einer Studie zur postnatalen Reifung der BALC im Zusammenhang mit der Immunabwehr gegen *Rhodococcus equi*-Infektionen untersuchten ZINK und JOHNSON drei Fohlen im Alter zwischen zwei und 63 Tagen. Für Fohlen bis zu drei Wochen geben sie im Mittel relative Werte von 86% Makrophagen als physiologisch an. Die Autoren beobachteten einen Abfall dieses Anteils im Verlauf der ersten zwei Lebensmonate auf mittlere 71% zugunsten der Lymphozyten, die von ungefähr 5% auf Werte um die 20% anstiegen. Ab der dritten Woche nach der Geburt kam es mit der Abnahme ihres Prozentsatzes jedoch zu einer Steigerung der Gesamtzahl der Makrophagen, die sich bis zum Alter von zwei Monaten bei Werten um ca. $2,0 \times 10^8$ Zellen pro Lavage einpendelte (ZINK und JOHNSON 1984). Unter einem Lebensalter von 19 Tagen enthielt die BALF, entsprechend der geringen Gesamtzellzahl, absolut betrachtet nur sehr wenige Makrophagen. Ähnliche Angaben machen LIU *et al.* für Fohlen im Alter bis zu drei Wochen. Zusätzlich zu einer niedrigen absoluten Anzahl wird den Makrophagen aus der BALF von zwei bis drei Tage alten Probanden eine mangelhafte chemotaktische Funktion bescheinigt (LIU *et al.* 1987).

Bezüglich der Lymphozytensubpopulationen aus der BALF kommt es im zweiten Lebensmonat der Fohlen zu einem Anstieg der Prozentsätze von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Diese Zunahme wird als selektive Proliferation von T-Zell Populationen gedeutet, wodurch

respiratorische Infektionen, von denen vor allem junge Fohlen betroffen sind, in einem späteren Lebensalter eventuell verhindert werden können (FLAMINIO *et al.* 2000). Diese Ergebnisse werden von BANKS *et al.* (1999) gestützt, die in einer fetalen Fohlenlunge nur 10% an epithelialen T-Lymphozyten (CD3⁺) nachweisen konnten. Das fetale Immunsystem in der Lunge scheint somit für seine spätere vollständige Entwicklung auf inhalative Stimuli aus der Umgebung angewiesen zu sein. BALSON beschreibt darüber hinaus, dass der Anteil der CD8⁺ Lymphozyten langsamer wächst als derjenige der CD4⁺ Zellen. Im Gegensatz zu den Helferzellen, die die Prozentsätze erwachsener Pferde schon ungefähr drei Wochen nach der Geburt erreichen, benötigen CD8⁺ Zellen länger, um auf dieses Niveau anzusteigen. Dabei veränderte sich die Ratio CD4⁺:CD8⁺ Lymphozyten von 1,26 in der ersten, über 0,78 in der zehnten Lebenswoche, bis zu einem für adulte Tiere physiologischen Wert von 0,66. B-Zellen sind in der BALF von Fohlen in den ersten vier Lebenswochen kaum nachweisbar. Umso bemerkenswerter ist es, dass ihr Anteil im zweiten Monat nach der Geburt höher als bei erwachsenen Tieren liegt (BALSON *et al.* 1997).

2.1.8.2 Zusammensetzung und Funktion bei adulten Tieren

Zum genauen Lebensalter von erwachsenen Kontrollpferden in Studien zur Zusammensetzung der BALC existieren in der Literatur nur lückenhafte Angaben. In der Publikation von HINES *et al.* (1996) weist die Gruppe der adulten Tiere beispielsweise eine Altersspanne von 8 bis 20 Jahren auf. Die Kontrollgruppe von McGORUM *et al.* (1993a) ist zwischen 7 und 24 Jahren alt. Es wird davon ausgegangen, dass für die übrigen Arbeiten ein ähnlicher Altersrahmen gilt.

2.1.8.2.1 Granulozyten und Makrophagen

Lichtmikroskopisch ermittelte Referenzbereiche für den Anteil der Makrophagen an den BALC von lungengesunden erwachsenen Tieren werden im Mittel mit 48,5 bis 64,3% angegeben. Der Prozentsatz an PMN kann zwischen 1,2 und 6,2% als physiologisch erachtet werden (VIEL 1985; DIXON *et al.* 1995b). McGORUM *et al.* (1993a) legen noch strengere Kriterien an und verlangen, dass Kontrollpferde Werte von 5% PMN nicht überschreiten. Für eosinophile Granulozyten gelten Grenzen von 0-2,5% (VIEL 1985; DIXON *et al.* 1995b).

Immunphänotypische Analysen zu Normalwerten der Makrophagen- und Granulozytenanteile in der equinen BALF existieren zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Jedoch wurde bereits eine Studie zur Markierung von intravaskulären Lungenmakrophagen mit dem anti-Makrophagen-

Antikörper MAC-387 in Zusammenhang mit dem Endotoxin-induzierten Schock des Pferdes publiziert (PARBHAKAR *et al.* 2004).

2.1.8.2.2 Lymphozyten und ihre Subpopulationen

Der physiologische, lichtmikroskopisch ermittelte Lymphozytenanteil in der BALF von Pferden liegt zwischen 24,2 und 37% (VIEL 1985; McGORUM *et al.* 1993a; DIXON *et al.* 1995b). Beim Menschen kommt diese Zellart dagegen nur zu einem Anteil von 10 bis 15% vor (HUNNINGHAKE *et al.* 1979; SALTINI *et al.* 1991). Mit 78 bis 95% (CD5⁺) T-Lymphozyten sind sie die prozentual größte Fraktion der lymphozytären Subpopulationen in der equinen BALF (McGORUM *et al.* 1993a; BENDAHLI-AHCENE *et al.* 1995; HINES *et al.* 1996; BALSON *et al.* 1997). Davon trägt ungefähr die Hälfte den CD8 Rezeptor (CD8⁺), und je nach Studie ist im Mittel mit 33,3 bis 58% CD4⁺ Zellen zu rechnen (McGORUM *et al.* 1993a; HINES *et al.* 1996; BALSON *et al.* 1997). Lediglich BENDAHLI-AHCENE *et al.* (1995) geben mit 73,6% einen höheren Prozentsatz an. Diese Untersucher unterscheiden sich auch bezüglich der B-Lymphozyten, für die ein Durchschnitt von 21,3% als physiologisch angesehen wird. Bei den übrigen Autoren liegen die Anteile für B-Zellen deutlich niedriger bei Werten zwischen 2 und 6%.

Ein Vergleich der Lymphozytensubpopulationen zwischen dem peripheren Blut und der BALF von Pferden ergibt, ebenso wie beim Menschen, signifikante Unterschiede. Lediglich 65,1 bis 74,9% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sind positiv für CD5. Die Anteile der CD4⁺ Lymphozyten schwanken von 55,5 bis 62%, und die CD8⁺ Zellen liegen mit 11,5 bis 32,1% deutlich niedriger als in der BALF. Im Gegensatz dazu ist der Prozentsatz der B-Lymphozyten mit 23 bis 30% im peripheren Blut höher als im Bronchialgewebe (McGORUM *et al.* 1993a; BENDAHLI-AHCENE *et al.* 1995; HINES *et al.* 1996).

2.1.8.3 Charakterisierung von BALC mittels Oberflächen-Antigenen

Im Zusammenhang mit der Rhodokokkose des Fohlens oder der COB adulter Pferde wurden bereits mehrfach durchflusszytometrisch Lymphozytensubpopulationen aus der equinen BALF charakterisiert (McGORUM *et al.* 1993a; BENDAHLI-AHCENE *et al.* 1995; HINES *et al.* 1996; BALSON *et al.* 1997; KLEIBER 2000). Marker gegen Moleküle auf equinen Makrophagen und Granulozyten, die einige Autoren auf Blut- bzw. intravaskulären Lungenzellen bereits verwendeten (KYDD *et al.* 1994; BRODERSEN *et al.* 1998; PARBHAKAR *et al.* 2004), wurden an BALC noch nicht eingesetzt. Somit fehlt bisher eine

immunphänotypische Absicherung der morphologischen Identifizierung von Makrophagen und Granulozyten aus der BALF im Durchflusszytometer.

Wo möglich, beschränken sich die Angaben zu den in der vorliegenden Arbeit markierten Antigenen auf equine Zellen. Liegen spezifische Daten für das Pferd nicht vor, erfolgt eine Beschreibung der Situation bei umfassender erforschten Tierspezies oder dem Menschen.

2.1.8.3.1 CD2

Auf der Grundlage von Klonierung und Gensequenzierung konnte das CD2 Molekül des Pferdes als Ortholog zum humanen Oberflächenmarker auf T-Zellen identifiziert werden. Es stellt ein Protein aus 347 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 58 kDa dar, zeigt 50-65% Identität mit den entsprechenden Rezeptoren von Mensch, Ratte bzw. Maus und besitzt dabei die größte Ähnlichkeit mit dem humanen Molekül (TAVERNOR *et al.* 1994; TUMAS *et al.* 1994). Im Gegensatz zur Maus, bei der es auch auf B-Zellen vorkommt, ähnelt die Lokalisation des equinen CD2 (eqCD2) der des Menschen (BARCLAY *et al.* 1993). Immunhistochemisch (KYDD *et al.* 1994) und durchflusszytometrisch (LUNN *et al.* 1998) wurde bestätigt, dass es beim Pferd auf der größten Mehrheit der T-Lymphozyten exprimiert wird. Funktionell gesehen ist das humane CD2-Antigen ein Zelladhäsionsmolekül, das an der Interaktion von naiven T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen bzw. T-Effektorzellen und deren Zielzellen beteiligt ist. Im erstgenannten Fall findet eine direkte Wechselwirkung mit dem so genannten Lymphocyte Function-associated Antigen (LFA)-3-Molekül statt (SELVARAJ *et al.* 1987; DAVIS *et al.* 1996).

2.1.8.3.2 CD4

Analog zum Menschen wird das CD4-Antigen des Pferdes, das ein Molekulargewicht von 58 kDa besitzt, auf einer Subpopulation der T-Lymphozyten sowohl im peripheren Blut als auch in lymphatischen Geweben exprimiert (KYDD *et al.* 1994; LUNN *et al.* 1991; LUNN *et al.* 1998). Während im Thymus CD4⁺/8⁺ Zellen vorhanden sind, stellen sich ausgereifte T-Lymphozyten im peripheren Blut nicht doppelt positiv dar. Dort tragen etwa 80 bis 90% der equinen T-Zellen den CD4-Rezeptor (LUNN *et al.* 1991). Als Subpopulation der T-Zellen sind bei Doppelfärbungen CD4⁺ Zellen auch positiv für CD5 (LUNN *et al.* 1991). Das CD4 Molekül besitzt als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors eine entscheidende Funktion in der Erkennung spezifischer Antigene (s. Kap. 2.1.5, S. 6 ff.).

2.1.8.3.3 CD5

Wie bei anderen Tierarten wird dieses Antigen beim Pferd als ein Pan-Marker von T-Lymphozyten angesehen. Auch das Gewicht des Oberflächenmoleküls ist mit 67 kDa ähnlich wie bei anderen Spezies (LUNN *et al.* 1991; BLANCHARD-CHANNELL *et al.* 1994). Die Aufgabe des CD5-Antigens wird beim Menschen in der Regulation der Ansprechbarkeit der Zellen auf IL-1 gesehen (NISHIMURA *et al.* 1988). Sein natürlicher Ligand ist das CD72 Oberflächen-Protein auf B-Lymphozyten (DeFRANCO 1991, VAN DE VELDE *et al.* 1991).

Laut KYDD *et al.* (1994) und LUNN *et al.* (1998) wird das equine CD5-Molekül im Gegensatz zum Menschen nicht auf peripheren B-Zellen exprimiert. Andere Autoren bescheinigen dagegen bis zu 5% der equinen B-Lymphozyten eine Expression von eqCD5 (BLANCHARD-CHANNELL *et al.* 1994). Das entsprechende Antigen kommt bei 10 bis 25% der B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Menschen vor. In der fetalen Milz und in Nabelschnurblut werden noch deutlich höhere Prozentsätze erreicht (KIPPS 1989). CD5⁺ B-Lymphozyten, die auch als B-1-Zellen bezeichnet werden, entstehen in einer frühen Entwicklungsphase und unterscheidet sich in einigen Punkten von gewöhnlichen B-Zellen. Beispielsweise sind sie in der Lage, ohne Unterstützung von T-Zellen Antikörper der IgM-Klasse zu produzieren (MARTIN und KEARNEY 2001). Da die antigenspezifische Wechselwirkung mit T-Zellen in diesem Fall nicht stattfindet, unterbleibt die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Somit ist das Spektrum von Spezifität und Wirksamkeit der B-1-Zellen, die hauptsächlich im Bereich von Körperhöhlen aktiv sind, begrenzt (JANEWAY und TRAVERS 2002).

2.1.8.3.4 CD8

Analog zur Situation beim Menschen werden equine CD8⁺ Zellen als Subpopulation von T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) angesehen. Immunpräzipitationsversuche zeigten, dass es sich bei dem CD8 Molekül des Pferdes (eqCD8) um ein Heterodimer handelt, das durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten wird. Die Molekulargewichte der beiden Ketten betragen 32 und 39 kDa (KYDD *et al.* 1994). Nach durchflusszytometrischen Untersuchungen sind im peripheren Blut ca. 18% der T-Zellen Träger des eqCD8 (LUNN *et al.* 1991). Es ist zudem bekannt, dass ein Teil der equinen $\gamma\delta$ -T-Zellen das CD8 Molekül exprimiert (TSCHETTER *et al.* 1998). Angaben zum genauen Prozentsatz und zur Verteilung dieser Zellen im Gewebe fehlen jedoch.

(Zur Funktion der CD8⁺ Lymphozyten s. Kap.2.1.5, S. 6 ff.)

2.1.8.3.5 CD9

Das CD9-Antigen, das ein Molekulargewicht von 24 kDa aufweist, wird physiologischerweise von verschiedenen humanen Zellarten exprimiert. Dazu gehören im Blut so genannte Prä-B-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten. Zusätzlich ist das Molekül auf Blutplättchen und aktivierten T-Zellen zu finden. Das Vorkommen von CD9 auf Monozyten wird auf anheftende Thrombozytenfragmente zurückgeführt. Im Gewebe liegt der Rezeptor sowohl auf Gehirn- und peripheren Nervenzellen als auch in der glatten Gefäßmuskulatur vor (BOUCHEIX *et al.* 1991; JANEWAY und TRAVERS 2002). Zusammen mit anderen Transmembran-Proteinen gehört das CD9-Antigen zur Familie der Tetraspanine. Es spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Fusionen, beispielsweise im Rahmen der Fortpflanzung (MIYADO *et al.* 2000).

Mit einem humanen Antikörper gegen CD9 (MCA 469S) konnten 20 bis 30% der Lymphozyten, 40 bis 60% der Monozyten und zwischen 90 und 100% der Granulozyten aus dem peripheren Blut von Pferden markiert werden (BRODERSEN *et al.* 1998).

2.1.8.3.6 CD13

Beim Menschen ist das CD13-Antigen, das ein molekulares Gewicht von 150 kDa besitzt und als Aminopeptidase-N identifiziert wurde, auf allen Granulozyten und Blut-Monozyten präsent. Zusätzlich kommt es im Dünndarm und im Epithel des proximalen Nierentubulus vor. Durch Versuche mit monoklonalen Antikörpern wurde unter Berücksichtigung seiner Verteilung und dem Molekulargewicht ein dem menschlichen CD13 homologes Antigen beim Pferd (eqCD13) identifiziert (KYDD *et al.* 1994).

2.1.8.3.7 B-Zell-Marker

Im Verlauf des ersten und zweiten internationalen Workshops über equine Leukozyten-Antigene wurden mehrere Antikörper zur Markierung von B-Lymphozyten beim Pferd unter einheitlichen Bedingungen getestet (KYDD *et al.* 1991; LUNN *et al.* 1994). Dabei eigneten sich beim ersten Workshop vier Antikörper (WS41, WS65, WS68 und WS81) zur Detektion von B-Zellen, wobei davon ausgegangen wird, dass sie unterschiedliche Strukturen markieren. Allerdings war es bei drei der Immunglobuline nicht sicher möglich, ihr genaues Ziel-Antigen festzulegen. Der Antikörper WS41 reagiert aber nachweislich mit löslichem IgG aus equinem Serum (KYDD *et al.* 1994). Für WS65 wird aufgrund seiner Gewebsverteilung und seines Massengewichtes angenommen, dass er das equine Homolog zum CD19-Antigen des Menschen erkennt. WS81 bindet eventuell an den CD45 Rezeptor auf B-Lymphozyten.

Die Versuche des zweiten Workshops, bei dem noch drei weitere Reagenten untersucht wurden, zeigten, dass die Antikörper WS73 und WS104 zur Präzipitation von Antigenen mit 85 und 240 kDa in der Lage waren. Für WS73 wird ebenfalls vermutet, dass er das equine Äquivalent des humanen CD19 Rezeptors markiert (ZHANG *et al.* 1994; LUNN *et al.* 1998). (Zur Funktion der B-Lymphozyten s. Kap. 2.1.5, S. 6 ff.)

2.2 Die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes

2.2.1 Definition und Allgemeines

Die equine COB besitzt in Deutschland und anderen europäischen Ländern eine herausragende Bedeutung unter den respiratorischen Erkrankungen des Pferdes (MAIR und DERKSEN 2000). Sie ist als chronische Entzündung der kleinen Atemwege definiert, die mit Hyperreagibilität und rezidivierender Obstruktion der Bronchiolen einhergeht. Ursächlich wurden schon früh Zusammenhänge mit Heustaubexposition und Stallhaltung der Tiere erkannt (LOWELL 1964). Die Leistungsfähigkeit der betroffenen Patienten wird häufig beträchtlich limitiert, und es kommt aufgrund der dauernden Unbrauchbarkeit zu einem frühzeitigen Ausscheiden der Tiere aus Sport oder anderweitiger Nutzung (GERBER 1973).

In der tierärztlichen Pferdepraxis werden heutzutage durch eine verbesserte Information der Pferdebesitzer und der daraus resultierenden Optimierung von Haltungs- und Managementbedingungen vor allem Pferde mit einer eher milden, chronisch verlaufenden Erkrankungsform vorgestellt (FEY 2005). Daneben existiert eine akute, schwere Form der COB, die vor allem im Rahmen experimenteller Studien eine Rolle spielt, bei denen durch Provokationsversuche starke Krankheitsschübe induziert werden. Diese „akuten Schübe“ der COB werden seit dem Jahr 2000 als Exazerbationen der Recurrent Airway Obstruction (RAO) bezeichnet. Sie ist laut Definition durch Umgebungswechsel oder die Gabe medikamenteller Bronchodilatoren komplett reversibel und muss sowohl mit einer hochgradigen Atemwegsobstruktion als auch mit mindestens 25% PMN in der BALF verknüpft sein (ROBINSON 2001).

2.2.2 Inzidenz

In Westeuropa und Großbritannien, wo die Stallhaltung üblich und Heu- und Strohqualität aufgrund von nassen Witterungsperioden im Frühjahr und Sommer oft mangelhaft sind, ist die COB eine der häufigsten Atemwegserkrankungen erwachsener Pferde (MAIR und DERKSEN 2000). Weltweit schwankt ihre Inzidenz aus den klimatischen Gründen deutlich. Sie wird je nach Studie mit 54% (BRACHER *et al.* 1991) bzw. 37% (WINDER *et al.* 1991) in der Schweiz angegeben und fällt bis hin zu 12% in manchen Regionen Nordamerikas (LARSON und BUSCH 1985). In einer Untersuchung an 270 Pferden mit Erkrankungen des Respirationstraktes im Vereinigten Königreich litten 16,7% der Tiere an akuten Infektionen der Atemwege. Im Gegensatz dazu wurde bei 54,8% der Patienten COB unterschiedlichen Schweregrades festgestellt (DIXON *et al.* 1995a). Im Rahmen einer Erhebung an 30

vorberichtlich lungengesunden Schweizer Sportpferden stellten GERBER *et al.* (2003) endoskopisch und über die Differentialzytologie der BALF bei 100% der Probanden mehr oder weniger starke Entzündungszeichen der unteren Atemwege fest. Somit muss auch in Deutschland damit gerechnet werden, dass neben offensichtlich kranken Tieren viele Pferde subklinisch betroffen und damit eventuell in ihrer Leistungsfähigkeit beeinträchtigt sind. In trockenen Regionen der Erde, wie beispielsweise in Kalifornien oder Australien, spielt die equine COB dagegen keine nennenswerte Rolle (ROBINSON *et al.* 1996).

2.2.3 Klinik

Die klinische Symptomatik der equinen COB ist sehr variabel und verändert sich mit den Haltungs- und Umweltbedingungen. In den meisten Fällen verschlimmern Staubbelastung, Ammoniakdämpfe, Pilzsporen und ähnliche unspezifische Reize die Atemwegsobstruktion (THOMSON und McPHERSON 1984; CLARKE 1993a; DIXON *et al.* 1995d). Aus diesen Gründen verschlechtert sich die Krankheit oft saisonal im Winter bei ausschließlicher Stallhaltung der Pferde. Andererseits können selbst schwer erkrankte Tiere bei Weidehaltung und heuloser Fütterung über lange Perioden symptomfrei sein (THOMSON und McPHERSON 1984; JACKSON *et al.* 2000). Während sie im Anfangsstadium meist nur bei Belastung auffällig wird, zeigt die COB bei vielen Patienten einen progressiven Charakter. In anderen Fällen wird aber auch von einem akuten Krankheitsbeginn berichtet (McPHERSON und THOMSON 1983). Dem Tierarzt werden die Pferde häufig wegen allgemeiner Leistungsinsuffizienz vorgestellt. Weitere Symptome sind Husten mit zuweilen anfallsartigem Charakter, mukopurulenter Nasenausfluss sowie vermehrte Anstrengung beim Atmen und dabei v. a. eine abdominale Betonung in der Expirationsphase (BEECH 1989a). Bei der klinischen Untersuchung können neben einer Erhöhung der Atemfrequenz (McPHERSON und THOMSON 1983) auskultatorisch abnormale Lungengeräusche bis hin zum Hiemen und Giemen festgestellt werden. Allerdings ist auch bei chronischem Husten nicht immer ein pathologischer Auskultationsbefund zu erheben. In fortgeschrittenen Fällen zeigt sich mittels Perkussion eventuell eine Vergrößerung des Lungenfeldes nach ventrokaudal mit überlauten Schallbezirken. Sie sind Zeichen übermäßig luftgefüllter Alveolen (Hyperinflation) oder emphysematöser Lungenbezirke (GERBER 1973; DERKSEN 1993; BEECH 1989a).

Da die Symptomatik im Ganzen sehr unspezifisch und eine klinische Diagnose häufig nur bei ernsthaften funktionellen Störungen sicher zu stellen ist, haben sich weiterführende Untersuchungen als unerlässlich erwiesen (DIXON *et al.* 1995c; SASSE *et al.* 1995a; SASSE 1996). Hierzu zählt die Analyse von Sauerstoff- (p_aO_2) und Kohlendioxidpartialdruck (p_aCO_2)

in einer arteriellen Blutprobe. Auf dem Höhenniveau Normalnull sollte der physiologische p_aO_2 von 100 ± 5 mmHg nicht unterschritten und ein p_aCO_2 von 40 ± 5 mmHg nicht überschritten werden (SASSE 1971). Bei Berechnung der zwischen unterschiedlichen Höhen- und Wetterlagen besser vergleichbaren Alveoloarteriellen Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($p_{(A-a)}O_2$) erreichen lungengesunde Pferde in der Regel Werte ≤ 7 mmHg (ROBINSON *et al.* 2001). Hilfreich ist zudem die tracheobronchoskopische Untersuchung. Dabei ist in der Luftröhre COB-kranker Patienten zäher, mukopurulenter Schleim in unterschiedlichen Mengen, meist in Kombination mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Schleimhautschwellung und -hyperämie zu erwarten (ROBINSON *et al.* 2001). Durch die lichtmikroskopische Differenzierung von Zellen aus der BALF, die im Zuge der Endoskopie entnommen werden kann, gelingt es in vielen Fällen, die Verdachtsdiagnose der COB abzusichern (WINDER *et al.* 1990; DIXON 1995a).

2.2.4 Ätiologie

In den meisten Publikationen zur Ursache der equinen COB wird von einer multifaktoriellen Ätiologie bzw. von einem Synergismus verschiedener Faktoren berichtet (EYRE 1972; SCHMIDT und PRIMER 1975; THEIN 1981a; EICHHORN 1989).

Laut MARTI *et al.* (1991; 2002) hängt die Manifestation der Erkrankung wie beim atopischen Asthma des Menschen (ÅBERG 1993) von einer genetischen Prädisposition ab. Als ätiologisch relevant gelten daneben die unspezifische und die spezifische bronchiale Hyperreagibilität, wobei letztere eine allergische Reaktion auf definierbare Antigene darstellt (KLEIN und DEEGEN 1986; ROBINSON *et al.* 1996). Als Reagibilität der Atemwege wird ein natürlicher Abwehrmechanismus verstanden, der das Individuum durch Verengung der Bronchien vor inhalierten Reizen schützt. Eine abnorm erhöhte Reaktionsbereitschaft entsteht in der Anfangsphase der COB beispielsweise durch Infektionen mit Bakterien, Parasiten oder epitheliotropen Viren (DEEGEN *et al.* 1987; SASSE 1995a). Durch diese Vorschädigungen, die u. a. die Zerstörung von zilientragenden Zellen und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in die Zwischenzellräume beinhalten, steigt auch die Reagibilität gegenüber unspezifisch irritierenden und bronchokonstriktorisch wirksamen Faktoren. Dies können beispielsweise mechanisch reizende Staubpartikel aus Haaren und Hautschuppen, eingetrocknetem Kot, Einstreu- oder Futterpartikeln sein (WATHES *et al.* 1983). Daneben sind chemische Stoffe (z. B. Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Kohlendioxid oder Histamin) und thermische Reize zu nennen (MAYER 1980; HALLIWELL *et al.* 1993). KLEIN und

DEEGEN (1986) beschreiben den so genannten Histamininhalationsprovokationstest zum Nachweis der unspezifischen Hyperreagibilität.

Organischer Staub aus Pferdeställen setzt sich aus über 70 verschiedenen Schimmelpilzarten, einer großen Anzahl an Milben, Bakterien, Endotoxinen und anorganischen Komponenten zusammen (CLARKE und MADELIN 1987; ZEITLER-FEICHT 1988; CLARKE 1993a; WOODS *et al.* 1993; HARTUNG 1998). Im Hinblick auf eine spezifische Hyperreagibilität besteht dieser Staub folglich aus einer Vielzahl von Antigenen, von denen eventuell etliche chronische Atemwegsentzündungen beim Pferd hervorrufen oder verschlimmern können (HALLIWELL *et al.* 1979; RADE 1996; McGORUM 1998). Für Schimmelpilze und bakterielles Endotoxin wurde zudem nachgewiesen, dass sie sich gegenseitig in ihrer Pathogenität potenzieren (PIRIE *et al.* 2001; NEVALAINEN *et al.* 2002).

In den nördlichen Teilen Großbritanniens scheinen der thermophile Aktinomyzete *Faenia rectivirgula* und der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* eine wichtige Rolle für die Hyperreagibilität der Atemwege zu spielen (McGORUM *et al.* 1993a). Außerdem gelten *Thermoactinomyces vulgaris* (PIRIE *et al.* 2002) und Gräserpollen (McPHERSON *et al.* 1979a) als potentielle Allergene. Bei Pferden mit COB wurde in der Lunge eine verstärkte antikörperabhängige Immunantwort auf Schimmelpilze festgestellt (HALLIWELL *et al.* 1993; SCHMALLENBACH *et al.* 1998). Dabei ist noch nicht geklärt, ob diese ursächlich mit der Hyperreagibilität zusammenhängt, oder ob sie lediglich als Zeichen für einen vorangegangenen Antigenkontakt zu interpretieren ist (RADE 1996; ROBINSON *et al.* 2001). Eine spezifische Hyperreagibilität sollte aber zumindest als Teil der Ursache für die COB beim Pferd angenommen werden. Weitgehend unklar ist jedoch, ob es sich um eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeit vom Typ I (SCHMALLENBACH 1997), um eine späte IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion (McGORUM *et al.* 1993b) oder um eine allergische Reaktion vom Typ III handelt (McPHERSON *et al.* 1979a; SASSE *et al.* 1985a). Außerdem wird eine gemischte Form aus Typ I und III diskutiert (HALLIWELL *et al.* 1979; McPHERSON und THOMSON 1983). In diesem Zusammenhang ist für die Maus bekannt, dass bestimmte Kohlenhydrate von *Aspergillus fumigatus* eine T_H2-Immunantwort induzieren können (YAMASHITA *et al.* 2002).

Erschwert wurde die Erforschung der immunologischen Grundlagen der equinen COB bislang durch das Fehlen spezifischer Nachweisreagenzien für equines IgE. Mit der Entwicklung rekombinanter Detektionsantikörper (WAGNER *et al.* 2003) wird es zukünftig möglich sein, die Anwesenheit dieser Immunglobulinklasse und damit die Rolle der Typ I-Hypersensitivität für diese Pferdekrankheit näher zu beleuchten (s. Kap. 2.1.6.4, S. 11).

2.2.5 Pathogenese

Bei der COB des Pferdes spielen obstruktive Atemwegsveränderungen eine entscheidende Rolle. Diese Verengung wird einerseits durch Spasmen der glatten Muskulatur von Bronchien und Bronchioli, andererseits durch die Anhäufung von übermäßig viskösem Sekret (Hyper- bzw. Dyskrinie) verursacht (ROBINSON *et al.* 1996). Über lumeneinengende Bronchialwandprozesse wie Ödematisierung und Hyperplasie des Epithels führt zudem die entzündliche Schleimhautschwellung zur Obstruktion der kleinen Atemwege (HAJER und SASSE 1980; VAN DEN INGH 1985; DERKSEN 1993). Als Charakteristikum für die equine COB sehen SCHOON und DEEGEN (1982) sowie WINDER und VON FELLEBERG (1988) eine teilweise makroskopisch erkennbare, lymphozytär infiltrierte Peribronchiolitis an.

2.2.5.1 Die Rolle der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten

Bei der Pathogenese des humanen Asthmas spielen neutrophile Granulozyten eine eher untergeordnete Rolle (KAY und CORRIGAN 1992), nur bei sehr schweren Krankheitsformen scheint eine neutrophil geprägte Entzündung beteiligt zu sein (JATAKANON *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu besitzen neutrophile Granulozyten bei der equinen COB, die dem Asthma des Menschen in einigen Punkten ähnelt, eine wichtige Bedeutung. In diversen Studien wurde nachgewiesen, dass eine exazerbierte Krankheitsphase von einem PMN-Influx in das pulmonale Gewebe und damit einer Neutrophilie in der BALF begleitet ist (DERKSEN *et al.* 1985; LARSON und BUSCH 1985; WINDER *et al.* 1991; MCGORUM und DIXON 1994; DIXON *et al.* 1995b; MOORE und COX 1996; ROBINSON *et al.* 1996; FRANCHINI *et al.* 1998; BRAZIL 1999). Die Höhe des Prozentsatzes der Neutrophilen ist dabei mit dem Grad der klinischen Symptomatik positiv korreliert (BRACHER *et al.* 1991; WINDER *et al.* 1991). Bei an COB leidenden Versuchspferden konnten nach Provokationstests mit Heu- und Strohstaub sogar Werte von über 90% ermittelt werden. Im Zuge dieser massiven prozentualen Zunahmen kam es auch zu einer Erhöhung der absoluten Neutrophilenzahlen in der Lavageflüssigkeit (MCGORUM *et al.* 1993a). Allerdings sind die von den erwähnten Autoren verwendeten Probanden nur begrenzt mit klinischen Patienten vergleichbar, die neben einer schwächeren Symptomatik auch deutlich niedrigere Anteile an PMN in ihrer BALF aufweisen (DIXON *et al.* 1995b; KLEIBER *et al.* 1999; BERENDONK 2000; FEY 2005). Selbst für hochgradig COB-krankte Patienten werden maximale Prozentsätze von mittleren $7 \pm 3,8\%$ bzw. knapp 30% neutrophile Granulozyten angegeben. Der höchste

durchschnittliche PMN-Anteil im Rahmen einer klinischen Erhebung liegt bei rund 45% (BENDALI-AHCENE *et al.* 1995) (s. Tab. 1).

Tab. 1: Angaben unterschiedlicher Autoren zum Differentialzellbild der BALF bei der COB des Pferdes

Autor <i>Anteil [%]</i>	McGorum³ <i>et al.</i> 1993a n=8	Dixon¹ <i>et al.</i> 1995b n=148	Bendali-Ahcene^{1,2} <i>et al.</i> 1995 n=7	Kleiber^{1,2} <i>et al.</i> 1999 n=4	Berendonk^{1,2} 2000 n=11	Fey¹ 2005 n=132
PMN	70,6 (10,3-97,7)	20,5 (5,5-98,0)	45,5 ±12,4	7 ±3,8	28,7 ±16,6	10,3 (5,4/15,6)
Makrophagen	13,9 (0,3-45,3)	42,0 (1,0-72,5)	27,9 ±10	k. A.	32,3 ±17,4	30,0 ±12,7
Mastzellen	1,0 (0-5,3)	2,3 (0-27,0)	6 ±5,6	k. A.	2,3 ±2,7	1,22 (0,7/2,1)
Lymphozyten	15,7 (2,0-38,7)	25,7 (0-60,3)	20,1 ±6,0	k. A.	36,5 ±17,1	55,4 ±12,7

Angegeben ist jeweils der Mittelwert in Prozent (Bandbreite) oder ±Standardabweichung bzw. *kursiv* der Median (1./3. Quartil) in %

¹ Diese Autoren verwendeten Patientengut aus den jeweiligen Kliniken

² Es wurden ausschließlich die Werte zu der am schwersten betroffenen Tiergruppe aufgeführt

³ nach experimenteller Staubinhalation

k. A.: keine Angaben

Die schädigende Wirkung der PMN besteht in ihrer Fähigkeit, reaktive Stoffe wie beispielsweise Stickstoffoxid, toxische Produkte aus Sauerstoff und unterschiedliche Proteasen freizusetzen. Zusammen mit ebenfalls sezernierten Entzündungsmediatoren können diese zumindest teilweise für die Schädigung des pulmonalen Gewebes und für die Entstehung von Lungenemphysemen bei schweren Verläufen der equinen COB verantwortlich gemacht werden. Bei emphysematösen Lungenveränderungen des Menschen spielt insbesondere das Enzym Elastase eine entscheidende Rolle (ABRAMSON *et al.* 1991). Die beiden Chemokine Interleukin-8 (IL-8) und das Makrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) sind über die chemische Anlockung der Neutrophilen an deren Emigration in die Atemwege beteiligt (FRANCHINI *et al.* 1998; MARR *et al.* 1999). Eine Untersuchung zur Expression von IL-8 und anderen Mediatoren in der BALF von Versuchspferden mit induzierbarer COB verglich den Zustand vor und nach der inhalativen Applikation eines Glukokortikoids bzw. die asymptotische Phase der Remission mit der Exazerbation. Dabei

exprimierten zu jedem Untersuchungszeitpunkt gesunde Pferde in ihrer BALF weniger mRNA für IL-8 als COB-kranke Tiere (GIGUÈRE *et al.* 2002). In einer früheren Studie konnte allerdings keine direkte Korrelation zwischen der IL-8 Konzentration in der BALF und dem Prozentsatz der Neutrophilen hergestellt werden. Die Autoren vermuteten zusätzliche Mechanismen, die für die Anlockung der PMN in die Atemwege verantwortlich sind (FRANCHINI *et al.* 2000). Im Jahre 2005 wurde eine Arbeit publiziert, aus der hervorgeht, dass bei COB-kranken Pferden in der BALF eine erhöhte Expression der mRNA für IL-17 vorliegt. Dieses Zytokin wird von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert und führt zur Reifung, Anlockung und Aktivierung von Neutrophilen (DEBRUE *et al.* 2005). Eine Bedeutung wird auch anderen Mediatoren, darunter beispielsweise dem Platelet-activating Factor (PAF), Leukotrien B₄ (LTB₄) (FOSTER *et al.* 1992; FAIRBAIRN *et al.* 1996; MARR *et al.* 1998) und Adhäsionsmolekülen (z.B. β 2-Integrin) (MARR *et al.* 1998; MARR *et al.* 1999) zugemessen. Transkriptionsfaktoren wie der Kernfaktor- κ B (NF- κ B) führen außerdem zur Überexpression von proinflammatorischen Proteinen (BUREAU *et al.* 2000). In Zusammenhang mit der Verursachung des Lungenemphysems wurden in den letzten Jahren die Matrixmetalloproteinasen (MMP) und bei der COB des Pferdes insbesondere die MMP-9 erforscht. Auf diesem Gebiet werden Ansätze für neue diagnostische und therapeutische Verfahren gesehen (RAULO *et al.* 2001).

Die häufigste Asthmaform des Menschen, das atopische Asthma, weist in Bezug auf die Reversibilität der klinischen Symptomatik und das Ansprechen auf Glukokortikoide Gemeinsamkeiten mit der equinen COB auf (ROBINSON *et al.* 1996). Die Erkrankungen ähneln sich zudem in ihrem histopathologischen Bild (SCHOON und DEEGEN 1983; WINDER und VON FELLEBERG 1988; KAUP *et al.* 1990a; b; BARNES *et al.* 1998; HOLT *et al.* 1999), so dass sich die Frage stellt, inwieweit auch auf pathogenetischer Ebene Vergleichbarkeit besteht. Als Ursache für das Asthma des Menschen gilt eine Typ-I-Hypersensitivität, die sowohl im Blutplasma als auch in der BALF durch einen vermehrten Gehalt an IgE gekennzeichnet ist. Zusätzlich kommt es im Bronchialepithel und in der BALF zu einer Ansammlung von proinflammatorischen eosinophilen Granulozyten, die in starkem Maße an der Pathogenese beteiligt sind (BOUSQUET *et al.* 1990, KAY 1991). Neben basischen Proteinen aus kristalloiden Granula, die für die Zerstörung des Schleimhautepithels verantwortlich gemacht werden, beeinflussen Botenstoffe aus der Zellmembran [z. B. der Platelet Activating Factor (PAF) und Leukotrien C₄ (LTC₄)] die Kontraktionsfähigkeit der glatten Bronchialmuskulzellen, die Permeabilität der kleinsten Gefäße und die Mukussekretion. Die Anzahl der Eosinophilen hängt mit der Schwere der Erkrankung

zusammen und eine erfolgreiche Behandlung geht in der Regel mit einer Abnahme der lokalen Eosinophilie einher (KAY und CORRIGAN 1992). Obwohl Mediatoren und Produkte der PMN auch beim Menschen die Atemwegsfunktion beeinflussen und modifizieren können, besitzen Neutrophile bei der Entstehung des atopischen Asthmas keine definierte Rolle (KAY 1992). Für Gewebeveränderungen bei anderen humanen respiratorischen Erkrankungen wie der Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) der Raucher oder der Lungenfibrose sind sie hingegen von großer Bedeutung (PRASSE und MATTHYS 2002; PRASSE und COSTABEL 2002).

Bei sechs von acht COB-kranken Pferden wurde beobachtet, dass in einer frühen Erkrankungsphase der typische Anstieg des Pleuraldrucks von einer PMN-Einwanderung in die Atemwege ohne Eosinophilie begleitet war (FAIRBAIRN *et al.* 1993). Neben einer Vielzahl von Publikationen zur Neutrophilie der BALF als Hauptbefund bei der COB des Pferdes (DERKSEN *et al.* 1985; LARSON und BUSCH 1985; WINDER *et al.* 1991; MCGORUM und DIXON 1994; DIXON *et al.* 1995b; MOORE und COX 1996; ROBINSON *et al.* 1996; FRANCHINI *et al.* 1998; BRAZIL 1999) existiert nur eine Veröffentlichung über erhöhte Prozentsätze von Eosinophilen. Bei der Untersuchung von 148 Probanden berichten DIXON *et al.* (1995b) von zwei COB-Pferden mit Anteilen von 8 bzw. 17% Eosinophilen in ihrer BALF. Entsprechend gering wird ihre Bedeutung bei der Pathogenese eingeschätzt (FAIRBAIRN *et al.* 1993; BERENDONK *et al.* 2000). Das atopische Asthma des Menschen und die equine COB können somit diesbezüglich kaum als vergleichbar gelten.

2.2.5.2 Immunphänotypisierung von BAL-Lymphozyten bei der COB des Pferdes

Es wird vermutet, dass bei Pferden, die an COB leiden eine spezifische Immunantwort entscheidend zur Pathogenese beiträgt. Neben Makrophagen sollen unterschiedliche Subpopulationen von T-Lymphozyten mit der Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen u. a. für den Neutrophilen-Influx in die kleinen Atemwege von Bedeutung sein. Zudem werden sie über die Ausschüttung von Lymphokinen und anderen Mediatoren bzw. entsprechende Folgereaktionen nach einem Antigen-Kontakt für typische pathologische Veränderungen verantwortlich gemacht. Weiterhin wird diskutiert, inwieweit B-Lymphozyten mit der Produktion von Antikörpern einen pathogenetischen Beitrag leisten (ROBINSON *et al.* 1996; MCGORUM *et al.* 1993a).

MCGORUM *et al.* (1993b) verglichen Lymphozyten-Subpopulationen in peripherem Blut und BALF bei lungengesunden und COB-kranken Versuchspferden. In der asymptomatischen Phase konnte in der BALF kranker Tiere ein größerer Anteil an B-Zellen und ein geringerer

Prozentsatz an CD5⁺, aber CD8⁻ Zellen als bei den Gesunden festgestellt werden. Dabei werteten die Autoren die letztgenannten als CD4⁺ Lymphozyten. Kranke Pferde wiesen nach der Krankheitsinduktion einen höheren Prozentsatz an CD5⁺/CD8⁻ Lymphozyten als die Kontrollen auf, und es kam zu einer Abnahme des Anteils der CD8⁺ Zellen (s. Tab. 2). Diese Befunde decken sich mit dem humanen Asthma (METZGER *et al.* 1987; GERBLICH *et al.* 1991) und werden als selektive Einwanderung von (aktivierten) T-Helferzellen ins Lungengewebe nach Allergenexposition interpretiert (McGORUM *et al.* 1993a). Auch RAILTON (1994) aus derselben Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluss, dass eine exazerbierte Krankheitsform von einem prozentualen Anstieg der CD4⁺ Subpopulation in der BALF begleitet ist (s. Tab. 2, S. 30). Wie McGORUM *et al.* (1993a) vermutet er eine zusätzliche Beteiligung von B-Lymphozyten an der Pathogenese der equinen COB, da in dem untersuchten Krankheitsstadium erhöhte Anteile dieser Zellart festzustellen waren. WATSON *et al.* wiesen auf Lymphozyten aus peripherem Blut und BALF von Kontrolltieren und kranken Versuchspferden die Antigene CD3, CD4 und CD8 bzw. B-Zellen nach. Die Provokation der Krankheitssymptome erfolgte durch eine vierzehntägige Periode in staubigen Ställen. Für den Prozentsatz der T-Zellen (CD3⁺) an Lymphozyten in der BALF geben die Autoren Werte von 70 bis 92% an. Bei 16 von 18 Proben war der Anteil der CD8⁺ Zellen größer als derjenige der T-Helferzellen, so dass ein umgekehrtes Verhältnis zum peripheren Blut vorlag. In allen Fällen wurde, in Übereinstimmung mit RAILTON (1994), nach der Aufstallung ein erhöhter Prozentsatz an B-Lymphozyten ermittelt. Dagegen erwies sich der Anteil der CD4⁺ Zellen nach der Provokation als signifikant erniedrigt. Allerdings wurden diese Effekte sowohl in der Gruppe der kranken als auch der lungengesunden Tiere beobachtet (WATSON *et al.* 1997). RUSH *et al.* (1998) führten an BALC neben differentialzytologischen Untersuchungen auch eine Phänotypisierung von Lymphozytensubpopulationen durch, um den Einfluss von Kortikosteroiden zu überprüfen. Dabei wurden über sieben Tage Glukokortikoide in Aerosolform bzw. parenteral an COB-kranke Versuchspferde appliziert und die Wirkung auf zellulärer Ebene miteinander verglichen. Eine Kontrollgruppe kranker Tiere erhielt aerosolisiertes Treibmittel als Placebo. Zur Krankheitsinduktion wurden die Pferde über sieben Tage schimmeligem Heu und Stroh ausgesetzt. Am 7. und 14. Tag nach Behandlungsbeginn war bei den Kontrolltieren ein höherer Anteil an CD4⁺ und B-Lymphozyten zu ermitteln als bei den beiden anderen Gruppen (RUSH *et al.* 1998).

Die drei im Folgenden zitierten Autoren (BENDALI-AHCENE *et al.* 1995; KLEIBER *et al.* 1999; BERENDONK 2000) arbeiteten mit Pferden, die aufgrund von COB unterschiedlichen

Schweregrades in den entsprechenden Kliniken vorgestellt und keiner experimentellen Krankheitsinduktion ausgesetzt wurden. Es handelte sich folglich um „normale“ Patienten, die sich in den meisten Fällen nicht in einer akut exazerbierten Krankheitsphase, sondern in einem mehr oder weniger ausgeprägten chronischen Stadium befinden. Im Jahre 1995 publizierten BENDALI-AHCENE *et al.* eine Studie, die u. a. die durchflusszytometrische Charakterisierung von Lymphozyten aus der BALF von zehn COB-kranken Patienten umfasste. Sowohl die Anzahl als auch der relative Anteil aller T-Zellen ($CD5^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$) waren im Vergleich zu einer lungengesunden Kontrollgruppe vermindert (s. Tab. 2, folgende Seite). Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass ein Anstieg aktivierter Helferzellen für die Pathogenese der equinen COB von Bedeutung sein könnte. Es geht allerdings aus der Veröffentlichung nicht hervor, ob die Kontrolldaten der gesunden Tiere im Verlauf derselben Studie gewonnen wurden oder ob sie früheren Untersuchungen von VRINS *et al.* (1988) entstammen. Die Autoren heben sich auch hinsichtlich des physiologischen Anteils der B-Lymphozyten in der BALF stark von den anderen Untersuchern ab. Während in der Regel zum Nachweis von B-Zellen der Antikörper WS81 verwendet wurde (McGORUM *et al.* 1993; HINES *et al.* 1996; BALSON *et al.* 1997), färbten BENDALI-AHCENE *et al.* (1995) und BERENDONK (2000) B-Zellen mit Hilfe polyklonaler Antikörper an. In einer Arbeit von KLEIBER wurden Detektionsantikörper gegen CD3, CD4, CD5, CD8, MHC I und II verwendet, um T-Zell-Subpopulationen in der BALF von COB-Patienten näher zu charakterisieren. Die Autoren teilten 25 Pferde in verschiedene Krankheitsgrade ein, die miteinander verglichen wurden: gesunde, subklinisch bis leicht erkrankte, mittelgradig und hochgradig kranke Tiere. Für alle Patienten machten T-Lymphozyten ($CD3^+$) den größten Teil der analysierten Lymphozyten in ähnlichen Prozentsätzen aus. Im Vergleich mit den Kontrolltieren hatten die hochgradig kranken Tiere zwar eine erhöhte absolute Anzahl an $CD4^+$ Zellen in der BALF, ihr Prozentsatz war zwischen den beiden Gruppen allerdings vergleichbar. Pferde mit einer gering- bzw. mittelgradigen COB besaßen im Unterschied zu den lungengesunden Tieren erniedrigte Anteile dieser Subpopulation. In allen Gruppen mit kranken Probanden waren der Prozentsatz und die absolute Anzahl der $CD8^+$ Zellen und der Prozentsatz an $CD8^+/MHC II^+$ Zellen erhöht. Außerdem konnten für diese beiden Subpopulationen positive Korrelationen mit dem Krankheitsstadium ermittelt werden, so dass eventuell nicht nur $CD4^+$ Lymphozyten, sondern auch zytotoxische T-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese der equinen COB spielen (KLEIBER *et al.* 1999). Untersuchungen von BERENDONK (2000), bei denen die Autorin klinische Patienten ($n=27$) in drei verschiedenen Erkrankungsstadien miteinander verglich, ergaben zwischen den

Schweregraden der COB bei der Phänotypisierung der Lymphozyten weder für CD4⁺ noch für CD8⁺ Zellen signifikante Unterschiede.

Tab. 2: Anteile der Lymphozytensubpopulationen in der BALF lungengesunder adulter Kontrolltiere und COB-kranker Pferde

Autor		Tierzahl	B-Zellen	CD5 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
McGorum et al. (1993a) ¹	<i>gesunde Pferde</i>	6	4,7% (2,4-5,6%)	95,3% (94,4-97,6%)	43,9% (20-58%)	51,4% (48-63%)
	<i>COB-kranke</i>	6	signifikant höher	keine Veränderung	signifikant höher	signifikant niedriger
Railton (1994)	<i>gesunde Pferde</i>	6	2,2% (0,9-12,2%)	82,5% (54,1-95,6%)	15,0% (2,2-31,9%)	46,5% (39,6-59,9%)
	<i>COB-kranke</i>	6	7,7% (2,5-14,4%)	82,2% (56,6-99,2%)	26,8% (11,4-39,9%)	42,0% (33,9-45,8%)
Bendahli-Ahcene et al. (1995)	<i>gesunde Pferde</i>	? ²	21,3%	92,2%	73,6%	47,7%
	<i>mgr. COB</i>	3	12,9% (±1,7%)	57,3% (±8,4%)	39,6% (±9,1%)	35,6% (±9,8%)
	<i>hgr. COB</i>	7	32,2% (±8,0)	49,3% (±13,0%)	38,2% (±12,5%)	35,0% (±10,5%)

Angegeben ist jeweils der Mittelwert (Bandbreite) bzw. ±Standardabweichung in %

¹ McGORUM *et al.* (1993a) werteten CD5⁺/CD8⁻ Zellen als CD4⁺

² Die Quelle der Daten für die Kontrolltiere bleibt unklar

mgr.: mittelgradig; hgr.: hochgradig

2.2.5.3 T_H1-/T_H2-Hypothese in Bezug auf die equine COB

T-Helferzellen sind in der Lage, zwei unterschiedliche Zytokinmuster hervorzubringen. Für den Menschen wurde bereits nachgewiesen, dass auch zytotoxische T-Lymphozyten dazu befähigt sind. Die von MOSMANN *et al.* (1986) erstmals am murinen Modell beschriebene Unterteilung in T_H1- und T_H2-Helferzellen findet anhand der Expression unterschiedlicher, gegenläufiger Zytokinprofile statt (MOSMANN *et al.* 1986; MOSMANN und COFFMAN 1989; MOSMANN *et al.* 1991; MOSMANN und SAD 1996; PRUSSIN 1997; MURAILLE und LEO 1998). In weniger distinktem Maße gilt dies auch für humane Helferzellen (ROTTEVEEL *et al.* 1988). Für andere Tierarten, u. a. das Rind, ist eine Trennung zwischen den beiden Mustern anscheinend nicht möglich, da sie gemischt auftreten (BROWN *et al.* 1998; ESTES *et al.* 2002). Zu welcher Gruppe die Spezies Pferd gerechnet werden muss, ist bisher noch nicht entschieden.

Beim T_{H1} -Zytokinmuster werden von den Helferzellen IL-2, IFN- γ und TNF- β produziert. In der Folge kommt es zu einer Limitierung der B-Zell-Antwort auf Antikörper des IgG2a Isotyps. Dieses Profil steht mit der Bekämpfung von intrazellulären Infektionen bzw. mit der Hypersensitivität vom verzögerten Typ in Zusammenhang. Im Gegensatz dazu bilden T_{H2} -Zellen Mediatoren wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Dieses Zytokinprofil zieht eine Deaktivierung von Makrophagen, eine Aktivierung von Mastzellen und die Produktion von IgG1 und IgE Antikörpern nach sich und wird daher mit der Hypersensitivität vom Typ I assoziiert (HUNTER und REINER 2000; PALLISER *et al.* 1998; MOSMANN *et al.* 1986). In den Atemwegen von Menschen mit atopischem Asthma herrschen, im Gegensatz zu anderen obstruktiven Lungenerkrankungen, Lymphozyten mit einem Typ 2 Zytokinprofil vor. Dabei handelt es sich zum größten Teil um $CD4^+$ T_{H2} -Lymphozyten, die IL-3, IL-5, IL-13 und Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) bilden. Daneben sind auch $CD8^+$ T_C2 -Lymphozyten an der Produktion dieser Mediatoren beteiligt. In der Folge wird durch die Zytokine z. B. eine Hyperreagibilität der Atemwege vermittelt. Außerdem werden eosinophile Granulozyten mobilisiert bzw. aktiviert, die zu Gewebeschäden in der betroffenen Schleimhaut beitragen. Zusätzlich kommt es zur Bildung von IL-4, das zusammen mit IL-13 als Co-Faktor für die lokale und systemische Bildung von IgE-Antikörpern durch B-Lymphozyten gilt (LARCHE *et al.* 2003). Diese führen zu einer IgE-abhängigen Mastzellen-Aktivierung (DURHAM *et al.* 2000). Aktivierte T-Zellen vermitteln somit beim allergischen Asthma des Menschen die eosinophile Gewebsentzündung. In der BALF von Erkrankten konnten zwischen IL-5-Spiegeln, der Anzahl der Eosinophilen und den aktivierten T-Zellen signifikante Korrelationen nachgewiesen werden (VIRCHOW 1995).

Von unterschiedlichen Autoren wurden pathogenetische Gemeinsamkeiten der equinen COB mit dem Asthma des Menschen im Hinblick auf den Allergie- bzw. Entzündungstyp anhand entsprechender Entzündungsmediatoren u. a. in BALF untersucht (BERENDONK 2000; LAVOIE *et al.* 2001; GIGUÈRE *et al.* 2002; AINSWORTH *et al.* 2003; CORDEAU *et al.* 2004; HOROHOV *et al.* 2005; KLEIBER *et al.* 2005). Dabei konnte bei den Erkrankten im Vergleich mit Kontrolltieren nach Heu- und Strohexposition eine erhöhte Expression der mRNA sowohl für IL-4 als auch für IL-5 festgestellt werden. Außerdem war die Expression für IFN- γ erniedrigt, so dass anhand dieser Ergebnisse auch für das Pferd ein typisches T_{H2} -Profil propagiert wird, das vergleichbar mit demjenigen beim humanen Asthma ist (LAVOIE *et al.* 2001). GIGUÈRE *et al.* (2002) führten eine Therapiestudie zur Expression von u. a. IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ in der BALF bei Pferden mit induzierbarer COB und bei Gesunden durch. Es wurde neben dem Zustand vor und nach der inhalativen Applikation

eines Glukokortikoids außerdem die Remission mit dem exazerbierten Krankheitsstadium verglichen. Der Nachweis von mRNA für IL-2, IL-5 oder IL-10 gelang bei keinem der untersuchten Tiere. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte aber eine erhöhte Expression der mRNA sowohl für IL-4 als auch für IFN- γ bei den kranken Pferden festgestellt werden. In der Exazerbation hatte die Verabreichung des Kortikosteroids neben dem vollständigen Verschwinden der klinischen Symptome eine Normalisierung der Lungenfunktionswerte und der PMN-Anteile in der BALF zur Folge. Zusätzlich wurde signifikant weniger mRNA für IL-4 exprimiert und das Verhältnis von IFN- γ zu IL-4 stieg an. Die Therapie mit Glukokortikoiden scheint demnach beim Pferd eine möglicherweise vorhandene T_H2-Antwort zu reduzieren und ein T_H1-geprägtes Zytokinmuster zu fördern. VAN DEN HOVEN *et al.* (2004) untersuchten die Einflüsse des in der COB Therapie häufig verwendeten Clenbuterols auf die Zytokinexpression in der BALF. Trotz einer durchschnittlichen Abnahme der mRNA Expression für IFN- γ bestanden bei drei von acht Versuchspferden über einen Anstieg von IFN- γ Hinweise, dass auch dieser β_2 -Agonist ein T_H1-Profil begünstigen kann, und dass möglicherweise eine übermäßige oder unkontrollierte T_H2-Aktivität eine pathogenetische Rolle für die Erkrankung spielt. Eine im Jahr 2003 veröffentlichte Studie kommt dagegen zu dem Schluss, dass das Zytokinprofil in der BALF von COB-kranken Pferden kein T_H2-Muster widerspiegelt. Die Autoren analysierten die Expression von u. a. IL-4, IL-13 und IFN- γ bei Kontrolltieren und COB-kranken Probanden in einer asymptomatischen Erkrankungsphase und 24 Stunden (akut) bzw. 5 Wochen (chronisch) nach Beginn einer Staubexposition. Dabei zeigten sie einerseits, dass die Tiere in einem symptomfreien Stadium im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um die Hälfte verringerte Expression von IL-13 aufwiesen, andererseits waren in der chronischen Phase der Erkrankung die mRNA-Spiegel für IFN- γ in der Gruppe der Kranken 2,5-mal höher. Dies kann als Hinweis für ein T_H1-Zytokinprofil in der genannten Krankheitsphase gewertet werden (AINSWORTH *et al.* 2003). Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von LAVOIE untersuchten bei Pferden mit COB die mRNA-Expression der Lymphozyten aus der BALF für IL-4, IL-5 und IFN- γ nach 24 Stunden und nach 9 Tagen inhalativer Staubprovokation. Sie konnten im Vergleich mit lungengesunden Kontrollpferden einen Anstieg der mRNA für IL-4 und IL-5 beobachten. Diese Veränderungen waren nach 9 tägiger Provokation noch verstärkt und außerdem von einer Abnahme der mRNA Expression für IFN- γ begleitet. Diese Ergebnisse wurden wiederum als Indiz für das Vorherrschen eines T_H2-Zytokinprofils in der Exazerbationsphase der equinen COB gedeutet (CORDEAU *et al.* 2004). Nach einer Separation von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten nahmen KLEIBER *et al.* eine Quantifikation der mRNA Expression für IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ aus peripherem

Blut und BALF vor. Dabei waren provozierte Krankheitsschübe zwar von einer Neutrophilie und absoluten Lymphozytose in der BALF, nicht aber von einer signifikanten Zunahme eines bestimmten T_H1 - oder T_H2 -Zytokins begleitet. Obwohl bei der equinen COB von einer überschießenden Immunreaktion ausgegangen wird, wurde in der Gruppe der erkrankten Tiere eine geringere mRNA-Expression für alle untersuchten Zytokine sowohl im peripheren Blut als auch in BALF beobachtet. Die Autoren vermuten, dass die Zytokin-Expression eventuell nicht auf der Stufe der Transkription reguliert wird, sondern dass posttranskriptionelle Prozesse eine Rolle spielen, die auch die divergierenden Ergebnisse der übrigen Untersucher erklären könnten. Als Absicherung für die PCR, die lediglich stellvertretend für die Protein-Expression angesehen werden kann, wird ein direkter Nachweis der Zytokine gefordert (KLEIBER *et al.* 2005). Die Arbeit von BERENDONK (2000), die die bislang einzige Untersuchung an klinischem Patientengut darstellt, ergab im Vergleich zwischen drei unterschiedlich schwer erkrankten Tiergruppen keine deutlichen Unterschiede im Zytokinmuster. Es wurde in den Proben mit BALC und PBMC mRNA für IL-4 am häufigsten exprimiert. Viele Ansätze enthielten jedoch gleichzeitig mRNA für IFN- γ . Diese Befunde wurden dementsprechend als gemischte T_H1/T_H2 -Zytokinantwort interpretiert.

Somit existieren in der aktuellen Literatur Hinweise sowohl für die Beteiligung einer T_H2 - als auch T_H1 -Antwort bzw. für einen gemischten Typ bei der Pathogenese der COB des Pferdes. Im Gegensatz zum humanen Asthma ist die Situation für diese Spezies zum heutigen Zeitpunkt widersprüchlich. Bis auf die Arbeit von BERENDONK (2000) wurden alle Arbeiten an Pferden durchgeführt, bei denen exazerbierte COB-Schübe experimentell durch Staubinhalation provoziert wurden. Es ist demnach unklar, inwieweit diese Daten auch für gering- bis mittelgradig erkrankte Patienten gelten können, die dem Tierarzt in der täglichen Praxis deutlich häufiger vorgestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungen an den Probanden

3.1.1 Pferde

Es wurden im Zeitraum von Februar 2003 bis April 2004 insgesamt 48 Tiere untersucht. Davon wiesen 46 unterschiedliche Schweregrade einer Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) auf. In der statistischen Analyse sollten Zusammenhänge zwischen den durchflusszytometrisch erhobenen Parametern und Messdaten aus der Routinediagnostik ermittelt werden. Daher wurden zudem zwei lungengesunde Pferde eingeschlossen. Beim Probandengut handelte es sich um 28 Wallache, 18 Stuten, einen Hengst und einen Kryptorchiden. 31 Tiere gehörten der Rasse der Warmblutpferde an und 12 waren Kleinpferde, darunter sieben Isländer. Außerdem wurden zwei Tinker, ein Kaltblüter, ein Reitpony und ein Vollblutaraber in die Studie mit aufgenommen. Das mittlere Alter der Pferde lag bei 11,9 ($\pm 5,2$) Jahren.

Bei 15 COB-Patienten wurde eine medikamentelle Kombinationstherapie durchgeführt (s. Kap. 3.1.6, S. 39 f.). Außerdem wurden vergleichend sieben Probanden untersucht, die mit Laserakupunktur behandelt wurden (s. Kap. 3.1.7, S. 40).

Alle 48 Pferde durchliefen die Erstuntersuchung. Bei den 22 stationär behandelten Tieren erfolgte ein zweiter Untersuchungsblock nach der Therapiephase.

3.1.2 Zeitpunkte der Untersuchungsblöcke/Probenahmen

Die Erstuntersuchung umfasste eine ausführliche klinische Untersuchung mit besonderer Berücksichtigung des Respirationstraktes inklusive arterieller Blutgasanalyse und Entnahme einer venösen Blutprobe und einer Tracheobronchoskopie. Dieser Untersuchungsblock wurde bei insgesamt 16 Pferden am Tag der Vorstellung durchgeführt, zudem erfolgte bei ihnen zu diesem Zeitpunkt eine bronchoalveoläre Lavage (BAL). Bei zehn Patienten wurde am Tag nach der Erstuntersuchung einmalig bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) entnommen. Die 22 COB-Patienten, deren Besitzer einer stationären Therapie zustimmten, wurden in die Boxen der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen eingestellt. Jeweils ein Untersuchungsblock inklusive Probenentnahme wurde am 1. Tag nach der Aufstallung und am 7. Tag der Therapie durchgeführt, so dass ein Vergleich der Daten vor und nach der entsprechenden Behandlung stattfinden konnte.

3.1.3 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung aller Pferde wurde zunächst mit einer sorgfältigen Befragung der Besitzer nach der Vorgeschichte des Pferdes begonnen. Bei der Anamnese wurde insbesondere auf die Krankheitsdauer und zu Hause beobachtete Symptome wie Leistungsabfall, Nasenausfluss (Konsistenz, Menge, Farbe), Husten (seit wann, Häufigkeit, Charakter, Anlass) und pumpende Atmung bzw. Dyspnoe geachtet. Weiterhin wurde der genaue Impf- bzw. Entwurmungsstatus erhoben und die Haltung und Aufstallung inklusive der Art der Einstreu und des Fütterungsmanagements sowie eine eventuelle Vorbehandlung erfragt.

Die körperliche Untersuchung der Patienten erfolgte zunächst in Ruhe und umfasste die Messung der Körperinnentemperatur, der Puls- und der Atemfrequenz. Bei der speziellen klinischen Untersuchung lag das Hauptaugenmerk auf dem Herz-Kreislaufsystem und dem Respirationstrakt. Es wurde die Qualität der Atemtätigkeit beurteilt und der Atemtyp bestimmt, wobei besonders auf die Ausbildung einer Dampf Rinne geachtet wurde. Außerdem wurde beobachtet, ob die Pferde Nasenausfluss zeigten und ob eine Depigmentierung der Nasenschleimhaut (Sekre Rinne) sichtbar war. Es wurde auf spontanen Husten geachtet und zudem versucht, durch Druck auf die erste Trachealspange Husten auszulösen. Neben ihrer Anzahl wurde vor allem auch die Qualität eventueller Hustenstöße beurteilt. Nach einer sorgfältigen Auskultation von Kehlkopf, Trachea und Lunge wurde die arterielle Blutprobe entnommen (s. Kap. 3.1.4, S. 38 f.). Alle Probanden wurden dann entsprechend ihrer Kondition und ihres Ausbildungsstandes ca. 15 min. im Trab und, sofern möglich, auch im Galopp bewegt (meistens an der Longe, Einzelfälle unter dem Reiter oder im Freilauf in der Bahn). Sofort nach der Belastung erfolgte eine erneute Auskultation der unteren und oberen Atemwege und nach einer kurzen Wiederberuhigungsphase die Tracheobronchoskopie. Bei dieser wurden Nasengänge, Rachenraum, Kehlkopf, Trachea und schließlich die Aufzweigung der Luftröhre in ihre beiden Hauptbronchien (*Bifurcatio tracheae*) beurteilt.

Die Pferde wurden bezüglich der klinischen Untersuchung anhand des in der Klinik üblichen Scores eingeteilt, bei dem durch Addition maximal 11 Punkte zu erreichen waren (s. Tab. 3).

Tab. 3: Klinikscore zur Punkteverteilung bezüglich Vorbericht und klinischer Untersuchung

Parameter	Score-Punkte	Erläuterung
<i>Husten</i>	0	Keiner
	1	Vorberichtlich selten
	2	Vorberichtlich mehrmals täglich
	3	Spontan bei Untersuchung bzw. anamnestisch anfallsweise
<i>Dyspnoe</i>	0	Keine angestrengte Atmung
	1	Endexpiratorisch ggr. vermehrt sichtbare Bauchpresse
	2	Expiratorisch deutlich sichtbare Bauchpresse
	3	Auffällig angestrengte Atmung
	4	Höchstgradige Atemnot
<i>Lungenauscultation</i>	0	Physiologisch (inspiratorisch vesikulär)
	1	Ggr. verschärftes inspiratorisches Atemgeräusch
	2	Verschärft inspiratorische und leise expiratorische Atemgeräusche
	3	Rauhe in- und expiratorische Atemgeräusche und/oder tracheale Rasselgeräusche
	4	Hiemen, Giemen und/oder Rasselgeräusche über dem Lungenfeld

Auch die Beurteilung der Tracheobronchoskopie erfolgte nach einem Score-System (s. Tab. 4, folgende Seite). Hier konnten durch Addition maximal 10 Punkte erreicht werden. Bei lediglich vereinzelt Schleimflocken in den Atemwegen wurde die Sekretviskosität aufgrund der geringen Menge als nicht beurteilbar angesehen und in diesen Fällen mit 0 Scorepunkten bewertet.

Tab. 4: Endoskopiescore zur Punkteverteilung bei der Tracheobronchoskopie

Parameter	Score-Punkte	Erläuterung
<i>Sekretmenge</i>	0	Kein Sekret erkennbar
	1	Vereinzelte Sekretflocken
	2	Schmale ventrale Sekretstrasse
	3	Durchgehende Sekretstrasse
	4	Breite Sekretstrasse mit Sekretsee
<i>Sekretviskosität</i>	0	Feuchte Schleimhaut
	1	Seröses, durchscheinendes Sekret
	2	Sekret fließfähig/beweglich im Atemstrom
	3	Hochvisköses Sekret, unbeweglich
<i>Schleimhautschwellung</i>	0	Keine Schleimhautschwellung
	1	Ggr. Schwellung der Bifurkation
	2	Mgr. Schwellung der Bifurkation oder undeutlich begrenzte Trachealspangen
	3	Hgr. Schwellung der Bifurkation oder kaum erkennbare Trachealspangen

3.1.4 Arterielle Blutgasanalyse

Vor Beginn der körperlichen Belastungsprobe wurde von allen Pferden eine arterielle Blutprobe aus der *A. carotis communis dextra* entnommen. Die Punktion erfolgte in der rechten Drosselrinne ca. handbreit über dem Brusteingang mit einer feinlumigen Kanüle (20 G), wie von mehreren Autoren beschrieben (MEISTER *et al.* 1976; ROSE und ROSSDALE, 1981; KLEIN und DEEGEN 1986). Das Blut wurde ohne Luftblasen in jeweils drei heparinisierte Glaskapillaren eingefüllt, die mit den Fingern luftdicht verschlossen wurden. Innerhalb von höchstens 10 min. nach der Entnahme wurden die Proben mit Hilfe eines AVL-Blutgasanalysegerätes (AVL OmniTM, AVL Medizintechnik Bad Homburg) unter Eingabe der aktuellen Körpertemperatur analysiert. Außerdem wurde mit Hilfe der gemessenen Gasdrücke die alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz $p_{(A-a)}O_2$ berechnet

(TISI 1985). Dieser Parameter berücksichtigt zusätzlich den aktuellen Luftdruck und gilt so bei unterschiedlichen Wetter- bzw. Höhenlagen als besser vergleichbar.

Von jeweils drei ermittelten Werten für den Sauerstoff- (p_aO_2) bzw. Kohlendioxidpartialdruck (p_aCO_2) im arteriellen Blut und die $p_{(A-a)}O_2$ wurde das arithmetische Mittel bestimmt.

Formel:

$$p_{(A-a)}O_2 = (p_B - p_{H_2O_{EX}}) \times 0,21 - p_aO_2 - p_aCO_2$$

Die Abkürzung p_B steht dabei für den aktuellen Luftdruck in mmHg, von dem der Wasserdampfdruck der Ausatemluft ($p_{H_2O_{EX}}$) subtrahiert wird. Dieser beträgt bei einer Körpertemperatur von 37,0°C 47 mmHg. Bei den einzelnen Probanden wurde er individuell auf die aktuelle Körpertemperatur korrigiert. Der Faktor 0,21 gibt den Anteil des Sauerstoffs an der Einatemluft an.

3.1.5 Analyse einer venösen Blutprobe

Neben der arteriellen Blutgasanalyse wurde von jedem Tier eine venöse Blutprobe entnommen. Es wurden vor allem Parameter untersucht, die auf akute Entzündungs- bzw. Infektionsgeschehen hindeuten, wobei hiervon betroffene Pferde nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Außer auf die absolute Leukozytenzahl und das Differentialzellbild wurde insbesondere auf den Gehalt an Fibrinogen, Albumin und Globulinen im Blut geachtet. Routinemäßig erfolgte zusätzlich die Analyse des roten Blutbildes und des Bilirubin- und Harnstoffgehaltes.

3.1.6 Durchführung der medikamentellen Therapie

Die stationäre Aufstallung der 15 medikamentell behandelten Patienten erfolgte in gut belüfteten, nach außen geöffneten Einzelboxen mit einem staubarmen Einstreugemisch aus Torf und Sägespänen. Ein Kontakt zu Stroh fand während des Kliniksaufenthaltes nicht statt. Die Boxen wurden mindestens zweimal pro Tag entmistet, und es wurde ausschließlich mit Leitungswasser angefeuchtetes Heu von grobsinnlich einwandfreier Qualität verfüttert. Jeden Morgen wurden alle Pferde über einen Ultraschallraumvernebler 30 min. mit einer isotonen Lösung aus Emser Sole[®] (Siemens & Co, D-Bad Ems) inhaliert.

Mit Abklingen der Sedation nach der ersten BAL erhielten die Tiere der medikamentell therapierten Gruppe zweimal pro Tag eine Kombination aus einem β_2 -Sympathomimetikum und einem Sekretolytikum (Venti Plus[®]; Boehringer Ingelheim/Vetmedica, D-Ingelheim) in

der vom Hersteller empfohlenen Dosierung (0,8 µg/kg KM Clenbuterol; 0,3 mg/kg KM Dembrexinhydrochlorid) übers Futter. Zudem wurden über drei Tage einmal täglich 0,04 mg/kg KM Dexamethason-21-Dinatriumphosphat (Hexadreson[®], Intervet, D-Unterschleissheim) intramuskulär appliziert. Ab dem vierten Tag wurde die Dosis um jeweils 2 mg pro Tag reduziert. Bei Pferden mit einem Körpergewicht von weniger als 350 kg erfolgte die Reduktion um lediglich 1 mg pro Tag. Ergänzend zu diesem therapeutischen Schema wurden alle Patienten täglich entsprechend den Witterungsbedingungen je nach Ausbildungs- und Gesundheitszustand bzw. Kondition auf einem teilweise überdachten Außenplatz bewegt.

3.1.7 Durchführung der Laserakupunktur

Die begleitenden Maßnahmen bei den sieben Pferden, die einer alternativmedizinischen Behandlung in Form der Laserakupunktur unterzogen wurden, entsprachen in der Art der Aufstallung, des Inhalations- und Bewegungsprogramms der medikamentell therapierten Gruppe. Die zusätzliche Diagnostik vor der entsprechenden Therapie und auch die nachfolgende Behandlung mittels Laserakupunktur wurden durch eine speziell ausgebildete Tierärztin durchgeführt, wobei sich eine ausführliche Beschreibung der dabei angewandten Methodik in der Dissertationsschrift von ASTRID REITZ (2006) findet. An dieser Stelle soll lediglich kurz erwähnt werden, dass die Untersucherin als diagnostisches Verfahren das Auffinden aktiver Akupunkturpunkte durch die Pulskontrolle verwendete. Nach standardisierten Methoden der Deutschen Akademie für Akupunktur (DAA) erfolgte die Lokalisierung u. a. des wichtigsten ursächlichen Punktes der Erkrankung, aus dem die primäre Symptomatik resultieren soll und des Punktes für Folgeerkrankungen sowie die Identifizierung lokaler Störherde. Zusätzlich wurden generell bei COB Patienten häufig gefundene aktive Akupunkturpunkte überprüft und nach energetischen Gesichtspunkten und den Akupunkturregeln für die anschließende Therapie ausgewählt.

Die Behandlung wurde mit einem Physiolaser vet-plus (Reimers & Janssen, D-Winden) durchgeführt. Es handelt sich um einen Impuls-Diodenlaser mit 90 Watt Impulsspitzenleistung bei einer Impulsbreite von 200 ns. Die Wellenlänge des emittierten Laserlichtes beträgt 904 nm. Es werden vorinstallierte Frequenzen nach BÄHR (1-7) und NOGIER (A-F) verwendet. Jeder ausgewählte Akupunkturpunkt wird 30 s lang und die Störherde zwischen 30 s und 2 min. (z. B. Narbenstörherde) bzw. 3 und 10 min. (z. B. Zahnstörherde) mit dem Laserlicht behandelt.

Während der siebentägigen stationären Aufstallung wurde das beschriebene Behandlungskonzept insgesamt viermal (jeden zweiten Tag) durchgeführt. Einmal behandelte Punkte wurden für die Dauer der Therapie beibehalten.

3.1.8 Gewinnung der BALF

Zur Durchführung der BAL wurden alle Pferde im klinikeigenen Zwangsstand mit 0,01 mg/kg KM Detomidinhydrochlorid intravenös (i. v.) sediert (Domosedan[®]; Pfizer, D-Karlsruhe) und beidseitig am Kopf fixiert. Die Entnahme der BALF erfolgte mit Hilfe eines Endoskops, das eine Länge von 2,00 m und einen Durchmesser von 11 mm besaß. Dieses wurde über den ventralen Nasengang bis zum Kehlkopf und dann über die Luftröhre an der *Bifurcatio tracheae* vorbei in den Bronchus einer Folgegeneration geschoben, bis es aufgrund seines Durchmessers in diesem verkeilt war (so genannte wedge-position). In den meisten Fällen wurde ein Bronchus der dritten oder vierten Generation des rechten kaudalen Lungenflügels gespült, bei wenigen Tieren erfolgte ein Eingehen über den linken Hauptbronchus. Über den Biopsiekanal des Endoskops wurde ein Polyethylenkatheter (oder eine Teflon-Spülsonde) mit Luer-Lock-Anschluss vorgeschoben, der jedoch nicht über die Spitze des Endoskops hinausragte. Über diesen Katheter wurden 60 ml/100kg KM sterile, körperwarme, isotone NaCl-Lösung mittels 60 ml Spritzen im Bolus instilliert und sofort nach der letzten Spritze wieder mit sanftem und gleichmäßigem Zug aspiriert. Da in den meisten Fällen mehrere Spritzen zur Erfassung des Lavagevolumens verwendet werden mussten, wurde der Katheter beim Wechseln der Spritzen abgeknickt, um einen Volumenverlust zu verhindern. Die so zurück gewonnene BALF wurde sofort vorsichtig über eine doppellagige Gaze gefiltert, um gröbere Beimengungen, insbesondere Schleimpartikel, zurückzuhalten. Danach wurde das Aspirat in einem 500 ml Kunststoffmessbecher aus Methylpenten gepoolt, der in einem Styroporbehälter mittels eines Kälteakkus aus Gel gekühlt wurde. In einigen Fällen, in denen die Flüssigkeit bis zur anschließenden Verarbeitung in 50-ml-Zentrifugen-Röhrchen (V-Form, Greiner, D-Frickenhausen) aufbewahrt wurde, bestand das Kühlmedium aus zerkleinertem Eis. Das Volumen der BALF wurde sofort im Messbecher bzw. Zentrifugen-Röhrchen bestimmt, und auch die weitere Aufbereitung des Probenmaterials erfolgte umgehend nach der Gewinnung.

3.2 Untersuchung der BALF

3.2.1 Makroskopische Beurteilung

Bei der grobsinnlichen Beurteilung der BALF direkt nach der Probenentnahme wurde vor allem auf Farbe bzw. Trübung der Flüssigkeit geachtet. Gelb-rötliche bis hellbräunliche Verfärbungen wiesen dabei auf einen erhöhten Gehalt an Erythrozyten hin, der in allen Fällen lichtmikroskopisch bestätigt werden konnte. Trübung sowie gelegentlich aufgetretene feine Beimengungen waren generell ein Zeichen für hohe Zellgehalte im Aspirat, die mit Hilfe der Zellzählung verifiziert werden konnten (s. Kap. 3.2.3). Das Vorhandensein von feinem, weißem Schaum wurde als Indiz für die Anwesenheit von Surfactant interpretiert. Dies spricht für eine erfolgreiche Probenentnahme aus Anteilen des Alveolarbereichs.

3.2.2 Bestimmung der Rückgewinnrate

Das Volumen des zurück gewonnenen Flüssigkeitsanteiles wurde entweder direkt im Messbecher oder in 50-ml-Zentrifugen-Röhrchen (Greiner) bestimmt, und der Anteil des BALF-Volumens am ursprünglich instillierten Flüssigkeitsvolumen in Prozent berechnet.

3.2.3 Bestimmung der absoluten Zellzahl

Die absolute Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt: Ein Teil der sanft durchmischten BALF wurde mit fünf Teilen Trypanblau verdünnt, und ein Aliquot der Lösung wurde in die vorbereitete Zählkammer pipettiert. Bei selten aufgetretenen sehr geringen Gesamtzellzahlen wurde mit einer niedrigeren Verdünnung (1:2) gearbeitet. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit 100facher Vergrößerung. Es wurde die Zellzahl von jeweils vier Gruppenquadraten bestehend aus 16 Kleinstquadraten bestimmt und in folgende Formel eingesetzt:

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

ZZ = in den vier Gruppenquadraten ausgezählte Zellzahl

V = Verdünnungsstufe

3.2.4 Lichtmikroskopisches Differentialzellbild

Zur mikroskopischen Beurteilung der Zusammensetzung der Zellen in der BALF wurden je Probenentnahme mindestens vier lichtmikroskopische Präparate mit Hilfe des „glass cover“-Prinzips hergestellt. Zu diesem Zweck wurde jeweils 1 ml der vorsichtig durchmischten Probe mit einer Eppendorfpipette in eine so genannte Zytokammer mit einer Fläche von 120 mm² (Hettich/D-Tuttlingen) überführt. Dabei wird ein Objektträger in eine spezielle Halterung eingeschoben, auf die mittels eines Spannrings ein am unteren Ende gummiertes, zylinderförmiges Probenbehältnis geklemmt werden kann. Die so vorbereitete und befüllte Halterung wurde in eine Becherzentrifuge (Rotanta/P, Hettich) verbracht und für 5 min. bei 560 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert, wonach den Präparaten ein ungebremstes Ausschwingen erlaubt wurde. Danach wurde der Überstand abpipettiert, der Objektträger aus der Halterung entnommen und für wenige Minuten in einen Gel-Elektrophorese-Trockner (Beckman Instruments, Fullerton, CA/USA) verbracht. Nach einer May-Grünwald-Giemsas- (Pappenheim-) Färbung der Präparate erfolgte schließlich die Differenzierung von mindestens 400 Zellen unter einem Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl. Die hierbei ermittelten Werte wurden für die Berechnung der prozentualen Anteile der jeweiligen Zellgruppen verwendet.

3.2.5 Durchflusszytometrie

3.2.5.1 Antikörpertitration

Um die geeigneten Verdünnungen für die jeweiligen Antikörper zu ermitteln, wurden vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihen mit bronchoalveolären Lavagezellen (BALC) Vorversuche zur Titration der primären Antikörper und der entsprechenden Konjugate durchgeführt. Diese Versuche erfolgten bezüglich der Immunphänotypisierung anhand von equinen Blutleukozyten, die mittels steriler Punktion der Jugularvenen von unterschiedlichen Pferden gewonnen wurden. Dabei wurde das Blut möglichst schonend und langsam tropfend über eine Kanüle (18 G) im Probengefäß aufgefangen.

Die Tests zur Titration der Antikörper für den intrazellulären Zytokinnachweis wurden zunächst unter Verwendung boviner Blutleukozyten durchgeführt. Die Venenpunktion verlief auf die für das Pferd beschriebene Weise, als gerinnungshemmender Zusatz wurde beim Rinderblut Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Die Erythrolyse erfolgte mit Hilfe von Aqua destillata (A. dest.) wie unter 3.2.5.2 (s. S. 45) beschrieben mit einer Inkubationsdauer von 50 s. Nachdem sich weder beim Nachweis von Interferon- γ (IFN- γ)

noch von Interleukin-4 (IL-4) Probleme ergaben, wurde dieselbe Methode auf equine Blutleukozyten übertragen, wobei es sich als günstiger erwies als Antikoagulanzen Citrat zu verwenden und die Hämolyse-Dauer auf 30 s zu verkürzen.

Nach Abschluss der Vorversuche konnten die folgenden Antikörperverdünnungen als geeignet erachtet und in den Hauptversuchen verwendet werden (Tab. 5 und 6, s. S. 45).

Tab. 5: Gebrauchslösungen für primäre Antikörper

Reagenz	Gebrauchslösung
Primäre Antikörper	
Ratte anti equines CD2, Klon Mac 288	1:80 in PBS
Maus anti equines CD4, Klon CVS 4	1:40 in PBS
Maus anti equines CD5, Klon CVS 5	1:40 in PBS
Maus anti equines CD8, Klon CVS 21	1:40 in PBS
Maus anti humanes CD9, Klon MM2/57	1:40 in PBS
Maus anti equines CD13, Klon CVS 19	1:20 in PBS
Maus anti canine B-Zellen, RPE-konjugiert, Klon CA2.1D6	1:40 in PBS
Maus anti bovines Interferon- γ , Klon CC302	1:1600 in PBS/1% BSA/ 0,1% Saponin/0,1% NaAzid
Maus anti bovines Interleukin 4, Klon CC303	1:800 in PBS/1% BSA/ 0,1% Saponin/0,1% NaAzid

CD: Cluster of Differentiation (Differenzierungscluster)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

BSA: bovines Serumalbumin

NaAzid: Natriumazid

Tab. 6: Gebrauchslösungen für sekundäre Antikörper

Reagenz	Gebrauchslösung
Sekundäre Antikörper	
Ziege anti Maus IgG2b(gamma), RPE-konjugiert	1:200 in PBS
Ziege anti Maus IgG2a(gamma), FITC-konjugiert	1:200 in PBS
Ziege anti Maus IgG1(gamma), FITC-konjugiert	1:1000 in PBS
Ziege anti Ratte IgG(H+L), FITC-konjugiert	1:100 in PBS
Ratte-IgM-Antikörper, FITC-konjugiert	1:200 in PBS
Ratte-IgM-Antikörper, PE-konjugiert	1:200 in PBS
Ziege anti Maus IgG(H+L), FITC-konjugiert	1:200 in PBS/1% BSA/ 0,1% Saponin/0,1% NaAzid
Isotyp-Kontroll-Antikörper	
1E8 (IgG1-Antikörper, gerichtet gegen Phospholipase C von <i>Clostridium perfringens</i>)	unverdünnt bzw. 1:2 (IPT) und 1:10 (Zytokinnachweis) zur Isotypenkontrolle
1F9 (IgG2a-Antikörper, gerichtet gegen Phospholipase C von <i>Clostridium perfringens</i>)	unverdünnt bzw. 1:10 zur Isotypenkontrolle (Zytokinnachweis)

FITC: Fluoreszein-Isotiozyanat

RPE: R-Phycoerythrin

IPT: Immunphänotypisierung

3.2.5.2 Hämolysen

In den wenigen Fällen, in denen makroskopische und/oder lichtmikroskopische Hinweise auf Erythrozyten in der BALF bestanden, wurde vor der weiteren Präparation der Zellen eine Erythrolyse mit A. dest. durchgeführt.

Dabei wurde das in einem Zentrifugen-Röhrchen (Greiner) durch Zentrifugation (202 x g, 7 min. bei Raumtemperatur) gewonnene Zellpellet mit einem Teil PBS resuspendiert, und es erfolgte die Zugabe von neun Teilen A. destillata. Nach 30 s wurde dazu ein Teil zehnfach konzentriertes PBS pipettiert, um die Isotonie wiederherzustellen. Schließlich wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und bei 202 x g für 7 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

3.2.5.3 Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz

Die Probenvorbereitung zur Detektion eines Oberflächenantigens auf Leukozyten und zur Anfärbung des Kerns toter Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen von 2×10^5 Zellen pro Kavität in eine Mikrotiterplatte (96 well, V-Form, Greiner)
2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min., 4 °C) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt)
3. Resuspendierung der Zellpellets in je 25 µl primärer Antikörperlösung (monoklonale Antikörper [mAK] gegen Oberflächenantigene equiner Leukozyten (s. Tab. 5, S. 44) und in je 25 µl PBS
4. Inkubation (mindestens 20 min.) im Dunkeln, anschließend Zentrifugationsschritt
5. Resuspendierung der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt (Waschen)
6. Resuspendierung der Zellpellets in je 25µl Gebrauchslösung des entsprechenden Sekundärantikörpers (s. Tab. 6, vorige Seite) und je 25 µl PBS.
7. Inkubation (mindestens 20 min.) im Dunkeln, anschließend Zentrifugationsschritt
8. Resuspendierung der Zellpellets in je 100 µl PBS mit 2 µg/ml Propidiumjodid (PI) pro Kavität mit anschließendem Zentrifugationsschritt
9. Aufnahme der Zellpellets in 100 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 300 µl PBS

Die gesamte Präparation wurde auf Eis durchgeführt.

3.2.5.4 Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz

Die Probenvorbereitung zur simultanen Detektion zweier Oberflächenantigene auf Leukozyten und zur Anfärbung des Kerns toter Zellen wurde grundsätzlich nach dem Schema für die Zweifarbenfluoreszenz durchgeführt. Dabei wurden wo möglich die beiden primären Antikörper zeitgleich aufgetragen. Auf dieselbe Weise wurde mit den Sekundärantikörpern verfahren. In den Fällen, in denen die Kombinationen der verwendeten Antikörper-Isotypen dies nicht erlaubten (Doppelfluoreszenzen anti-CD9/anti-Maus IgG2bPE und anti-CD2/anti-Ratte IgG (H+L)FITC bzw. anti-B-Zell-PE und anti-CD5/anti-Maus IgG1FITC), wurden die Antikörper nacheinander unter Zwischenschaltung eines Block-Schrittes mit Isotyp-Kontroll-Antikörpern zu den Zellen gegeben. Zentrifugations- und Waschschrte wurden analog zur Zweifarbenfluoreszenz nach jeder einzelnen Inkubation durchgeführt.

3.2.5.5 Probenvorbereitung für die Bestimmung der Zytokin-Produktion

Die Fähigkeit der BALC, IFN- γ und IL-4 *in vitro* zu produzieren, wurde nach einer Inkubation der Zellen im Brutschrank für 6 h bzw. über Nacht (für ca. 18 h) in der An- oder Abwesenheit der Stimulantien Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) überprüft. Die Kombination dieser beiden Mitogene ist die allgemein anerkannte Art und Weise zur Stimulierung der Zellen für den intrazellulären Zytokinnachweis, wobei das Kalzium-Ionophor Ionomycin vor allem die Transkriptions-Aktivität des IL-4 Promoters fördert (PALIOGIANNI *et al.* 1996), wohingegen PMA in Anwesenheit von Ionophoren zu einem Anstieg der IFN- γ Produktion führt (ENOMOTO *et al.* 1998). Um die Sekretion der Zytokine zu verhindern, wurde Brefeldin A (10 μ g/ml) zugegeben. Zur Schonung der Zellen geschah dies erst eine Stunde nach Inkubationsbeginn.

Protokoll zur Anfärbung der Zytokine:

1. Einsetzen von 2×10^5 Zellen (stimuliert und unstimuliert), die 6 h bzw. über Nacht (ca. 18 h) im Brutschrank inkubiert wurden, in eine Mikrotiterplatte (96 well, V-Form, Greiner).
2. Zentrifugation (150 x g, 7 min., 4 °C) mit anschließendem Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt) und Resuspendierung der Zellpellets in 100 μ l PBS
3. Zentrifugation und Resuspendierung der Zellpellets in 100 μ l Paraformaldehyd (PFA) (1% in PBS) (Fixationsschritt)
4. Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10 min.
5. Zentrifugationsschritt und Resuspendierung in je 100 μ l PBS/0,1% Saponin/0,1% NaAzid
6. Zentrifugationsschritt; wurden die 6-Stunden-Proben über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, erfolgt eine Resuspendierung in je 100 μ l PBS/1% BSA/0,01% NaAzid.
7. Die über Nacht im Brutschrank inkubierten Proben wurden sofort, die im Kühlschrank gelagerten 6-Stunden-Proben nach einem Zentrifugationsschritt in je 100 μ l PBS/0,1% Saponin/0,1% NaAzid resuspendiert
8. Inkubation 5 min. bei Raumtemperatur
9. Zentrifugationsschritt und Resuspendierung in 50 μ l primärer Antikörperlösung (s. Tab. 5, S. 44) pro Kavität
10. Inkubation 20 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur

11. Zweimaliger Zentrifugationsschritt mit Resuspendierung in je 100 μ l PBS/0,1% Saponin/0,1% NaAzid
12. Zentrifugationsschritt und Resuspendierung in je 50 μ l/well sekundärer Antikörper (s. Tab. 6, S. 45)
13. Inkubation 20 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur
14. Zentrifugationsschritt und Resuspendierung in je 100 μ l PBS/0,1% Saponin/0,1% NaAzid
15. Zentrifugationsschritt und Resuspendierung in je 100 μ l PBS/1% BSA/0,01% NaAzid
16. Zentrifugationsschritt, Aufnehmen der Zellen in je 50 μ l PBS/1% BSA/0,01% NaAzid und Überführung der Proben in Teströhrchen mit je 300 μ l PBS

Soweit nicht anders angegeben wurde die Präparation auf Eis durchgeführt.

3.2.5.6 Analyse der Proben

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Zellen wurde ein EPICSTM Elite Analyser (Beckmann Coulter, D-Krefeld), ausgestattet mit einem 488 nm Argonlaser und einer Standardfilterkombination (488 nm für Seitwärtsstreulicht, 525 nm für Fluoreszenz 1 [Fl. 1], 575 nm für Fl. 2 und 630 nm für Fl. 3) verwendet. Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte anhand von Vorversuchen, wurde in Form eines Standardprotokolls gespeichert und dann für alle weiteren Messungen derselben Probenart verwendet.

Je Probe wurden im Doppelansatz stichprobenartig 5000 Ereignisse analysiert. In den Vorversuchen mit equinen PBL und in den Hauptversuchen mit equinen BALC konnten anhand der Parameter Vorwärtsstreulicht (korreliert mit der Größe der Zellen) und Seitwärtsstreulicht (korreliert mit der Granularität der Zellen) drei morphologisch unterschiedliche Populationen differenziert werden. Dies war bei den BALC deutlich weniger distinkt der Fall als bei den PBL. Um diese morphologisch differenzierbaren Populationen getrennt analysieren zu können, wurden elektronische Auswertungsfenster gesetzt (s. Kap. 4.1.3, S. 53 ff.).

Durch Zusatz des Totfarbstoffes Propidiumjodid (2 μ g PI pro ml Probe), das nur bei toten Zellen zur Anfärbung des Zellkerns führt (PI⁺), konnten bei der Immunphänotypisierung die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden. Zellen, deren Fluoreszenzintensität für diesen Farbstoff über der von 98% der Zellen einer ungefärbten Kontrolle lag, wurden durch ein elektronisches Auswertungsfenster als „tote Zellen“ definiert. Da sie bei einer Antikörpermarkierung sowohl zu falsch negativen als auch zu falsch positiven Ergebnissen

führen können, wurden sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei den außerhalb dieses Fensters liegenden Zellen („lebende Zellen“) wurde für die einzelnen Populationen das Vorhandensein bestimmter Oberflächenantigene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dazu wurde wiederum ein elektronisches Auswertungsfenster so definiert, dass weniger als 2% der Zellen einer Negativkontrolle (Probe mit einem unspezifischen Antikörper desselben Isotyps wie der Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper) eine Fluoreszenzintensität innerhalb des Fensters aufwiesen. Die bis zu 2% Zellen mit einem Fluoreszenzsignal oberhalb des Schwellenwertes wurden als falsch-positive Zellen bewertet. Auf eine Subtraktion der Prozentsätze der Negativkontrollen von denjenigen der Proben mit Primärantikörper wurde zur Vermeidung negativer Prozentsätze bei der Datenauswertung verzichtet.

Als weiterer Messbereich wurden die „Einzelzellen“ angelegt. Diese Region umfasst alle „innen liegenden“ Messereignisse, lässt den äußersten Messkanal des Diagramms aber frei. Sie enthält somit neben vitalen Leukozyten und PI^+ Zellen auch Partikel, die zwischen den abgrenzbaren Zellpopulationen liegen. Ausgeschlossen werden sehr kleine Messereignisse (z.B. Zelldebris) im unteren und Zellhaufen aus dem oberen Randabschnitt. Tote Zellen können im negativen und Einzelzellen im positiven Sinn als Qualitätsparameter für die BALF gewertet werden. Zur Darstellung der Ergebnisse ist der Anteil der Antigen-positiven Zellen an den lebenden Zellen in einer bestimmten morphologischen Population angegeben. Bei der intrazellulären Zytokin-Analyse, die sich auf den Bereich der durchflusszytometrisch ermittelten Lymphozyten beschränkte, wurde auf eine spezielle Anfärbung der toten Zellen verzichtet. Auch hier wurde mit Hilfe einer Negativkontrolle ein Auswertungsfenster so gesetzt, dass weniger als 2% der Zellen in der betrachteten Messregion der Lymphozyten eine Fluoreszenzintensität aufwiesen.

3.3 Statistische Auswertung

Das Überführen der Daten aus den Listmode-Dateien des EPICSTM Elite Analysers und deren Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms FCS Express, Version 2 (DeNovo-Software, Canada-Ontario) auf einem Personalcomputer des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Aus den dabei gewonnenen prozentualen Anteilen wurde zusätzlich sowohl für die lichtmikroskopische als auch für die durchflusszytometrische Zelldifferenzierung über die mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelte absolute Zellzahl für die einzelnen Populationen die Anzahl der Zellen bzw. Ereignisse pro μ l BALF errechnet.

Die anschließende Datenauswertung wurde mit einem Rechner der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des oben genannten Fachbereiches unter Verwendung des Statistikprogramm pakets BMDP/Dynamic Release 7.0 bewerkstelligt.

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 wurde eine logarithmische Datentransformation durchgeführt und die Deskription der Werte mit Hilfe des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors vorgenommen. Zur statistischen Prüfung der Daten auf Signifikanz fanden eine Korrelationsanalyse, der paired-t-Test bzw., bei fehlender Normalverteilung, der Wilcoxon-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben Anwendung. In der behandelten Tiergruppe wurden die Unterschiede zwischen den beiden Therapiearten durch Vergleich der Differenzen der prä-/posttherapeutischen Werte über einen pooled-t-Test bzw., bei im Levene-Test stark voneinander abweichenden Standardabweichungen, über einen separate-t-Test ermittelt.

Für grafische Darstellungen wurden die Programme Adobe Photoshop CS, Microsoft® Excel 2002 und Microsoft® PowerPoint 2002 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 ($p \leq 0,001$)

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Erstuntersuchungen

In der Erstuntersuchung wurde eine Gruppe von 48 Tieren vor einer Therapie bzw. zur einmaligen Bestimmung ihres Zustandes untersucht. Da Korrelationen zwischen den routinemäßig erhobenen Messparametern und der Durchflusszytometrie ermittelt werden sollten, wurden Pferde mit unterschiedlichen Schweregraden einer Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) und zwei lungengesunde Pferde in diese Probandengruppe aufgenommen (s. Kap. 3.1.1, S. 35).

4.1.1 Klinische Untersuchung des Respirationstraktes, Tracheobronchoskopie und arterielle Blutgasanalyse

Das mittlere Alter der Probanden lag bei 11,9 ($\pm 5,2$) Jahren, sie waren durchschnittlich 536 (± 102) kg schwer. Der Durchschnitt der Tiergruppe war durch pathologische Abweichungen bei allen aufgeführten Einzelparametern mit Ausnahme des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ($p_a\text{CO}_2$) gekennzeichnet (s. Tab. 7).

Tab. 7: Charakterisierung der Probanden anhand ausgewählter klinischer, blutgasanalytischer und endoskopischer Parameter (Erstuntersuchung)

Parameter	Einheit	Referenzbereich	n	Min.	Max.	$\bar{x}_a \pm \text{SD}$
Alter	Jahre		48	5	24	11,9 \pm 5,2
Körpergewicht	kg		46	303	657	536 \pm 102
Ruhe-Atemfrequenz	/min.	8-16	46	10	32	18 \pm 6
Klinikscore	Punkte	<2	48	0	10	4,2 \pm 3,1
Endoskopiescore	Punkte	<2	48	0	10	4,6 \pm 2,7
$p_a\text{O}_2$	mmHg	100 \pm 5	48	63,7	117,5	93,8 \pm 12,9
$p_a\text{CO}_2$	mmHg	40 \pm 5	48	38,1	52,5	44,4 \pm 3,2
$p_{(A-a)}\text{O}_2$	mmHg	≤ 7	48	-6,0	39,2	11,2 \pm 12,0

\bar{x}_a : arithmetischer Mittelwert; SD: Standardabweichung

$p_a\text{O}_2$: arterieller Sauerstoffpartialdruck

$p_{(A-a)}\text{O}_2$: Alveoloarterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz

graue Schraffierung: Mittelwert im pathologischen Bereich

Min.: Minimum; Max.: Maximum

4.1.2 Konventionelle Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

4.1.2.1 Rückgewinnrate

Der durchschnittliche Anteil der wiedergewonnenen BALF am ursprünglich instillierten Flüssigkeitsvolumen lag bei 24,5% ($\pm 10,8\%$) mit Einzelwerten zwischen 8,2 und 66,7%.

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Rückgewinnrate und anderen Parametern waren nicht herzustellen.

4.1.2.2 Lichtmikroskopisches Differentialzellbild

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der BAL-Zellen (BALC) (s. Tab. 8) befand sich der durchschnittliche Anteil der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) im pathologischen Bereich.

Tab. 8: Zusammensetzung der BALC
(Ergebnisse der lichtmikroskopischen Differenzierung und absolute Zellzahl)

Parameter	Referenzbereich	n	Min.	Max.	$x_a \pm SD$ $x_g x/:SF$
<i>Absolute Zellzahl</i> <i>[/ul BALF]</i>	120-640 [†]	48	100	3300	416,3 x/:2,2
Ly [%]	15,3-62,3*	48	35,6	77,8	59,1 \pm 11,5
PMN [%]	0-4,3*	48	0,2	25,6	6,1 x/:2,7
M [%]	37,7-71,7*	48	11,2	55,5	30,3 \pm 11,5
Eos [%]	0-1,3*	48	0,0	2,6	0,01 x/:9,7
MZ [%]	2,0-5,0*	48	0,0	10,2	1,1 x/:4,3

Ly: Lymphozyten; M: Makrophagen; Eos: eosinophile Granulozyten; MZ: Mastzellen

kursiv (nicht normalverteilt): x_g : geometrischer Mittelwert; SF: Streufaktor

graue Schraffierung: Mittelwert im pathologischen Bereich

[†]: McGORUM und DIXON (1994); *: McGORUM et al. (1993a)

Hochsignifikante Korrelationen unter den lichtmikroskopisch differenzierten Parametern waren mit $p \leq 0,001$ und negativem Vorzeichen zwischen den Prozentsätzen der Makrophagen und der PMN einerseits ($r = -0,48$) und der Makrophagen und der Lymphozyten andererseits ($r = -0,85$) zu verzeichnen. Zudem zeigte der durchschnittliche Prozentsatz der PMN in der BALF einen positiven Zusammenhang mit der $p_{(A-a)}O_2$ ($r = 0,48$; $p \leq 0,001$).

4.1.3 Durchflusszytometrische Differenzierung der übergeordneten Zellpopulationen in der BALF

Die Abbildungen 1 und 2 (s. S. 55 f.) erläutern die Unterscheidung equiner Zellen mit Hilfe morphologischer Merkmale in der durchflusszytometrischen Analyse anhand typischer Blut- bzw. BALF-Proben. Dabei wird die Zellgröße mit dem Parameter Vorwärtsstreulicht (FS) und ihre Komplexität bzw. Granularität mit dem Seitwärtsstreulicht (PMT1) des Lasers bestimmt. Um die morphologisch differenzierbaren Populationen getrennt analysieren zu können, wurden elektronische Auswertungsfenster gesetzt, wobei in den Blutproben zumindest zwei distinkte Zellpopulationen (Lymphozyten und PMN) sicher voneinander abgetrennt werden konnten. Die Lokalisierung der Monozyten aus dem peripheren Blut und die Einteilung im Bereich der größeren bzw. stärker granulierten Zellen (Makrophagen und PMN) in den BALF-Proben gestalteten sich hingegen weniger eindeutig. Während unter den Zellpopulationen der morphologisch gut abgrenzbaren peripheren Blutleukozyten (PBL) die neutrophilen Granulozyten den Hauptanteil ausmachten, waren Lymphozyten in der BALF die prozentual stärkste Zellgruppe.

Zur näheren Charakterisierung wurde für die einzelnen Populationen das Vorhandensein bestimmter Oberflächenantigene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Für jeden Patienten und für jede einzelne Messregion wurde dazu vor der eigentlichen Analyse ein elektronisches Auswertungsfenster so definiert, dass mehr als 98% der Zellen einer Negativkontrolle (Probe mit einem unspezifischen Antikörper desselben Isotyps wie der Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper) eine Fluoreszenzintensität unterhalb eines Schwellenwertes besitzen. Die bis zu 2% Zellen mit einem Fluoreszenzsignal oberhalb des Schwellenwertes wurden als falsch-positive Zellen bewertet. Auf eine Subtraktion der Prozentsätze der Negativkontrollen von denjenigen der Proben mit Primärantikörper wurde zur Vermeidung negativer Prozentsätze bei der Datenauswertung verzichtet.

Die Abbildungen 1 und 2 enthalten die immunphänotypische Markierung des CD9- bzw. CD13-Antigens. Diese beiden Oberflächenmoleküle erwiesen sich insbesondere in der BALF,

in der die Zellpopulationen aufgrund von Größenschwankungen morphologische Überschneidungen zeigten, für die Trennung der Lymphozyten von den PMN und Makrophagen als nützlich. Ein gewisser Prozentsatz der Zellen in der Region der Lymphozyten (RL) trug das CD9 Molekül auf seiner Oberfläche. CD13⁺ und damit auch doppelt positive (CD13⁺/9⁺) Zellen waren in RL kaum vorhanden. Im Gegensatz dazu konnten bestimmte Anteile der Granulozyten und Makrophagen mit beiden Antikörpern angefärbt werden. Während der Prozentsatz der CD13⁺/9⁻ Zellen in den Messregionen von Granulozyten (RG) und Makrophagen (RM) im Bereich des Anteils falsch-positiver Zellen lag, waren unterschiedliche Anteile in diesen Bereichen CD13⁻/9⁺. Beim größten Teil dieser Zellen in RG handelt es sich wahrscheinlich um CD9⁺ Lymphozyten. Im Vergleich mit den PBL zeigte sich die Färbung auf den CD13⁺ Granulozyten aus der BALF stärker und besser abgesetzt.

Bei der Analyse der Daten (s. Tab. 9, S. 57) wurden zwei weitere Zellpopulationen definiert. Die Bezeichnung „Tote“ umfasst Zellen, deren Kerne durch die Zugabe von Propidiumjodid (PI) anzufärben waren. Da sie bei einer Antikörpermarkierung sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen können, wurden sie von der immunphänotypischen Charakterisierung elektronisch ausgeschlossen. In der Darstellung der morphologischen Parameter (Größe und Granularität) wurde außerdem der Messbereich „Einzelzellen“ angelegt, der mit dem Ausschluss des äußersten Messkanals sehr kleine Partikel (z.B. Zelldebris) im unteren und Zellhaufen aus dem oberen Randabschnitt nicht einbezieht. Diese Region enthält somit neben vitalen Leukozyten und PI⁺ Zellen auch Ereignisse, die zwischen den abgegrenzten Zellpopulationen liegen. Der Anteil der toten Zellen kann im negativen und derjenige der Einzelzellen im positiven Sinn als Qualitätsparameter für die BALF gewertet werden.

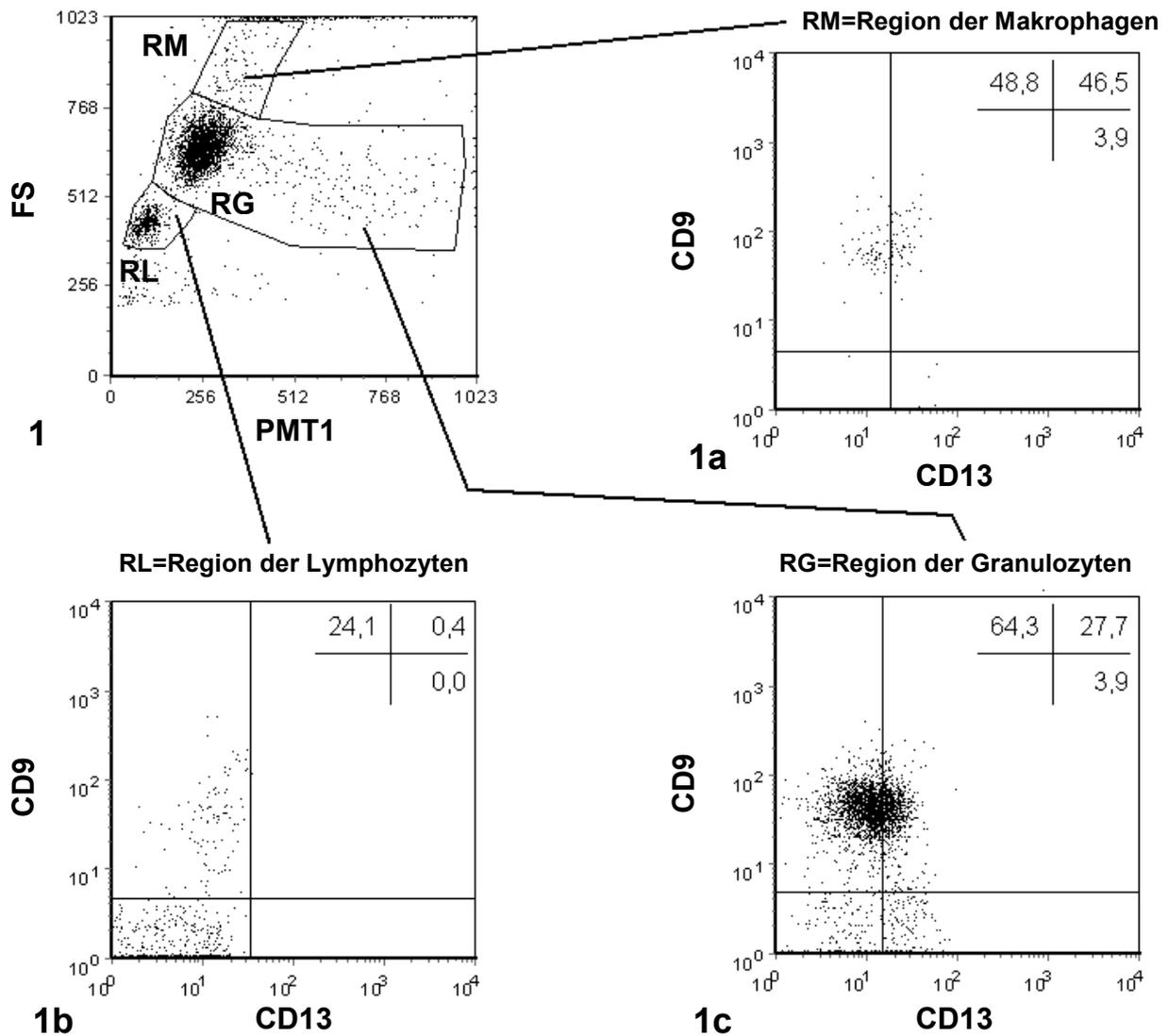


Abb. 1: Durchflusszytometrische Analyse equiner peripherer Blutleukozyten
1: Darstellung der Messereignisse im Vorwärts- (FS) und Seitwärtsstreulicht (PMT1).
1a-c: in 1 getrennte Zellpopulationen nach simultaner Markierung des CD9- und CD13-Antigens; 1a: Region der Makrophagen (RM); 1b: Region der Lymphozyten (RL); 1c: Region der Granulozyten (RG).
1a-c: linkes oberes Fenster: CD9⁺ Zellen; rechtes unteres Fenster: CD13⁺ Zellen; rechtes oberes Fenster: doppelt positive Zellen.
 Der prozentuale Anteil der Zellen an allen Ereignissen aus der betreffenden Messregion ist im jeweiligen Fenster mit Hilfe des Datenkreuzes im rechten oberen Abschnitt des Färbediagramms angegeben.

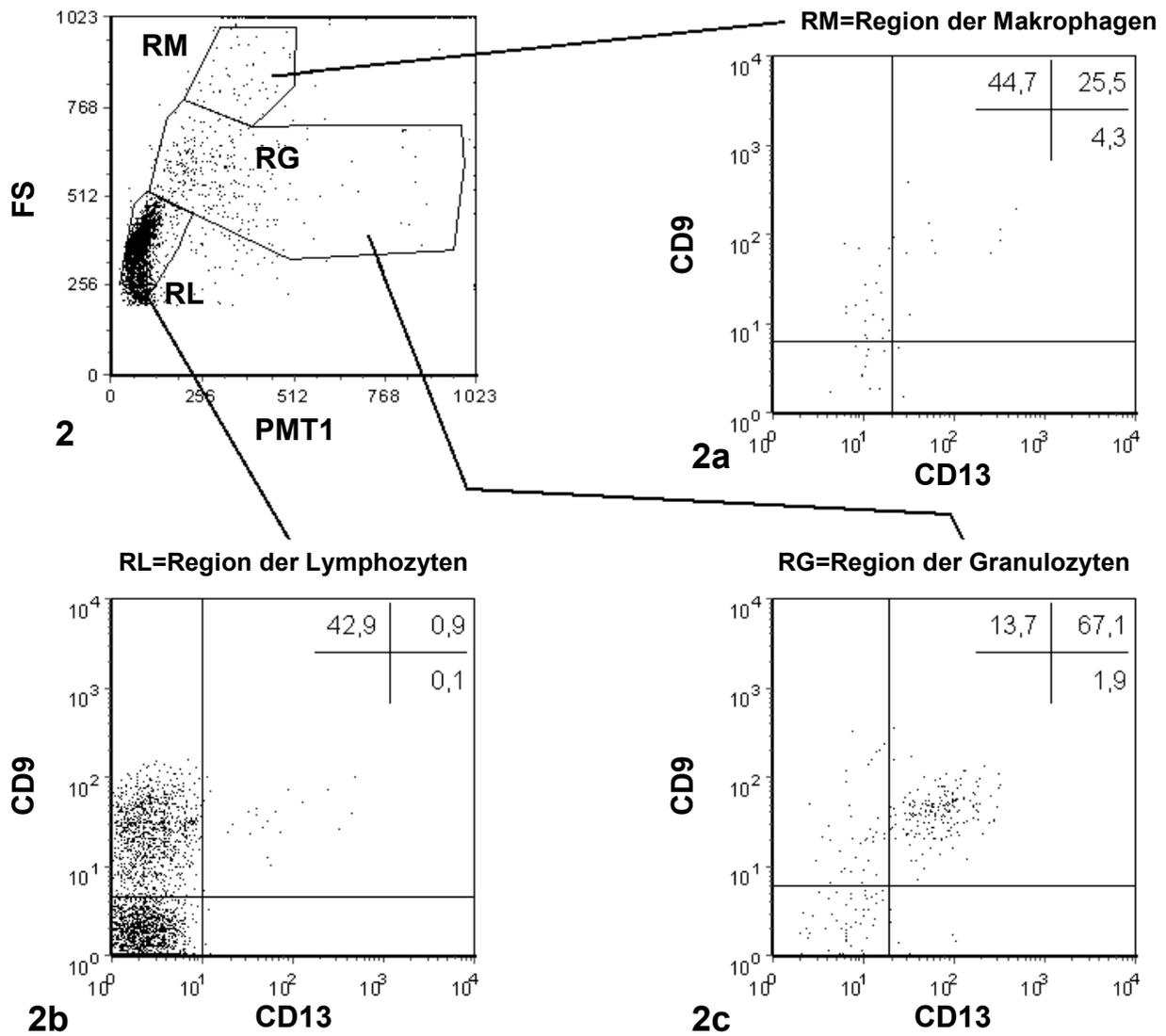


Abb. 2: Durchflusszytometrische Analyse equiner bronchoalveolärer Lavagezellen (BALC)
 Legende s. Abb. 1, vorige Seite
 Die in der vorigen Abbildung als 1 bzw. 1a-c bezeichneten Diagramme entsprechen hier den Diagrammen 2 bzw. 2a-c und sind auf BALC bezogen.

Tab. 9: Durchflusszytometrisch analysierte Zellpopulationen in der BALF im Rahmen der Erstuntersuchung (relative Anteile)

Region	n	[%]		
		$x_a \pm SD$ <i>$x_g x/SF$</i>	Min.	Max.
[%] in RL	48	47,8 \pm 10,9	18,0	69,0
<i>[%] in RG</i>	48	<i>10,6 $x/1,6$</i>	3,9	31,7
<i>[%] in RM</i>	48	<i>4,3 $x/1,6$</i>	1,2	16,4
[%] Einz.	48	80,8 \pm 7,6	61,3	98,5
[%] Tote (PI ⁺)	48	14,7 \pm 6,8	4,9	46,4

x_a : arithmetischer Mittelwert; SD: Standardabweichung

kursiv (nicht normalverteilt): x_g : geometrischer Mittelwert; SF: Streufaktor

Min.: Minimum; Max.: Maximum

RL: Messregion der Lymphozyten; RG: Messregion der Granulozyten; RM: Messregion der Makrophagen

4.1.4 Vergleich der durchflusszytometrischen mit der lichtmikroskopischen Zelldifferenzierung

Der lichtmikroskopisch bestimmte Prozentsatz der PMN wies eine signifikante Korrelation mit dem Anteil der durchflusszytometrisch analysierten Ereignissen in RG ($r=0,64$; $p\leq 0,001$) auf. Außerdem bestand zwischen dem lichtmikroskopisch und dem durchflusszytometrisch ermittelten Anteil an Makrophagen eine enge positive Korrelation ($r=0,71$; $p\leq 0,001$) (s. Tab. 10). Auch für den Lymphozytenanteil wurde eine positive Korrelation zwischen den beiden Methoden ermittelt ($r=0,51$; $p\leq 0,001$), so dass sich bezüglich ihrer Identifizierung für alle drei Zellpopulationen Verbindungen zwischen der lichtmikroskopischen Differenzierung als Goldstandard und der Durchflusszytometrie herstellen ließen. Aufgrund der deutlichen Divergenzen zwischen den Anteilen der jeweiligen Zellpopulation im Vergleich von Lichtmikroskopie und durchflusszytometrischer Identifizierung ist trotzdem eine fehlerhafte Einordnung von Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse wahrscheinlich. Da Makrophagen eine besonders starke prozentuale Abweichung aufweisen (Lichtmikroskopie: $30,3 \pm 11,5\%$; Durchflusszytometrie: $4,3 \times / 1,6$), ist insbesondere diese Population davon betroffen. Über einen genauen Zahlenwert falsch eingeordneter Messereignisse ist anhand der vorliegenden Daten, vor allem durch den derzeitigen Mangel an spezifischen Markern für Makrophagen des Pferdes, noch keine sichere Aussage zu treffen.

Tab. 10: Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten (r) zwischen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmten Zellpopulationen

Durchfluss- zytometrie	[%] in RL	[%] in RM	[%] in RG	Einz. [%]
Licht- mikroskopie				
Ly [%]	0,51 ***	-0,51 ***	-0,35 *	0,45 **
M [%]	-0,36 *	0,71 ***	-0,05 n. s.	-0,65 ***
PMN [%]	-0,03 n. s.	-0,44 **	0,64 ***	0,49 ***
abs. ZZ/μl	-0,04 n. s.	0,12 n. s.	0,24 n. s.	0,07 n. s.

hellgraue Schattierung: $p \leq 0,05$ (*); mittelgraue Schattierung: $p \leq 0,01$ (**)
dunkelgraue Schattierung: $p \leq 0,001$ (***)

4.1.5 Immunphänotypisierung der BALC

4.1.5.1 Lymphozyten in der Region der Lymphozyten

Aufgrund der guten Abgrenzbarkeit, der morphologischen Einheitlichkeit und der Identifizierung mit spezifischen Lymphozytenmarkern handelt es sich beim überwiegenden Anteil der Messereignisse in RL um Lymphozyten. Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit werden im Folgenden auch als BALL bezeichnet.

Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung der Lymphozyten für alle Probanden zeigten in der Einzelmarkierung, dass mit durchschnittlich 91,1% ($\pm 7,3\%$; 68,7 bis 97,1%) der größte Anteil der Messereignisse in RL $CD2^+$ war. Demgegenüber konnten lediglich 68,8% ($\pm 11,7\%$; 29,9 bis 88,5%) der Zellen in RL mit dem Antikörper gegen das CD5-Antigen angefärbt werden. Somit scheinen nicht alle T-Lymphozyten aus der equinen BALF das CD5-Antigen konstitutiv auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Etwas mehr als ein Drittel (35,4 $\pm 8,8\%$; 15,8 bis 54,9%) der Ereignisse in RL waren $CD4^+$. Mit 40,8% ($\pm 7,8\%$; 19,0 bis 57,1%) trug ein etwas größerer Anteil auf seiner Oberfläche das CD8-Antigen. Im Durchschnitt exprimierten 44,6% ($\pm 10,9\%$; 17,6 bis 66,1%) der Zellen in RL das CD9-Antigen. B-Zellen lagen in RL zwischen 0,1% und 2,7% mit einem Durchschnitt im Bereich des Prozentsatzes der falsch-positiven Zellen (1,4 $\pm 0,6\%$) (s. Abb. 3). Bei Markierung des CD13-Oberflächenantigens zeigten sich mit 3,0% ($x: 1,7$; 0,8 bis 11,8%) nur wenige Zellen positiv. Zudem kamen in der Messregion RL 2,8% ($x: 1,8$; 0,5 bis 8,7) $CD13^+/9^+$ Zellen vor. Bei den beiden letztgenannten Subpopulationen könnte es sich um PMN handeln (s. auch Kap. 4.1.5.3, S. 71).

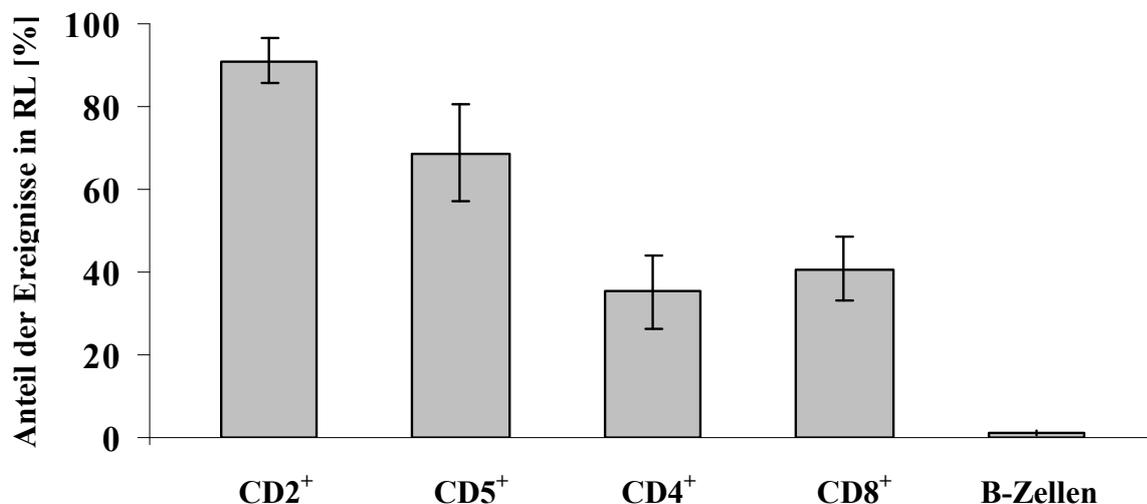


Abb. 3: Durchflusszytometrisch identifizierte BALL in RL im Rahmen der Erstuntersuchung (Einzelmarkierung)
 $x_a \pm SD$; $n=48$ ($CD8^+$: $n=47$)

Zwischen CD5⁺ Lymphozyten und der durchflusszytometrisch bestimmten Lymphozytenzahl pro μl BALF bestand ein positiver Zusammenhang ($r=0,55$; $p\leq 0,001$), während CD2⁺ Lymphozyten und die Lymphozytenzahl pro μl nicht statistisch signifikant korrelierten.

Zwischen den immunphänotypisch mittels Einzelmarkierung charakterisierten Lymphozyten-subpopulationen lagen folgende Korrelationen mit $p\leq 0,001$ vor:

CD2⁺ waren positiv mit den CD5⁺ Lymphozyten korreliert ($r=0,49$). Bei einer Steigung der zugehörigen Regressionsgerade von $m=1,09$ ist bei hohen Prozentsätzen an CD2⁺ Zellen mit ebenfalls hohen Anteilen der CD5⁺ Zellen zu rechnen. Diese waren, relativ betrachtet, noch etwas höher als bei niedrigen CD2⁺ Anteilen. Demgegenüber bestand ein negativer Zusammenhang zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten ($r= -0,55$), so dass erwartungsgemäß in einer BALF mit einem hohen Anteil an CD8⁺ T-Zellen im Mittel ein geringerer Prozentsatz an CD4⁺ T-Lymphozyten vorlag. Allerdings enthielt eine BALF mit einem großen Prozentsatz an CD4⁺ Zellen aufgrund des flachen Gefälles der Regressionsgeraden ($m= -0,48$) relativ mehr CD8⁺ Zellen als eine BALF mit wenigen CD4⁺ Zellen (s. Abb. 4, folgende Seite). Da mit $r=0,47$ ein positiver Zusammenhang zwischen CD2⁺ Lymphozyten und CD4⁺ Lymphozyten ermittelt wurde ($m=0,78$), lagen im Durchschnitt bei einem hohen Anteil an CD2⁺ Lymphozyten auch viele CD4⁺ Zellen vor. Allerdings war eine Korrelation zwischen CD2⁺ und CD8⁺ Lymphozyten aus den vorliegenden Daten nicht zu entnehmen (s. Abb. 5, folgende Seite). In Kombination mit der flachen Steigung der negativen Korrelation zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten und dem Zusammenhang der CD4⁺ mit den CD2⁺ Lymphozyten mit $m<1$, spricht dies für die Anwesenheit einer CD2⁺/4⁻/8⁻ Subpopulation von T-Lymphozyten in der BALF, deren Prozentsatz besonders hoch ist, wenn niedrige Anteile an CD4⁺ Zellen vorliegen. Indirekte Hinweise auf eine solche Subpopulation sind auch aus den Prozentsätzen in der Einzelmarkierung zu entnehmen, bei der durch Addition der Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nicht der Prozentsatz der CD2⁺ Lymphozyten erreicht wird (s. Abb. 3, S. 59)

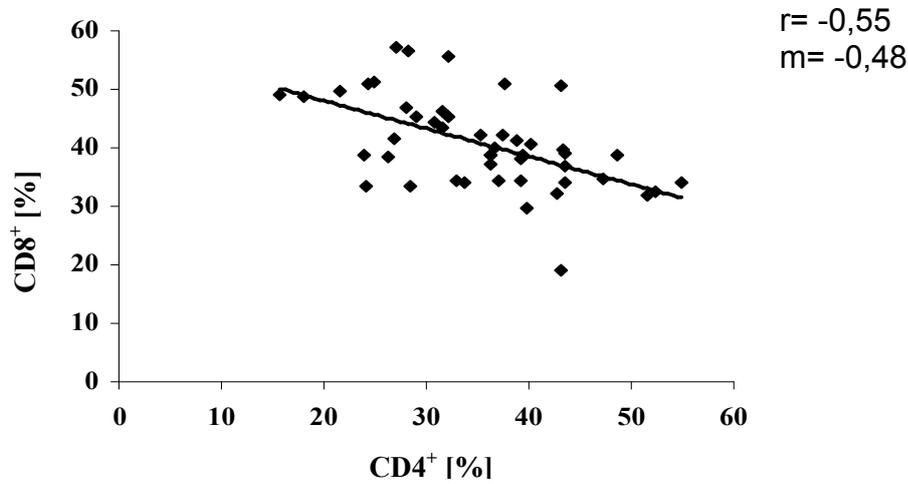


Abb. 4: Korrelation zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten ($p \leq 0,001$; $n=45$)

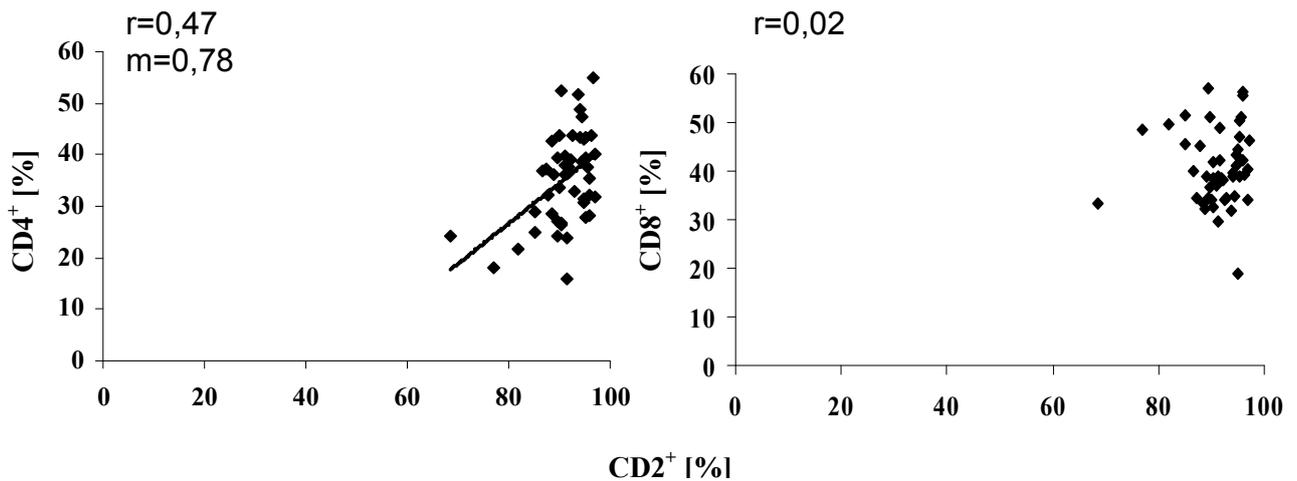


Abb. 5: Korrelation zwischen CD2⁺ und CD4⁺ ($p \leq 0,001$; $n=46$) bzw. CD2⁺ und CD8⁺ Lymphozyten (n. s.; $n=47$)

Mit Hilfe der Abbildung 6 wird anhand der typischen BALF eines Pferdes die simultane Zweifachmarkierung der Zellen in der durchflusszytometrischen Lymphozytenregion erläutert. Bei der Markierung des CD2-Antigens waren die positiven Zellen grundsätzlich durch gute Abgesetztheit und eine hohe Signalintensität gekennzeichnet. Das CD9 Signal verhielt sich weniger distinkt. Bei der Markierung des CD5-Antigens variierte das Signal der positiven Zellen über einen Bereich von mehr als einer Logarithmus-Stufe.

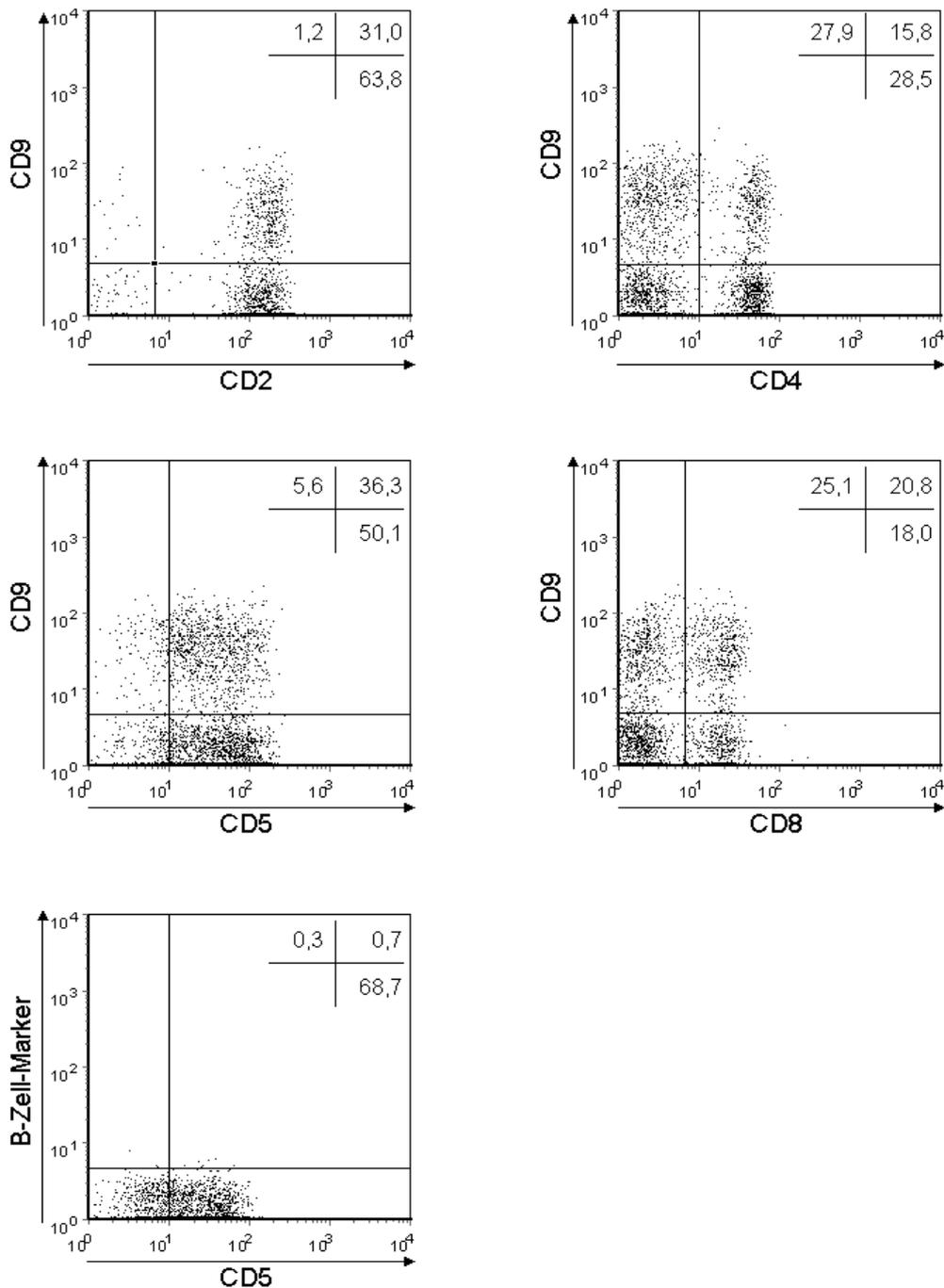


Abb. 6: Immunphänotypisierung der BALL in RL in einer typischen equinen BALF
Legende s. Abb. 1, S. 55

Obwohl sich die Mittelwerte der $CD2^+/9^+$ ($31,5 \pm 12,3\%$) und der $CD5^+/9^+$ Messereignisse ($27,8 \pm 10,3\%$) in RL ähnelten, zeigten die Zweifachmarkierungen, dass die Verteilung des CD9-Antigens auf den $CD2^+$ Zellen nicht der auf den $CD5^+$ Zellen entspricht. Der Anteil der $CD2^+/9^+$ an allen $CD2^+$ Zellen lag bei ungefähr einem Drittel. Das Verhältnis von $CD5^+/9^+$ an den $CD5^+$ Ereignissen in RL betrug hingegen knapp die Hälfte. Da das CD9-Antigen als Aktivierungsmarker auf T-Zellen gilt, kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die $CD5^+$ Zellen vermehrt in einem Zustand der Aktivierung befinden.

Mit einem prozentualen Anteil von $25,4\%$ ($\pm 8,4\%$) an den Messereignissen in RL unterschieden sich die $CD8^+/9^+$ Zellen vom Prozentsatz der $CD4^+/9^+$ Zellen, der lediglich $13,1\%$ ($x/:1,6$) der Lymphozyten aus der BALF (BALL) ausmachte. Beim Vergleich der $CD4^+$ mit den $CD8^+$ Zellen bestand ebenfalls eine voneinander abweichende Verteilung des CD9-Moleküls: Während das Verhältnis der $CD4^+/9^+$ Zellen an den $CD4^+$ Ereignissen in RL ca. ein Drittel betrug, lag der Anteil der $CD8^+/9^+$ Zellen an den $CD8^+$ Zellen bei rund der Hälfte. Da die Gesamtprozentsätze der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zellen nur gering voneinander abwichen, trugen das CD9-Antigen mehr $CD8^+$ als $CD4^+$ Zellen auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 7 und Tab. 11, S. 64).

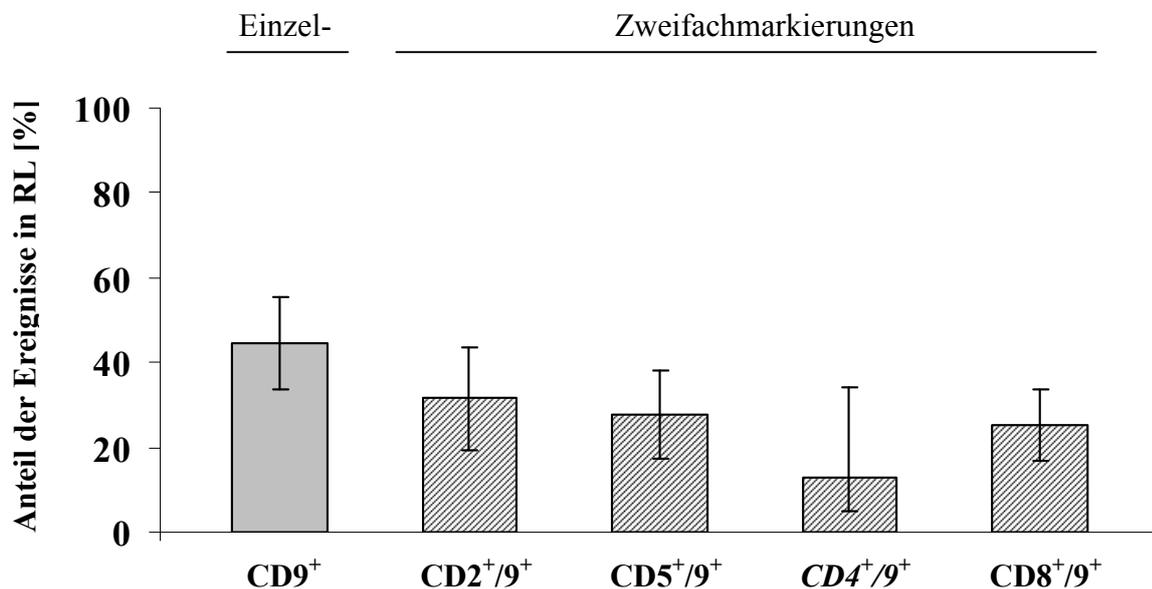


Abb. 7: Durchflusszytometrisch identifizierte BALL in RL im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9-Antigens (grau) und Zweifachmarkierungen (schraffiert); $CD9^+$: $n=47$; Zweifachmarkierungen: $n=46$
 $x_a \pm SD$; *kursiv (nicht normalverteilt): $x_g x/:SF$*

Tab. 11: Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RL

Subpopulation	n	x_a [%] in RL x_g [%] in RL	\pm SD [%] x : SF	Minimum [%]	Maximum [%]
CD2 ⁺	48	91,1	7,3	68,7	97,1
CD5 ⁺	48	68,8	11,7	29,9	88,5
CD4 ⁺	48	35,4	8,8	15,8	54,9
CD8 ⁺	47	44,6	10,9	17,6	66,1
B-Zellen	48	1,4	0,6	0,1	2,7
CD2 ⁺ /9 ⁺	47	31,5	12,3	0,4	58,6
CD2 ⁺ /9 ⁻		58,0	14,7	18,4	94,1
CD5 ⁺ /9 ⁺	46	27,8	10,3	10,7	54,7
CD5 ⁻ /9 ⁺		13,9	1,8	2,8	39,7
CD5 ⁺ /9 ⁻		33,5	13,0	5,2	70,9
CD4 ⁺ /9 ⁺	46	13,1	1,6	4,5	39,3
CD4 ⁻ /9 ⁺		30,1	9,9	11,5	60,0
CD4 ⁺ /9 ⁻		21,9	9,8	6,4	49,5
CD8 ⁺ /9 ⁺	46	25,4	8,4	9,6	46,5
CD8 ⁻ /9 ⁺		19,0	7,0	6,4	43,8
CD8 ⁺ /9 ⁻		24,1	9,5	10,4	51,9
CD13 ⁻ /9 ⁺	46	42,4	10,8	14,5	61,8

⁺: positiv für ein Antigen; ⁻: negativ für ein Antigen

Tab. 12: Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten (r) zwischen einzeln und zweifach markierten Lymphozytensubpopulationen in der BALF

Subpopulation	CD2 ⁺	CD5 ⁺	CD4 ⁺	CD9 ⁺	CD8 ⁺
CD5 ⁺ /B ⁻	0,54 ***	0,92 ***	0,39 **	-0,05 n. s.	0,05 n. s.
CD2 ⁺ /9 ⁺	0,12 n. s.	-0,06 n. s.	-0,18 n. s.	0,77 ***	0,01 n. s.
CD2 ⁺ /9 ⁻	0,46 **	0,28 n. s.	0,39 **	-0,75 ***	0,01 n. s.
CD5 ⁺ /9 ⁺	0,05 n. s.	0,09 n. s.	-0,28 n. s.	0,69 ***	0,19 n. s.
CD5 ⁺ /9 ⁻	0,49 ***	0,35 *	0,51 ***	-0,74 ***	0,01 n. s.
CD4 ⁺ /9 ⁺	0,11 n. s.	-0,03 n. s.	0,26 n. s.	0,52 ***	-0,32 *
CD4 ⁺ /9 ⁻	-0,18 n. s.	-0,06 n. s.	-0,65 ***	0,81 ***	0,35 *
CD4 ⁺ /9 ⁻	0,40 **	0,30 *	0,79 ***	-0,74 ***	-0,33 *
CD8 ⁺ /9 ⁺	-0,13 n. s.	0,05 n. s.	-0,57 ***	0,78 ***	0,47 **
CD8 ⁺ /9 ⁺	-0,14 n. s.	-0,10 n. s.	-0,01 n. s.	0,63 ***	-0,34 *
CD8 ⁺ /9 ⁻	0,44 **	0,14 n. s.	0,15 n. s.	-0,48 ***	0,26 n. s.
CD13 ⁺ /9 ⁺	-0,03 n. s.	-0,01 n. s.	-0,35 *	0,36 *	0,12 n. s.

hellgraue Schattierung: $p \leq 0,05$ (*); mittelgraue Schattierung: $p \leq 0,01$ (**)
dunkelgraue Schattierung: $p \leq 0,001$ (***)

Unter den durch Zweifachmarkierung charakterisierten Lymphozytensubpopulationen bestand ein Zusammenhang zwischen CD2⁺/9⁺ und CD4⁺/9⁺ Lymphozyten ($r=0,61$; $p \leq 0,001$) bzw. CD2⁺/9⁺ und CD8⁺/9⁺ ($r=0,57$; $p \leq 0,001$). Für den erstgenannten Zusammenhang weist die flache Steigung der Regressionsgeraden ($m=0,31$) darauf hin, dass bei hohen CD2⁺/9⁺ Anteilen relativ weniger CD4⁺/9⁺ Zellen in der jeweiligen BALF vorhanden sind als bei niedrigen. Im Umkehrschluss müsste damit ein größerer Anteil an CD8⁺/9⁺ Zellen verbunden sein. Daraus ergibt sich theoretisch bei kleinen CD2⁺/9⁺ Prozentsätzen ein relativ größerer CD4⁺/9⁺ (und somit ein kleinerer prozentualer Anteil an CD8⁺/9⁺ Zellen) als beim Durchschnitt der Proben. Die Steigung der Regressionsgeraden des Zusammenhangs zwischen CD2⁺/9⁺ und CD8⁺/9⁺ Lymphozyten ergänzt mit $m=0,39$ die Steigung der Geraden zwischen CD2⁺/9⁺ und CD4⁺/9⁺ Lymphozyten aber nicht in der erwarteten Weise zur Summe von 1. Neben CD4⁺/9⁺ und CD8⁺/9⁺ Lymphozyten tritt bei höheren Anteilen an CD2⁺/9⁺ bzw. niedrigen Prozentsätzen an CD4⁺/9⁺ Zellen offenbar vermehrt eine Population von CD2⁺/4⁻/8⁻/9⁺ Zellen auf (s. Abb. 8). Dabei könnte es sich um $\gamma\delta$ -T-Zellen handeln.

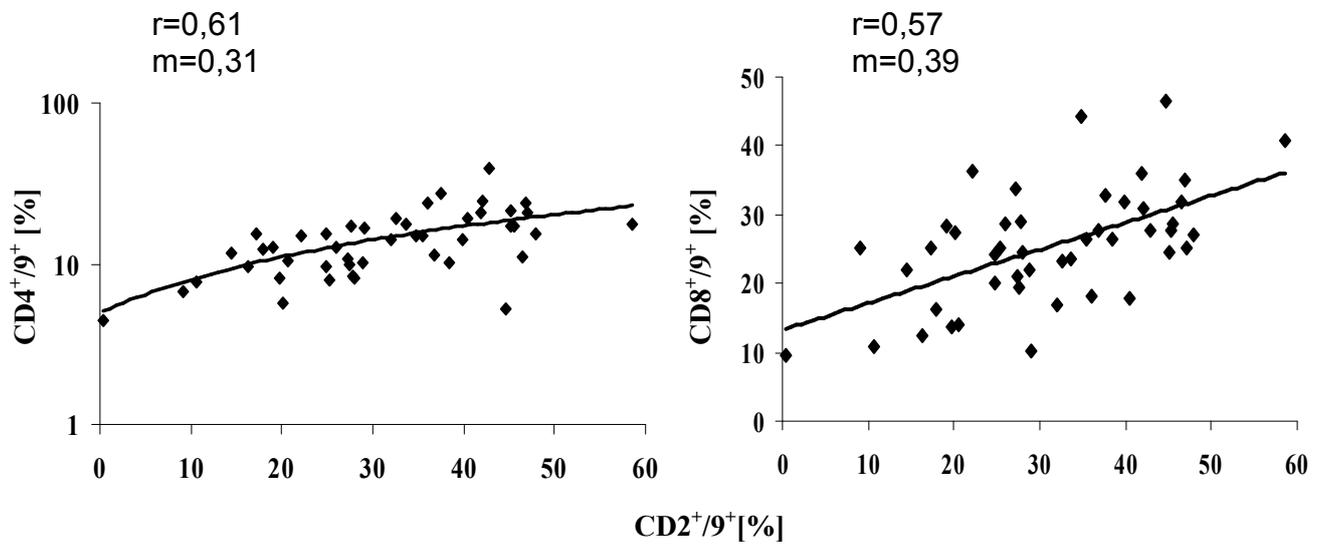


Abb. 8: Korrelation zwischen CD2⁺/9⁺ Lymphozyten und CD4⁺/9⁺ ($p \leq 0,001$; $n=44$) bzw. CD8⁺/9⁺ Lymphozyten ($p \leq 0,001$; $n=44$)

4.1.5.2 Lymphozyten in den Regionen der Granulozyten und Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine Untersuchung von Lymphozyten, die außerhalb ihrer Messregion innerhalb der durchflusszytometrisch bestimmten Bereiche der Granulozyten (RG) und Makrophagen (RM) identifiziert wurden. Die Zuordnung zur Lymphozytenpopulation ist anhand der eingesetzten, spezifischen Marker sicher zu treffen. Eine Ausnahme bildet in allen Messbereichen die $CD13^{-}/9^{+}$ Subpopulation. Hierbei könnte es sich sowohl um Lymphozyten als auch um Makrophagen handeln. Insbesondere die Region der Makrophagen zeichnete sich durch größere Zellen aus, so dass es sich bei den dort identifizierten Lymphozyten um große Immunzellen handelt. Dies wird als Zeichen erhöhter Aktivität gewertet. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Granulozyten und Makrophagen waren in den beiden Bereichen kleinere prozentuale Anteile und andere Verhältnisse der jeweiligen Lymphozytensubpopulationen vorhanden als in RL.

In RG wurde mit 0,7% ($x/4,6$) ein durchschnittlicher Anteil an B-Lymphozyten (0,0 bis 3,0%) im Bereich des Prozentsatzes der falsch-positiven Zellen identifiziert. Zudem befanden sich in dieser Messregion 16,8% ($\pm 7,8\%$) $CD2^{+}$ Zellen (2,0 bis 35,8%). Der Mittelwert für $CD5^{+}$ Lymphozyten lag bei 6,8% ($x/2,0$) mit Einzelwerten zwischen 0,8 und 22,0%. Der Anteil der $CD4^{+}$ Zellen erreichte mit 6,3% ($x/1,7$) eine ähnliche Höhe (1,3 bis 18,2%). Der Prozentsatz der $CD8^{+}$ Lymphozyten in RG lag nur knapp über dem Anteil falsch-positiver Zellen (2,4% $x/2,1$; 0,3 bis 10,4%) (s. Tab. 13, folgende Seite).

In RM lag der durchschnittliche Anteil der B-Lymphozyten mit 0,2% ($x/45,4$; 0,0 bis 12,2%) wie in RL und RG im Bereich des Prozentsatzes falsch-positiver Zellen. 27,8% ($\pm 12,7\%$; 2,5 bis 73,4%) der Zellen aus RM ließen sich mit dem Antikörper gegen CD2 anfärben, während 6,9% ($x/6,6$; 0,0 bis 68,5%) der Zellen das CD5-Antigen aufwiesen. Der Prozentsatz der $CD4^{+}$ Zellen lag bei durchschnittlich 11,6% ($x/1,8$) mit Einzelwerten zwischen 2,9 und 53,9%. Für $CD8^{+}$ Zellen erreichte der Mittelwert mit 1,1% ($x/20,8$; 0,0 bis 21,0%) den Schwellenwert nicht (s. Tab. 14, folgende Seite). Somit scheinen die außerhalb von RL liegenden T-Zellen aus der BALF eher $CD4^{+}$ als $CD8^{+}$ zu sein.

Tab. 13: Durchflusszytometrisch identifizierte Lymphozytensubpopulationen in RG

Subpopulation	n	x_a [%] in RG x_g [%] in RG	SD [%] SF	Minimum [%]	Maximum [%]
CD2 ⁺	48	16,8	7,8	2,0	35,8
CD5 ⁺	48	6,8	2,0	0,8	22,0
CD4 ⁺	48	6,3	1,7	1,3	18,2
CD8 ⁺	46	2,4	2,1	0,3	10,4
B-Zellen	48	0,7	4,6	0,0	3,0
CD2 ⁺ /9 ⁺	47	4,3	5,9	0,0	19,0
CD2 ⁺ /9 ⁻		5,3	2,0	0,9	19,1
CD5 ⁺ /9 ⁺	46	4,6	1,9	0,9	14,2
CD5 ⁺ /9 ⁻		2,3	2,5	0,2	9,8
CD4 ⁺ /9 ⁺	46	4,1	2,2	0,6	50,4
CD4 ⁺ /9 ⁻		2,2	2,4	0,2	7,6
CD8 ⁺ /9 ⁺	46	2,8	2,2	0,2	7,9
CD8 ⁺ /9 ⁻		0,4	15,0	0,0	3,8
CD13/9 ⁺	46	31,9	13,0	6,6	61,8
CD5 ⁺ /B ⁺	47	0,6	8,4	0,0	65,0
CD5 ⁺ /B ⁻		5,0	2,3	0,6	20,1

⁺: positiv für ein Antigen; ⁻: negativ für ein Antigen

Tab. 14: Durchflusszytometrisch identifizierte Lymphozytensubpopulationen in RM

Subpopulation	n	x_a [%] in RM x_g [%] in RM	SD [%] SF	Minimum [%]	Maximum [%]
CD2 ⁺	48	27,8	12,7	2,5	73,4
CD5 ⁺	48	6,9	6,6	0,0	68,5
CD4 ⁺	48	11,6	1,8	2,9	53,9
CD8 ⁺	46	1,1	20,8	0,0	21,0
B-Zellen	48	0,2	45,4	0,0	12,2
CD2 ⁺ /9 ⁺	47	6,2	11,8	0,0	59,8
CD2 ⁺ /9 ⁻		3,9	27,2	0,0	50,0
CD5 ⁺ /9 ⁺	46	8,9	2,1	1,5	57,8
CD5 ⁺ /9 ⁻		1,8	9,8	0,0	15,9
CD4 ⁺ /9 ⁺	46	7,5	6,0	0,0	48,5
CD4 ⁺ /9 ⁻		1,7	22,8	0,0	15,6
CD8 ⁺ /9 ⁺	46	1,5	33,8	0,0	31,8
CD8 ⁺ /9 ⁻		0,0	109,5	0,0	7,7
CD13/9 ⁺	46	47,9	11,9	87,4	16,9
CD5 ⁺ /B ⁺		0,0	117,8	0,0	2,8
CD5 ⁺ /B ⁺	47	0,0	140,4	0,0	57,1
CD5 ⁺ /B ⁻		3,3	17,9	0,0	47,4

⁺: positiv für ein Antigen; ⁻: negativ für ein Antigen

Zwischen den einzelnen Lymphozytensubpopulationen konnten in RG folgende signifikante Korrelationskoeffizienten berechnet werden (jeweils $p \leq 0,001$):

$CD4^+$ Zellen in dieser Messregion waren sowohl mit $CD9^+$ ($r = -0,51$) als auch mit $CD2^+$ Zellen ($r = 0,72$) korreliert. Dabei lag der erstgenannte Zusammenhang mit seinem negativen Vorzeichen auch in RL vor, erreichte dort aber keine hohe statistische Signifikanz.

$CD2^+$ Lymphozyten aus RG wiesen sowohl mit $CD4^+/9^+$ ($r = 0,56$; $p \leq 0,001$) als auch mit $CD8^+/9^+$ Zellen einen positiven Zusammenhang auf ($r = 0,51$; $p \leq 0,001$). Keine dieser beiden Korrelationen bestand in RL.

In RM bestand eine positive Korrelation analog zu den Verhältnissen bei den (kleineren) Lymphozyten aus RL zwischen $CD2^+$ und $CD4^+$ Zellen ($r = 0,70$; $p \leq 0,001$) (s. Abb. 9). Während $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten in RL negativ korreliert waren, lag in RM zwischen ihnen ein positiver Zusammenhang vor ($r = 0,55$; $p \leq 0,001$) (s. Abb. 10, folgende Seite).

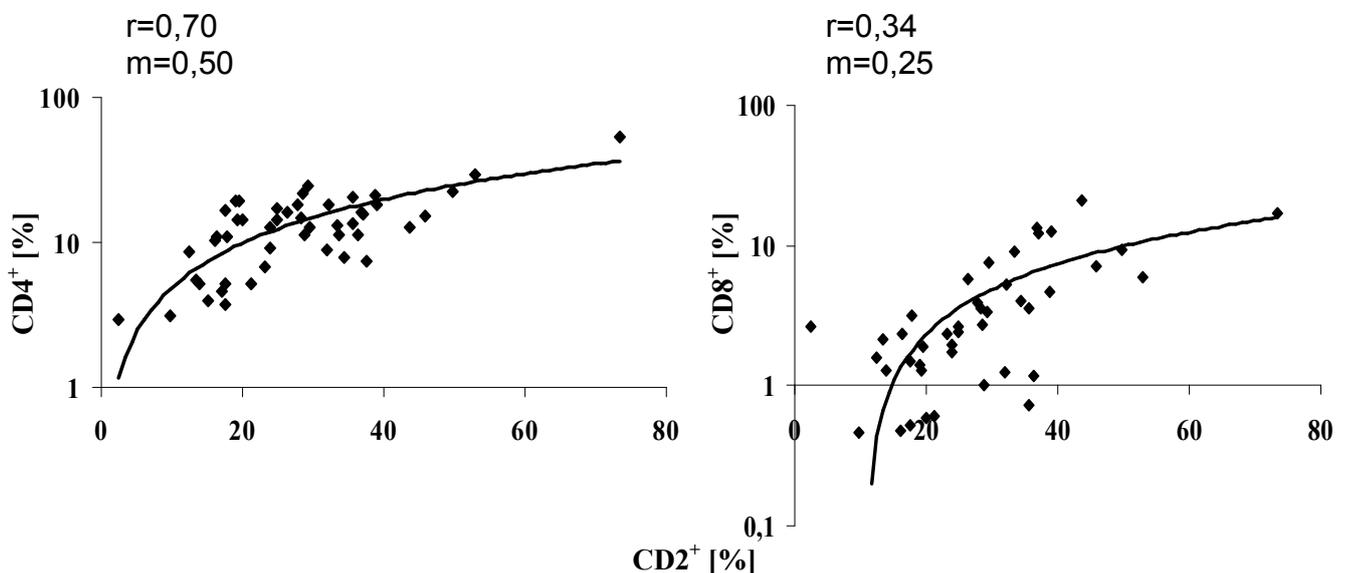


Abb. 9: Korrelation zwischen $CD2^+$ und $CD4^+$ ($p \leq 0,001$; $n=46$) bzw. $CD2^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten in RM ($p \leq 0,05$; $n=45$)

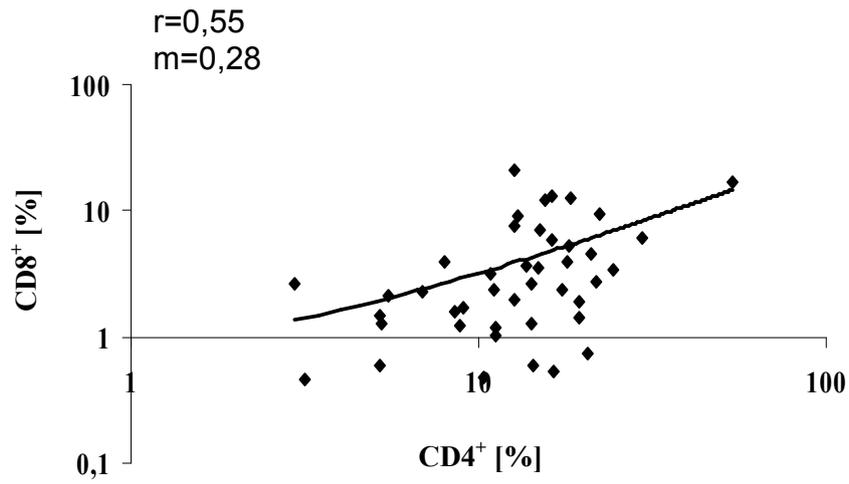


Abb. 10: Korrelation zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten in RM ($p \leq 0,001$; $n=45$)

4.1.5.3 Andere Zellen in der Region der Granulozyten

Im Mittel war bei 74,5% ($\pm 11,2\%$; 44,2 bis 94,1%) der Zellen in RG das CD9-Antigen und bei durchschnittlich 47,5% ($\pm 19,2\%$; 7,1 bis 81,2%) das CD13-Antigen nachweisbar (s. Abb. 11). Neben den Einzelmarkierungen sind die durchschnittlichen Prozentsätze der durch Zweifachmarkierung identifizierten Zellen in Tab. 15 aufgeführt.

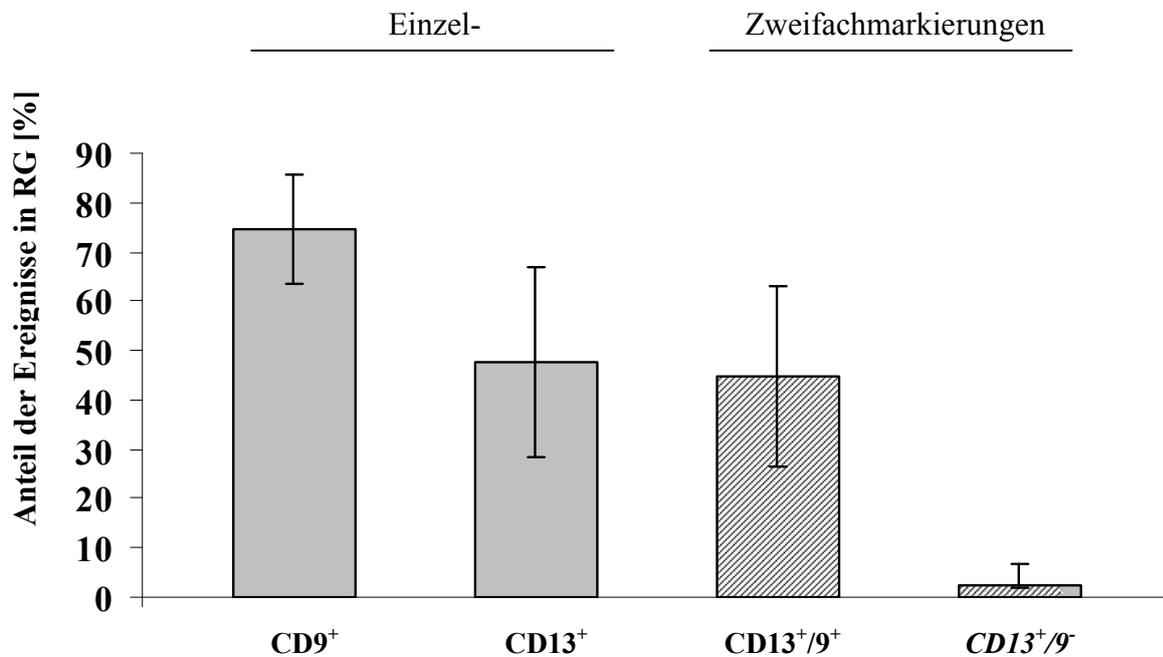


Abb. 11: Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RG im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9- bzw. CD13-Antigens (grau) und Zweifachmarkierungen (schraffiert)

$x_a \pm SD$; *kursiv (nicht normalverteilt): $x_g x/SF$*

CD13⁺: n=48; CD9⁺: n=47; Zweifachmarkierungen: n=46

Tab. 15: Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RG

Subpopulation	n	x_a [%] in RG <i>x_g [%] in RG</i>	SD [%] <i>SF</i>	Minimum [%]	Maximum [%]
CD9 ⁺	47	74,5	11,2	44,2	94,1
CD13 ⁺	48	47,5	19,2	7,1	81,2
CD2 ⁻ /9 ⁺	47	59,0	19,4	0,3	92,3
CD5 ⁻ /9 ⁺	46	70,4	12,1	41,7	93,6
CD4 ⁻ /9 ⁺	46	70,7	14,1	21,9	91,9
CD8 ⁻ /9 ⁺	46	72,1	11,8	38,9	92,8
CD13 ⁺ /9 ⁺	46	44,9	18,3	9,2	77,0
CD13 ⁻ /9 ⁻		1,8	2,5	0,2	9,6

⁺: positiv für ein Antigen; ⁻: negativ für ein Antigen

Der positive Zusammenhang zwischen CD13⁺ und CD9⁺ Messereignissen aus RG ($r=0,62$; $p\leq 0,001$), dessen Regressionsgerade mit $m=0,36$ vergleichsweise flach anstieg, belegt, dass bei hohen CD13⁺ Anteilen zwar auch große Prozentsätze an CD9⁺ Zellen vorlagen, diese aber relativ niedriger als bei kleinen Prozentsätzen der CD13⁺ Zellen ausfielen (s. Abb. 12, folgende Seite). CD13⁺ Zellen wiesen in RG zudem positive Zusammenhänge mit CD2⁻/9⁺ ($r=0,38$; $p\leq 0,01$), CD5⁻/9⁺ ($r=0,59$; $p\leq 0,001$), CD4⁻/9⁺ ($r=0,50$; $p\leq 0,001$) und CD8⁻/9⁺ Zellen ($r=0,64$; $p\leq 0,001$) auf. Die stärkste lineare Korrelation bestand zwischen CD13⁺ und CD13⁺/9⁺ Messereignissen ($r=0,96$; $p\leq 0,001$). Für diesen Zusammenhang betrug die Steigung der Regressionsgeraden 1,01 (s. Abb. 13, folgende Seite), so dass bei hohen Anteilen der CD13⁺ Zellen grundsätzlich auch mit einem großen Prozentsatz an CD13⁺/9⁺ Zellen zu rechnen ist. Es erscheint somit wahrscheinlich, dass alle PMN sowohl das CD13 als auch das CD9-Antigen tragen. Bestärkt wird dies durch die positiven Korrelationen sowohl für CD9⁺ als auch für CD13⁺ Ereignisse in RG mit dem durchflusszytometrischen Prozentsatz der PMN ($r=0,58$ bzw. $0,57$; $p\leq 0,001$). Außerdem waren CD13⁺/9⁺ ($r=0,62$; $p\leq 0,001$), CD2⁻/9⁺ ($r=0,47$; $p\leq 0,001$), CD5⁻/9⁺ ($r=0,63$; $p\leq 0,001$), CD4⁻/9⁺ ($r=0,58$; $p\leq 0,001$) und CD8⁻/9⁺ Zellen ($r=0,57$; $p\leq 0,001$) positiv mit diesem Messparameter korreliert. Die Regressionsgerade für die Korrelation zwischen CD9⁺ und CD13⁺/9⁺ Zellen ($r=0,70$) wies eine flache Steigung ($m=0,15$) auf (s. Abb. 13, folgende Seite), die durch die Anwesenheit von 29,0% ($x: 1,61$; 6,64 bis 61,82%) CD13⁻/9⁺ Lymphozyten (oder Makrophagen) in RG zu erklären ist. Indizien dafür liefern z. B. die beiden negativen Korrelationen, die CD13⁻/9⁺ Zellen aus diesem Bereich sowohl mit dem lichtmikroskopisch ($r= -0,50$; $p\leq 0,001$) als auch mit dem durchflusszytometrisch ermittelten Anteil der PMN ($r=0,41$; $p\leq 0,01$) besaßen, so dass es sich dabei nicht um Granulozyten handeln dürfte.

Zusätzlich zu den PMN aus RG kamen CD13⁺/9⁺ Zellen zu einem geringen Prozentsatz auch in RL vor (s. Kap. 4.1.5.1, S. 59).

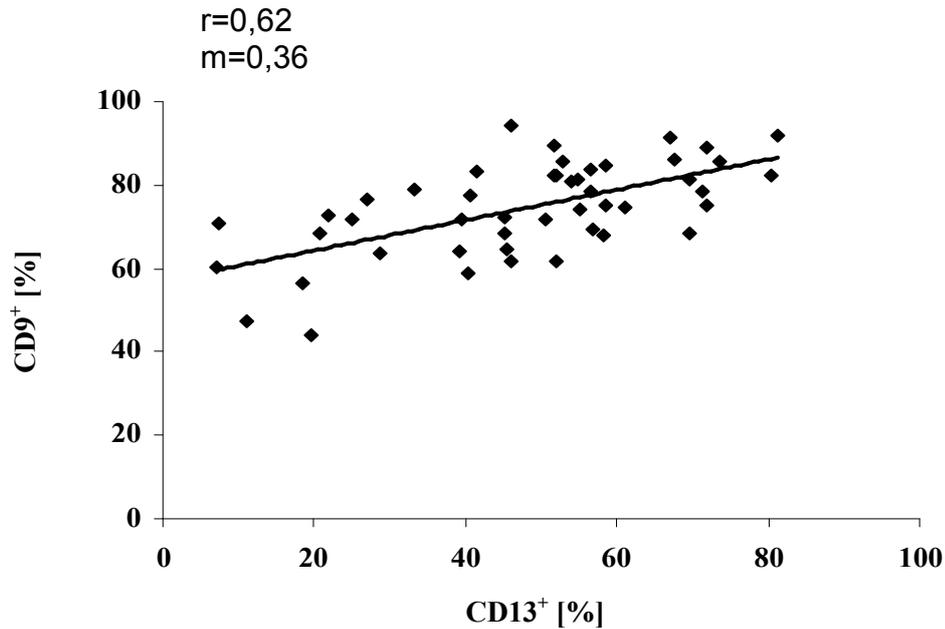


Abb. 12: Korrelation zwischen CD13⁺ und CD9⁺ BALC in RG ($p \leq 0,001$; $n=45$)

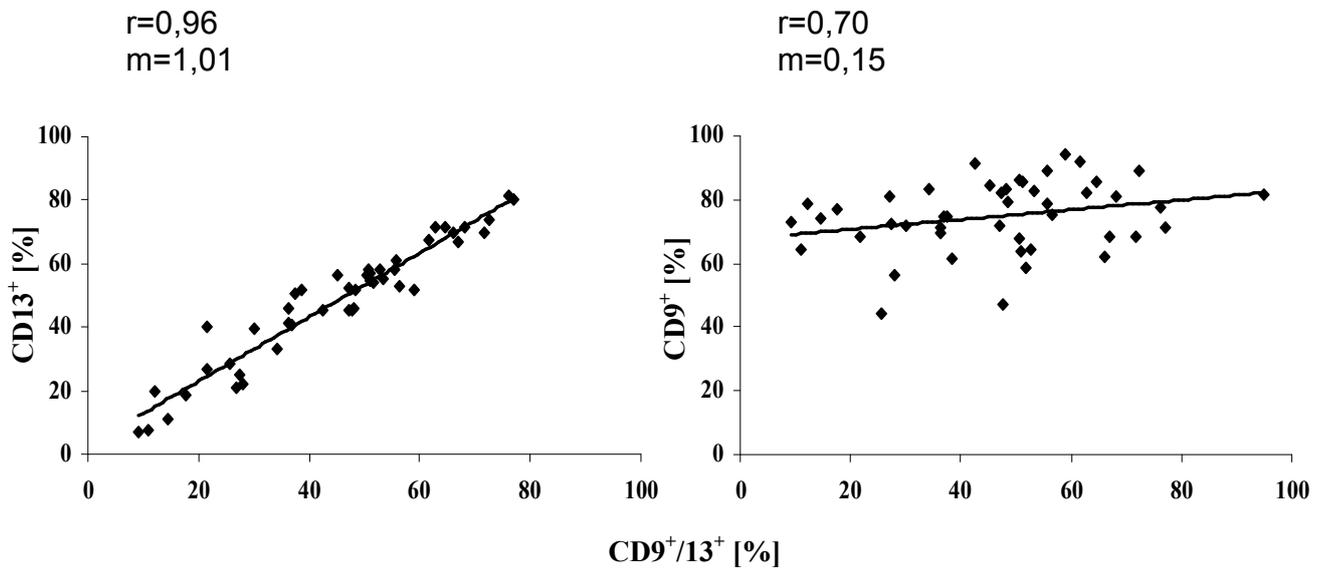


Abb. 13: Korrelation zwischen CD13⁺ und CD9⁺/13⁺ ($p \leq 0,001$; $n=44$) bzw. CD9⁺ und CD9⁺/13⁺ BALC in RG ($p \leq 0,001$; $n=44$)

4.1.5.4 Andere Zellen in der Region der Makrophagen

In RM wiesen durchschnittlich 59,4% ($\pm 13,7\%$; 18,3 bis 88,9%) das CD9-Antigen auf. Ein Anteil von 6,8% ($x/:11,6$; 0,0 bis 39,9%) war CD13⁺ (s. Abb. 14). Im Gegensatz zu RG bestand in dieser Messregion keine Korrelation zwischen den CD9⁺ und den CD13⁺ Zellen. Die durchschnittlichen Prozentsätze der durch Einzel- und Zweifachmarkierung identifizierten Zellen sind in Tabelle 16 aufgeführt (zu den Lymphozyten in RM s. Kap. 4.1.5.2, S. 67 ff.)

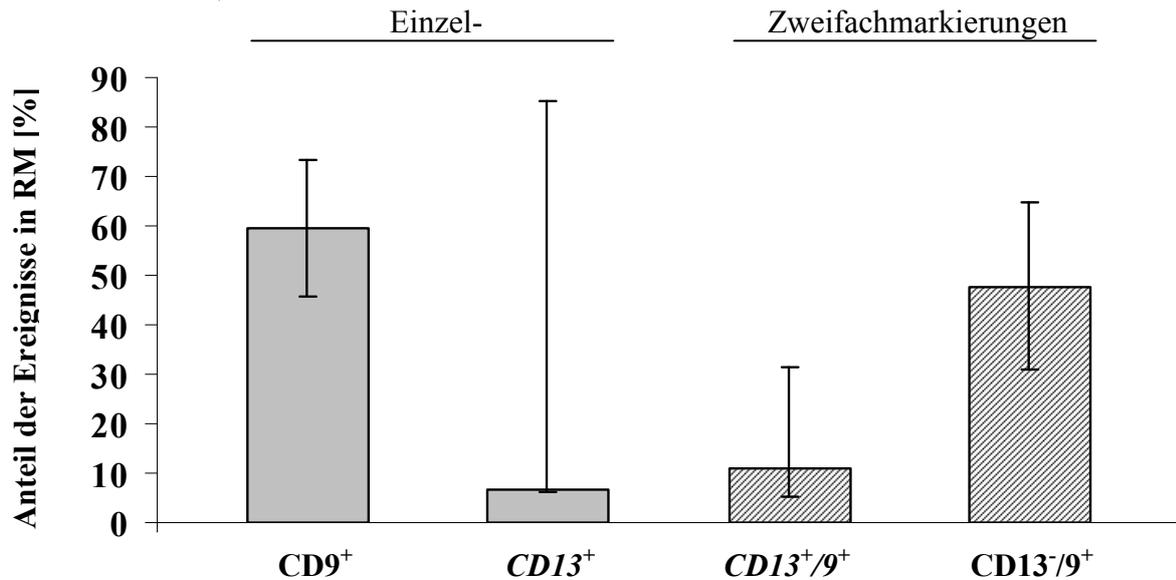


Abb. 14: Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RM im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9- bzw. CD13-Antigens (grau) und Zweifachmarkierungen (schraffiert)

$x_a \pm SD$; *kursiv (nicht normalverteilt): $x_g x/:SF$*

CD13⁺: n=48; CD9⁺: n=47; Zweifachmarkierungen: n=46

Tab. 16: Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RM

Subpopulation	n	x_a [%] in RM <i>x_g [%] in RM</i>	SD [%] <i>SF</i>	Minimum [%]	Maximum [%]
CD9 ⁺	47	59,4	13,7	18,3	88,9
CD13 ⁺	48	6,8	11,6	0,0	39,3
CD2 ⁻ /9 ⁺	47	15,8	24,6	0,0	77,2
CD5 ⁻ /9 ⁺	46	48,7	16,0	17,6	86,6
CD4 ⁻ /9 ⁺	46	46,8	16,7	10,7	84,0
CD8 ⁻ /9 ⁺	46	54,0	14,4	22,6	90,5
CD13 ⁺ /9 ⁺	46	10,8	1,9	1,6	38,0
CD13 ⁻ /9 ⁺		47,9	16,9	11,9	87,4
CD13 ⁻ /9 ⁻		0,1	117,1	0,0	8,7

⁺: positiv für ein Antigen; ⁻: negativ für ein Antigen

4.1.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-4 (IL-4) in RL der BALF

Anhand einer typischen equinen BALF sind für die beiden Zytokine auf der folgenden Seite exemplarische Darstellungen der Messereignisse abgebildet. Das Auswertungsfenster der Isotypenkontrolle (Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper desselben Isotyps wie der Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper), die in den jeweiligen Diagrammen in Form einer schwarzen Kurve abgebildet ist, wurde anhand eines Schwellenwertes wiederum so eingerichtet, dass weniger als 2% der enthaltenen Messereignisse positiv waren. In den Proben mit spezifischem Primärantikörper, die in den Diagrammen durch grau schattierte Flächen repräsentiert werden, befinden sich die Antigenpositiven Zellen dann innerhalb des durch einen Querstrich markierten Fensters (s. Abb. 15, folgende Seite). Die Bestimmung des zytokinproduzierenden Zellanteils erfolgte ausschließlich im Messbereich der durchflusszytometrisch identifizierten Lymphozyten. Die Proben wurden unstimuliert belassen bzw. mit Phorbol-myristat-acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert und jeweils für sechs bzw. achtzehn Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Verwendung dieser beiden Stimulantien ist die anerkannte Methode für den intrazellulären Zytokinnachweis (s. Kap. 3.2.5.5, S. 47).

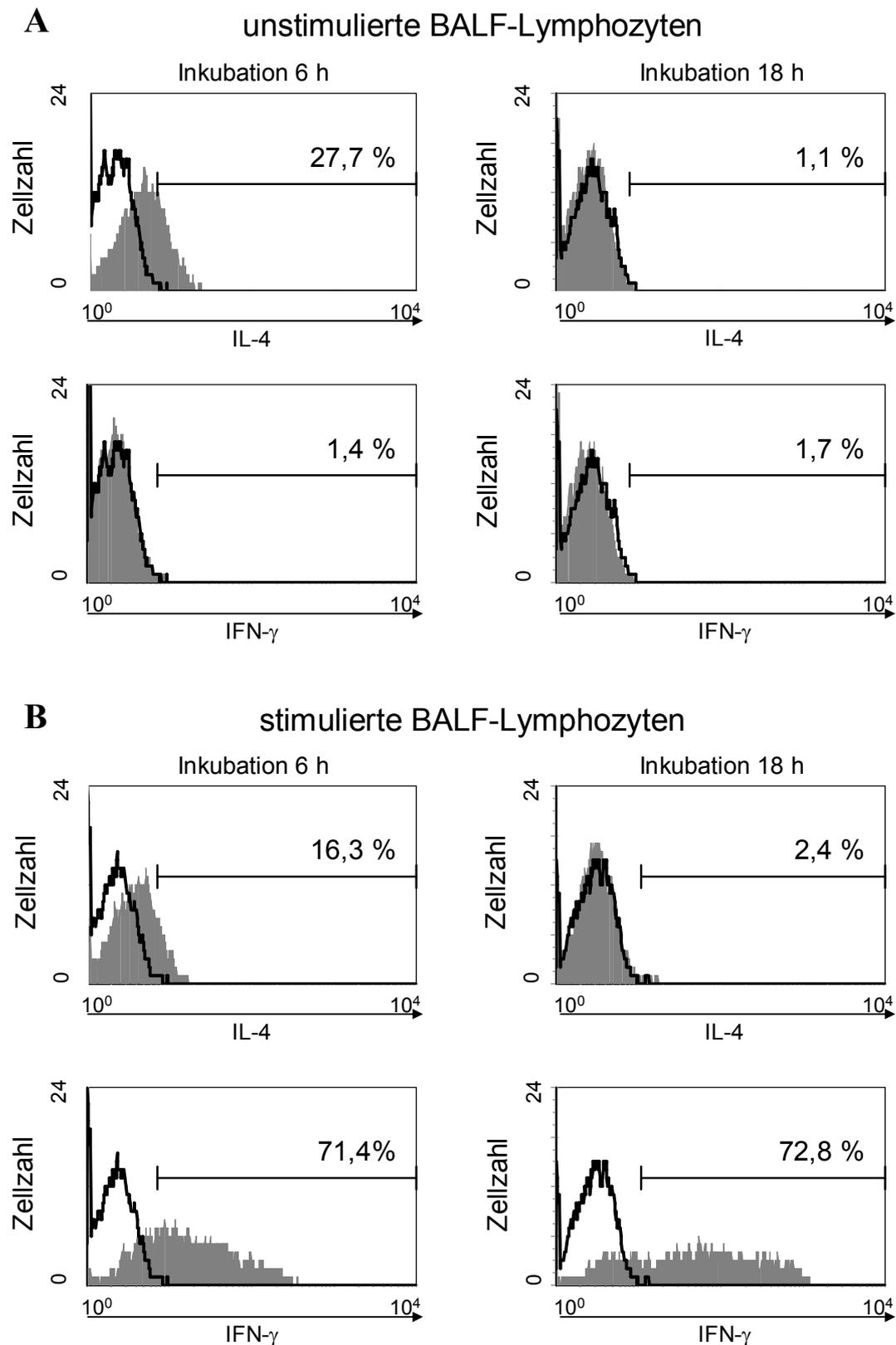


Abb. 15: Darstellungen der IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozyten in einer typischen equinen BALF. A: unstimulierte BALL; B: Ionomycin- und PMA-stimulierte BALL. Schwarz: Isotypenkontrolle; Grau schattiert: typische Proben mit Primärantikörper; Antigen-positive Zellen befinden sich innerhalb des durch den Querstrich markierten Fensters (exakter Zahlenwert der positiven Lymphozyten im jeweiligen Diagramm angegeben)

Tab. 17: Durchschnittliche IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätze in RL

	n	x_a bzw. x_g	SD bzw. SF	Minimum	Maximum
IFN-γ					
<i>unstim./6h</i>	35	1,7	2,4	0,2	55,4
<i>unstim./18h</i>	35	1,4	2,0	0,3	8,7
<i>stim./6h</i>	36	59,0	25,1	0,9	99,0
<i>stim./18h</i>	35	71,8	17,5	6,1	98,1
IL-4					
<i>unstim./6h</i>	35	16,5	2,7	1,0	77,4
<i>unstim./18h</i>	35	0,8	3,3	0,0	12,1
<i>stim./6h</i>	36	8,8	2,5	1,2	55,9
<i>stim./18h</i>	35	1,9	2,3	0,2	7,0

6h: sechsstündige, 18h: achtzehnstündige Inkubation
 unstim.: unstimuliert; stim.: mit PMA und Ionomycin stimuliert

Unstimulierte equine BALL waren nicht zur Bildung von IFN- γ in der Lage. Nach sechsstündiger Inkubation produzierten jedoch durchschnittlich 16,5% IL-4. Dies spricht im Alveolarbereich der untersuchten Pferdepopulation für ein *a priori* T_H2-geprägtes Zytokinmuster. Nach achtzehnstündiger Bebrütung war der Anteil der IL-4 $^+$ Zellen stark abgesunken. Wurden die Lymphozyten stimuliert, so lag der Prozentsatz der IFN- γ^+ Zellen nach sechsstündiger Inkubation im Durchschnitt bei fast 60%, so dass die BALL durch einen geeigneten Reiz auch zur Bildung eines T_H1-Zytokins angeregt werden können. Dieser Anteil konnte auf rund 72% gesteigert werden, wenn die Zellen für achtzehn Stunden inkubiert wurden. Das entsprechende Fluoreszenzsignal zeigte nach der längeren Inkubation zudem eine höhere durchschnittliche Intensität. Im Gegensatz dazu gelang es nicht, durch Stimulation mehr Zellen zur Bildung von IL-4 anzuregen. Ihr Anteil bewegte sich ohne Stimulation für die sechsstündige Inkubation sogar unter dem Niveau der unstimulierten Proben (s. Abb. 15, S. 76 und Tab. 17).

Zwischen dem Anteil der IFN- γ^+ Zellen (stimuliert, sechsstündige Inkubation bzw. stimuliert achtzehnstündige Inkubation) und dem mikroskopisch bestimmten Prozentsatz der Lymphozyten lag jeweils ein positiver Zusammenhang vor ($r=0,64$ bzw. $0,59$). Weitere Korrelationen bestanden zwischen den prozentualen Anteilen der IFN- γ^+ BALL und den folgenden durchflusszytometrisch ermittelten Zellpopulationen (jeweils $p \leq 0,001$): So hing der Prozentsatz der IFN- γ^+ Zellen (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation) mit dem durchflusszytometrisch analysierten Anteil der Zellen in RL zusammen ($r=0,62$) (s. Abb. 16),

so dass der Anteil der IFN- γ^+ Zellen umso höher ausfiel, je größer der Anteil Messereignisse in RL war. Negative Zusammenhänge zwischen den lichtmikroskopisch oder durchflusszytometrisch ermittelten Granulozyten und den Anteilen der IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Zellen bestanden nicht. Die positive Korrelation der CD5 $^+$ T-Lymphozyten aus RM mit den IFN- γ^+ Zellen (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation: $r=0,67$; $p\leq 0,001$) weisen darauf hin, dass in der Region der Makrophagen viele große, evtl. aktivierte T-Zellen vorliegen, wenn in RL große Anteile an IFN- γ bildenden Zellen vorhanden sind.

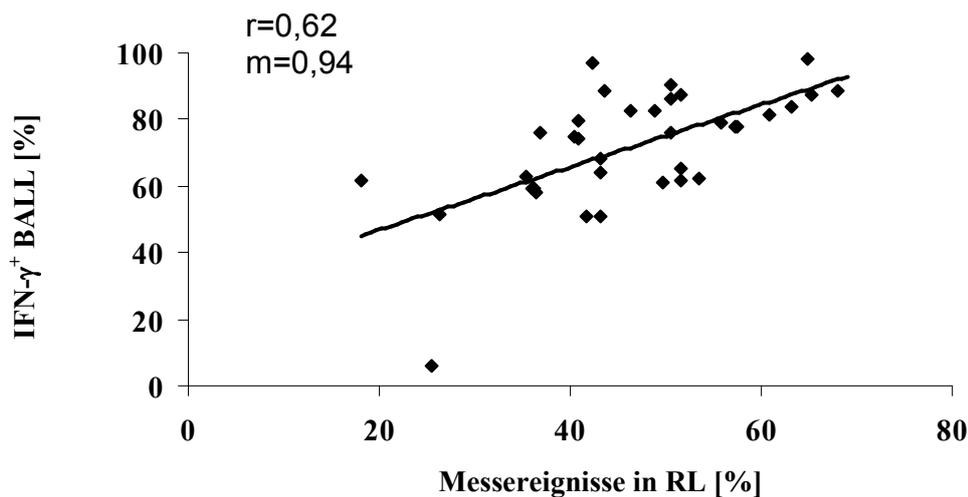


Abb. 16: Korrelation zwischen dem durchflusszytometrisch analysierten Messereignissen in RL und dem Prozentsatz IFN- γ^+ BALL (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation) ($p\leq 0,001$; $n=33$)

Wurden durch Division der jeweiligen Prozentsätze zusätzlich die Quotienten zwischen den IFN- γ und IL-4 bildenden Zellen gebildet, so ergaben sich die in Tabelle 19 aufgeführten Durchschnittswerte. Da sich nach achtzehnstündiger Inkubation mit Stimulation die höchsten durchschnittlichen Prozentsätze für die IFN- γ^+ Zellen bzw. nach sechsständiger Inkubation ohne Stimulation die im Mittel größten Anteile für die IL-4 $^+$ BALL ergaben, wurde neben den in der Inkubationsdauer vergleichbaren Werten aus diesen beiden Anteilen ein zusätzlicher Quotient gebildet.

Tab. 18: Quotienten zwischen IFN- γ^+ und IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätzen

IFN-γ/IL-4	n	x_g	<i>SF</i>	Minimum	Maximum
<i>IFN-γ 6h stim./ IL-4 6h stim.</i>	36	5,6	3,1	0,1	71,0
<i>IFN-γ 18h stim./ IL-4 18h stim.</i>	35	36,0	2,5	2,6	217,3
<i>IFN-γ 6h stim./ IL-4 6h unstim.</i>	35	2,9	3,4	0,1	56,6
<i>IFN-γ 18h stim./ IL-4 6h unstim.</i>	34	4,0	3,0	0,7	58,7

6h: sechsständige, 18h: achtzehnstündige Inkubation
unstim.: unstimuliert; stim.: mit PMA und Ionomycin stimuliert

Die Quotienten wiesen signifikante Korrelationen mit zytologischen Parametern auf. So bestand ein negativer Zusammenhang zwischen dem Quotienten von IFN- γ^+ und IL-4 $^+$ BALL (stimuliert, sechsständige Inkubation) und dem lichtmikroskopisch ermittelten Prozentsatz der Makrophagen ($r = -0,53$; $p \leq 0,001$). Ebenfalls negativ korrelierte der Quotient von IFN- γ^+ und IL-4 $^+$ BALL (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation) mit dem durchflusszytometrisch bestimmten Prozentsatz der Zellen aus RG ($r = -0,56$; $p \leq 0,001$), so dass bei größeren Anteilen an IFN- γ sowohl kleinere Prozentsätze an Makrophagen als auch an Granulozyten vorhanden waren.

Tab. 19: Zusammenfassung der signifikanten Korrelationskoeffizienten (r) zwischen Quotienten der Anteile IFN- γ ⁺ und IL-4⁺ BALL und verschiedenen Lymphozytensubpopulationen

Quotient	Subpopulation	Korrelationskoeffizient r
IFN-γ/IL-4	RL	
IFN- γ 18h stim./ IL-4 18h stim.	CD8 ⁺ /9 ⁻ (Lymphozyten)	0,40 *
	RM	
IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h stim.	CD2 ⁺ (Lymphozyten)	0,53 ***
IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h stim.	CD5 ⁺ (Lymphozyten)	0,55 ***
IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h unstim.	CD2 ⁺ (Lymphozyten)	0,53 ***
IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h unstim.	CD5 ⁺ (Lymphozyten)	0,46 **
IFN- γ 18h stim./ IL-4 6h unstim.	CD2 ⁺ (Lymphozyten)	0,52 ***
IFN- γ 18h stim./ IL-4 6h unstim.	CD5 ⁺ (Lymphozyten)	0,46 **
	RG	
IFN- γ 18h stim./ IL-4 18h stim.	CD4 ⁺ /9 ⁺ (Lymphozyten)	0,59 ***
IFN- γ 18h stim./ IL-4 18h stim.	CD5 ⁺ /9 ⁺ (Lymphozyten)	0,57 ***
IFN- γ 18h stim./ IL-4 18h stim.	CD8 ⁺ /9 ⁺ (Lymphozyten)	0,49 **

6h: sechsstündige, 18h: achtzehnstündige Inkubation
unstim.: unstimuliert; stim.: mit PMA und Ionomycin stimuliert

4.1.7 Korrelationen der Durchflusszytometrie mit klinischen Parametern

Signifikante Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und den klinischen Parametern mit $r \geq 0,50$ oder $r \leq -0,50$ traten mit Ausnahme der arteriellen Sauerstoffparameter (p_aO_2 und $p_{(A-a)}O_2$) nicht auf.

Ein Zusammenhang wurde mit $r=0,48$ zwischen $CD2^+$ Lymphozyten in RL und dem p_aO_2 ermittelt ($p \leq 0,001$). Die Steigung der zugehörigen Regressionsgeraden lag bei 1,17, so dass die Probanden bei geringen Prozentsätzen an T-Lymphozyten gleichzeitig einen besonders niedrigen p_aO_2 aufwiesen. $CD2^+/9^-$ und $CD4^+/9^-$ Lymphozyten in RG waren mit dem p_aO_2 ebenfalls positiv ($r=0,56$ bzw. $0,49$; jeweils $p \leq 0,001$) und mit der $p_{(A-a)}O_2$ negativ korreliert ($r = -0,58$ bzw. $-0,48$; jeweils $p \leq 0,001$). Somit war mit einem hohen Anteil an T-Lymphozyten bzw. Helferzellen eine gute Oxygenierung des arteriellen Blutes verbunden. Im Gegensatz dazu bestand zwischen $CD5^+/9^+$ Zellen in RG und der $p_{(A-a)}O_2$ ein positiver Zusammenhang ($r=0,49$, $p \leq 0,001$). Zusätzlich zu diesen Subpopulationen korrelierten bestimmte Anteile der zytokinproduzierenden Lymphozyten mit Parametern der arteriellen Blutgasanalyse. So wies der Prozentsatz der $IFN-\gamma^+$ Zellen einen positiven Zusammenhang mit dem p_aO_2 auf (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation: $r=0,44$; stimuliert, sechsstündige Inkubation: $r=0,49$; jeweils $p \leq 0,01$), so dass bei großen Anteilen an $IFN-\gamma$ bildenden Lymphozyten eine bessere Oxygenierung des arteriellen Blutes vorlag als bei geringen. Das Verhältnis der $IFN-\gamma$ produzierenden zu den $IL-4$ bildenden Zellen (beide stimuliert, achtzehnstündige Inkubation) war negativ mit der $p_{(A-a)}O_2$ korreliert ($r = -0,51$, $p \leq 0,001$). Dasselbe Verhältnis wies auch eine negative Korrelation mit der Höhe des Klinikscores auf ($r = -0,47$, $p \leq 0,01$).

4.2 Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung vor und nach Therapie

22 klinische Patienten mit COB unterschiedlichen Schweregrades, deren Besitzer einer stationären Aufnahme zu Therapie Zwecken zustimmten, wurden einem zweiten Untersuchungsblock nach einwöchiger Behandlung unterzogen. Zur Charakterisierung dieser therapierten Tiere wurden die Ergebnisse ihrer prätherapeutischen Untersuchung aus den Daten der Gesamtgruppe extrahiert. Bei 15 Pferden erfolgte eine medikamentelle, bei sieben eine alternativmedizinische Therapie in Form von Laserakupunktur (s. Kapitel 3.1.6 und 3.1.7, S. 39 ff.). Das Ziel der Untersuchung bestand in der Erkennung eventueller Unterschiede zwischen Erst- und Wiederholungsuntersuchung, nicht in der Ermittlung der wirksameren Therapieform. Rückschlüsse hinsichtlich eines größeren Therapieeffektes lassen sich aus den hier ermittelten Daten nicht ziehen.

In wichtigen klinischen und lichtmikroskopischen Parametern ergaben sich nach der einwöchigen Behandlung in beiden Therapiegruppen signifikante Veränderungen in Richtung einer Verbesserung der Befunde. Dagegen zeigten sich in einer Vielzahl durchflusszytometrisch bestimmter Messgrößen zwischen den Gruppen konträre Entwicklungen in der Werthöhe. Daher erscheint es zum großen Teil sinnvoll, die Ergebnisse getrennt nach Therapiegruppen darzustellen. Die Unterschiede zwischen den beiden Therapiearten wurden durch Vergleich der Differenzen der prä-/posttherapeutischen Werte über einen pooled-t-Test bzw., bei stark voneinander abweichenden Standardabweichungen, über einen separate-t-Test ermittelt.

4.2.1 Klinische Untersuchung des Respirationstraktes, Tracheobronchoskopie und arterielle Blutgasanalyse

Die Ergebnisse der prätherapeutischen Untersuchung für die behandelten Pferde wurden, getrennt nach Behandlungsart, aus den Daten der Gesamtgruppe extrahiert. Im Vergleich zur Gesamtgruppe waren in den Therapiegruppen dabei Parameter aus der routinemäßigen COB-Diagnostik stärker zum Pathologischen hin verändert (s. Tab. 20, folgende Seite).

Wie aus Tabelle 20 weiterhin ersichtlich, ergaben sich nach einwöchiger Therapie v. a. in p_aO_2 und $p_{(A-a)}O_2$ deutlich verbesserte Werte. Bei der in der Tabelle nicht enthaltenen Gesamtbetrachtung aller behandelten Pferde stieg der p_aO_2 von durchschnittlich 86,3 ($\pm 15,0$) mmHg auf 93,9 ($\pm 10,5$) mmHg an ($p=0,005$). Zudem sank die $p_{(A-a)}O_2$ von mittleren 19,0 ($\pm 13,0$) mmHg auf 11,0 ($\pm 9,0$) mmHg ab ($p=0,003$). Der p_aCO_2 veränderte sich nicht signifikant.

Tab. 20: Prätherapeutische Werte ausgewählter klinischer, blutgasanalytischer und endoskopischer Parameter der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart

			Gesamt- gruppe n=48	Medikamenten- gruppe ($\bar{x}_a \pm SD$) n=15	Laserakupunktur- gruppe ($\bar{x}_a \pm SD$) n=7		
			$\bar{x}_a \pm SD$				
Para- meter	Einheit	Referenz- bereich	Erstunter- suchung	prä	post	prä	post
Alter	Jahre		11,9 \pm 5,2	12,3 \pm 4,2		12,6 \pm 5,2	
Körper- gewicht	kg		536 \pm 102	524 \pm 120		538 \pm 91	
RuheAF	/min.	8-16	18 \pm 6	20 \pm 6	17 \pm 4	21 \pm 6	18 \pm 6
Klinik	Punkte	<2	4,2 \pm 3,1	5,9 \pm 2,1		8,1 \pm 1,8	
Endosk.	Punkte	<2	4,6 \pm 2,7	6,4 \pm 2,0	4,9 \pm 2,5	6,3 \pm 2,5	5,0 \pm 2,8
p_aO₂	mmHg	100 \pm 5	93,8 \pm 12,9	91,2 \pm 14,5	98,0 \pm 8,3	75,6 \pm 10,1	85,0 \pm 9,7
p_aCO₂	mmHg	40 \pm 5	44,4 \pm 3,2	44,0 \pm 3,5	44,1 \pm 3,0	45,8 \pm 3,8	46,9 \pm 2,1
p_{(A-a)O₂}	mmHg	\leq 7	11,2 \pm 12,0	16,0 \pm 13,3	8,6 \pm 8,3	25,4 \pm 10,5	9,6 \pm 16,1

prä: vor Therapie; post: nach Therapie
graue Schraffierung: Mittelwert im pathologischen Bereich

4.2.2 Konventionelle Untersuchung der BALF

4.2.2.1 Rückgewinnrate

Die durchschnittliche Rückgewinnrate lag vor Therapie bei 24,6% (\pm 9,5%) und danach bei 24,4% (\pm 7,1%), so dass kein Effekt der Behandlung auf diesen Parameter bestand.

4.2.2.2 Lichtmikroskopisches Differentialzellbild

Der Anteil der PMN in der BALF, dessen Höhe hinsichtlich der equinen COB eine Aussage über den Schweregrad erlaubt (s. Kap. 4.1.2.2, S. 52 f.), bewegte sich in beiden Therapiegruppen vor der Behandlung durchschnittlich im pathologischen Bereich über 5% (s. Tab. 21, folgende Seite). Wurden die Prozentsätze der PMN in der BALF vor und nach Therapie betrachtet, so zeigte sich in der gesamten Therapiegruppe mit $p=0,0006$ ein hochsignifikantes Absinken von durchschnittlich 10,6% (x : 1,9) auf 5,8% (x : 1,9). Zudem reduzierte sich die absolute Zahl der PMN von 47,3 (x : 2,7) auf 20,8

(x : 2,9) pro μl BALF ($p=0,002$). Darüber hinaus wurden, auch bei Trennung zwischen den beiden Behandlungsarten, für keine lichtmikroskopisch bestimmte Zellpopulation weitere statistisch signifikante Veränderungen festgestellt.

Tab. 21: Prätherapeutische Zusammensetzung der BALC der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart (Ergebnisse der lichtmikroskopischen Differenzierung und absolute Zellzahl)

		Gesamt- gruppe n=48	Medikamenten- gruppe n=15		Laserakupunktur- gruppe n=7	
		$x_a \pm SD$ [%] bzw. x_g [%] x : SF				
Parameter	Referenz- bereich	Erstunter- suchung	prä	post	prä	post
Absolute Zellzahl [/μl BALF]	120-640 [†]	416,3 x :2,2	486,0 x :1,9	404,2 x :1,9	377,6 x :2,0	272,7 x :2,2
Ly [%]	15,3-62,3*	59,1 \pm 11,5	58,8 \pm 12,2	60,1 \pm 11,1	54,2 \pm 13,2	65,2 \pm 13,4
PMN [%]	0-4,3*	6,1 x :2,7	10,3 x :3,1	6,2 x :2,1	11,2 x :1,6	5,0 x :1,5
M [%]	37,7-71,7*	30,3 \pm 11,5	27,0 \pm 10,5	30,2 \pm 12,8	32,0 \pm 9,9	27,8 \pm 11,9
Eos [%]	0-1,3*	0,01 x :9,7	0,02 x :11,2	0,02 x :14,7	0,01 x :5,2	0,01 x :6,8
MZ [%]	2,0-5,0*	1,1 x :4,3	1,35 x :1,7	1,2 x :2,6	1,3 x :1,8	1,4 x :1,9

Ly: Lymphozyten; M: Makrophagen; Eos: eosinophile Granulozyten;
MZ: Mastzellen

Kursiv (nicht normalverteilt): x_g : geometrischer Mittelwert, SF : Streufaktor
graue Schraffierung: Mittelwert im pathologischen Bereich

[†]: McGORUM und DIXON (1994); *: McGORUM et al. (1993a)

prä: vor Therapie; post: nach Therapie

4.2.3 Durchflusszytometrische Differenzierung der BALC

Für die durchflusszytometrisch bestimmten Zellen in den Regionen von Lymphozyten und Makrophagen bestanden sowohl in der gesamten Therapiegruppe als auch bei Trennung in die beiden Behandlungsarten beim prä-/posttherapeutischen Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Dagegen sank der prätherapeutische Prozentsatz der Zellen in der Region der Granulozyten für den Gesamtdurchschnitt der behandelten Tiere von 13,8% ($x/: 1,6$) auf 9,7% ($x/: 1,4$) nach Therapie ($p=0,002$). Signifikante Unterschiede zwischen den Therapiemethoden bestanden nicht (s. Tab. 22). Somit lagen für die durchflusszytometrisch analysierten Granulozyten, ebenfalls unabhängig von der Behandlungsmethode, ähnliche Verhältnisse wie bei der lichtmikroskopischen Untersuchung vor (s. Tab. 21, vorige Seite).

Tab. 22: Prätherapeutische Zusammensetzung der BALC der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart (Ergebnisse der durchflusszytometrischen Differenzierung)

	Gesamt- gruppe n=48	Medikamenten- Gruppe n=15		Laserakupunktur- gruppe n=7	
Region	$x_a \pm SD$ [%] bzw. x_g [%] $x/:SF$				
	Erstunter- suchung	prä	post	prä	post
[%] in RL	47,8 \pm 10,9	47,2 \pm 14,3	51,6 \pm 8,3	44,7 \pm 7,9	55,7 \pm 7,0
[%] in RG	10,6 $x/:1,6$	13,5 $x/:1,6$	10,2 $x/:1,4$	14,2 $x/:1,4$	8,6 $x/:1,2$
[%] in RM	4,3 $x/:1,6$	3,7 $x/:1,7$	5,3 $x/:1,9$	4,4 $x/:1,4$	4,2 $x/:1,7$
[%] Einz.	80,8 \pm 7,6	84,1 \pm 6,0	81,8 \pm 5,2	82,1 \pm 6,1	84,3 \pm 6,0
[%] Tote (PI⁺)	14,7 \pm 6,8	16,4 \pm 9,6	16,1 \pm 4,7	18,6 \pm 5,3	16,5 \pm 4,5

prä: vor Therapie; post: nach Therapie

4.2.4 Immunphänotypisierung der BALC

4.2.4.1 Lymphozyten in den drei Messregionen

In der Therapiegruppe waren $CD2^+/9^-$ Zellen in RL nach der Behandlung um 3,7 Prozentpunkte im Vergleich zum prätherapeutischen Wert abgefallen ($p=0,031$). Eine gegenläufige Zunahme der $CD2^+/9^+$ Lymphozyten mit statistischer Signifikanz konnte nicht verzeichnet werden. Allerdings lag ein prozentualer Anstieg der $CD13^-/9^+$ Zellen um 3,2 Prozentpunkte vor ($p=0,006$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Therapiemethoden konnte in RL nur bezüglich der $CD5^+/9^-$ Zellen nachgewiesen werden (s. Tab. 24, folgende Seite). In RG stieg bei Betrachtung aller therapierten Pferde der Prozentsatz der $CD13^-/9^+$ Lymphozyten um 10,4 Prozentpunkte an ($p=0,003$). $CD4^+$ Lymphozyten in RM fielen um 12,2 Prozentpunkte ab ($p=0,002$). Ebenfalls in RM stiegen $CD2^+/9^+$ Zellen um 20,8 Prozentpunkte ($p=0,03$), $CD4^-/9^+$ um 9,3 Prozentpunkte ($p=0,027$) und $CD13^-/9^+$ Lymphozyten um 6,6 Prozentpunkte ($p=0,035$) in ihren Anteilen an. Somit scheint die erfolgreiche Therapie der Erkrankung und eine dadurch erzielte Verbesserung des Lungengesundheits-Zustandes mit einem prozentualen Anstieg $CD9^+$ Lymphozyten verknüpft zu sein. Bei getrennter Betrachtung der beiden Behandlungsmethoden wird zudem deutlich, dass bei vergleichbarer klinischer Verbesserung die Kombination der Medikamente T- bzw. $CD4^+$ Zellen in RG und RM in ihren Anteilen reduziert, während diese in der Laserakupunkturgruppe teilweise sogar ansteigen (s. Tab. 23 und Tab. 24, folgende Seite).

Tab. 23: Prä-/posttherapeutischer Vergleich der Anteile der Lymphozytensubpopulationen in RG und RM unter Berücksichtigung der Therapieart

Subpopulation	<i>medikamentell</i>		<i>Laserakupunktur</i>	
	RG			
	$x_a \pm SD$ [%] bzw. x_g [%] x : SF			
	prä	post	prä	post
CD2⁺	15,4 ±8,8	10,4 ±5,1	9,6 ±4,6	18,9 ±7,0
CD4⁺	5,8 x :2,2	3,0 x :2,4	3,8 x :1,3	7,2 x :1,6
CD5⁺/9⁺	4,0 (x :2,1)	4,2 x :1,8	2,9 x :1,9	7,7% x :1,8
	RM			
	$x_a \pm SD$ [%] bzw. x_g [%] x : SF			
CD2⁺	25,7 ±13,3	18,0 ±11,3	29,0 ±10,7	35,5 ±10,6
CD4⁺	12,9 x :1,8	0,3 x :159,0	13,9 x :1,3	11,9 x :3,0
CD5⁺/9⁺	1,5 x :2,5	4,3 x :3,7	8,0 x :2,4	12,0 x :1,6
CD5⁺/9⁻	1,8 x :19,4	0,04 x :208,3	1,6 x :2,1	3,5 x :2,3
CD4⁺/9⁺	3,2 x :20,6	2,3 x :19,3	10,5 x :1,4	10,2 x :2,0

Tab. 24: Signifikante prä-/posttherapeutische Differenzen der Anteile der Lymphozytensubpopulationen aus den drei Messregionen unter Berücksichtigung der Therapieart

Subpopulation	<i>medikamentell</i>	<i>Laserakupunktur</i>	p-Wert
RL			
CD5⁺/9⁻	↓ um 4,7 PP	↑ um 4,7 PP	0,0097 **
RG			
CD2⁺	↓ um 5,0 PP	↑ um 9,2 PP	0,0004 ***
CD4⁺	↓ um 2,8 PP	↑ um 3,4 PP	0,0001 ***
CD2⁺/9⁺	↑ um 0,1 PP	↑ um 5,3 PP	0,017 *
CD5⁺/9⁺	↑ um 0,1 PP	↑ um 4,8 PP	0,017 *
CD5⁺/B⁻	↓ um 1,4 PP	↑ um 3,6 PP	0,012 *
RM			
CD2⁺	↓ um 7,7 PP	↑ um 6,6 PP	0,0013 **
CD4⁺	↓ um 12,6 PP	↓ um 2,0 PP	0,007 **
CD5⁺/9⁺	↓ um 3,6 PP	↑ um 4,0 PP	0,017 *

↓: Abfall; ↑: Anstieg (jeweils um PP=Prozentpunkte)
statistische Tests: pooled t-Test bzw. separate t-Test

4.2.4.2 Andere Zellen in den Regionen der Granulozyten und Makrophagen

Zwischen den beiden Behandlungsmethoden waren für die Subpopulationen der übrigen Zellen sowohl in RG als auch in RM keine Unterschiede zu verzeichnen. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich somit ausschließlich auf den prä-/posttherapeutischen Vergleich in der gesamten Therapiegruppe.

In RG fielen bei Betrachtung aller therapierten Pferde CD9⁺ Zellen von prätherapeutischen 78,1% (±10,1%) auf 71,2% (±17,3%) nach der Behandlung ab (p=0,045). Außerdem konnte für CD13⁺ Ereignisse in RG, die vor der Therapie bei 56,7% (±16,5%) lagen, nach Therapie ein Anteil von 38,4% (±19,4%) ermittelt werden. Die Differenz war mit p=0,0005 statistisch hoch signifikant. CD13⁺/9⁺ Zellen aus RG zeigten einen ebenfalls hochsignifikanten Abfall (p=0,0006) von 53,5% (15,7%) auf 37,0% (19,2%). Die Ursache für den prozentual betrachtet weniger starken Abfall der CD9⁺ Zellen in RG ist in der Anwesenheit CD9⁺ Lymphozyten zu sehen. Sie schwächen den Abfall der CD9⁺ Granulozyten, der sich bei ausschließlich CD13⁺/9⁺ PMN in seiner prozentualen Ausprägung analog zu den CD13⁺ Granulozyten verhalten müsste, ab. Auch für weitere Subpopulationen war im Vergleich der prä- und

posttherapeutischen Prozentsätze in der gesamten Therapiegruppe ein Abfall zu bemerken. Der Anteil der CD4⁺/9⁺ lag nach der Behandlung um 7,3 Prozentpunkte ($p=0,039$), derjenige der CD5⁺/9⁺ um 9,7 Prozentpunkte ($p=0,0064$) und der Prozentsatz der CD8⁺/9⁺ Granulozyten um 7,7 Prozentpunkte ($p=0,0134$) niedriger als zuvor (s. Abb. 17), so dass die Messereignisse aus RG im Gegensatz zu RL, nach der Therapie deutlich reduzierte Anteile ihrer CD9⁺ Zellen aufweisen.

In RM sank der Prozentsatz der CD13⁺/9⁺ Zellen um durchschnittlich 5,4% ab ($p=0,0025$).

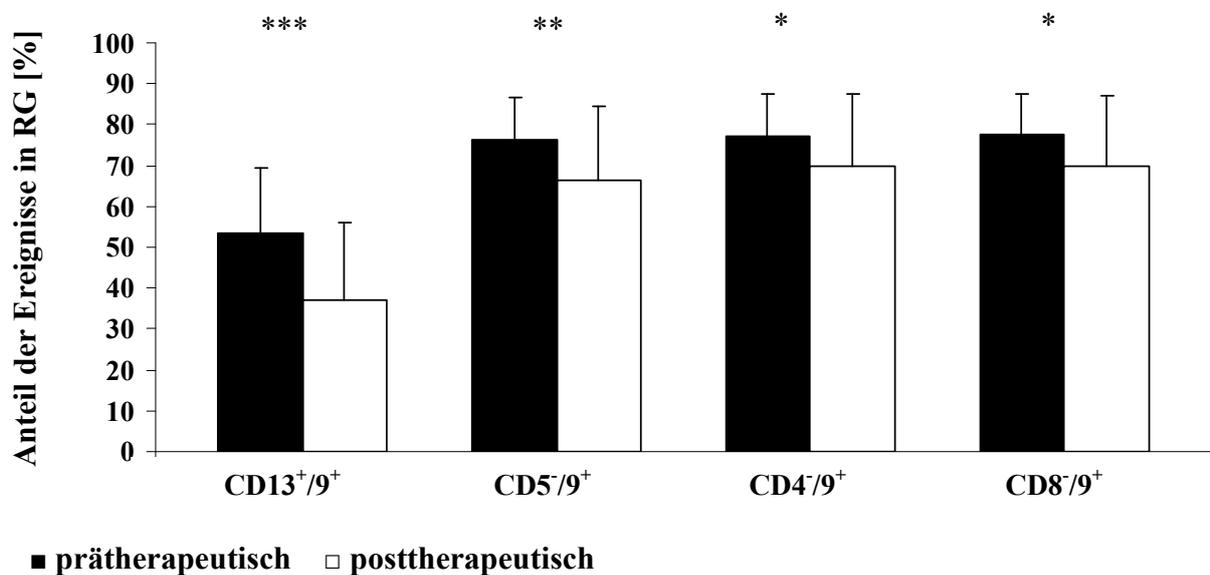


Abb. 17: Vergleich der prozentualen Anteile von Subpopulationen in RG vor und nach Therapie (Zweifachmarkierungen); $n=21$
 *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$

4.2.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung von IFN- γ und IL-4

Obwohl posttherapeutisch in beiden Behandlungsgruppen nach sechsständiger Inkubation für unstimulierte IL-4 bildende Lymphozytenanteile ein tendenzieller Abfall und für stimulierte IFN- γ^+ Zellen ein Anstieg zu verzeichnen war (s. Tab. 25), bestand für diese Veränderungen keine statistische Signifikanz.

Tab. 25: Durchschnittliche IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentanteile in RL getrennt nach Behandlungsart vor und nach Therapie

	Gesamt- gruppe n=36	Medikamenten- Gruppe n=8		Laserakupunktur- gruppe n=7	
IL-4	$x_a \pm SD$ [%] bzw. x_g [%] x : SF				
	Erstunter- suchung	prä	post	prä	post
<i>unstimuliert 6h</i>	16,5 x :2,7	15,7 x :3,3	9,5 x :3,5	19,8 x :4,4	13,4 x :3,6
<i>unstimuliert 18h</i>	0,8 x :3,3	1,5 x :3,2	1,2 x :3,2	1,3 x :1,4	0,9 x :2,3
<i>stimuliert 6h</i>	8,8 x :2,5	7,2 x :3,3	6,6 x :3,2	8,8 x :2,5	6,7 x :3,6
<i>stimuliert 18h</i>	1,9 x :2,3	2,8 x :2,1	2,1 x :2,8	2,8 x :2,1	1,5 x :1,9
IFN-γ					
<i>unstimuliert 6h</i>	1,7 x :2,4	1,7 x :2,6	0,9 x :2,6	1,5 x :1,5	1,7 x :2,5
<i>unstimuliert 18h</i>	1,4 x :2,0	1,2 x :2,1	1,0 x :2,0	1,2 x :1,6	1,2 x :1,7
stimuliert 6h	59,0 \pm 25,1	54,1 \pm 29,2	58,5 \pm 18,6	45,6 \pm 19,6	70,9 \pm 20,0
stimuliert 18h	71,8 \pm 17,5	64,2 \pm 25,6	72,8 \pm 15,8	69,3 \pm 9,1	80,9 \pm 10,0

6h: sechsständige, 18h: achtzehnstündige Inkubation

unstim.: unstimuliert; stim.: mit PMA und Ionomycin stimuliert

Gesamtgruppe (Erstuntersuchung): n=35-36

medikamentell therapierte Gruppe: n=7-8; Laserakupunkturgruppe: n=6-7

Im Hinblick auf die individuellen Anteile der IL-4 $^+$ Zellen (unstimuliert, sechsständige Inkubation) zeigten von fünfzehn Patienten sieben posttherapeutisch niedrigere Werte als zuvor, drei wiesen nahezu identische Werte auf. Bei fünf Tieren stieg der Anteil der IL-4 $^+$ Zellen nach der Behandlung, z. T. allerdings nur geringgradig, an (s. Abb. 18, folgende Seite). Nach Stimulation lag der Anteil der IL-4 $^+$ BALL (sechsständige Inkubation) für zehn Pferde posttherapeutisch niedriger als zuvor. Besonders homogen war diesbezüglich die Akupunkturgruppe, in der fünf von sechs Patienten einen posttherapeutischen Abfall des IL-4 $^+$ Lymphozytenanteils zeigten. Vier Pferde erreichten nach der Behandlung einen höheren Prozentsatz als zuvor (s. Abb. 19, folgende Seite).

Da die unstimulierten IFN- γ produzierenden Zellen sowohl vor als auch nach Therapie in keiner Gruppe und zu keinem Zeitpunkt Durchschnittswerte über dem Bereich des

Prozentsatzes falsch-positiver Zellen aufwies, wurde auf ihre gesonderte Darstellung verzichtet. Durch die Stimulation mit Ionomycin und PMA gelang es, die Lymphozyten aus der BALF zu einer deutlichen Produktion von IFN- γ anzuregen. Dabei wurden nach Stimulation und sechsständiger Inkubation der BALL bei zehn Patienten nach Therapie höhere Prozentsätze an IFN- γ^+ Zellen als zuvor nachgewiesen. Bei achtzehnstündiger Inkubation lag der posttherapeutische Wert ebenfalls bei zehn Tieren höher als vor der Behandlung (s. Abb. 20, folgende Seite).

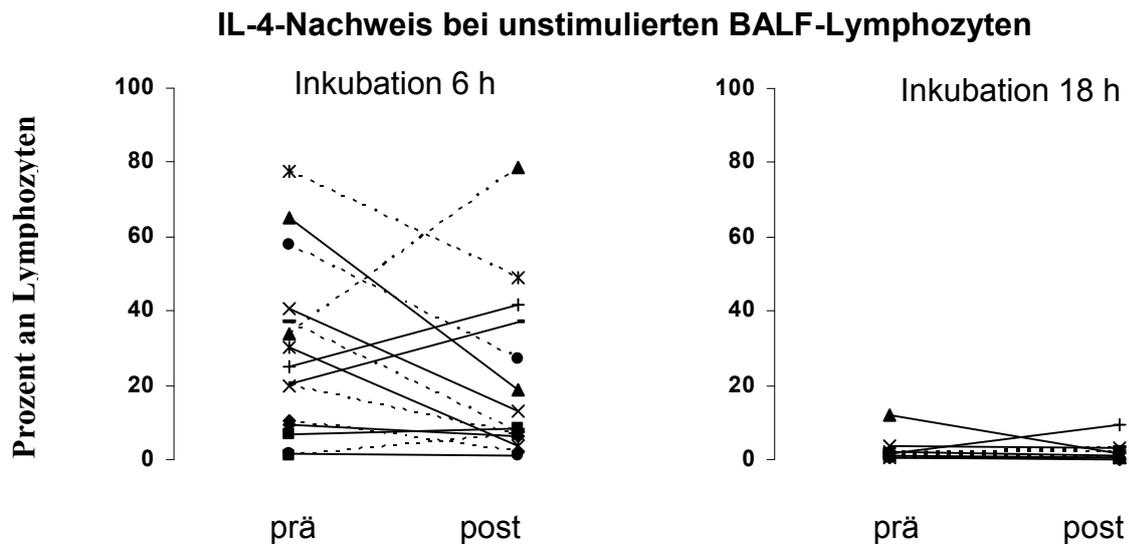


Abb. 18: Produktion von IL-4 durch die unstimulierten BALL equiner Patienten vor und nach Therapie; durchgezogene Linien (n=8): medikamentelle Behandlung; gestrichelte Linien (n=7): Laserakupunktur

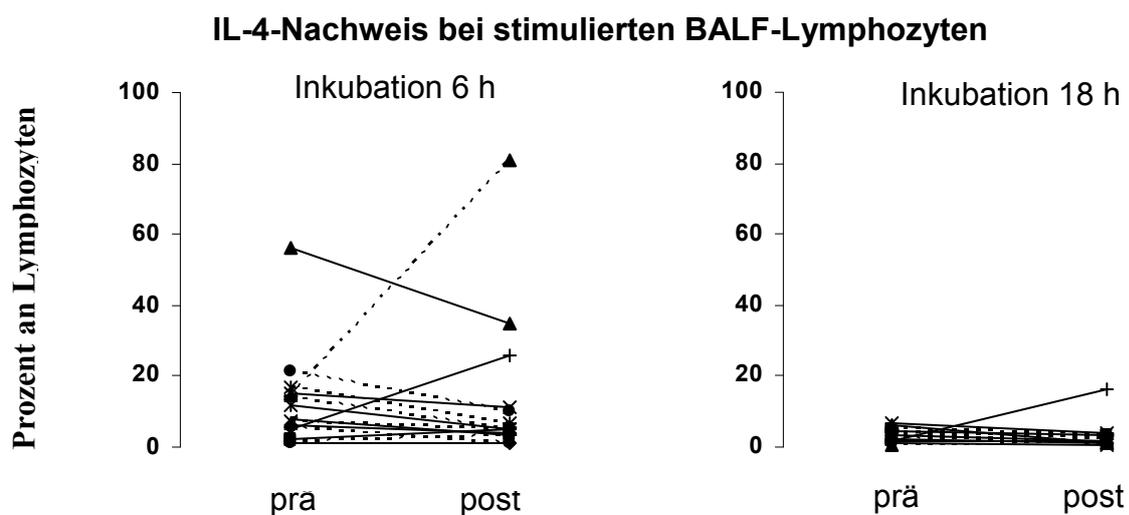


Abb. 19: Produktion von IL-4 durch die stimulierten BALL equiner Patienten vor und nach Therapie; durchgezogene Linien (n=7): medikamentelle Behandlung; gestrichelte Linien (n=6): Laserakupunktur

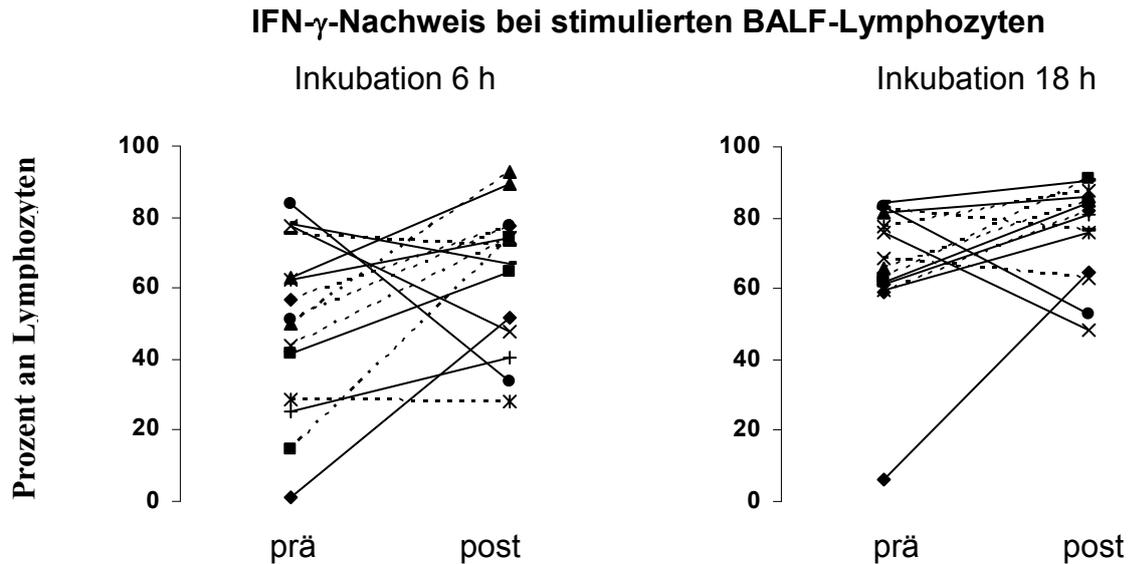


Abb. 20: Produktion von IFN- γ durch die stimulierten BALF equiner Patienten vor und nach Therapie; durchgezogene Linien (n=8): medikamentelle Behandlung; gestrichelte Linien (n=7): Laserakupunktur

Wurden die Quotienten der IFN- γ produzierenden zu den IL-4⁺ BALL gebildet, so ergaben sich statistisch signifikante Veränderungen vor und nach Behandlung, wobei zwischen den beiden Therapiearten kein Unterschied bestand (s. Tab. 26). So wurde für die stimulierten, achtzehn Stunden inkubierten Lymphozyten eine Erhöhung des Quotienten des IFN- γ produzierenden zum IL-4 bildenden Zellanteil von 21,3 auf 41,0 ermittelt (p=0,026). Außerdem stieg das Verhältnis der BALL, die nach Stimulation IFN- γ produzierten zum Prozentsatz der Zellen, die unstimuliert IL-4 bildeten bei sechsstündiger Inkubation von 2,1 statistisch signifikant auf 5,5 an (p=0,023) (s. Tab. 26).

Tab. 26: Quotienten der durchschnittlichen Anteile der IFN- γ und IL-4 produzierenden BALL vor und nach Therapie

IFN- γ /IL-4 (x_g $x/:SF$)							
IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h stim.		IFN- γ 18h stim./ IL-4 18h stim.		IFN- γ 6h stim./ IL-4 6h unstim.		IFN- γ , 18h stim./ IL-4 6h unstim.	
prä	post	prä	post	prä	post	prä	post
4,7 x/: 4,0	9,2 x/: 3,1	21,3 x/: 2,5	41,0 x/: 2,3	2,1 x/: 4,5	5,5 x/: 3,5	3,3 x/: 4,0	6,0 x/: 3,1
n. s.		p=0,026 (*)		p=0,023 (*)		n. s.	

graue Schattierung: nach der Therapie statistisch signifikant höheres Verhältnis von IFN- γ ⁺ zu IL-4⁺ BALL als prätherapeutisch

5 Diskussion

Da die Kenntnisse über die immunpathologischen Mechanismen bei der Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes bis zum heutigen Zeitpunkt sehr lückenhaft sind, spielt sich die Therapie der Erkrankung bislang auf symptomatischer Ebene ab. Aktuelle Studien, die anhand von Zellen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) untersuchen, ob bestimmte Lymphozytensubpopulationen bzw. die von unterschiedlichen T-Helferzellen produzierten T_H1 - bzw. T_H2 -Zytokinmuster eine pathogenetische Bedeutung besitzen, kamen bisher nicht zu einem einheitlichen Ergebnis.

Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass eine Verbesserung der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der Lymphozyten aus der BALF notwendig ist, um bei klinischen COB-Patienten eine Detektion und Quantifizierung der lymphozytären Veränderungen zu erlauben, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung zulassen.

Die eigenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich bei der equinen COB die Rolle der T-Helferzellen weniger über ihren prozentualen Anteil als vielmehr über die Produktion von Entzündungsmediatoren definieren lässt. Die Prozentsätze der $IFN-\gamma$ bzw. IL-4 bildenden BALL sprechen generell für ein *a priori* T_H2 -geprägtes Zytokinmuster in den Atemwegen COB-kranker Pferde. Dagegen war mit großen Prozentsätzen an stimulierbaren $IFN-\gamma^+$ Lymphozyten ein niedriger Klinikscore, eine bessere Sauerstoffversorgung des arteriellen Blutes und ein geringerer PMN-Prozentsatz in der BALF verknüpft.

Sowohl in der Medikamentengruppe als auch bei den Pferden, die ohne Verwendung von Pharmaka mit Laserakupunktur therapiert wurden, bewirkte die Behandlung der Erkrankung eine klinische Verbesserung des Krankheitsbildes, die beim Hauptteil der Patienten von einer Reduktion des IL-4 bildenden Zellanteils und einer prozentualen Zunahme der $IFN-\gamma^+$ Lymphozyten begleitet wurde. Da zwischen den beiden Therapiemethoden diesbezüglich aber kein signifikanter Unterschied vorlag, sind selektiv immunmodulatorische Effekte der verwendeten Medikamente (z. B. Dexamethason und Clenbuterol) als Ursache für die Veränderungen im Zytokinmuster unwahrscheinlich. Die eigenen Untersuchungsergebnisse belegen vielmehr, dass die klinische Verbesserung des Lungengesundheitszustandes nach einer Therapie bei vielen Pferden in den tiefen Atemwegen mit einer Verschiebung des Zytokinmusters in Richtung einer T_H1 -Antwort einhergeht. Damit bestehen Hinweise, dass die Erkrankung beim Hauptteil der *in praxi* vorgestellten COB-Patienten von einem Ungleichgewicht der T_H1 - und T_H2 -Zytokine begleitet wird. Dieses könnte durch einen

Mangel an IFN- γ hervorgerufen und eventuell sogar ursächlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung der equinen COB sein.

5.1 Auswahl der Probanden

Bei vielen der in den letzten Jahren publizierten Studien zur COB des Pferdes muss die Probandenauswahl in ihrer Relevanz für klinische Patienten kritisch bewertet werden, da zumeist Tiere mit experimentell provozierten, exazerbierten Krankheitsschüben verwendet wurden. Diese Erkrankung, die definitionsgemäß durch Umgebungswechsel oder die Gabe medikamenteller Bronchodilatoren voll reversibel ist und in ihrer akuten, schweren Form (Exazerbation) sowohl mit einer hochgradigen Atemwegsobstruktion als auch mit mindestens 25% polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in der BALF einhergeht, hat im Jahre 2000 den Namen Recurrent Airway Obstruction (RAO) erhalten (ROBINSON 2001). Viele Patientenbesitzer kennen jedoch die symptomauslösenden Eigenschaften von Stäuben und minimieren diese Reize durch eine Optimierung der Aufstellungs- und Managementbedingungen, so dass in der Praxis eher mildere, chronische Erkrankungsformen vorkommen. Die Unterschiede zwischen RAO-Exazerbation und der *in praxi* relevanten COB werden in der klinischen Symptomatik, aber auch bei der weiterführenden Diagnostik deutlich. So publizierten McGORUM *et al.* (1993a) PMN-Prozentsätze in der BALF, die nach den Provokationstests durchschnittlich 70,6% (10,3 bis 97,7%) betragen. Für klinische Patienten berichten DIXON *et al.* (1995b) hingegen von 20,5% (5,5 bis 98,0), KLEIBER *et al.* (1999) von 7% ($\pm 3,8\%$), BERENDONK (2000) von 28,8% ($\pm 16,6\%$) und FEY (2005) von 10,3% (1. Quartil: 5,4/3. Quartil: 15,6). Die Probanden von BENDAHLI-AHCENE *et al.* (1995) zeigten mit durchschnittlich 45,5% ($\pm 12,4\%$) die höchsten PMN-Anteile einer Gruppe von klinischen Patienten. In der eigenen Studie lag der prätherapeutische Prozentsatz der PMN in der Therapiegruppe bei 10,6 ($x/1,9$), wobei lediglich ein Pferd mit 25,6% die differentialzytologischen Bedingungen für die RAO-Exazerbation erfüllte. Da folglich die Vergleichbarkeit der in Studien meist mittels Staubinhalation provozierten Erkrankungsform mit klinischen Patienten bereits auf dieser Ebene fraglich ist, sollten die an solchen Versuchspferden ermittelten Ergebnisse nicht kritiklos auf die in der Pferdepraxis vorgestellten Fälle übertragen werden. Separate Studien an klinischem Tiermaterial sind somit, insbesondere zur Erforschung der immunpathologischen Mechanismen in den Atemwegen, unerlässlich.

Problematisch bei der Verwendung klinischer Patienten sind allerdings die größtenteils heterogenen Ausgangsbedingungen, die u. a. die Erkrankungsdauer, das Aufstellungs-

management und die Vorbehandlung betreffen (BERENDONK 2000). Dies erfordert in der Regel große Tierzahlen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit konnte die Schwierigkeit der großen interindividuellen Unterschiede durch den Verzicht auf eine Einteilung der Probanden in unterschiedlich schwer erkrankte Gruppen und durch den prä-/posttherapeutischen Vergleich auf Ebene des Einzeltieres gelöst werden.

Als schwierig erwies sich die Rekrutierung lungengesunder Pferde: Trotz der gezielten Suche nach Kontrolltieren konnten lediglich zwei Probanden als unauffällig eingestuft werden. Beispielsweise war keines der acht klinikseigenen Pferde nach den Routineuntersuchungen als gesund zu klassifizieren. Außerdem wurden neun Tiere einbezogen, die aufgrund einer konservativ zu heilenden Kolik in der Klinik vorgestellt worden waren. Obwohl alle diese Pferde vorberichtlich einen ungestörten Lungengesundheitszustand aufwiesen, wurde bei acht durch weiterführende Untersuchungen eine COB unterschiedlichen Schweregrades diagnostiziert. Dies entspricht den Befunden von GERBER, der bei 26 anamnestisch und klinisch asymptomatischen Pferden teilweise erhebliche tracheobronchoskopische Veränderungen und Anteile von PMN in der BALF zwischen 0 und 27,8% feststellte (GERBER *et al.* 2003). Davor berichteten schon REITEMEYER (1983) und SASSE *et al.* (1985b) von endoskopisch sichtbaren Schleimansammlungen bei vorberichtlich unauffälligen Pferden. Zur sicheren Beurteilung der Lungengesundheit sollten somit möglichst umfassende weiterführende Untersuchungsmaßnahmen durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem in klinischen Therapiestudien ist, dass sich viele Pferdebesitzer nur mit Behandlungsmethoden einverstanden erklären, die offenkundig Erfolg versprechen. So existieren bislang keine Berichte über Untersuchungen, in denen medikamentell therapierten Tieren eine „unbehandelte“, ausschließlich optimierten Haltungsbedingungen ausgesetzte Kontrollgruppe entgegengestellt wurde. Ob verbesserte Aufstallungsbedingungen zur Therapie bereits ausreichen, welche Effekte auf die BALC den häufig verabreichten, immunmodulativen Glukokortikoiden oder Clenbuterol zuzuschreiben sind, und welche zellulären Veränderungen tatsächlich mit einer Verbesserung des Lungengesundheitszustandes in Zusammenhang stehen, ist bislang unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde neben den u. a. mit Kortikosteroiden behandelten Patienten eine weitere Tiergruppe mit Laserakupunktur therapiert. Da diese Pferde keine Pharmaka erhielten, können sie in gewissem Maße als Vergleichsprobanden dienen, bei denen ohne medikamentelle Intervention lediglich die Haltungsbedingungen optimiert wurden.

5.2 Verlässlichkeit der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen

Während equine BALL bereits mehrfach mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert wurden (McGORUM *et al.* 1993a; RAILTON 1994; BENDALI-AHCENE *et al.* 1995; WATSON *et al.* 1997; RUSH *et al.* 1998; KLEIBER *et al.* 1999; BERENDONK 2000), blieben PMN und Makrophagen in den genannten Untersuchungen entweder unerwähnt oder wurden lediglich auf der Basis ihrer Morphologie mittels Vorwärtsstreulicht (Größe) und Seitwärtsstreulicht (Granularität) identifiziert, ohne dass prozentuale Anteile aufgeführt sind (McGORUM *et al.* 1993a; BERENDONK 2000). Eine Qualitätskontrolle der durchflusszytometrischen Messregionen und eine immunphänotypische Analyse zur Abgrenzung dieser drei Zellpopulationen anhand geeigneter Detektionsantikörper wurden bislang nicht durchgeführt. Für die absolute Zellzahl in der BALF ist allerdings bereits bekannt, dass ihre Bestimmung mit lasergestützten hämatologischen Zellzählungsgeräten durch die im Vergleich zu Blutzellen deutlich abweichenden und stark variierenden Zellgrößen häufig zu niedrige Werte ergibt (CRYSTAL *et al.* 1986; MOORE und COX 1996). Da bisher keine vergleichenden Studien vorliegen, ist unklar, ob und in welchem Maße die einzelnen zytologischen Populationen durchflusszytometrisch in Messbereiche fremder Zellarten eingeordnet werden und inwieweit dadurch Prozentsätze und Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen beeinflusst oder verfälscht werden. Keine der bislang publizierten Arbeiten zur Durchflusszytometrie an equinen BAL-Zellen (BALC) enthält prozentuale Anteile von Makrophagen oder PMN oder einen Vergleich der durchflusszytometrischen Analyse mit der Lichtmikroskopie.

In der eigenen Arbeit ergab sich für Lymphozyten ein lichtmikroskopisch ermittelter Durchschnitt von 59,1% ($\pm 11,5\%$), während die durchflusszytometrische Differenzierung durchschnittlich 47,8% ($\pm 10,9\%$) erbrachte. Dabei konnte eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen dem lichtmikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch analysierten Lymphozytenanteil ermittelt werden. Die PMN lagen lichtmikroskopisch bei durchschnittlich 6,1% ($x/2,7$) und durchflusszytometrisch bei 10,6% ($x/1,6$). Für sie wurde ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen dem mikroskopisch und dem durchflusszytometrisch analysierten Anteil errechnet. Als problematisch erwiesen sich die Makrophagen, die, wie lichtmikroskopisch erkennbar, offenbar in ihrer Größe stark variieren und wohl aus diesem Grund in der Durchflusszytometrie nicht in einer abgrenzbaren Population zusammenzufassen waren (s. Kap. 4.1.3, Abb. 2, S. 55). Trotz einer hoch signifikanten Korrelation zwischen dem lichtmikroskopisch und dem durchflusszytometrisch bestimmten Makrophagenanteil standen durchschnittlich 30,3% ($\pm 11,5\%$) mikroskopisch ausgezählten Makrophagen lediglich 4,3%

(x/1,6) im Durchflusszytometer gegenüber. Somit befinden sich in diesem Messbereich zwar Makrophagen, bei der Immunphänotypisierung wird aber deutlich, dass zusätzlich insbesondere CD2⁺, CD5⁺ und CD4⁺ Lymphozyten darin vorkommen, durch die der Prozentsatz der in der Region liegenden Makrophagen weiter gesenkt wird. Die Zuordnung der oben genannten Lymphozyten in die Region der Makrophagen (RM) spricht dafür, dass es sich dabei um relativ große Zellen handelt, die sich u. U. in einem Zustand der Aktivierung befinden. Wie an exemplarischen Proben überprüft, liegen fluoreszierende Zellen und damit auch markierte Makrophagen in der durchflusszytometrischen Darstellung (Größe und Granularität) nicht überproportional außerhalb des Einzelzellbereiches, also z. B. als Zellklumpen am oberen Rand oder beim Zelldebris im unteren Bereich. Somit ist anzunehmen, dass Makrophagen über die Regionen der beiden anderen Populationen und zwischen ihnen verstreut sind. Weiterhin könnten sie aufgrund eines eventuell vermehrten Absterbens und der Aufnahme eines Totfarbstoffes (Propidiumjodid) von der weiteren Analyse ausgeschlossen worden sein. Für die letzte Annahme spricht, dass Makrophagen bei der lichtmikroskopischen Betrachtung mehr Zytoplasma als andere Zellarten enthalten, wodurch sie unter Umständen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber mechanischen Einflüssen z. B. während der Zentrifugationsschritte im Rahmen der Antikörpermarkierung besitzen. Da lichtmikroskopisch erkennbar die Makrophagen jene Zellpopulation darstellen, die die deutlichsten Unterschiede in ihrer Größe aufweisen, liefert eine durchflusszytometrische Identifizierung, die sich lediglich an morphologischen Charakteristika orientiert, eine mangelhafte Vergleichbarkeit mit der Lichtmikroskopie. Aufgrund von Merkmalsüberschneidungen mit den beiden anderen Zellpopulationen ermöglicht auch die Markierung des CD9- bzw. CD13-Antigens keine sichere Erkennung der Makrophagen, so dass für diese Population in der vorliegenden Arbeit anhand der Durchflusszytometrie nur begrenzte Aussagen getroffen werden können. Als Konsequenz scheint die Entwicklung eines spezifischen Markers für die Immunphänotypisierung notwendig, mit dem es möglich wäre, equine Makrophagen aus der BALF durchflusszytometrisch eindeutig identifizieren zu können.

Bei der Detektion des CD9 Moleküls, das auf verschiedenen Zellarten, u. a. Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und aktivierten T-Zellen zu finden ist (BOUCHEIX *et al.* 1991; BRODERSEN *et al.* 1998), waren durchschnittlich 44,6% ($\pm 10,9\%$) der Zellen aus der Region der Lymphozyten (RL) positiv für das Antigen. Dieser Wert lag etwas höher als die 20-30%, die BRODERSEN *et al.* (1998) mit Hilfe desselben kreuzreagierenden humanen Antikörpers (MCA 469S) auf peripheren Blutlymphozyten des Pferdes markieren konnten. Im

Gegenzug blieb der Prozentsatz der CD9⁺ Zellen in der Messregion der Granulozyten (RG) mit 74,5% ($\pm 11,2\%$) in der Höhe etwas hinter den 90-100% für das periphere Blut zurück. Ein Grund hierfür könnte die Existenz von CD9⁻ Lymphozyten in diesem Messbereich sein. Der Prozentsatz CD9⁺ Zellen aus der Region der Makrophagen (RM) von 59,4% ($\pm 13,7\%$) bewegte sich im Rahmen von 40-60%, den die obigen Autoren für Blutmonozyten angeben. Für CD13, das beim Menschen auf allen Granulozyten und Blut-Monozyten vorhanden ist, war die unterschiedlich starke Anfärbbarkeit der PMN aus peripherem Blut und BALF auffällig. CD13⁺ Blutzellen waren durch ein relativ schwach abgesetztes Fluoreszenzsignal gekennzeichnet. BALC zeigten hingegen eine intensivere Färbung. Möglicherweise ist dies durch den im Vergleich zur BALF höheren Prozentsatz der Granulozyten im peripheren Blut zu erklären, woraus in der Immunphänotypisierung ein niedrigeres Verhältnis der Antigene zu den Detektionsantikörpern als bei dem geringeren PMN Anteil in der BALF resultiert. Um insgesamt eine Verbesserung der Signalstärke bei der Markierung des CD13-Antigens zu erreichen, sollte eventuell in Zukunft anstelle des Fluoreszein-Isothiozyanat- (FITC-) gekoppelten Sekundärantikörpers für die Färbung ein Farbstoff mit höherem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, z. B. R-Phycoerythrin (R-PE), verwendet werden. Zur Optimierung des Signals kommen daneben Verstärkersysteme in Frage, die nach der Markierung mit dem Primärantikörper zusätzliche Markierungsschritte beispielsweise mit Biotin und Farbstoffgekoppeltem Streptavidin vorsehen.

Bei Betrachtung des Färbeverhaltens in der Doppelmarkierung trugen die Zellen aus der durchflusszytometrischen Region der Lymphozyten (RL) durch das Fehlen von CD13 auf ihrer Oberfläche entweder keines der beiden Antigene (CD13⁻/9⁻) oder lediglich das CD9 Molekül (CD13⁻/9⁺). In den Regionen der Granulozyten (RG) und Makrophagen (RM) war dagegen ein Teil der Zellen doppelt positiv (RG: 44,9% $\pm 18,3\%$; RM: 10,8% $\times / 1,9$), während der Anteil CD13⁺/9⁻ Zellen in beiden Messregionen unterhalb des Schwellenwertes lag. Die Zellen in RM waren folglich entweder CD13⁺/9⁺ oder zu einem größeren Teil CD13⁻/9⁺ (47,9 $\pm 16,9\%$). Der Prozentsatz der CD13⁻/9⁺ Ereignisse in RG fiel mit 31,9 $\pm 13,0\%$ hingegen kleiner aus und ist zumindest teilweise auf die Existenz von Lymphozyten im Messbereich zurückzuführen, die dort beispielsweise als CD2⁺/9⁺, CD5⁺/9⁺ oder CD4⁺/9⁺ Zellen vorhanden waren. Hinweise auf die mangelhafte Zugehörigkeit der CD13⁻/9⁺ Zellen zur Population der PMN bestehen zudem durch die signifikanten negativen Korrelationskoeffizienten dieser Messereignisse mit dem lichtmikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch ermittelten PMN-Prozentsatz. Dagegen waren CD13⁺/9⁺, CD2⁻/9⁺, CD5⁻/9⁺, CD4⁻/9⁺ und CD8⁻/9⁺ Zellen aus RG positiv mit dem durchflusszytometrisch

analysierten Anteil der PMN korreliert. Auch die Korrelation zwischen $CD13^+$ und $CD13^+/9^+$ PMN ($r=0,96$) mit einer Steigung der zugehörigen Regressionsgeraden von 1 weist darauf hin, dass Granulozyten generell sowohl das CD13 als auch das CD9-Antigen tragen. Folglich bietet sich der simultane immunphänotypische Nachweis des CD9- und CD13-Antigens zur Identifizierung der PMN in der BALF an. Über die gleichzeitige Nutzung von Lymphozytenmarkern würde es außerdem möglich werden, Lymphozyten in den Messregionen angrenzender Zellpopulationen kenntlich zu machen. Somit sollte in zukünftigen Studien der simultane Nachweis des CD9- und CD13-Antigens mit einem Lymphozytenmarker kombiniert werden, um eine exaktere Abgrenzung der Zellpopulationen zu erreichen.

5.3 PMN aus der equinen BALF

Studien an klinischem Probandenmaterial belegen Zusammenhänge zwischen dem Grad der chronischen Atemwegserkrankung und dem PMN-Prozentsatz in der BALF (GERBER 1997; FEY 2005). In der eigenen Arbeit lagen ebenfalls negative Zusammenhänge des lichtmikroskopisch ermittelten PMN-Anteils bzw. des durchflusszytometrisch bestimmten Anteils der $CD9^+$, $CD13^+$ und $CD13^+/9^+$ Zellen aus RG mit dem Grad der Oxygenierung des arteriellen Blutes vor. Die Optimierung der klinischen Parameter im Therapievergleich (z. B. Abfall der Atemfrequenz und Erhöhung des Sauerstoff-Partialdrucks im arteriellen Blut) war, unabhängig von der Behandlungsmethode, erstens von einer Reduktion der lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch analysierten PMN-Anteile in der BALF und zweitens in RG von einem statistisch signifikanten Abfall der $CD9^+$ Zellen von 78,1% ($\pm 10,1\%$) auf 71,2% ($\pm 17,3\%$) ($p=0,045$) und der $CD13^+$ Messereignisse von 56,7% ($\pm 16,5\%$) auf 38,4% ($\pm 19,4\%$) ($p=0,0005$) begleitet. Somit verhielten sich die durchflusszytometrisch ermittelten Parameter analog zur Lichtmikroskopie. Jedoch müsste, wenn alle PMN sowohl das CD13- als auch das CD9-Antigen tragen, davon ausgegangen werden, dass beide Subpopulationen in RG gleichmäßig abfallen. Das weniger starke prozentuale Absinken der $CD9^+$ PMN ist auf die Existenz ($CD13^-$)/ 9^+ Lymphozyten in der Messregion zurückzuführen (s. Kap. 5.2, S. 95 ff.). Durch die prozentuale Abnahme der PMN scheint insbesondere diese Lymphozytensubpopulation posttherapeutisch in RG in ihrem Anteil anzusteigen.

5.4 Lymphozyten aus der equinen BALF

Im Folgenden werden Zellen aus den drei Messregionen RL, RG und RM behandelt, die mit mindestens einem der spezifischen Lymphozytenmarker anzufärben waren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Antikörper gegen CD2, CD5, CD4 und CD8) und bei denen es sich somit definitionsgemäß um Lymphozyten handelt.

5.4.1 Lymphozytensubpopulationen

Sowohl das CD2- als auch das CD5-Antigen gelten als Marker für T-Zellen. Allerdings ergaben sich in der eigenen Arbeit, trotz positiver Korrelation zwischen den Anteilen der CD2⁺ und CD5⁺ BALL, voneinander abweichende Prozentsätze. Während durchschnittlich 91,1% ($\pm 7,3\%$) der Ereignisse in RL CD2⁺ waren, wiesen lediglich 68,8% ($\pm 11,7\%$) das CD5-Antigen auf. Das Färbesignal der CD5⁺ Zellen war in seiner Intensität im Vergleich zu CD2 relativ schwach ausgeprägt und variierte über einen Bereich von mehr als einer Logarithmus-Stufe. Mit dem positiven Zusammenhang zwischen der durchflusszytometrisch bestimmten Anzahl der Messereignisse in RL pro μl BALF und dem Prozentsatz der CD5⁺ Zellen ($r=0,55$) lagen keine Hinweise auf eine zu niedrige Konzentration des Antikörpers bei hohen Anteilen an Zellen in RL vor. Eine Erklärung für die prozentuale Divergenz könnte eine nicht-konstitutive Expression des CD5-Antigens auf den (CD2⁺) BALL sein, so dass neben den erwarteten CD2⁺/5⁺ auch CD2⁺/5⁻ Zellen existieren. Obwohl CD2⁺/5⁻ Lymphozyten beim Pferd bislang nicht beschrieben wurden, ist eine entsprechende Subpopulation von anderen Tierarten bekannt: So konnten durchflusszytometrische Untersuchungen an bovinen Milchzellen beweisen, dass in bestimmten Laktationsstadien ca. 40% der CD8⁺/2⁺ Lymphozyten negativ für CD5 sind (YANG *et al.* 1997). In der eigenen Arbeit war der Anteil der CD9⁺ Zellen unter den CD2⁺ T-Lymphozyten geringer als unter den CD5⁺ T-Lymphozyten. Da CD9 als Aktivierungsmarker auf T-Zellen gilt, wird das CD5 Molekül wahrscheinlich ebenfalls abhängig vom Aktivierungszustand der Zellen exprimiert. Zur genauen Bestimmung der prozentualen Anteile von CD2⁺/5⁺ und CD2⁺/5⁻ Zellen ist in Zukunft die simultane Markierung beider Antigene nötig.

LUNN *et al.* (1991) bewiesen anhand durchflusszytometrischer Studien, dass im peripheren Blut des Pferdes keine ausgereiften CD4⁺/8⁺ T-Lymphozyten vorkommen. Durch die negativen Korrelationen, die in der eigenen Arbeit zwischen CD4⁺ und CD8⁺ BALL bestanden ($r= -0,55$), kann diese Aussage indirekt auch auf equine BALL ausgedehnt werden. Allerdings befanden sich in RM und RG CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen, deren Anteile positiv miteinander korreliert waren. Dieser Zusammenhang könnte für die Existenz von CD4⁺/8⁺

koexprimierenden Zellen unter den größeren Lymphozyten in der BALF sprechen, die bei den Tierarten Schwein, Huhn und Affe sowohl im peripheren Blut als auch in bestimmten Lymphgeweben bereits nachgewiesen wurden (ZUCKERMANN 1999). Als Erklärung für die positive Korrelation erscheint jedoch wahrscheinlicher, dass unter den T-Zellen aus der BALF, die außerhalb ihres eigentlichen Messbereichs angetroffen werden, sowohl CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten sind, und dass bei großen Anteilen der einen Subpopulation auch hohe Prozentsätze der anderen vorliegen. Zur sicheren Klärung dieser Frage sollte in zukünftigen Studien auch für die beiden Antigene CD4 und CD8 eine simultane Markierung vorgenommen werden.

Durch die Anfärbung des CD9-Antigens, das als Aktivierungsmarker auf Lymphozyten nicht konstitutiv exprimiert wird (BOUCHEIX *et al.* 1991), konnten in der eigenen Arbeit zusätzliche Informationen über die CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen gewonnen werden: Im Vergleich mit den CD4⁺ Zellen trug ein größerer Anteil der CD8⁺ Lymphozyten das CD9-Antigen, so dass unter den CD8⁺ Zellen ein größerer Prozentsatz aktivierter Zellen zu finden ist. Außerdem wurde nach Therapie der Tiere für bestimmte CD9⁺ Lymphozyten in RL und RM (CD13⁻/9⁺, CD2⁻/9⁺; CD4⁺/9⁺) ein prozentualer Anstieg beobachtet. Bei COB kranken Pferden scheinen CD9⁺ BALL somit mit einer klinischen Verbesserung der Krankheitssymptome zusammenzuhängen. Dies wird durch die positiven Korrelationen untermauert, die CD4⁺/9⁺, CD5⁺/9⁺ und CD8⁺/9⁺ Lymphozyten in RG mit dem Quotienten der IFN- γ ⁺/IL-4⁺ BALL aufwiesen. Bei hohen Prozentsätzen dieser Subpopulationen wird folglich die Tendenz zu einem T_H1-Zytokinprofil erkennbar. In Analogie zum Menschen, für den bekannt ist, dass auch CD8⁺ Lymphozyten zur Bildung von Zytokinmustern in der Lage sind, die dem T_H1- oder T_H2-Muster entsprechen (CARTER und DUTTON 1996; LI *et al.* 1997), scheinen neben den CD4⁺ Zellen auch CD8⁺ Zellen aus der BALF des Pferdes IFN- γ zu produzieren. Da sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ Lymphozyten zusätzlich das CD9-Antigen tragen, befinden sich diese IFN- γ bildenden Zellen zudem eventuell in einem Zustand der Aktivierung.

$\alpha\beta$ -T-Zellen stellen sowohl beim Menschen als auch bei den meisten Tierarten den Hauptanteil der T-Lymphozyten in peripherem Blut und in den Geweben. Daneben existiert ein kleinerer Anteil so genannter $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die Unterscheidung erfolgt anhand des T-Zellrezeptors, der bei den beiden Gruppen aus unterschiedlichen Proteinketten zusammengesetzt ist. Zudem exprimieren die in der Lunge von Mäusen vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen weder das CD4- noch das CD8-Oberflächenantigen (AUGUSTIN *et al.* 1989; HAYES *et al.* 1996). Die physiologische Rolle der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten besteht in der ersten Abwehr

bestimmter Bakterien, Viren und Parasiten. Da ihr T-Zellrezeptor von demjenigen der $\alpha\beta$ -T-Zellen abweicht, wird allerdings davon ausgegangen, dass sich die Untergruppen bezüglich der Erkennung von Antigenen unterscheiden (HAAS 1993; JANEWAY und TRAVERS 2002). In der BALF von Menschen mit atopischem Asthma ist sowohl der prozentuale Anteil als auch die absolute Zahl von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu gesunden Personen erhöht. Bekannt ist außerdem, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der BALF von humanen Asthmatikern IL-4 produzieren können (SPINOZZI *et al.* 1995b). BERENDONK (2000) vermutet, allerdings ohne Nachweis, dass sich $CD4^+/8^-$ Lymphozyten in der BALF von COB-kranken Pferden sowohl aus $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch aus NK-Zellen zusammensetzen. Die eigenen Untersuchungen lieferten durch die bei Addition von $CD4^+$ ($35,4 \pm 8,8\%$) und $CD8^+$ Zellen ($40,8\% \pm 7,8\%$) entstehende Differenz zu den $CD2^+$ Zellen ($91,1\% \pm 7,3\%$) und durch unterschiedliche Korrelationen indirekte Indizien für die Existenz einer dritten Untergruppe neben den direkt identifizierten Lymphozytensubpopulationen: Beispielsweise lag ein positiver Zusammenhang zwischen $CD2^+$ und $CD4^+$ Lymphozyten ($r=0,47$) mit einer Steigung der zugehörigen Regressionsgeraden von 0,78 vor. Eine Korrelation zwischen $CD2^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten war jedoch aus den vorliegenden Daten nicht zu entnehmen. In Kombination mit einer vergleichsweise flachen Steigung der negativen Korrelation zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten kann daraus auf eine $CD2^+/4^-/8^-$ Subpopulation geschlossen werden, bei der es sich um NK-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen handelt. Würde es sich um $\gamma\delta$ -T-Zellen handeln, würde das CD2-Antigen beim Pferd, im Gegensatz zum Rind (CLEVERS *et al.* 1990), nicht nur auf $\alpha\beta$ - sondern auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert werden. Die Zusammenhänge aus der Zweifachmarkierung ($CD2^+/9^+$ und $CD4^+/9^+$ Zellen bzw. $CD2^+/9^+$ und $CD8^+/9^+$) weisen zusätzlich darauf hin, dass diese dritte T-Zell-Population $CD9^+$ ist. Inwieweit equine $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Lunge an der Produktion von Entzündungsmediatoren beteiligt sind, und ob sie eine pathogenetische Rolle bei der COB des Pferdes spielen, muss noch geklärt werden. Zur genauen Erforschung ihrer Bedeutung sind Studien mit direkter Markierung dieser Subpopulation erforderlich.

Hinsichtlich der Beteiligung von B-Lymphozyten aus den tiefen Atemwegen an den Entzündungsvorgängen bei der klinischen COB des Pferdes kommt die vorliegende Arbeit zu ähnlichen Erkenntnissen wie BERENDONK (2000), nach deren Ansicht die intraluminale Antikörperproduktion keine pathogenetische Rolle spielt. Mit Prozentsätzen zwischen 0,1 und 2,7% konnten im Gegensatz zu McGORUM *et al.* (1993a) und BENDALI-AHCENE *et al.* (1995) auch bei hochgradig COB-kranken Patienten keine erhöhten Anteile an B-Zellen in der BALF ermittelt werden. Obwohl zwei Einzeltiere hohe Werte an B-Lymphozyten aufwiesen

(65,0% CD5⁻/B⁺ Zellen in RG und 57,1% in RM bzw. 12,2% B⁺ Zellen in RM), wurde bei keinem der Probanden eine CD5⁺/B⁺ Subpopulation und damit B1-Zellen identifiziert. Dieser Befund steht in Analogie zu KYDD *et al.* (1994) und LUNN *et al.* (1998), die der Spezies Pferd generell die Existenz von B1-Lymphozyten absprechen (s. Kap. 2.1.8.3.3, S. 18).

5.4.2 Einfluss der medikamentellen Therapie auf die Lymphozyten aus der BALF

Um den Einfluss einer Therapie auf die BALC zu überprüfen, führten RUSH *et al.* (1998) u. a. eine Immunphänotypisierung von Lymphozyten durch. Dabei war bei den beiden Gruppen, die mit Kortikosteroiden behandelt wurden, nach der Behandlung ein geringerer Prozentsatz an CD4⁺ Lymphozyten nachzuweisen als bei den mit einem Placebo therapierten Pferden.

In den eigenen Untersuchungen an klinischen Patienten konnten im prä-/posttherapeutischen Vergleich abhängig von der Art der Therapie ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der Lymphozytensubpopulationen beobachtet werden. Spezielle Effekte der Medikamentenkombination, die aus dem Kortikosteroid Dexamethason, dem β_2 -Sympathomimetikum Clenbuterol und dem Mukolytikum Dembrexin bestand, lagen im Gegensatz zur alternativmedizinischen Behandlung in der prozentualen Reduktion bestimmter Lymphozytensubpopulationen, von der besonders RG und RM betroffen waren. Aufgrund ihrer Größe kann für die BALL in RM davon ausgegangen werden, dass sie sich in einem Zustand der Aktivierung befinden. Die Medikamentenapplikation bewirkte, dass aktivierte Lymphozyten, insbesondere CD2⁺, CD4⁺ und CD5⁺/9⁺ Zellen, in ihrem Anteil reduziert wurden. Gleichwohl konnte nach der medikamentellen Therapie bei Stimulation der Zellen die statistisch nicht signifikante Tendenz zu erhöhten Anteilen IFN- γ ⁺ Lymphozyten nachgewiesen werden. CD2⁺ und CD5⁺ Lymphozyten in RM korrelieren positiv mit diesen IFN- γ ⁺ Zellen. Daher scheint trotz der erniedrigten Lymphozytensubpopulationen nach klinisch erfolgreicher medikamenteller Therapie eine erhöhte IFN- γ Produktion der stimulierten Zellen stattzufinden. In der Laserakupunkturgruppe, in der ebenfalls eine Verbesserung der klinischen Symptomatik beobachtet werden konnte, wurden bezüglich der Zytokinproduktion ähnliche, insgesamt homogenere Resultate erzielt, die jedoch nicht mit Abnahmen der einzelnen Subpopulationen verknüpft waren. Der Einfluss einer erfolgreichen Therapie auf die BALL scheint somit nicht in erster Linie in einer prozentualen Reduktion bestimmter Subpopulationen, sondern vielmehr in deren funktioneller Beeinflussung und einer veränderten Sekretion von Entzündungsmediatoren zu liegen.

5.5 Durchflusszytometrische Analyse von IFN- γ und IL-4

Da posttranskriptionelle Modifikationen der Zytokinexpression Divergenzen zwischen dem Vorhandensein einer bestimmten mRNA und der tatsächlichen Existenz des Moleküls hervorrufen können, fordert KLEIBER anstatt der vielfach verwendeten Quantifizierung zytokinspezifischer mRNA eine direkte Analyse von Zytokinproteinen in der equinen BALF (KLEIBER *et al.* 2005). Wie von PEDERSEN *et al.* (2002) für Blutzellen beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit der direkte Zytokinnachweis erstmals über die Markierung der IFN- γ und IL-4 produzierenden Einzelzellen mit kreuzreagierenden bovinen Detektionsantikörpern durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass equine Lymphozyten aus der BALF keine nennenswerte Spontanproduktion von IFN- γ aufwiesen. Im Gegensatz dazu waren 16,5% aber zur spontanen Bildung von IL-4 in der Lage. Durch Stimulation der Zellen mit Phorbol-myristat-acetat (PMA) und Ionomycin konnte der Prozentsatz der IFN- γ^+ Zellen auf über 50% angehoben werden, so dass keine strikte, unumkehrbare Polarisierung der BALL auf ein T_H2-geprägtes Zytokinmuster vorzuliegen scheint.

Während signifikante Zusammenhänge zwischen dem lichtmikroskopisch bestimmten Lymphozytenprozentsatz und den IL-4 produzierenden BALL nicht bestanden, lagen zwischen dem Prozentsatz der IFN- γ^+ Zellen (stimuliert, sechsstündige Inkubation $r=0,64$; stimuliert, achtzehnstündige Inkubation $r=0,59$) und dem Lymphozytenanteil aus der Lichtmikroskopie jeweils positive Korrelationen vor. Zudem wies der Anteil IFN- γ^+ Zellen mit dem Prozentsatz der durchflusszytometrisch analysierten Ereignisse in RL eine positive Korrelation auf ($r=0,62$). Damit ist, wie zu erwarten, davon auszugehen, dass Lymphozyten in der BALF die IFN- γ produzierende Zellpopulation darstellen. Zudem war bei hohen Prozentsätzen der (großen) CD5⁺ Zellen in RM mit hohen prozentualen Anteilen an IFN- γ^+ Zellen zu rechnen ($r=0,67$). Somit sind höhere Anteile an IFN- γ bildenden Zellen mit vielen großen, evtl. aktivierten T-Zellen in der Region der Makrophagen verknüpft. Die Quotienten der IFN- γ^+ /IL-4⁺ BALL waren signifikant und positiv sowohl mit CD2⁺ als auch mit CD5⁺ Lymphozyten in RM korreliert. Dies galt auch für CD4⁺/9⁺, CD5⁺/9⁺ und CD8⁺/9⁺ Zellen aus RG, so dass bei hohen Prozentsätzen an IFN- γ bildenden Zellen wiederum große prozentuale Anteile der genannten Lymphozytensubpopulationen vorlagen. Zur direkten Beurteilung der Zytokinproduktion in den Messregionen außerhalb von RL sollte in zukünftigen Studien der Nachweis von IFN- γ und IL-4 folglich auch in RG und RM durchgeführt werden. Negative Korrelationen zwischen den jeweiligen zytokinproduzierenden Lymphozytenanteilen

bestanden nicht, so dass höhere Prozentsätze an IFN- γ^+ BALL nicht automatisch mit geringeren Anteilen an IL-4 $^+$ Zellen verknüpft waren.

Hinsichtlich des posttherapeutisch nach Stimulation angestiegenen Verhältnisses der IFN- γ^+ zu den IL-4 $^+$ Lymphozyten sowie der niedrigen IL-4 Bildung der stimulierten Zellen sollte als möglicherweise methodisch bedingter Einfluss bedacht werden, dass bei einer starken intrazellulären Produktion von IFN- γ das zugesetzte Brefeldin A eventuell nicht vollständig in der Lage ist, die Sekretion des Zytokins zu verhindern. Das freigesetzte IFN- γ könnte in diesen Ansätzen zu einer parakrinen Hemmung der IL-4 Produktion und damit zu niedrigen Anteilen IL-4 $^+$ BALL führen. Unter diesem Gesichtspunkt muss in den stimulierten Ansätzen mit ihren hohen Anteilen an IFN- γ bildenden Zellen der niedrige Prozentsatz der IL-4 produzierenden Lymphozyten kritisch betrachtet werden. Um die Bildung von IL-4 objektiv beurteilen zu können, ist es auch für zukünftige Studien empfehlenswert, unstimulierte und stimulierte Zellen im direkten Vergleich zu untersuchen. Die abschließende Beurteilung der IL-4 Produktion sollte dann insbesondere bei niedriger IFN- γ Synthese erfolgen.

5.6 Rolle der Helferzellen und der T_{H1}- bzw. T_{H2}-Antwort bei der equinen COB

In der BALF von Menschen mit atopischem Asthma spielen CD4 $^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle. Sie besitzen die Fähigkeit, eine Reihe von Lymphokinen wie IL-4, IL-5 und den Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) zu produzieren, und über diese Mediatoren beispielsweise die Einwanderung eosinophiler Granulozyten und die Bildung von IgE zu stimulieren (HOLT *et al.* 1991; CORRIGAN und KAY 1992a; b; KAY 1992; ROBINSON *et al.* 1992). Die Arbeiten von McGORUM *et al.* (1993a), RAILTON (1994), BENDALI-AHCENE *et al.* (1995), WATSON *et al.* (1997), RUSH *et al.* (1998), KLEIBER *et al.* (1999) und BERENDONK (2000) untersuchten die Rolle einzelner Lymphozytensubpopulationen aus der BALF von Pferden mit COB. Für T-Zellen beobachteten McGORUM *et al.* (1993a) nach Provokation der Krankheit bei Versuchspferden einen Anstieg der CD5 $^+$ /CD8 $^-$ Zellen, die als CD4 $^+$ gewertet wurden. RAILTON *et al.* (1997) aus derselben Arbeitsgruppe bekräftigten diese Befunde mittels direkter Markierung, so dass bei exazerbierten Krankheitsformen den Helferzellen aus der BALF eine pathogenetische Bedeutung zuzukommen scheint. Im Gegensatz dazu konnte BERENDONK (2000) bei klinischen Patienten für den Anteil der CD4 $^+$ (und der CD8 $^+$) Lymphozyten zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der gering- bis mittelgradig und der Gruppe der hochgradig kranken Tiere keine Unterschiede aufdecken. In einer klinischen Studie aus der Schweiz

hatten hochgradig kranke Pferde im Vergleich mit den Kontrolltieren zwar eine erhöhte absolute Anzahl an CD4⁺ BALL, ihr Prozentsatz war zwischen den beiden Gruppen allerdings ähnlich. Patienten mit gering- bzw. mittelgradiger COB besaßen, verglichen mit Lungengesunden, sogar erniedrigte Anteile dieser Subpopulation in der Studie von KLEIBER *et al.* (1999). In der eigenen, klinisch orientierten Arbeit lagen die Anteile der CD4⁺ Zellen mit 35,4% ($\pm 8,8\%$) und der CD8⁺ Zellen mit 40,8% ($\pm 7,8\%$) niedriger als in der experimentellen Studie von McGORUM *et al.* (1993a) und näher bei den Ergebnissen von BERENDONK (2000). Sowohl bei separater Betrachtung der prätherapeutischen Werte der klinisch schwerer kranken, therapierten Tiere als auch hinsichtlich ihrer posttherapeutischen Daten waren keine Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert zu ermitteln. Die eigenen Daten belegen bei höheren post- als prätherapeutischen Anteilen bestimmter Subpopulationen von T-Lymphozyten (CD5⁺, CD2^{+/9}⁻, CD4⁺, und CD4^{+/9}⁻ aus RG) eine Verbesserung der Oxygenierung des arteriellen Blutes der Probanden. Zudem waren positive Korrelationen zwischen CD2⁺ bzw. CD5⁺ T-Lymphozyten in RM und dem T_H1-Zytokin IFN- γ nachzuweisen, so dass diese Subpopulationen in RG bzw. RM eventuell einen günstigen Einfluss auf die Lungengesundheit haben. Ähnliches gilt für den bereits oben erwähnten, posttherapeutischen Anstieg der CD13⁻/9⁺ Lymphozyten in allen drei Messregionen. Daneben bestehen auch bei klinischen Patienten Indizien dafür, dass gewisse Subpopulationen einen negativen Einfluss besitzen können: Ohne Berücksichtigung der Behandlungsart kam es, verbunden mit einer Verbesserung der klinischen Krankheitssymptome, posttherapeutisch zu einem signifikanten Abfall der CD2^{+/9}⁻ T-Lymphozyten und der (großen) CD4⁺ Lymphozyten in RM, so dass insbesondere diese Zellen möglicherweise an der Aufrechterhaltung der equinen COB beteiligt sind.

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien zur pathogenetischen Rolle des T_H1- und T_H2-Zytokinprofils und damit zur Funktionalität der Helferzellen im Zusammenhang mit der equinen COB publiziert (BERENDONK 2000; LAVOIE *et al.* 2001; GIGUÈRE *et al.* 2002; AINSWORTH *et al.* 2003; CORDEAU *et al.* 2004; HOROHOV *et al.* 2005; KLEIBER *et al.* 2005). Ein einheitliches Ergebnis konnte bislang allerdings nicht ermittelt werden. Während die kanadische Gruppe um LAVOIE und CORDEAU ihre Daten als Hinweis auf ein T_H2-geprägtes Zytokinmuster in der exazerbierten Phase der Erkrankung interpretierte (LAVOIE *et al.* 2001; CORDEAU *et al.* 2004), fanden AINSWORTH *et al.* (2003) in der BALF von Versuchspferden keine Mediatoren, die auf ein T_H2-Zytokinprofil hinwiesen. GIGUÈRE *et al.* (2002) beobachteten allerdings, dass bei einer Verbesserung der klinischen Symptomatik durch die inhalative Applikation eines Kortikosteroids die Bildung von Zytokinen des T_H1-

Profils gefördert wurde. Entsprechende Hinweise erhielten auch VAN DEN HOVEN *et al.* (2004), die nach Applikation des β_2 -Sympathomimetikums Clenbuterol bei drei von acht Versuchspferden einen Anstieg der mRNA Expression für IFN- γ feststellten. Als einzige Untersucherin verwendete BERENDONK (2000) klinische Patienten. Dabei wurde ohne Zusammenhang zum Erkrankungsgrad mRNA sowohl für IL-4 als auch für IFN- γ in der BALF nachgewiesen, so dass die Autorin ein gemischtes Zytokinprofil für die COB des Pferdes propagiert.

Im Gegensatz dazu lag in der eigenen Arbeit für die BALL bei der Erstuntersuchung der Probanden grundsätzlich eine spontane IL-4 Produktion vor. Dabei waren die Zellen ohne Stimulation nicht in der Lage IFN- γ zu bilden. Somit herrscht ein *a priori* T_H2-geprägtes Zytokinmuster in den tiefen Atemwegen von Pferden mit COB vor, das weder positive noch negative Korrelationen zu den Parametern aus der routinemäßigen COB-Diagnostik zeigte. Allerdings konnte anhand von positiven Zusammenhängen zwischen den IFN- γ^+ BALL und der p_aO₂ bzw. der negativen Korrelation zwischen dem Quotienten von IFN- γ und IL-4 produzierendem Lymphozytenanteil und der p_(A-a)O₂ sowie dem Klinikscore geschlussfolgert werden, dass pulmonale Lymphozyten von schwerer betroffenen Pferden selbst nach adäquater Stimulation in geringerem Maße IFN- γ^+ produzieren als weniger schwer erkrankte Patienten. Eine entsprechende Tendenz ließ auch die negative Korrelation zwischen dem Quotienten der IFN- γ^+ /IL-4⁺ BALL und dem durchflusszytometrisch bestimmten Prozentsatz der Granulozyten in der BALF erkennen. Bei der lichtmikroskopischen Analyse wurde für den Anteil der PMN in der BALF bereits vielfach ein Zusammenhang mit der Schwere der COB nachgewiesen (DERKSEN *et al.* 1985; McGORUM und DIXON 1994; DIXON *et al.* 1995b; ROBINSON *et al.* 1996; FRANCHINI *et al.* 1998; BRAZIL 1999). IFN- γ scheint folglich mit einer Linderung der klinischen Krankheitssymptome der COB zusammenzuhängen, so dass ein Mangel dieses Zytokins als fehlendes Gegengewicht zu einer dominierenden T_H2-Antwort bei COB kranken Pferden einen pathogenetischen Beitrag liefern könnte. Die eigenen Ergebnisse, insbesondere die signifikante posttherapeutische Erhöhung der Quotienten IFN- γ^+ /IL-4⁺ BALL belegen darüber hinaus bei einer klinisch erfolgreichen Behandlung der COB eine Veränderung des Zytokinmusters in der BALF. Da sich zwischen den Therapiearten bezüglich des Anstiegs der IFN- γ^+ Zellen keine Unterschiede ergaben und auch die Patienten aus der Laserakupunkturgruppe eine Verbesserung der klinischen Parameter aufwiesen, scheinen mögliche immunmodulative Effekte der in der Medikamentengruppe eingesetzten Pharmaka nicht ursächlich für die Veränderung zu sein.

Somit ist die Zunahme der IFN- γ^+ Zellen als Indiz für die Induktion eines T_H1-Zytokinmusters durch die Therapie zu werten.

Drei Tiere in der medikamentell therapierten Gruppe zeigten eine mit den anderen Patienten klinisch und lichtmikroskopisch vergleichbare Verbesserung der Krankheitssymptome, die posttherapeutisch (ohne Stimulation der Zytokinproduktion) von einem Anstieg des IL-4⁺ Zellanteils ohne gesteigerte IFN- γ Synthese in der BALF begleitet war. Daneben fiel ein einzelner COB-kranker Proband auf, dessen BALF in unstimuliertem Zustand bereits 55,4% IFN- γ^+ Zellen enthielt. Bei zwei Pferden mit hochgradiger COB wurden sowohl vor als auch nach der Therapie nur marginale Prozentsätze an IL-4⁺ BALL nachgewiesen. Bei diesen drei Einzelfällen scheint trotz teilweise hochgradiger klinischer COB-Symptomatik bereits vor einer entsprechenden Behandlung ein T_H1-geprägtes Zytokinmuster vorzuliegen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die COB des Pferdes auf der Basis der beteiligten Immunzellen und der regulatorischen Zytokine keine einheitliche Pathogenese besitzt. Dies könnte u. a. zur Uneinigkeit beitragen, die in der Literatur bezüglich der Beteiligung einer T_H1- bzw. T_H2-Immunantwort für die Erkrankung derzeit herrscht. Die Markierung von zytokinproduzierenden BALC wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig angewandt. Um die Bedeutung der „Ausreißer“ genauer beurteilen zu können, ist somit in zukünftigen Studien zu überprüfen, ob auch in einem größeren Tierkollektiv regelmäßig Pferde auftreten, die sich deutlich vom Durchschnitt der Tiergruppe abheben. Zudem sollten sowohl das Zytokinprofil in der BALF lungengesunder Pferde als auch die Veränderung des Zytokinmusters bei einer mit Placebo therapierten Kontrollgruppe überprüft werden.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblicke auf neue Therapieformen

Aufgrund des mangelhaften Verständnisses der immunpathologischen Mechanismen basiert die medikamentelle Therapie der COB des Pferdes zurzeit auf der Bekämpfung von Symptomen. Dazu steht nur eine vergleichsweise kleine Auswahl an nachgewiesenermaßen wirksamen Pharmaka zur Verfügung. Es werden beispielsweise die bronchodilatatorische Substanz Clenbuterol (SASSE und HAJER 1977; DENAC und PFISTER 1981; SASSE 1984; TRAUB-DARGATZ *et al.* 1992; SANDER *et al.* 2002) und sekretolytische Wirkstoffe wie Dembrexin (SASSE und DEEGEN 1984; MATTHEWS *et al.* 1988) verwendet. Zudem kommen Kortikosteroide zum Einsatz, wobei Dexamethason einen besonders günstigen Einfluss auf die Verbesserung der klinischen und lungenfunktionsanalytischen Symptomatik besitzt (RUSH *et al.* 1998a; RUSH *et al.* 1998b; LAVOIE *et al.* 2002; ROBINSON *et al.* 2002; ROBINSON *et al.* 2003; PICANDET *et al.* 2003). Für Patienten, bei denen ein

Übergewicht von T_H2 -Zytokinen in den tiefen Atemwegen ursächlich für die Entzündungsvorgänge ist, können Kortikosteroide beispielsweise über die Hemmung der IL-5 abhängigen Reifung eosinophiler Granulozyten und die Reduktion der Mastzellen (BELVISI 2004) auch ein kausales Therapeutikum darstellen. GIGUÈRE *et al.* (2002) wiesen bei COB-kranken Pferden nach einer Therapie mit Glukokortikoiden in der BALF signifikant weniger mRNA für IL-4 und einen Anstieg des $IFN-\gamma$ /IL-4 Verhältnisses nach. Eine T_H2 -Antwort in der Lunge wurde somit reduziert und ein T_H1 -geprägtes Zytokinmuster gefördert. Allerdings ist der (Langzeit-) Einsatz von Kortikosteroiden beim Pferd mit Risiken behaftet, zu denen z. B. die Induktion von Hufrehe und eine vermehrte Infektanfälligkeit gehören (EUSTACE und REDDEN 1990; HARKINS *et al.* 1993), so dass zur Behandlung der equinen COB Alternativen benötigt werden.

In der Humanmedizin werden bei immunpathologischen Krankheiten wie dem atopischen Asthma schon seit längerer Zeit kausal wirkende Medikamente z. B. in Form einer antiallergischen Immuntherapie geprüft. Ihr Ziel ist es, eine T_H1 -Antwort zu fördern (HANSEN 2003). Neben der Applikation von $IFN-\gamma$ kommt die Vakzinierung mit dem allergieauslösenden Antigen und unmethylierten Cytosin/Guanosin Motiven (CpG) aus Bakterien-DNA zum Einsatz, die sowohl die bronchiale Hyperreagibilität als auch die pulmonale Entzündung langanhaltend unterdrücken. Die Integration von Genen für Zytokine der T_H1 -Immunität ist in der Lage, den Effekt dieser DNA-Vakzine noch zu verstärken. Zudem wird der Einsatz von allergengepulsten Dendritischen Zellen (DC) überprüft, die mit Adjuvantien zur Produktion von IL-12 angeregt werden. Eine Alternative hierzu ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen (HANSEN 2003). Daneben wurden als Ersatz für die Therapie mit Kortikosteroiden sowohl der Antagonisierung von IL-4 durch einen löslichen IL-4 Rezeptor (Altrakincept) als auch monoklonalen Antikörpern gegen IL-5 (Mepolizumab) eine gewisse Wirksamkeit bei der Therapie des humanen Asthmas bescheinigt (BELVISI 2004; HENDELES *et al.* 2004).

Diese Ansätze für eine kausale antiallergische Immuntherapie bei der COB des Pferdes liegen einerseits aufgrund der bisherigen lückenhaften Erkenntnisse zur Pathogenese aber auch wegen des zurückhaltenden Interesses der Pharmafirmen bzw. der hohen Kosten für die Entwicklung entsprechender Pharmaka noch in der Zukunft. Alternativ dazu würde sich beispielsweise der Einsatz von Paramunitätsinducern anbieten, die zurzeit noch vor allem bei der Pro- und Metaphylaxe von Infektionskrankheiten genutzt werden. Für gewisse Präparate wie beispielsweise für das attenuierte Vaccinia Virus MVA (modifiziertes Vaccinia Virus Ankara) wurde bereits bewiesen, dass sie zur Induktion von T_H1 -Zytokinen in der Lage sind

(VILSMEIER 1999). Ob eine parenterale Gabe auch im pulmonalen Gewebe die erwünschte Wirkung entfaltet, oder ob beispielsweise eine Applikation *per inhalationem* besser geeignet wäre, ist in zukünftigen Therapiestudien zudem zu überprüfen. Obwohl die Methodik des direkten Zytokinnachweises mittels Antikörpermarkierung für die Routinediagnostik momentan noch zu aufwendig erscheint, sollte sie, zusätzlich zur Verwendung in Pathogenesestudien zur equinen COB, bei Entwicklung, Optimierung und Vergleich neuer Therapieverfahren als objektivierbares Diagnostikum zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung

Die Erkenntnisse zur Pathogenese der Chronisch Obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes sind lückenhaft, so dass bis zum heutigen Zeitpunkt lediglich eine symptomatische Therapie zur Verfügung steht. Obwohl von mehreren Autoren vermutet wird, dass die Erkrankung wie das Asthma des Menschen auf einer überschießenden T_H2 -Reaktion beruht, gelangten die Untersucher, die ihren Studien hauptsächlich exazerbierte COB-Formen zugrunde legten, bislang nicht zu einem einheitlichen Ergebnis.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine verbesserte phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Lymphozyten aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) bei klinischen COB-Patienten eine Detektion und Quantifizierung lymphozytärer Veränderungen erlaubt, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung zulassen.

In einem ersten Untersuchungsblock wurden 48 equine Patienten zunächst klinisch und labordiagnostisch untersucht, tracheobronchoskopiert und einer bronchoalveolären Lavage unterzogen. Die gewonnenen Zellen aus der BALF wurden lichtmikroskopisch differenziert. Daneben erfolgte eine durchflusszytometrische Charakterisierung von Granulozyten, Makrophagen und insbesondere Lymphozytenpopulationen anhand von Zweifachmarkierungen und der Detektion von Aktivierungsantigenen. Die durchflusszytometrische Zelldifferenzierung wurde mit den lichtmikroskopischen Differentialzellbildern verglichen. Zudem wurden über die Markierung mit Detektionsantikörpern die beiden Zytokine IFN- γ und IL-4 auf Niveau der Einzelzelle direkt quantifiziert. Die durchflusszytometrischen Daten wurden auf Zusammenhänge mit den Parametern aus der routinemäßigen COB-Diagnostik überprüft. Aus der Tiergruppe wurden 15 Pferde medikamentell mit Dexamethason, dem β_2 -Sympathomimetikum Clenbuterol und dem Mukolytikum Dembrexin behandelt. Weitere sieben Patienten wurden mit Laserakupunktur therapiert. Diese Tiere erhielten keine Pharmaka und können als Vergleichsprobanden dienen. Sieben Tage nach Beginn der jeweiligen Therapie wurden die Patienten einem zweiten Untersuchungsblock unterzogen, so dass ein prä-/posttherapeutischer Vergleich auf Ebene des Einzeltieres ermöglicht wurde.

Bei der an Blutzellen orientierten durchflusszytometrischen Identifikation der einzelnen Abwehrzellpopulationen in der BALF wurde deutlich, dass sich in den eingestellten Messregionen nicht ausschließlich die gewünschten Leukozyten befanden. Die immunphänotypische Untersuchung ermöglichte die eindeutige Identifikation der Lymphozyten, deren Nachweis auch in den Bereichen der Granulozyten und Makrophagen

gelang. In der Messregion der Lymphozyten trug im Vergleich mit $CD4^+$ Zellen ein größerer Prozentsatz der $CD8^+$ Lymphozyten das CD9-Antigen, das auf aktivierten T-Zellen zu finden ist. Zudem weisen insbesondere die Korrelationen mit der lichtmikroskopischen Differenzierung darauf hin, dass Granulozyten aus der BALF sowohl das CD13- als auch das CD9-Antigen tragen.

Im Zuge der posttherapeutischen Verbesserung der klinischen Krankheitssymptomatik konnten in den Regionen von Lymphozyten und Makrophagen prozentuale Anstiege von $CD9^+$ Lymphozyten verzeichnet werden, die nicht mit den übrigen Lymphozytenmarkern anzufärben waren, so dass diese aktivierten Zellen mit einem günstigen Einfluss auf die Lungengesundheit der Patienten verknüpft sind.

Zur Beurteilung der Lymphozytenfunktion wurde erstmals eine direkte Quantifizierung der $IFN-\gamma$ bzw. $IL-4$ produzierenden Zellen aus der BALF mit kreuzreagierenden bovinen Detektionsantikörpern durchgeführt. Die prätherapeutischen Prozentsätze der $IFN-\gamma$ bzw. $IL-4$ bildenden Lymphozyten sprechen für ein T_H2 -geprägtes Zytokinmuster in den Atemwegen der untersuchten COB-Patienten. Posttherapeutisch war bei den meisten Pferden ein Anstieg des Anteils $IFN-\gamma^+$ Lymphozyten aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALL) zu verzeichnen. Der Quotient der Prozentsätze $IFN-\gamma^+$ zu $IL-4^+$ BALL stieg statistisch signifikant an. Unterschiede zwischen den beiden Therapiemethoden konnten nicht ermittelt werden. Sowohl in der Medikamenten- als auch in der Laserakupunkturgruppe wurde bei einem Großteil der Probanden mit einer klinischen Verbesserung das Zytokinmuster in den tiefen Atemwegen in Richtung eines T_H1 -Profils verändert.

Neben einer erweiterten und detaillierteren Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen ist somit insbesondere die funktionelle Charakterisierung der Lymphozyten aus der BALF über die direkte Quantifizierung von $IFN-\gamma$ und $IL-4$ zur Aufdeckung lymphozytärer Veränderungen bei klinischen COB-Patienten geeignet. Obwohl die Methodik des direkten Zytokinnachweises für die Routinediagnostik bislang noch zu aufwendig erscheint, könnte sie in zukünftigen Pathogenesestudien zur equinen COB bzw. für Entwicklung, Optimierung und Vergleich neuer Therapieverfahren als wertvolles und objektivierbares Diagnostikum dienen.

7 Summary

Since knowledge of the pathogenesis of recurrent airway obstruction (RAO) in the horse is incomplete, merely a symptomatic therapy is available. Many authors suspect, that the disorder is comparable to human asthma and is based on an excessive T_H2 reaction. However, researchers, who mainly have investigated exacerbated forms of RAO, have not yet reached a uniform conclusion.

The hypothesis of this dissertation was that an improved phenotypic and functional characterization of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) allows the detection and quantification of lymphocytic changes in clinical RAO patients, allowing conclusions to the pathogenesis of the disorder.

In the first examination block, 48 equine patients with RAO underwent clinical and laboratory examinations, tracheobronchoscopy and bronchoalveolar lavage. BALF cells were differentiated by light microscopy. In addition, a flow cytometric characterization of granulocytes, macrophages and particularly lymphocyte subpopulations was performed by immunofluorescent double staining and the detection of activation antigens. Results of flow cytometric analysis were compared with cell differentiation by light microscopy. Furthermore, via direct detection by antibodies, IFN- γ and IL-4 were quantified on single-cell level. All flow cytometric data were checked for correlations with the parameters of the routine RAO diagnostics. From the total group of 48 animals, 15 horses were subsequently medicated with Dexamethasone, the β_2 -sympathomimetic Clenbuterol and the mucolytic Dembrexine. Additionally seven patients were treated with laser acupuncture. These animals did not receive any pharmaceuticals and therefore serve to some degree as control subjects. After seven days of therapy, the patients underwent a second examination block to enable a pre/post-therapeutic comparison on a single-animal basis.

The blood cell oriented flow cytometric identification of BALF cell populations revealed, that within the preset measuring gates, there were not exclusively expected leucocytes present. The immunophenotypic analysis allowed a definite identification of lymphocytes, which were to some degree detected in the granulocyte and macrophage gates. In the lymphocyte gate, compared to the $CD4^+$ cells, a higher percentage of $CD8^+$ lymphocytes carried the CD9 antigen, which can be found on activated T-cells. Furthermore correlation coefficients between flow cytometric and light microscopic cell differentiation indicate that granulocytes in the equine BALF carry CD13 and CD9 antigens concurrently.

With post-therapeutic improvement of the clinical signs, increases of CD9⁺ lymphocyte-percentages, which could not be stained by the other lymphocyte markers, were recorded in the lymphocyte and macrophage gates. This leads to the conclusion that these activated cells have a positive effect on the patients' lung health.

For the first time, as known to the author, lymphocyte function was assessed by direct quantification of IFN- γ and/or IL-4 producing BALF cells using cross-reacting bovine detection antibodies. Percentages of IFN- γ and/or IL-4 forming lymphocytes in BALF of RAO patients were consistent with a T_H2 cytokine pattern. After therapy, in most horses an increase of the IFN- γ ⁺ bronchoalveolar lavage lymphocytes (BALL) was seen. Statistically, the ratio IFN- γ ⁺/IL-4⁺ BALL percentages rose significantly. Differences between the two therapy methods could not be detected. Medication and laser acupuncture caused in a majority of subjects a significant clinical improvement and a change of the cytokine pattern in the deep airways towards a T_H1-profile.

In addition to an extended and more detailed examination of BALF lymphocyte subpopulations, the direct quantification of IFN- γ and IL-4 is especially helpful for the assessment of functional changes in clinical RAO-patients. Direct cytokine detection so far is too elaborate for routine diagnostic. However, in research towards pathogenesis and improvement of therapy of equine RAO, it will serve as a valuable method.

8 Literaturverzeichnis

- ÅBERG, N. (1993)
Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors.
Clinical and Experimental Allergy, 23, 829-834
- ABRAMSON, S. L.; MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. (1991)
Neutrophils
In: The lung; Scientific Foundations; Vol. 1, Eds.: Crystal, R. G.; West, J. B.; Barnes, P. J.; Cherniak, N. S.; Weibel, E. R.
Raven Press, New York, 553-563
- AINSWORTH, D. M.; APPLETON, J. A.; ANTCZAK, D. F.; SANTIAGO, M. A.; AVIZA, G. (2002)
IgG antibody responses to an inhaled antigen in horses with "heaves" (recurrent airway obstruction).
Vet. Immunol. Immunopathol., 84, 169-180
- AINSWORTH, D. M.; GRÜNIG, 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- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells.
Vet. Immunol. Immunopathol., 96, 83-91
- ALLEN, G.; YEARGAN, M.; COSTA, L. R.; CROSS, R. (1995)
Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in horses infected with equine herpesvirus 1.
J. Virol., 69 (1), 606-612
- AUGUSTIN, A.; KUBO, R. T.; SIM, G.-K. (1989)
Resident pulmonary lymphocytes expressing the γ/δ T-cell receptor
Nature, 340, 239-241
- BALSON, G. A.; SMITH, G. D.; YAGER, J. A. (1997)
Immunophenotypic analysis of foal bronchoalveolar lavage lymphocytes.
Vet. Microbiol., 56, 237-246
- BANKS, E. M.; KYRIAKIDOU, M.; LITTLE, S.; HAMBLIN, A. S. (1999)
Epithelial lymphocyte and macrophage distribution in the adult and fetal equine lung.
J Comp Pathol., 120(1), 1-13
- BARCLAY, A. N.; BIRKELAND, M. I.; BROWN, M. H.; BEYERS, A. D.; DAVIS, S. J.; SOMOZA, C.; WILLIAMS, A. F. (1993)
The leucocyte antigen facts book.
London, Academic Press, Harcourt Brace Jovannovich, S. 118
- BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. (1998)
Inflammatory mediators of asthma: an update.
Pharmacol. Rev., 50, 515-596

- BEECH, J. (1989a)
Diagnosing chronic obstructive pulmonary disease.
Veterinary Medicine, June, Symposium on equine respiratory disease, S. 614-619
- BELVISI, M. G. (2004)
Regulation of Inflammatory Cell Function by Corticosteroids.
Proc. Am. Thorac. Soc., 1, 207-214
- BENDALI-AHCENE, S.; MONIER, J. C.; FONTAINE, M.; CADORE, J. L., (1995)
Analyse cytologique et cytofluorimétrique du lavage bronchoalvéolaire (LBA) des chevaux souffrant de bronchopneumopathies chroniques obstructives (BCPO).
Revue Méd. Vét., 146 (5), 349-356
- BERENDONK, M. (2000)
Untersuchungen verschiedener Lymphzytensubpopulationen, entsprechender regulatorischer Zytokine und Immunglobulinisotypen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB)
Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.
- BLANCHARD-CHANNELL, M.; MOORE, P. F.; STOTT, J. L. (1994)
Characterization of monoclonal antibodies specific for equine homologues of CD3 and CD5.
Immunology, 82 (4), 548-554
- BOUCHEIX, C.; BENOIT, P.; FRACHET, P.; BILLARD, M.; WORTHINGTON, R. E.; GAGNON, J.; UZAN, G. (1991)
Molecular Cloning of the CD9 Antigen. A new family of cell surface proteins.
J. Biol. Chem., 266 (1), 117-122
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J. Y., BARNEON, G., GHAVANIAN, N., ENANDER, I., VENGE, P., AHLSTEDT, S., SIMONY-LAFONTAINE, J., GODARD, P., *et al.* (1990)
Eosinophilic inflammation in asthma.
N. Engl. J. Med., 323 (15), 1033-1039
- BRACHER, V.; VON FELLEBERG, R.; WINDER, C. N.; GRUNIG, G.; HERMANN, M. (1991)
An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses.
Equine Vet. J., 23, 136-141
- BRAZIL, T. J. (1999)
Pulmonary Neutrophil Recruitment, Activation and Clearance in Equine Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
PhD Thesis, the University of Edinburgh
- BRAZIL, T. J.; MCGORUM, B. C. (2001)
Molecules and mediators of inflammation in equine heaves: mechanisms and markers of disease (editorial).
Equine Vet. J. 33: 113-115

BRODERSEN, R.; BIJLSMA, F.; GORI, K.; JENSEN, K. T.; CHEN, W.; DOMINGUEZ, J.; HAVERSON, K.; MOORE, P. F.; SAALMÜLLER, A.; SACHS, D.; SLIERENDRECHT, W. J.; STOKES, C.; VAINIO, O.; ZUCKERMANN, F.; AASTED, B. (1998)

Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species.

Vet. Immunol. Immunopathol., 64, 1-13

BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A. C.; ESTES, D. M. (1998)

Bovine type 1 and type 2 responses

Vet. Immunol. Immunopathol., 63 (1-2), 45-55

BUFLER, P., SCHIKOR, D., SCHMIDT, B., GRIESE, M. (2004)

Cytokine stimulation by *Pseudomonas aeruginosa*-strain variation and modulation by pulmonary surfactant.

Exp. Lung Res., 30(3), 163-179

BUTTERWORTH, A. E.; DAVID, J. R. (1981)

Eosinophil function

N. Engl. J. Med., 304, 154-156

BUREAU, F.; DELHALLE, S.; BONIZZI, G.; FIEVEZ, L.; DOGNE, S.; KIRSCHVINK, N.; VANDERPLASSCHEN, A.; MERVILLE, M. P.; BOURS, V.; LEKEUX, P. (2000)

Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma.

J. Immunol., 165 (10), 5822-5830

CARTER, L. L.; DUTTON, R. W. (1996)

Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets.

Curr. Opin. Immunol., 8 (3), 336-342

CLARKE, A. F.; MADELIN, T. (1987)

Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials.

Equine Vet. J., 19 (5), 442-447

CLARKE, A. F. (1993a)

Stable dust-threshold limiting values, exposures variables and host risk factors

Equine Vet. J., 25 (3), 208-213

CLEVERS, H.; MACHUGH, N. D.; BENSALD, A.; DUNLAP, S.; BALDWIN, C. L.; KAUSHAL, A.; IAMS, K.; HOWARD, C. J.; MORRISON, W. I. (1990)

Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4⁻CD8⁻ T cell receptor gamma/delta⁺ T lymphocytes.

Eur. J. Immunol., 20 (4), 809-817

CORDEAU, M.-E.; JOUBERT, P.; DEWACHI, O.; HAMID, Q.; LAVOIE, J.-P. (2004)

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

Vet. Immunol. Immunopathol., 97, 87-96

- CRYSTAL, R. G.; REYNOLDS, H. Y.; KALICA, A. R. (1986)
Bronchoalveolar lavage: report of an international conference.
Chest 90: 122-131
- CRYSTAL, R. G. (1991)
Alveolar macrophages
In: *The lung; Scientific Foundations; Vol. 1, Eds.: Crystal, R. G.; West, J. B.; Barnes, P. J.; Cherniak, N. S.; Weibel, E. R.*
Raven Press, New York, 527-538
- CURRAN, J. A.; ARGYLE, D. J.; COX, P.; ONIONS, D. E.; NICOLSON, L. (1994)
Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA.
DNA-Sequence - The Journal of Sequencing and Mapping, 4, 405-407
- DAVIS, S. J.; VAN DER MERWE, P. A. (1996)
The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function.
Immunol. Today, 17 (4), 177-187
- DEBRUE, M.; HAMILTON, E.; JOUBERT, P.; LAJOIE-KADOCH, S.; LAVOIE, J. P. (2005)
Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells.
Vet. Immunol. Immunopathol., 105 (1-2), 25-31
- DeFRANCO, A. L. (1991)
All about B cells.
Cancer Cells, 3 (11), 450-453
- DENAC, M.; PFISTER, R. (1981)
Der Einfluss des b2-Rezeptoren-stimulierenden Sympathikomimetikums Ventipulmin® (NAB-365) auf die Atmungsmechanik des Pferdes.
Tierärztl. Umschau, 36: 188-194
- DERKSEN, F. J.; ROBINSON, N. E.; ARMSTRONG, P. J.; STICK, J. A.; SLOCOMBE, R. F. (1985a)
Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves).
J. Appl. Physiol., 58, 598-604
- DERKSEN, F. J.; SCOTT, J. S.; MILLER, D. C.; SLOCOMBE, R. F.; ROBINSON, N. E. (1985c)
Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves).
Am. Rev. Respir. Dis., 132, 1066-1070
- DERKSEN, F. J.; ROBINSON, N. E.; SCOTT, J. S.; STICK, J. A. (1988)
Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves).
Am. J. Vet. Res., 49, 933-938
- DERKSEN, F. J. (1993)
Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition.
Equine Vet. J., 25 (4), 257-258

- DIECKMANN, M. P.; DEEGEN, E. (1990a)
Klinische Bedeutung der Tracheobronchialsekret-Zytologie
Pferdeheilkunde, 6, 101-110
- DIXON, P. M.; RAILTON, D. I.; MCGORUM, B. C. (1995a)
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1:
Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses.
Equine Vet. J., 27 (6), 416-421
- DIXON, P. M.; RAILTON, D. I.; MCGORUM, B. C. (1995b)
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details
of animals and of historical and clinical findings.
Equine Vet. J., 27 (6), 422-42
- DIXON, P. M.; RAILTON, D. I.; MCGORUM, B. C. (1995c)
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary
diagnostic findings.
Equine Vet. J., 27 (6), 428-435
- DIXON, P. M.; RAILTON, D. I.; MCGORUM, B. C.; TOTTHILL, S. (1995d)
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 4:
Treatments and re-examination findings.
Equine Vet. J., 27(6), 436-439
- DOHMANN, K.; WAGNER, B.; HOROHOV, D.; LEIBOLD, W. (2000)
Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4.
Vet. Immunol. Immunopathol., 77 (3-4), 243-256
- DOWDALL, S. M.; MATTHEWS, J. B.; MAIR, T.; MURPHY, D.; LOVE, S.;
PROUDMAN, C. J. (2002)
Antigen-specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostominae
infection in horses.
Vet. Parasitol., 106 (3), 225-242
- DURHAM, S. R.; TILL, S. J.; CORRIGAN, C. J. (2000)
T lymphocytes in asthma: bronchial versus peripheral responses.
J. Allergy Clin. Immunol., 106 (5 Suppl.), 221-226
- 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, 241-253
- EICHHORN, W. (1989)
Respiratorische Infektionskrankheiten beim Pferd.
Prakt. Tierarzt, 70, 37-40

- 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 (10), 841-850
- ESTES, D. M.; BROWN, W. C. (2002)
Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle.
Vet. Immunol. Immunopathol., 90 (1-2), 1-10
- EUSTACE, R. A.; REDDEN, R. R. (1990)
Iatrogenic laminitis.
Vet. Rec., 126 (23), 586
- EYRE, P. (1972)
Equine pulmonary emphysema: a bronchopulmonary mould allergy.
Vet. Rec., 91, 134-140
- FAIRBAIRN, S. M.; PAGE, C. P.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F. M. (1993)
Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure.
Clinical and Experimental Allergy, 23, 821-828
- FAIRBAIRN, S. M.; MARR, K. A.; LEES, P. (1996)
Effects of platelet-activating-factor on the distribution of radiolabeled leucocytes and platelets in normal horses and asymptomatic horses with chronic obstructive pulmonary-disease.
Res. Vet. Sci., 61, 107-113
- FELS, A. O. S.; COHN, Z. A. (1986)
The alveolar macrophage
J. Appl. Physiol., 60, 353-369
- FEY, K. (2005)
Der klinische Nutzen zytologischer Untersuchungen von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit bei der Differenzierung chronischer Bronchitiden des Pferdes.
Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät der Justus-Liebig Universität, vet. med. Habil.
- FEY, K.; SASSE, H. H. L. (1997)
Die bronchoalveoläre Lavage als Diagnostikum beim Pferd.
Internationales Symposium – Diagnostik beim Pferd; Bad Homburg, FN Verlag, S. 133
- FINKELMANN, D. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F. JR.; BECKMANN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; PAUL, W. E. (1990)
Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.
Annu. Rev. Immunol., 8, 303-333

- FLAMINIO, M. J. B. F.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. (2000)
Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals.
Vet. Immunol. Immunopathol., 73, (267-285)
- FOSTER, A. P.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F. M. (1992)
Platelet activating factor is a mediator in equine neutrophil and eosinophil migration in vivo.
Res. Vet. Sci., 53 (2), 223-229
- FRANCHINI, M.; GILLI, U.; AKENS, M. K.; FELLEBERG, R. v.; BRACHER, V. (1998)
The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD).
Vet. Immunol. Immunopathol., 66, 53-65
- FRANCHINI, M.; GILLI, U.; FELLEBERG, R. v.; BRACHER, V. (2000)
Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay.
Am. J. Vet. Res., 61 (11), 1369-1374
- GERBER, H. (1973)
Chronic pulmonary disease in the horse.
Equine Vet. J., 5, 26-32
- GERBER, H. (1997)
Krankheiten der unteren Luftwege.
In: Krankheiten des Pferdes, 2, 49-57
Paul Parey Verlag, Berlin
- GERBER, V.; ROBINSON, N. E.; LUETHI, S.; MARTI, E.; WAMPFLER, B.; STRAUB, R. (2003)
Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses.
Equine Vet J., 35 (5):491-495
- GERBLICH, A. A.; CAMPBELL, A. E.; SCHUYLER, M. R. (1991)
Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics.
Am. Rev. Respir. Dis., 143, 533-537
- 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, 147-158

- GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R. (1991)
Eosinophils.
In: The lung; Scientific Foundations; Vol. 1, Eds.: Crystal, R. G.; West, J. B.; Barnes, P. J.; Cherniak, N. S.; Weibel, E. R.
Raven Press, New York; 581-590
- GREEN, G. M.; JAKAB, G. J.; LOW, R. B.; DAVIS, G. S. (1977)
Defense mechanisms of the respiratory membrane.
Am. Rev. Respir. Dis., 115, 479-514
- GRÜNIG, G.; HIMMLER, A.; ANTCZAK, D. F. (1994)
Cloning and sequencing of equine interferon- γ cDNA.
Immunogenetics, 39, 448-449
- GRÜNIG, G.; BARBIS, D. P.; ZHANG, C. H.; DAVIS, W. C.; LUNN, D. P.; ANTCZAK, D. F. (1994)
Correlation between monoclonal antibody reactivity and expression of CD4 and CD8 α genes in the horse.
Vet. Immunol. Immunopathol., 42, 61-69
- HAAS, W. (1993)
Gamma/delta cells
Annu. Rev. Immunol., 11, 637-685
- HAJER, R.; SASSE, H. H. L. (1980)
Zur Ätiologie, Diagnostik und Therapie der COPD.
7. Fachtagung der DVG, Fachgruppe Pferdekrankheiten, Hamburg, 30-35
- HALLIWELL, R. E. W.; FLEISCHMAN, J. B.; MACKAY-SMITH, M.; BEECH, J.; GUNSON, D. E. (1979)
The role of allergy in chronic obstructive pulmonary disease of horses.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 174 (3), 277-281
- HALLIWELL, R. E. W.; 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 (3-4), 201-215
- HANSEN, G. (2003)
Entwicklung anti-allergischer Immuntherapien.
Med. Report, 35, 27. Jahrgang, Blackwell Verlag, Berlin, 7
- HARE, J. E.; VIEL, L. (1998)
Pulmonary eosinophilia associated with increases airway responsiveness in young racing horses
J. Vet. Intern. Med., 12, 163-170
- HARE, J. E.; VIEL, L.; CONLON, P. D.; MARSHALL, J. S. (1999)
In vitro allergen-induced degranulation of pulmonary mast cells from horses with recurrent airway obstruction (heaves).
Am J Vet Res., 60 (7), 841-847

- HARKINS, J. D.; CARNEY, J. M.; TOBIN, T. (1993)
Clinical use and characteristics of the corticosteroids.
Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 9 (3), 543-562
- HARTUNG, J. (1998)
Art und Umfang der von Nutztierställen ausgehenden Luftverunreinigungen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 105, 213-252
- HAYES, S. M.; SIRR, A.; JACOB, S.; SIM, G.-K.; AUGUSTIN, A. (1996)
Role of IL-7 in the shaping of the pulmonary $\gamma\delta$ T cell repertoire.
J. Immunol., 156, 2723-2729
- HENDELES, L.; ASMUS, M.; CHESROWN, S. (2004)
Evaluation of cytokine modulators for asthma.
Paediatr. Respir. Rev., 5, Suppl. A, 107-112
- HERMANN, J. (1984)
Lysozym- und Immunglobulinbestimmungen im Tracheobronchialsekret von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.
- HILL, W. C.; CEBRA, J. J. (1965)
Horse anti- SI immunoglobulins: I. Properties of gamma-M-antibody.
Biochemistry, 4, 2575-2584
- HIMMLER, A.; GRÜNIG, G. (1997)
The cloning of equine type I and type II interferons.
In: Cytokines in veterinary medicine. (Hrsg. V. E. C. J. Schijns und M. C. Horcinek)
©Cab International
- HINES, M. T.; PALMER, G. H.; BYRNE, K. M.; BRASSFIELD, A. L.; McGUIRE, T. C. (1996)
Quantitative characterization of lymphocyte populations in bronchoalveolar fluid and peripheral blood of normal adult Arabian horses.
Vet. Immunol. Immunopathol., 51, 29-37
- HOLMES, M. A.; LUNN, D. P. (1994)
Variation of MHC II expression on canine lymphocytes with age.
Tissue Antigens, 43 (3), 179-183
- HOLT, P. G.; MACAUBAS, C.; STUMBLES, P. A.; SLY, P. D. (1999)
The role of allergy in the development of asthma.
Nature (London), 402, B12-17
- HOOPER-McGREVY, K. E.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. (2003)
Immunoglobulin G subisotype response of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins.
Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10 (3), 345-351

- 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, 237-245
- HUNNINGHAKE, G. W.; GADEK, J. E.; KAWANAMI, O. E. (1979)
Inflammatory and immune processes in human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage
Am. J. Pathol., 97, 149-206
- HUNTER, C. A.; REINER, S. L. (2000)
Cytokines and T cells in host defense.
Curr. Opin. Immunol., 12(4), 413-418
- JATAKANON, A.; UASUF, C.; MAZIAK, W.; LIM, S.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. (1999)
Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 160, 1532-1539
- 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 (5), 432-438
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. (2002)
Immunologie
5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg·Berlin
- KALTREIDER, H. B. (1991)
Normal immune response.
In: Crystal, R. G.; West, J. B.; Barnes, P. J.; Cherniak, N. S.; Weibel, E. R. (Eds.)
The lung; Scientific Foundations; Vol. 1,
Raven Press, New York, 499-510
- KAUP, F.-J.; DROMMER, W.; DEEGEN, E. (1990a)
Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)
I: Alterations of the larger conducting airways.
Equine Vet. J., 22, (5), 343-348
- KAY, A. B. (1991)
Eosinophils and asthma.
N. Engl. J. Med., 324, (21), 1514-1515
- KAY, A. B. (1992)
'Helper' (CD4⁺) T cells and eosinophils in allergy and asthma.
Am. Rev. Resp. Disease, 145, 22-26
- KAY, A. B.; CORRIGAN, C. J. (1992)
Asthma. Eosinophils and neutrophils.
Br. Med. Bull., 48 (1), 51-64

- KAY, A. B. (1998)
T Cell response to inhaled antigen
In: Mac Donald, T. T. (Ed.); Mucosal T cells (Chemical Immunology; Vol. 71)
Karger, Basel, 161-177
- KAY, A. B. (1998)
Role of T Cells in Asthma
In: Mac Donald, T. T. (Ed.); Mucosal T cells (Chemical Immunology; Vol. 71)
Karger, Basel, 179-191
- KIPPS, T. J. (1989)
The CD5 B cell.
Adv. Immunol., 47, 117-185
- KIRSCHVINK, N.; DI SILVESTRO, F.; SBAI, I.; VANDENPUT, S.; ART, T.; ROBERTS, C.; LEKEUX, P. (2002a)
The use of cardboard bedding material as part of an environmental control regime for heaves-affected horses: in vitro assessment of airborne dust and aeroallergen concentration and in vivo effects on lung function.
Vet. J. 163: 319-325
- KIRSCHVINK, N.; SMITH, N.; FIEVEZ, L.; BOUGNET, V.; ART, T.; DEGAND, G.; MARLIN, D.; ROBERTS, C.; GENICOT, B.; LINDSEY, P.; LEKEUX, P. (2002b)
Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses.
Equine Vet. J. 34: 563-571
- KLEIBER, C.; GRÜNIG, G.; JUNGI, T.; SCHMUCKER, N.; GERBER, H.; DAVIS, W. C.; STRAUB, R. (1999)
Phenotypic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Lymphocytes in Horses with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
J. Vet. Med. A, 46, 177-184
- 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 (1-2), 91-97
- KLEIN, H. J.; DEEGEN, E. (1986)
Histamine inhalation provocation test: Method to identify nonspecific airway reactivity in equids.
Am. J. Vet. Res., 47(8), 1776-1800
- KLINMAN, N. R.; DARUSH, F. (1967)
Equine antihapten antibody. V. The non-precipitability of bivalent antibody.
Immunochemistry, 4, 387-405

- KYDD, J. H.; ANTCZAK, D. F.; ALLEN, W. R.; BARBIS, D.; BUTCHER, G.; DAVIS, W.; DUFFUS, W. P. H.; EDINGTON, N.; GRÜNIG, G.; HOLMES, M. A.; LUNN, D. P.; McCULLOCK, J.; O'BRIEN, M. A.; PERRYMAN, I. E.; TAVERNOR, A. S.; WILLIAMSON, S.; ZHANG, C. (1994)
Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens, Cambridge, UK, July 1991.
Vet. Immunol. Immunopathol., 42, 1-60
- LAAN, T. T.; VAN NIEUWSTADT, R. A.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; BREUKINK, H. J. (2001)
Bronchoaveolar lavage for the diagnosis of lower airway disorders in horses
Tijdschr. Diergeneesk., 126 (17), 554-559
- LAPOINTE, J.-M.; LAVOIE, J.-P.; VRINS, A. A. (1993)
Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease.
Am. J. Vet. Res., 54 (8), 1310-1316
- LARSON, V. L.; BUSCH, R. H. (1985)
Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings.
Am. J. Vet. Res., 46 (1), 144-146
- LARCHE, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. (2003)
The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma.
J. Allergy Clin. Immunol., 111 (3), 450-463
- 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, 1410-1413
- LAVOIE, J. P.; LÉGUILLETTE, R.; PASLOSKE, K.; CHARETTE, L.; SAWYER, N.; GUAY, D.; MURPHY, T.; HICKEY, G. J. (2002)
Comparison of effects of dexamethasone and leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction.
AJVR, 63, 579-585
- LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. (1988)
Neutrophils and host defense
Ann. Intern. Med., 109, 127-142
- LI, L.; SAD, S.; KAGI, D.; MOSMANN, T. R. (1997)
CD8Tc1 und Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions.
J. Immunol., 158 (9), 4152-4161

- LIU, I. K.; WALSH, E. M.; BERNOCO, M.; CHEUNG, A. T. (1987)
Bronchoalveolar lavage in the newborn foal.
J. Reprod. Fertil. Suppl., 35, 587-592
- LOOK, A. T.; ASHMUN, R. A.; SHAPIRO, L. H.; PEIPER, S. C. (1989)
Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp 150) is identical to aminopeptidase N.
J. Clin. Invest., 83 (4), 1299-1307
- LOWELL, F. C. (1964)
Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse.
J. Allergy Clin. Immunol., 35, 322-330
- LUNN, D. P., HOLMES, M. A.; DUFFUS, W. P. H. (1991)
Three monoclonal antibodies identifying antigens on all equine T-lymphocytes, and two mutually exclusive T-lymphocytes subsets.
Immunology, 74, 251-257
- LUNN, D. P., HOLMES, M. A.; SCHRAM, B.; DUFFUS, W. P. H. (1995a)
Monoclonal antibodies specific for equine IgG sub-isotypes including an antibody which recognizes B lymphocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol., 47, 239-251
- LUNN, D. P.; HOLMES, M. A.; ANTCZAK, D. F.; AGERWAL, N.; BAKER, J.; BENDALI-AHCENE, S.; BLANCHARD-CHANNELL, M.; BYRNE, K. M.; CANNIZZO, 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
- MAIR, T. S.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. (1988)
Increased local IgA production in chronic obstructive pulmonary disease.
Equine Vet. J., 20 (3), 214-216
- MAIR, T. S.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. (1988)
Immunohistochemical study of the local humoral immune system of the equine respiratory mucosa.
Res. Vet. Sci., 45 (2), 160-165
- MAIR, T. S.; DERKSEN, F. J. (2000)
Chronic obstructive pulmonary disease: a review
Equine Vet. Ed., (AE) 2, 53-62
- MARR, K. A.; LEES, P.; PAGE, C. P.; CUNNINGHAM, F. M. (1998)
Inhaled leukotrienes cause bronchoconstriction and neutrophil accumulation in horses.
Res. Vet. Sci., 64 (3), 219-224

- MARR, K. A.; LEES, P.; CUNNINGHAM, F. M. (1999)
Agonist-induced adherence of equine neutrophils of fibronectin- and serum-coated plastic is CD18 dependent.
Vet. Immunol. Immunopathol., 71 (2), 77-88
- MARTI, E., GERBER, H.; ESSICH, G.; OULEHLA, J.; LAZARY, S. (1991)
The genetic basis of equine allergic diseases
1. Chronic hypersensitivity bronchitis.
Equine Vet. J., 23 (6), 457-460
- MARTI, E.; HARWOOD, L. (2002)
Genetics of human asthma and equine recurrent airway obstruction: can these two diseases be compared?
Pferdeheilkunde, 18 (6), 587-593
- MARTIN, F.; KEARNEY, J. F. (2001)
B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets.
Curr. Opin. Immunol., 13, 195-201
- MATTHEWS, A. G.; IMLAH, P.; McPHERSON, E. A. (1983)
A reagin-like antibody in horse serum: 1. Occurrence and some biological properties.
Vet. Res. Commun., 6 (1), 13-23
- MATTHEWS, A. G.; HACKETT, I. J.; LAWTON, W. A. (1988)
The mucolytic effect of Sputolysin in horses with respiratory disease
Vet. Rec., 122, 106-108
- MATTHYS, H. (2002)
Bronchialerkrankungen.
In: Matthys und Seeger (Hrsg.); Klinische Pneumologie
Springer-Verlag, 2002, 223-240
- MAYER, H. (1980)
Zur Diagnose und Therapie der chronischen Bronchitis
7. Arbeitstagung der DVG, Fachgruppe Pferdekrankheiten, Hamburg, 36-43
- McGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E. W. (1993a)
Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens.
Equine Vet. J., 25 (4), 261-267
- McGORUM, B. C.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E. W. (1993b)
Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'.
Vet. Immunol. Immunopathol., 36, 207-222
- McGORUM, B. C.; DIXON, P. M. (1994)
The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology.
Equine Vet. Educ., 6, 203-209

- 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, 430-434
- McGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B. (1972)
Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A.
Infect. Immun., 6 (4), 610-615
- McGUIRE, T. C.; TUMAS, D. B.; HINES, M. T.; LEIB, S. R.; BRASSFIELD, A. L.; O'ROURKE, K. I.; PERRYMAN, L. E. (1994)
Major histocompatibility complex-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins
J. Virol., 68 (3), 1459-1467
- McKANE, S. A.; CANFIELD, P. J.; ROSE, R. J. (1993)
Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training.
Aust. Vet. J., 70 (11), 401-404
- McPHERSON, E. A.; LAWSON, G. H. K.; MURPHY, J. R.; NICHOLSON, J. M.; BREEZE, R. G.; PIRIE, H. M. (1979a)
Chronic obstructive pulmonary disease in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenetic challenge.
Equine Vet. J., 11, 159-166
- McPHERSON, E. A.; THOMSON, J. R. (1983)
Chronic obstructive pulmonary disease in the horse 1: Nature of the disease.
Equine Vet. J., 15, 203-206
- MEISTER, U., GERBER, H., TSCHUDI, P. (1976)
Arterial blood gas analysis in the diagnosis and monitoring of horses with chronic pulmonary diseases.
Schweiz. Arch. Tierheilkd., 118 (3), 99-104
- METZGER, W. J.; ZAVALA, D.; RICHERSON, H. B.; MOSELEY, P.; IWAMOTA, P.; MONICK, M.; SJOERDSMA, K.; HUNNINGHAKE, G. W. (1987)
Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation.
Am. Rev. Respir. Dis., 135 (2), 433-440
- MEUER, S. C.; SCHLOSSMANN, S. F.; REINHERZ, E. L. (1982)
Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4395
- MIYADO, K. G.; YAMADA, S.; YAMADA, H.; HASUWA, Y.; NAKAMURA, F.; RYU, K.; SUZUKI, K.; KOSAI, K.; INOUE, K.; OGURA, A. (2000)
Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization.
Science, 287, 321-324

- MONTGOMERY, P. C. (1973)
Molecular aspects of equine antibodies.
In: J. T. Bryans u. H. Gerber (Eds.); Proceedings of the 3rd International Conference on Equine Infectious Diseases.
Karger, Basel, 343-363
- MOORE, B. R.; KRAKOWKA, S.; ROBERTSON, J. T.; CUMMINS, J. M. (1995)
Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from Standardbred racehorses with inflammatory airway disease.
AJVR, 56 (5), 562-567
- MOORE, B. R.; COX, J. H. (1996)
Diagnostic use of bronchoalveolar lavage in horses.
Equine Pract., 18, 7-15
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMANN, R. L. (1986)
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
J. Immunol., 136 (7), 2348-2357
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. (1989)
TH1- and TH2-cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Annual Rev. Immunol., 7, 145-173
- MOSMANN, T. R.; SCHUMACHER, J. H.; STREET, N. F.; BUDD, R.; O'GARRA, A.; FONG, T. A.; BOND, M. W.; MOORE, K. W.; SHER, A.; FIORENTINO, D. F. (1991)
Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells.
Immunol. Rev., 123, 209-229
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. (1996)
The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more
Immunol. Today, 17 (3), 138-146
- MURAILLE, E.; LEO, O. (1998)
Revisiting the Th1/Th2 paradigm.
Scand. J. Immunol., 47, 1-9
- NAVARRO, P.; BARBIS, D. P.; ANTCZAK, D.; BUTLER, J. E. (1995)
The complete cDNA and deduced amino acid sequence of equine IgE.
Molecular Immunol., 32 (1), 1-8
- NEVALAINEN, M.; RAULO, S. M.; BRAZIL, T. J.; PIRIE, R. S.; SORSA, T.; MCGORUM, B. C.; MAISI, P. (2002)
Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses.
Equine Vet. J., 34 (2), 150-155

- NISHIMURA, Y.; BIERER, B. E.; BURAKOFF, S. J. (1988)
Expression of CD5 regulates responsiveness to IL-1.
J. Immunol., 141 (10), 3438-3444
- O'BRIEN, M. A.; HOLMES, M. A.; LUNN, D. P.; DUFFUS, W. P. H. (1991)
Evidence for MHC class-I restricted cytotoxicity in the one-way, primary mixed lymphocyte reaction.
Equine Vet. J., 12, 30-35, Supplement
- OVERESCH, G.; WAGNER, B.; RADBRUCH, A.; LEIBOLD, W. (1998)
Organisation of the equine immunoglobulin constant heavy chain genes. Equine cgamma genes.
Vet. Immunol. Immunopathol., 66 (3-4), 273-287
- PAHUD, J. J.; MACH, J. P. (1972)
Equine secretory IgA and secretory component.
Arch. Allergy, 42, 175-186
- 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 (1); 33-38
- PALLISER, D.; LOWREY, A.; LAMB, J. R.; HOYNE, G. F. (1998)
T-Cell Response to Inhaled Antigen
In: Mac Donald, T. T. (Ed.); *Mucosal T cells (Chemical Immunology; Vol. 71)*
Karger, Basel, 161-177
- PARBHAKAR, O. P.; DUKE, T.; TOWNSEND, H. G.; SINGH, B. (2004)
Immunophenotypic characterization and depletion of pulmonary intravascular macrophages of horses.
Vet Res., 35(1); 39-51.
- PARNES, J. R. (1989)
Molecular biology and function of CD4 and CD8.
Adv. Immunol., 44, 265-311
- 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, 111-122
- PÈNE, J.; ROUSSET, F.; BRIÈRE, F.; CHRÉTIEN, I.; BONNEFOY, J.-Y.; SPITS, H.; YOKOTA, T.; ARAI, N.; ARAI, K.-I.; BANCHEREAU, J. (1988)
IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E₂.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6880-6884

- PICANDET, V.; LÉGUILLETTE, R.; LAVOIE, J. P. (2003a)
Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction (“heaves”)
Equine Vet. J., 35, 419-424
- PICKLES, K.; PIRIE, R. S.; RHIND, S.; DIXON, P. M.; McGORUM, B. C. (2002a)
Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots.
Equine Vet. J. 34: 288-291
- PIRIE, R. S.; DIXON, P. M.; COLLIE, D. D. S.; McGORUM, B. C. (2001)
Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses.
Equine Vet. J., 33 (3), 311-318
- PIRIE, R. S.; McLACHLAN, G.; McGORUM, B. C. (2002)
Evaluation of nebulised hay dust suspension (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS.
Equine Vet. J., 34 (4), 332-336
- PRASSE, A.; MATTHYS, H. (2002)
Differentialdiagnose: Alveolitiden, Vaskulitiden, Granulomatosen und Lungenfibrosen.
In: Matthys und Seeger (Hrsg.); Klinische Pneumologie Springer-Verlag, 389-396
- PRASSE, A.; COSTABEL, U. (2002)
Interstitielle Lungenerkrankungen bei Systemerkrankungen.
In: Matthys und Seeger (Hrsg.); Klinische Pneumologie Springer-Verlag, 415-437
- PRUSSIN, C. (1997)
Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level.
J. Clin. Immunol., 17, 195-204
- QUIE, P. G. (1986)
Lung defense against infection
J. Pediatr., 108, 813-816
- RADE, C. (1996)
Klinische und serologische Reaktionen junger Pferde auf eine kontrollierte Applikation (per os/per inhalationem) von Schimmelpilzen und Futtermilben.
Hannover, Diss. Vet. Med.
- RAILTON, D. (1994)
An investigation into lymphocyte subpopulations in equine chronic obstructive pulmonary disease (C.O.P.D.)
PhD Dissertation, University of Edinburgh, Schottland

- RAULO, S. M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, T.; PIRILÄ, E.; MAISI, P. (2001)
MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD in horses.
Equine Vet. J., 33, 128-136
- REITEMEYER, H. (1983)
Klinische und endoskopische Reihenuntersuchungen der oberen und tiefen Atemwege bei 3-7jährigen hannoverschen Reitpferden.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.
- REITZ, A. (2006)
Vergleich therapeutischer Effekte von Laserakupunktur und medikamenteller Therapie bei der COB (RAO) des Pferdes.
Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät der Justus-Liebig Universität, Vet. med. Diss.,
- ROBINSON, D. S.; QUTAYBA, H.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, A. M.; CORRIGAN, C.; DURHAM, S.; KAY, A. B. (1992)
Predominant TH2-like bronchoalveolar T-Lymphocyte population in atopic asthma.
New Engl. J. Med., 326 (5), 298-304
- ROBINSON, N. E.; DERKSEN, F. J.; OLSZEWSKI, M. A.; BUECHNER-MAXWELL, V. A. (1996)
The Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease of Horses.
Br. Vet. J., 152, 283-305
- ROBINSON, N. E. (2001)
International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University,
16-18 June 2000
Equine Vet. J., 33 (1), 5-19
- ROBINSON, N. E.; JACKSON, C.; JEFCOAT, A.; BERNEY, C.; PERONI, D.; DERKSEN, F. J. (2002a)
Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves.
Equine Vet. J., 34, 17-22
- ROBINSON, N. E.; JEFCOAT, A. M.; GERBER, V. (2002b)
Mucus and inflammation in equine heaves.
Pferdeheilkunde, 18, 551-556
- ROBINSON, N. E.; BERNEY, C.; EBERHART, S.; DeFEIJTER-RUPP, H. L.; JEFCOAT, A. M.; CORNELISSE, C. J.; GERBER, V. M.; DERKSEN, F. J. (2003)
Coughing and mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction.
AJVR, 64, 550-557
- ROCKEY, J. H.; KLINMAN, N. R.; KARUCH, F. (1964)
Equine anithapten antibody. I. 7S beta-2A- and 10S gamma-1-globulin components of purified anti-beta-lactoside antibody.
J. Exp. Med., 120, 589-609

- ROCKEY, J. H. (1967)
Equine antihapten antibody. The subunits and fragments of anti-beta-lactoside antibody.
J. Exp. Med., 125 (2), 249-275
- ROHWER, J.; WAGNER, B.; WEGE, A.; LEIBOLD, W. (2003)
Sensitization and modulation of equine basophils.
34th Annual Meeting of German Society of Immunology, Berlin 2003, 288
- ROMAGNINI, S. (1996)
Short analytical review. TH1 and TH2 in human diseases.
Clin. Immunol. Immunopathol., 80, 225-235
- ROSE, R. J.; ROSSDALE, P. D. (1981)
Techniques and clinical application of arterial blood collection in the horse.
Equine Vet. J., 13, 70-73
- ROTTEVEEL, F. T.; KOKKELINK, I.; VAN LIER, R. A.; KUENEN, B.; MEAGER, A.; MIEDEMA F.; LUCAS, C. J. (1988)
Clonal analysis of functionally distinct human CD4⁺ T cell subsets.
J. Exp. Med., 168 (5), 1659-1673
- RUSH, B. R.; FLAMINIO, M. J. B. F.; MATSON, C. J.; HAKALA, J. E.; SHUMAN, W. (1998a)
Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively.
AJVR, 59, 1033-1038
- RUSH, B. R.; RAUB, E. S.; RHOADS, W. S.; FLAMINIO, M. J.; MATSON, C. J.; HAKALA, J. E.; GILLESPIE, J. R. (1998b)
Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively.
AJVR, 59, 1039-1043
- SANDER, K.; DEEGEN, E.; OHNESORGE, B. (2002)
Beeinflussung atemgasanalytischer Lungenfunktionsparameter durch intravenöse Clenbuterol-Applikation beim chronisch lungenkranken Pferd.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 109: 295-299
- SALTINI, C.; RICHELDI, L.; HOLROYD, K. J.; DU BOIS, R. M.; CRYSTAL, R. G. (1991)
Lymphocytes
In: The lung; Scientific Foundations; Vol. 1, Eds.: Crystal, R. G.; West, J. B.; Barnes, P. J.; Cherniak, N. S.; Weibel, E. R.
Raven Press, New York, 459-479
- SASSE, H. H. L. (1971)
Some pulmonary function tests in horses.
Utrecht, Niederlande, vet. med. Diss.

- SASSE, H. H. L.; HAJER, R. (1977)
Enkele veterinaire klinische ervaringen met het gebruik van een β 2-receptoren stimulerenden sympathico-mimeticum (NAB-365) bij paarden met longaadeningen.
Tijdschr. Diergeneeskd., 102, 1233-1238
- SASSE, H. H. L. (1984)
Ein Vergleich des Effektes nach einmaliger parenteraler Gabe von Ventipulmin oder Euphyllin auf die Lungenfunktionsprüfung bei an C.O.P.D. erkrankten Pferden.
Tierärztliche Umschau, 39, 656-659
- SASSE, W.; DEEGEN, E. (1984)
Zur Wirksamkeit von Sputolysin bei Pferden mit chronischen Bronchialerkrankungen
Tierärztliche Umschau, 39, 941-945
- SASSE, H. H. L.; BOERMA, S.; SMOLDERS, E. A. A. (1985a)
Zur Ätiologie chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd-Veterinärmedizinische und landwirtschaftliche Aspekte in Großmanegen.
9. Arbeitstagung der DVG, Fachgruppe Pferdekrankheiten Münster/Westfalen, 79-86
- SASSE, H. H. L.; BOERMA, S.; SMOLDERS, E. A. A. (1985b)
The relationship between pulmonary function tests and other parameters. Results of a research project in the etiology of C.O.P.D. in horses.
In: DEEGEN, E.; BEADLE, R. E.: Lung function and respiratory diseases in the horse International Symposium in Hannover, 46-48
- SASSE, H. H. L. (1995a)
C.O.B.-Prognose und Behandlungsmaßnahmen.
Collegium Veterinarium 25 (XXV), 66-69
- SASSE, H. H. L. (1996)
The amazing career of the respiratory system in equine exercise research.
Pferdeheilkunde, 12 (4), 528-530
- SCHMALLENBACH, K. H. (1997)
Local pulmonary and systemic antibody responses against *Aspergillus fumigatus* antigens in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease.
Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät der Justus-Liebig Universität, vet. med. Diss.
- SCHMALLENBACH, K. H.; RAHMAN, I.; SASSE, H. H.; DIXON, P. M.; HALLIWELL, R. E.; MC GORUM, 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(3-4), 245-256
- SCHOON, H. A.; DEEGEN, E. (1983)
Histopathology of chronic obstructive bronchitis in clinically sick horses.
Tierärztl. Prax., 11 (2), 213-221

- SELVARAJ, P.; PLUNKETT, M. L.; DUSTIN, M.; SANDERS, M. E.; SHAW, S.; SPRINGER, T. A. (1987)
The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3.
Nature, 326 (6111), 400-403
- SHEORAN, A. S.; HOLMES, M. A. (1996)
Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb, IgG(T)) using their differential binding characteristics for staphylococcal protein A and streptococcal protein G.
Vet. Immunol. Immunopathol., 55 (1-3), 33-43
- SHEORAN, A. S.; TIMONEY, J. F.; HOLMES, M. A.; KARZENSKI, S. S.; CRISMAN, M. V. (2000)
Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses.
Am. J. Vet. Res.; 61 (9), 1099-1105
- SIBILLE, Y.; REYNOLDS, H. Y. (1990)
Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.
Am Rev Respir Dis., 141(2), 471-501.
- SIEGER, L. (1978)
Pulmonary alveolar macrophages in pre- and post-natal rabbits.
J. Reticuloendothel. Soc., 23 (5), 389-395
- SPINOZZI, F.; BERTOTTO, A. (1995a)
Cellular mechanisms in the pathogenesis of bronchial asthma.
Immunol. Today, 16, 407-408
- SPINOZZI, F.; AGEA, E.; BISTONI, O.; FORENZA, N.; MONACO, A.; FALINI, B.; BASSOTTI, G.; DE BENEDICTIS, F.; GRIGNANI, F.; BERTOTTO, A. (1995b)
Local expansion of allergen-specific CD30⁺Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma.
Mol. Med., 1, 821-826
- STEINBACH, F.; MAUEL, S.; BEIER, I. (2002)
Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity.
Vet. Immunol. Immunopathol., 84 (1-2), 83-95
- 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(6179), 255-258
- SUTER, M.; FEY, H. (1983)
Further purification and characterization of horse IgE.
Vet. Immunol. Immunopathol., 4 (5-6), 545-553
- SWEENEY, C. R.; BEECH, J.
Bronchoalveolar lavage.
In: Equine Respiratory Disorders
Lea & Febiger, Philadelphia (1991), 55-61

- TAVERNOR, A. S.; KYDD, J. H.; BODIAN, D. L.; JONES, E. Y.; STUART, D. I.; DAVIS, S. J.; BUTCHER, G. W. (1994)
Expression cloning of an equine T-lymphocyte glycoprotein CD2 cDNA. Structure-based analysis of conserved sequence elements.
Eur. J. Biochem., 219 (3), 969-976
- TESAROWSKI, D. B.; VIEL, L.; McDONELL, W. N. (1996)
Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves).
Am. J. Vet. Res. 57: 1214-1219
- THEIN, P. (1981a)
Virusinfektionen und chronische Bronchitis des Pferdes.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 94, 65-68
- 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 (1), 35-38
- TRAUB-DARGATZ, J. L.; McKINNON, A. O.; THRALL, M. A.; JONES, R. L.; BRUYNINCKX, W.; BLANCQUAERT, A. M.; DARGATZ, D. A. (1992)
Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride.
Am. J. Vet. Res. 53: 1908-1916
- TREMBLAY, G. M. et al. (1993)
Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses.
Equine Vet. J. 25: 194-197
- TSCHETTER, J. R.; DAVIS, W. C.; PERRYMAN, L. E.; McGUIRE, T. C. (1998)
CD8 dimer usage on alpha beta and gamma delta T lymphocytes from equine lymphoid tissues.
Immunobiology, 198 (4), 424-438
- TUMAS, D. B., BRASSFIELD, A. L., TAVERNOR, A. S., HINES, M. T., DAVIS, . C.; McGUIRE, T. C. (1994)
Monoclonal antibodies to the equine CD2 T lymphocyte marker, to a pan-granulocyte/monocyte marker and to a unique pan-B lymphocyte marker.
Immunobiology, 192 (1-2), 48-64.
- VAERMAN, J. P.; QUERINJEAN, P.; HEREMANS, J. F. (1971)
Studies on the IgA system of the horse.
Immunology, 21, 443-454

- VAN DEN HOVEN, R.; DUVIGNEAU, J. C.; HARTL, R. T.; RIEDELBERGER, K.; TEINFALT, M.; GEMEINER, M. (2004)
The expression of messenger RNA for Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukins 1 β , 6, 8, and 10; Tissue Growth Factor-b; and Interferon- γ in bronchoalveolar lavage fluid cells from horses challenged with lipopolysaccharide and treated with Clenbuterol
Journal of Equine Veterinary Science, 24 (1), 29-36
- VAN DEN INGH, T. S. G. A. M. (1985)
Morphological aspects of bronchitis and bronchiolitis in the horse.
In: DEEGEN, E.; BEADLE, R. E.: Lung function and respiratory disease in the horse, International Symposium in Hannover, 13-1
- VANDENPUT, S.; VOTION, D.; DUVIVIER, D. H.; VAN ERCK, E.; ANCIAUX, N.; ART, T.; LEKEUX, P. (1998b)
Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses.
Vet. J. 155: 189-195
- VANDERGRIFT, E. V.; SWIDERSKY, C. E.; HOROHOV, D. W. (1994)
Molecular cloning and expression of equine interleukin 4.
Vet. Immunol. Immunopathol., 40, 379-384
- VAN DE VELDE, H.; VON HOEGEN, I.; LUO, W.; PARNES, J. R.; THIELEMANS, K. (1991)
The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5.
Nature, 351 (6328), 603-604
- VIEL, L. (1985)
Bronchoalveolar lavage and transtracheal aspiration in horses.
Swiss Vet., 11-S, 11-12
- VIEL, L. (1997)
Small airway disease as a vanguard for chronic obstructive pulmonary disease.
Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 13 (3), 549-560
- VILSMEIER, B. (1999)
Paramunity-inducing effects of vaccinia strain MVA.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 112 (9), 329-333
- VIRCHOW, J. C. Jr.; WALKER, C.; HÄFNER, D.; KORTSIK C.; WERNER, P., MATTHYS, H., KROEGEL, C. (1995)
Activated T lymphocytes and cytokine pattern in BAL after segmental endobronchial allergen provocation in atopic asthma.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 151, 960-968
- VRINS, A.; DOUCET, M. (1988)
L'examen cytologique du lavage bronchoalvéolaire chez des chevaux présentant les signes cliniques d'une maladie des voies respiratoires inférieures.
Congrès de l'AVEF, Paris, 1988

- VRINS, A.; DOUCET, M.; NUNEZ-OCHOA, L. (1991)
A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease.
Zentralbl. Veterinarmed. A, 38, 472-479
- WALDVOGEL, A. S.; LEPAGE, M.-F.; ZAHKER, A.; REICHEL, M. P.; EICHER, R.; HEUSSLER, V. T. (2004)
Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*
Vet. Immunol. Immunopathol., 97, 53-63
- WAGNER, B.; SIEBENKOTTEN, G.; LEIBOLD, W.; RADBRUCH, A. (1997a)
Organization of the equine immunoglobulin constant heavy chain genes; I. $c\epsilon$ and $c\alpha$ genes.
Vet. Immunol. Immunopathol., 60, 1-13
- WAGNER, B.; OVERESCH, G.; SHEORAN, A.; HOLMES, M. A.; RICHARDS, C.; LEIBOLD, W.; RADBRUCH, A. (1998b)
Organization of the equine immunoglobulin heavy chain constant region genes; III. Alignment of $c\mu$, $c\gamma$ and $c\alpha$ genes.
Immunobiol., 199, 105-118
- WAGNER, B.; SIEBENKOTTEN, G.; LEIBOLD, W.; RADBRUCH, A. (2002)
Expression of a 4-(hydroxy-3-nitro-phenyl) acetyl (NP) specific equi-murine IgE antibody that mediates histamine release in vitro and a type I skin reaction in vivo.
Equine Vet J., 34(7), 657-665
- WAGNER, B.; RADBRUCH, A.; ROHWER, J.; LEIBOLD, W. (2003)
Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE.
Vet. Immunol. Immunopathol., 92 (1-2), 45-60
- WATHES, C. M.; JONES, C. D. R.; WEBSTER, A. J. F. (1983)
Ventilation, air hygiene and animal death.
Vet. Rec., 113, 554-559
- WATSON, E. D.; SWEENEY, C. R.; STEENSMA, K. A. (1992)
Arachidonate metabolites in bronchoalveolar lavage fluid from horses with and without COPD.
Equine Vet. J., 24, 379-381
- WATSON, J. L.; STOTT, J. L.; BLANCHARD, M. T.; LAVOIE, J.-P.; WILSON, W. D.; GERSHWIN, L. J.; WILSON, D. W. (1997)
Phenotypic Characterization of Lymphocyte Subpopulations in Horses Affected with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and in Normal Controls.
Vet. Pathol. 34, 108-116

- WEINBRENNER, D. (2004)
Nachweis von Antikörpern gegen Equines Herpesvirus 1 (EHV1) und Equines Herpesvirus 4 (EHV4) aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) bei Pferden.
Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät der Justus-Liebig Universität, Vet. med. Diss.,
- WELTE, T.; KÖHNLEIN, T.; GOLPON, H.
Pathogenese.
In: COPD – Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen und Komplikationen Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien (2002), 29-39
- WIDDERS, P. R.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. (1986)
Investigation of the antigenetic relationship between equine IgG and IgG(T).
Vet. Immunol. Immunopathol., 13, 255-259
- WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B.; NEBEN, T. Y.; KARP, C. L.; DONALDSON, D. D. (1998)
Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma.
Science, 282, 2258-2261
- WINDER, N. C.; VON FELLEBERG, R. (1988)
Chronic small airway disease in the horse: immunohistochemical evaluation of lungs with mild, moderate and severe lesions.
Vet. Rec., 122 (8), 181-183
- WINDER, N. C.; HERMANN, M.; GRÜNIG, G.; HULLIGER, C.; VON FELLEBERG, R. (1990)
Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with clinically diagnosed chronic pulmonary disease.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 132: 505-510
- WINDER, N. C.; GRÜNIG, G.; HERMANN, H.; VON FELLEBERG, R. (1991)
Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with histologically diagnosed chronic pulmonary disease.
Schweiz. Arch. Tierheilkd., 133, 123-130
- 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 (3), 208-213
- WRIGHT, J. R. (2004)
Host defense functions of pulmonary surfactant.
Biol Neonate., 85(4), 326-332
- YAMASHITA, Y.; OKANO, M.; YOSHINO, T.; HATTORI, H.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.; TAKISHITA, T.; AKAGI, T.; NISHIZAKI, K. (2002)
Carbohydrates expressed on *Aspergillus fumigatus* induce *in vivo* allergic Th2-type response.
Clin. Exp. Allergy, 32, 776-782

- YANG, T. J.; AYOUB, I. A.; REWINSKI, M. J. (1997)
Lactation stage-dependent changes of lymphocyte subpopulations in mammary secretions: inversion of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios at parturition
Am. J. Reprod. Immunol., 37 (5), 378-383
- YOUNES, H. M.; AMSDEN, B. G. (2002)
Interferon-gamma therapy: evaluation of routes of administration and delivery systems.
J. Pharm. Sci., 91 (1), 2-17
- 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
- ZEITLER-FEICHT, M. H.; BEISSERT, S.; GROTH, W. (1988)
Zur bakteriellen Kontamination von Absetzstaub aus Pferdeställen.
Tierärztl. Umsch., 43, 728-733
- ZINK, M. C.; JOHNSON, J. A. (1984)
Cellular constituents of clinically normal foal bronchoalveolar lavage fluid during postnatal maturation.
AJVR, 45 (5), 893-897
- ZINKL, J. G.
Lower Respiratory Tract.
In: Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse 2nd ed.
Ed.: Schrefer, J. A.; Mosby, St. Louis/USA (2002), 73-86
- ZUCKERMANN, F. A. (1999)
Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells.
Vet. Immunol. Immunopathol., 72, (1-2), 55-66

9 Anhang

9.1 Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Brefeldin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	B-6542
BSA (bovines Serumalbumin) Fraktion V	Carl Roth GmbH&Co.	8076
FITC-konjugierte Ziege-anti- Maus-Antikörper (Anti-IgG2a(gamma))	Caltag TM Laboratories	M32201
FITC-konjugierte Ziege anti- Maus-Antikörper (Anti-IgG1(gamma))	Caltag TM Laboratories	M32001
FITC-konjugierte Ziege anti- Maus-Antikörper (Anti-IgG(H+L))	Dianova GmbH	115-095-062
FITC-konjugierte Ziege anti- Ratte-Antikörper (Anti-IgG(H+L))	Dianova GmbH	112-095-062
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest	S1810
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	I-0634

Isotypenkontrolle IgG1-Antikörper (Maus) (1E8) gerichtet gegen Phospholipase C von <i>Clostridium perfringens</i> Hybridomüberstand	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen Eigenproduktion	
Isotypenkontrolle IgG2a-Antikörper (Maus) (1F9) gerichtet gegen Phospholipase C von <i>Clostridium perfringens</i> Hybridomüberstand	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen Eigenproduktion	
Gentamycin (-sulfat)	Biochrom AG	A 271-25
Maus-anti-bovines Interferon- γ - Antikörper (mAK, Klon CC302)	Serotec	MCA 1783
Maus-anti-bovines Interleukin-4- Antikörper (mAK, Klon CC303)	Serotec	MCA 1820
Maus-anti-canine B-Zellen-Antikörper RPE-konjugiert (mAK, Klon CA2.1D6)	Serotec	MCA 1781PE
Maus-anti-equines CD4-Antikörper (mAK, Klon CVS 4)	Serotec	MCA 1078
Maus-anti-equines CD5-Antikörper (mAK, Klon CVS 5)	Serotec	MCA 1079

Maus-anti-equines CD8-Antikörper (mAK, Klon CVS 21)	Serotec	MCA 1080 (zurzeit nicht erhältlich)
Maus-anti-equines CD13-Antikörper (mAK, Klon CVS 19)	Serotec	MCA 1084
Maus-anti-humanes CD9-Antikörper (mAK, Klon MM2/57)	Serotec	MCA 469
Merkaptoethanol	Fluka	63689
Penizillin-Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories GmbH	P11-010
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Orpegen Pharma	10-0200 (Phagoburst®; Test- kit für Oxidative Burst)
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P-4170
Ratte-anti-equines CD2-Antikörper (mAK, Klon Mac 288)	Serotec	MCA 1278
R-Phycoerythrin-konjugierte Ziege-anti- Maus-Antikörper (Anti-IgG2b(gamma))	Caltag™ Laboratories	M32404
RPMI 1640-Medium mit stabilisiertem Glutamin	PAN Biotech GmbH	P04-18500

9.2 Puffer, Medien und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS (pH 7,4)

PBS-Stammlösung	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)

NaCl	100,00 g
KCl	2,50 g
KH ₂ PO ₄	2,50 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18,00 g
A. bidest.	ad 1000 g

Puffer, Medien und Lösungen für die Zellkulturtechniken

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1000 ml

Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin (PAN Biotech)	900 ml
FCS	100 ml
Merkaptoethanol (1mM)	3,0 ml
Pen /Strep-Lösung (10.000 IE/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml-Lösung)	10 ml
Gentamycin (2,5 µg/ml)	125 µl

9.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Durchflusszytometrische Analyse equiner peripherer Blutleukozyten (PBL)	55
Abb. 2	Durchflusszytometrische Analyse equiner BALC	56
Abb. 3	Durchflusszytometrisch identifizierte BALL in RL im Rahmen der Erstuntersuchung (Einzelmarkierung)	59
Abb. 4	Korrelation zwischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	61
Abb. 5	Korrelation zwischen CD2 ⁺ und CD4 ⁺ bzw. CD2 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	61
Abb. 6	Immunphänotypisierung der Lymphozyten in einer typischen equinen BALF	62
Abb. 7	Durchflusszytometrisch identifizierte BALL aus RL im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9 Antigens und Zweifachmarkierungen	63
Abb. 8	Korrelation zwischen CD2 ⁺ /9 ⁺ Lymphozyten und CD4 ⁺ /9 ⁺ bzw. CD8 ⁺ /9 ⁺ Lymphozyten	66
Abb. 9	Korrelation zwischen CD2 ⁺ und CD4 ⁺ bzw. CD2 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten in RM	69
Abb. 10	Korrelation zwischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten in RM	70
Abb. 11	Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RG im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9 Antigens und Zweifachmarkierungen	71
Abb. 12	Korrelation zwischen CD13 ⁺ und CD9 ⁺ BALC in RG	73
Abb. 13	Korrelation zwischen CD13 ⁺ und CD9 ⁺ /13 ⁺ bzw. CD9 ⁺ und CD9 ⁺ /13 ⁺ BALC in RG	73
Abb. 14	Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RM im Rahmen der Erstuntersuchung; Einzelmarkierung des CD9 bzw. CD13 Antigens und Zweifachmarkierungen	74
Abb. 15	Darstellungen der IFN- γ ⁺ bzw. IL-4 ⁺ Lymphozytenanteile in einer typischen equinen BALF	76
Abb. 16	Korrelation zwischen dem durchflusszytometrisch analysierten Messereignissen in RL und dem Prozentsatz IFN- γ ⁺ BALL (stimuliert, achtzehnstündige Inkubation)	78
Abb. 17	Vergleich der prozentualen Anteile von Subpopulationen in RG vor und nach Therapie (Zweifachmarkierungen)	88
Abb. 18	Produktion von IL-4 durch die unstimulierten BALL equiner Patienten vor und nach Therapie; medikamentelle Behandlung und Laserakupunktur	90
Abb. 19	Produktion von IL-4 durch die stimulierten BALL equiner Patienten vor und nach Therapie; medikamentelle Behandlung und Laserakupunktur	90
Abb. 20	Produktion von IFN- γ durch die stimulierten BALL equiner Patienten vor und nach Therapie; medikamentelle Behandlung und Laserakupunktur	91

9.4 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Angaben unterschiedlicher Autoren zum Differentialzellbild der BALF bei der COB des Pferdes	26
Tab. 2	Anteile der Lymphozytensubpopulationen in der BALF lungengesunder adulter Kontrolltiere und COB-kranker Pferde	31
Tab. 3	Kliniksore zur Punkteverteilung bezüglich Vorbericht und klinischer Untersuchung	37
Tab. 4	Endoskopiescore zur Punkteverteilung bei der Tracheobronchoskopie	38
Tab. 5	Gebrauchslösungen für primäre Antikörper	44
Tab. 6	Gebrauchslösungen für sekundäre Antikörper	45
Tab. 7	Charakterisierung der Probanden anhand ausgewählter klinischer, blutgasanalytischer und endoskopischer Parameter (Erstuntersuchung)	51
Tab. 8	Zusammensetzung der BALC (Ergebnisse der lichtmikroskopischen Differenzierung und absolute Zellzahl)	52
Tab. 9	Durchflusszytometrisch analysierte Zellpopulationen in der BALF im Rahmen der Erstuntersuchung	57
Tab. 10	Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten (r) zwischen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmten Zellpopulationen	58
Tab. 11	Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RL	64
Tab. 12	Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten (r) zwischen einzeln und zweifach markierten Lymphozytensubpopulationen aus der BALF	65
Tab. 13	Durchflusszytometrisch identifizierte Lymphozytensubpopulationen in RG	68
Tab. 14	Durchflusszytometrisch identifizierte Lymphozytensubpopulationen in RM	68
Tab. 15	Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RG	71
Tab. 16	Durchflusszytometrisch identifizierte Subpopulationen in RM	74
Tab. 17	Durchschnittliche IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätze	77
Tab. 18	Quotienten zwischen IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätzen	79
Tab. 19	Zusammenfassung der signifikanten Korrelationskoeffizienten (r) zwischen Quotienten der Anteile IFN- γ^+ und IL-4 $^+$ BALL und verschiedenen Lymphozytensubpopulationen	80
Tab. 20	Prätherapeutische Werte ausgewählter klinischer, blutgasanalytischer und endoskopischer Parameter der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart	83
Tab. 21	Prätherapeutische Zusammensetzung der BALC der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart (Ergebnisse der lichtmikroskopischen Differenzierung und absolute Zellzahl)	84
Tab. 22	Prätherapeutische Zusammensetzung der BALC der Gesamtgruppe und prä-/posttherapeutische Ergebnisse getrennt nach der Behandlungsart (Ergebnisse der durchflusszytometrischen Differenzierung)	85

Tab. 23	Prä-/posttherapeutischer Vergleich der Anteile der Lymphozytensubpopulationen aus RG und RM unter Berücksichtigung der Therapieart	86
Tab. 24	Signifikante prä-/posttherapeutische Differenzen der Anteile der Lymphozytensubpopulationen aus den drei Messregionen unter Berücksichtigung der Therapieart	87
Tab. 25	Durchschnittliche IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätze in RL getrennt nach Behandlungsart vor und nach Therapie	89
Tab. 26	Quotienten zwischen IFN- γ^+ bzw. IL-4 $^+$ Lymphozytenprozentsätzen vor und nach Therapie	91

Danksagung

Bei meiner Erstbetreuerin, Frau PD Dr. Kerstin Fey, möchte ich mich für die Überlassung des Themas, ihren Ideenreichtum und die freundliche, aufmunternde und konstruktive Unterstützung während des praktischen und schriftlichen Teils dieser Arbeit bedanken. Zudem danke ich ihr für die vielen Dinge, die ich im Lauf der Jahre auf dem Gebiet der Pferdeinternistik von ihr lernen konnte.

Weiterhin gilt mein ausdrücklicher und herzlicher Dank meinem Betreuer im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Herrn PD Dr. Christian Menge, der mir bei Fragen und Problemen stets sein offenes Ohr lieh, und ohne dessen tatkräftigen Rat und seine Kritik diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Außerdem danke ich Frau Dr. Ivonne Stamm für die geduldigen Erklärungen, ihre Hilfe beim Umgang mit den Zellen und bei der praktischen Umsetzung der Durchflusszytometrie sowie Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Bereitstellung der diversen Verbrauchsmaterialien und Gerätschaften.

Meinen Dank aussprechen möchte ich auch Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Kerstin Meerkamp aus der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre unermüdliche Unterstützung und Beratung bei allen statistischen Fragestellungen.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin der Pferdeklinik bedanken, die durch ihre Professionalität und Geduld bei der praktischen Versuchsdurchführung an den Patienten diese Arbeit erst durchführbar gemacht haben. Insbesondere seien an dieser Stelle das Team der Tierpfleger, alle Famulanten, Frau Dr. Nicole Lamberti, Frau Dr. Astrid Reitz, Herr Marc Schütte und Frau Karen Kötter genannt. Frau Dr. Katja Roscher danke ich für ihre tatkräftige Beratung bei Problemen mit dem Computer.

Weiterhin gilt mein Dank Jens, der mich auch in schwierigen Phasen zum Durchhalten ermutigt hat, und der mit seiner Hilfsbereitschaft und seinem beeindruckenden Wissen jedes Problem auf dem Gebiet der Datenverarbeitung lösen konnte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die aufbauenden Worte und die ausdauernde finanzielle Hilfe bedanken. Ohne Euch, die Ihr mich immer in allen meinen Zielen unterstützt habt, wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Manuela Franz
Krofdorfer Str. 62
35398 Gießen

Gießen, den 19.08.06

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.

Manuela Franz

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5110-6



9 783835 951105

