

Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Gesundheit und den Immunstatus von Pferden

Kerstin Mertens, geb. Eiblmaier

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Gerhards

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Aus dem Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. M. H. Erhard

Angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. M. H. Erhard

Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Gesundheit und den Immunstatus von Pferden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Kerstin Mertens, geb. Eiblmaier

aus

Truchtlaching

München 2006

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Phytotherapie	2
2.2 Echinacea	2
2.2.1 Geschichte und Verwendung von Echinacea	3
2.2.2 Arten und Beschreibung	5
2.2.3 Inhaltstoffe und deren Wirkung	6
2.2.4 Allgemeine Wirkungsweisen von Echinacea	8
2.2.5 Wirkungen auf Komponenten des Abwehrsystems	10
2.2.6 Toxizität von Echinacea	13
2.3 Kortisol als Stressparameter bei Pferden	15
2.4 Respiratory Burst der Granulozyten	16
2.5 Antioxidative Kapazität im Plasma	18
2.6 Immunglobulin G als Immunmarker bei Pferden	19
2.7 Zielsetzung	20
3. Tierbestand, Material und Methoden	21
3.1 Tierbestand und Haltungsformen	21

	Seite
3.2 Versuchsaufbau	21
3.2.1 Gruppeneinteilung	21
3.2.2 Zeitlicher Ablauf des Versuchs	22
3.2.3 Allgemeine Untersuchung	23
3.2.4 Blutentnahme	23
3.2.5 Bestimmung der Blutparameter	24
3.2.6 Bestimmung des Kortisols im Plasma	24
3.2.7 Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität	26
3.2.8 Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma	28
3.2.9 Bestimmung von Immunglobulin G mittels ELISA	29
3.2.10 Bestimmung der Tollwuttiter	30
3.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	31
3.4 Versuchsanzeige	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Einfluss einer Echinaceafütterung auf den Gesundheitsstatus von Pferden	32
4.1.1 Atmung	32
4.1.2 Temperatur	33
4.1.3 Pulsfrequenz	34
4.1.4 Auskultation der Darmmotorik	35
4.1.5 Blutparameter	36
4.2 Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Plasmakortisol-Konzentration von Pferden	41
4.3 Einfluss einer Echinaceafütterung auf Parameter der unspezifischen Immunabwehr von Pferden	42
4.3.1 Respiratory Burst	42
4.3.2 Antioxidative Kapazität im Plasma	44

	Seite
4.4 Einfluss einer Echinaceafütterung auf Parameter der spezifischen Immunabwehr von Pferden	45
4.4.1 Immunglobulin G im Serum	45
4.4.2 Tollwuttiter	46
5. Diskussion	48
5.1 Beurteilung des Allgemeinzustand und der Blutparameter	48
5.2 Beurteilung der Plasmakortisol-Konzentration	52
5.3 Beurteilung des Immunstatus von Pferden	53
5.3.1 Beurteilung des Immunstatus anhand von Respiratory Burst und antioxidativer Kapazität im Plasma	53
5.3.2 Beurteilung des Immunstatus anhand von Serum Immunglobulin G und der Reaktion auf eine Tollwutimpfung	56
5.4 Schlussbetrachtung	59
6. Zusammenfassung	61
7. Summary	63
8. Literaturverzeichnis	65
9. Anhang	72

Danksagung

Lebenslauf

Verzeichnis der Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt
BSA	Bovines Serumalbumin
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FMLP	N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
FSC	Vorwärtsstreulicht
GRA%	Granulozyten in Prozent
GRA#	Granulozyten als absoluter Wert
HGB	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
IgG	Immunglobulin G
IU/L	Internationale Einheit (Unit) pro Liter
LiHeparin	Lithium-Heparin
LIA	Luminescence immunoassay
LM	Lebendmasse
LYM%	Lymphozyten in Prozent
LYM#	Lymphozyten als absoluter Wert
M	Molarität
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen
MnO ₂	Mangan Dioxid
MON%	Monozyten in Prozent
MON#	Monozyten als absoluter Wert
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen
n	Anzahl der Tiere
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O.I.E.	Office Internationale des Epizooties
p	Wahrscheinlichkeitswert

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	Propidium Jodid
PLT	Blutplättchen (Thrombozyten)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RBC	Rote Blutkörperchen (Erythrozyten)
RDW	Verteilungsindex der roten Blutkörperchen
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SEM	Standard Error of Mean
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAA	Total Antioxidant Activity
TEAC	Trolox equivalent antioxidative activity
TMB	Tetramethylbenzidin
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TS	Trockensubstanz
WBC	Weißer Blutkörperchen (Leukozyten)

1. Einleitung

Heilpflanzen oder pflanzliche Drogen werden in den verschiedensten Zubereitungen bereits seit Jahrhunderten eingesetzt. Eine häufig verwendete Gattung stellt Echinacea dar. Im Bereich der Humanmedizin werden von den neun bekannten Arten vor allem Echinacea (E.) purpurea, E. angustifolia und E. pallida in mittlerweile über 300 phytotherapeutischen oder homöopathischen Zubereitungen verordnet. Die möglichen Anwendungsgebiete bei Mensch und Tier sind vielfältig, die immunmodulatorischen Eigenschaften von Echinacea stehen dabei jedoch im Vordergrund. Trotz des vielfachen Einsatzes von Heilpflanzen, insbesondere von Echinacea, sind die Wirkungsweisen immer noch umstritten und oft nicht wissenschaftlich belegt bzw. beruhen auf empirischen Erkenntnissen.

Bei Pferden ist eine Steigerung der Immunabwehr besonders effektiv bei der Bekämpfung von respiratorischen Erkrankungen (MAYR et al., 1994). Mittlerweile wird dem Einsatz von immunmodulatorischen Zubereitungen, z.B. Paramunitätsinducern, generell ein Vorteil gegenüber einem zum Teil unkontrollierten Einsatz von Chemotherapeutika und Antibiotika eingeräumt, da hier häufig mit dem Problem der Resistenzbildung von Keimen zu rechnen ist. Zudem können bakterizide oder entzündungshemmende Wirkstoffe unter Umständen immunsuppressiv wirken. Aus diesen Gründen werden Antibiotika nicht nur bei lebensmittelliefernden Tieren in den letzten Jahren von Halter, Verbraucher und Gesetzgeber immer kritischer betrachtet. Pferde sind häufig, aufgrund eines entsprechenden Vermerks im Equidenpass zur Schlachtung vorgesehen, woraus sich ebenfalls Einschränkungen hinsichtlich des Medikamenteneinsatzes ergeben können. Eine der möglichen Alternativen zum Antibiotika- oder Chemotherapeutikaeinsatz könnten Phytotherapeutika darstellen.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die Fütterung von E. purpurea (Roter Sonnenhut) Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitszustand und ausgewählte Parameter der Immunabwehr des Pferdes nehmen kann. Hierzu wurden das Allgemeinbefinden und Blutwerte sowie die Kortisolkonzentration im Plasma und Immunglobulin G im Serum bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung des Respiratory Burst der Granulozyten und die Bestimmung des antioxidativen Potentials im Plasma. Eine Tollwutschutzimpfung wurde eingesetzt, um mögliche Einflüsse auf die Ausprägung des Impftiters festzustellen.

2. Literaturübersicht

2.1 Phytotherapie

Der Einsatz von Pflanzen ist in der Medizin weltweit verbreitet. Welche ihrer Komponenten aber arzneilich wirksam sind konnte erst teilweise erforscht werden (COWAN, 1999). Trotzdem können die bisher bekannten Inhaltsstoffe der Pflanzen in die Kategorien Phenole, Terpene und essentielle Öle, Lektine und Polypeptide, Alkaloide und Polyethylene eingeteilt werden (COWAN, 1999). Die Wirkmechanismen sollten nach DORSCH (1996) vor dem Einsatz einer Pflanze in der Therapie geklärt sein. Besonders wichtig ist dies, da bei einigen Pflanzen auch schädliche Wirkungen auf Organsysteme bekannt sind (MILLER, 1998). Deshalb fordert COWAN (1999) ein standardisiertes System zur Extraktion der Pflanzenwirkstoffe. Diese Standardisierung stellt aber gleichzeitig das größte Problem in der Phytotherapie dar. So stellten SUR et al. (1991) fest, dass die Gehalte der Monoterpene in Pflanzenproben selbst bei gleichem Extraktionsverfahren sehr starken Schwankungen unterworfen sind. Eine chemische Standardisierung ist ohnehin erst dann möglich, wenn die in Frage kommenden Wirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen bekannt sind (WAGNER, 1990).

Der Heilpflanzenmarkt hat sehr große Zuwachsraten. Allein in den USA wuchs der Verkauf im Jahr 1997 um 57 %, und dieser Trend ist nicht nur auf Amerika beschränkt (MILLER, 1998). In der Humanmedizin werden Heilpflanzenpräparate vor allem zur Therapie von Erkältungskrankheiten eingesetzt (BRAUNIG et al., 1992). In der Tiermedizin dagegen ist der Einsatz von Phytotherapeutika bisher vergleichsweise gering (STREY, 1996).

2.2. Echinacea

Derzeit hält der deutsche Markt etwa 300 Präparate bereit, die Echinacea-Zubereitungen enthalten (Bauer 1994). Echinacea-Präparate zählen nach BAUER (1997) in der Humanmedizin zu den bedeutendsten pflanzlichen Immunstimulantien.

2.2.1 Geschichte und Verwendung von Echinacea

Die erste Darstellung einer Echinacea-Pflanze aus dem Jahr 1699 findet sich im dritten Band der „Plantarum Historia Universalis Oxoniensis“ von R. Morrison, dem ersten Professor für Botanik in Oxford. Morrison bezeichnet die Pflanze als „*Dracunculus Virginianus latifolius petalis florum longissimis purpurascens*“. Diese Abbildung stammt aus der Zeit vor Linné, welcher im Jahr 1753 in seinen „Species Plantarum“ die gleiche Pflanze als „*Rudbeckia purpurea*“ beschreibt. Erneut umbenannt wurde sie 1794 durch Moench, der ihr den bis heute gebräuchlichen Namen „*E. purpurea*“ gab (BAUER, 1994).

Die ursprüngliche Bezeichnung durch Morrison belegt auch die Herkunft der beschriebenen Echinacea-Art: Virginia, USA. Vor allem in den Great Plains des Mittleren Westens und in den Mittelgebirgen Nordamerikas ist die Gattung verbreitet (BAUER, 1994). Mündliche Überlieferungen durch Medizinmänner und archäologische Funde belegen den Einsatz von Echinacea in der Heilkunde der Indianer Nordamerikas. Insbesondere für die Stämme der Cheyenne, Dakota, Fox, Kiowa, Crow, Omaha, Pawnee, Ponca, Teton, Winnebago, Choctaw, Delaware und Komanchen ist die Verwendung überliefert. Neben *Echinacea pallida* und *E. purpurea* wurde am häufigsten *E. angustifolia* als Heilpflanze eingesetzt, wobei die Indianer selbst nicht zwischen den einzelnen Arten unterschieden. Sie verwendeten vermutlich die im jeweiligen Gebiet vorkommende Art. Echinacea-Pflanzen zählen zu den wichtigsten Heilpflanzen der Indianer und fanden gegen mehr Krankheiten Einsatz als jede andere Pflanze. Zu den zahlreichen Anwendungsgebieten zählt die äußerliche Anwendung bei Wunden, Verbrennungen, Lymphdrüenschwellung und Insektenstichen. Innerlich wurde Echinacea bei Zahn-, Hals-, und Kopfschmerzen, sowie Magenkrämpfen, Husten, Erkältung, Masern und Gonorrhoe eingesetzt. Auch die Verwendung als Antidot bei Schlangenbissen und anderen Vergiftungen ist überliefert. Neben diesen vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten beim Menschen wird auch über den Einsatz in der Tierheilkunde, gegen Druse des Pferdes, berichtet. Die Indianer verwendeten zumeist Echinacea-Wurzeln, die oft gekaut wurden. Auch Saft oder Brei aus Frischpflanzen kam zum Einsatz. Abkochungen wurden seltener verwendet und alkoholische Tinkturen waren den Indianern lange unbekannt (BAUER und WAGNER, 1990).

Die weißen Siedler Nordamerikas übernahmen die Anwendung von Echinacea bereits früh. Der arzneiliche Einsatz wurde 1762 erstmals erwähnt: Frederick Gronovius beschreibt in

seiner „Flora Virginica“ die Wurzel von „Obeliscotheca barbulis pallide rubentibus“ (Nr. 417, später von Linné als „Rudbeckia purpurea“ bezeichnet) und ihre Wirksamkeit bei Satteldruck der Pferde. Neben einem weiteren Bericht aus dem 18. Jahrhundert, der von einem Armeearzt stammt, wird Echinacea im 19. Jahrhundert von verschiedenen Ärzten und Forschern beschrieben. Die Beschreibungen der Wurzeln lassen allerdings den Schluß zu, dass es bereits in dieser Zeit häufiger zu Verwechslungen der einzelnen Arten, insbesondere zwischen *E. angustifolia* und *E. pallida* kam. Einsatz fand Echinacea vor allem in der Laienmedizin. Als Anwendungsgebiete werden wiederholt Schlangenbisse und Syphilis oder generell der Einsatz als Allheilmittel genannt.

Die breite medizinische Bedeutung gewann *E. angustifolia* durch H.C.F. Meyer. Der angeblich promovierte deutsche Mediziner brachte um 1870 das weltweit erste Echinacea-Präparat, „Meyer`s Blutreiniger“ genannt, auf den Markt. Sein Wundermittel sollte u.a. bei Rheumatismus, Neuralgien, Kopfschmerzen, Rotlauf, Dyspepsie, Geschwülsten, Geschwüren, Wunden, Schwindel, Klapperschlangenbissen, Cholera, Pocken, Masern und sogar Tollwut helfen. Erst 16 Jahre später wurde die darin verarbeitete Pflanze von C.G. Lloyd als *E. angustifolia* identifiziert. Verschiedene Mediziner begannen im Anschluß die Tinkturen und Wurzeln erfolgreich zu testen. Aufgrund der steigenden Nachfrage wurden auch andere *E. angustifolia*-Tinkturen produziert und die Publikationen über Heilerfolge nahmen zu. Trotzdem wurde Anfang des 20. Jahrhunderts die Anerkennung und Wirksamkeit von Echinacea, aufgrund eines Mangels an wissenschaftlichen Beweisen, von schulmedizinischer Seite in Frage gestellt. Der Absatz der Echinacea-Zubereitungen stieg jedoch weiter.

Aus verschiedenen Abhandlungen dieser Zeit geht hervor, dass die beiden Arten *E. angustifolia* und *E. pallida* nicht genügend unterschieden wurden. Verschiedene Autoren weisen zwar in ihren Untersuchungen auf die Verwechslungsproblematik hin, geben aber zum Teil selbst offensichtlich falsche Bezeichnungen an. Ob in der Therapie und in früheren wissenschaftlichen Untersuchungen *E. angustifolia* oder *E. pallida* eingesetzt wurde, kann deshalb nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Ein möglicher immunologischer Wirkmechanismus wurde bereits 1915 beschrieben. In Laborversuchen wurde gezeigt, dass Echinacea die Phagozytoseleistung von Lymphozyten verbessert und Einfluss auf das Differentialblutbild hat. In einer Studie mit Meerschweinchen 1920 konnte bei verschiedenen Infektionsmodellen keine Wirkung nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit von Echinacea blieb daher weiterhin umstritten. Das Interesse an Echinacea in Amerika ließ ab den 30er Jahren schließlich deutlich nach (BAUER und WAGNER, 1990).

In Europa wurden die Wurzeln von *E. purpurea* erstmals gegen Ende des 19. Jahrhunderts als Arzneidroge erwähnt. Vor allem die Homöopathie interessierte sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts für *Echinacea*. Darüber hinaus wurde hauptsächlich *E. angustifolia* in der Gynäkologie, bei septischen Prozessen, bei Verbrennungen und bei Akne eingesetzt. Aufgrund der starken Nachfrage entstand gegen Ende der 30er Jahre sogar ein Engpass in der Frischpflanzenbeschaffung. Die Verbreitung von *E. purpurea* in Europa ist auf eine Sendung mit Samen an Dr. Gerhard Madaus zurückzuführen, welche fälschlicherweise als *E. angustifolia* deklariert war. Die Frischpflanzenzubereitung aus *E. purpurea* erwies sich als ebenso wirksam und wurde deshalb erfolgreich in Europa eingeführt (BAUER und WAGNER, 1990; MADAUS AG, 1997).

2.2.2 Arten und Beschreibung

Die Gattung *Echinacea* wird der Familie der Compositae (Asteraceae) zugeordnet und gehört zur Unterfamilie Heliantheae. Diese enthält insgesamt 260 Gattungen und mehr als 3000 Arten und stellt somit die größte Unterfamilie innerhalb der Compositae dar. Eine umfassende Revision erfuhr die taxonomische Einordnung und Charakterisierung der Gattung *Echinacea* 1968 durch MCGREGOR. Er teilte aufgrund seiner vergleichenden, morphologisch-anatomischen Studie die Gattung in neun Arten und zwei Varietäten ein. Als Arzneipflanzen gewannen aber nur die drei Arten *E. purpurea* (L.) MOENCH, *E. angustifolia* D.C. und *E. pallida* (NUTT.) NUTT. größere Bedeutung.

Echinacea purpurea (L.) MOENCH ist hiervon die am längsten bekannte Art. Gleichzeitig stellt sie die häufigste und am weitesten verbreitete Art in Nordamerika dar. Sie hat eine Wuchshöhe von 60-180 cm und verfügt über einen aufrechten, kräftigen und verzweigten Stengel. Die Blätter sind groß, eiförmig und gesägt. Typisch für die Art sind dabei der verzweigte Habitus, die grannigen Spreublätter sowie die tiefpurpurnen, kurzen Zungenblüten und die noch dunkleren Röhrenblüten der igelförmigen Blütenköpfchen.

Echinacea angustifolia D.C. ist eine kleinwüchsige Art mit gelben Pollen (Wuchshöhe 10-50 cm). Weitere typische Merkmale sind die rauhe Behaarung und die relativ kurzen Zungenblüten, welche weiß, rosa oder purpurn gefärbt sein können. Außerdem verfügt sie über lanzettähnliche Blätter. Ihr Chromosomensatz ist diploid. In verschiedenen Gegenden

Nordamerikas sind durch Hybridisierung mit *E. arrorubens* abweichende Formen (zum Teil mit tetraploidem Chromosomensatz) aufgetreten. Hinsichtlich des Aussehens stehen sie zwischen *E. angustifolia* und *E. pallida* – wahrscheinlich ein weiterer Grund für die frühere häufige Verwechslung dieser beiden Arten.

Echinacea pallida (NUTT.) NUTT. ist zwar auch schmalblättrig wie *E. angustifolia*, wächst aber deutlich höher (40-90 cm). Die Zungenblüten sind lang, hängend und purpurn, rosa oder weiß gefärbt. Auch die weiße Farbe der Pollenkörner ist ein artspezifisches Merkmal. Sie verfügt über einen tetraploiden Chromosomensatz (allotetraploide Art). Nach McGregor ist sie durch Hybridisierung und anschließende Polyploidisierung entstanden. Als Ausgangsarten nimmt er dabei *E. sanguinea* und *E. simulata* an (BAUER und WAGNER, 1990, BAUER, 1994).

2.2.3 Inhaltstoffe und deren Wirkung

Entscheidend bei der Verwendung von *Echinacea*-Präparaten ist, welche Pflanzenanteile (von welcher *Echinacea*-Art) verarbeitet wurden: die Wurzeln, die oberirdischen Pflanzenteile oder die ganze Pflanze (BAUER, 1994). Die Gehalte an entsprechenden Inhaltstoffen können dadurch variieren, die chemische Zusammensetzung und entsprechend die biologische Aktivität kann ebenfalls unterschiedlich sein. Auch verschiedene Extraktionsverfahren können sich auf die Inhaltstoffe auswirken (BAUER, 1994). So sind beispielsweise Polysaccharide in wässrigen Auszügen vorhanden, kaum jedoch in alkoholischen (BAUER et al., 1988; BORCHERS et al., 2000). Dagegen stellten PERRY et al. (2000) wie auch WILLS und STUART (2000) fest, dass die Trocknung der Frischpflanzen keinen Einfluß auf den Gehalt an Alkamiden hat. STUART und WILLS (2003) untersuchten in weiteren Studien den Effekt der Trocknung von *E. purpurea* auf die Cichoriensäure. In den oberirdischen Pflanzenteilen konnte eine durch die Trocknung bedingte geringere Konzentration der Cichoriensäure festgestellt werden.

Bisher konnten ca. 75 bis 100 Inhaltsstoffe isoliert werden (BODINET et al., 1993). Therapeutische Erfolge sind, aufgrund dieser hohen Anzahl, vermutlich nicht auf einzelne Komponenten, sondern auf deren Kombination oder synergistische Wirkung zurückzuführen.

BAUER (1994) teilt die Inhaltstoffe zunächst in hydrophil und lipophil ein, da sie auch getrennt analysiert werden. In den Echinacea-Wurzeln finden sich, laut BAUER (1994), vor allem Kaffeesäurederivate, wobei es sich hauptsächlich um Echinacosid handelt. In den Wurzeln von *E. angustifolia* kommt zusätzlich das Chinasäurederivat Cynarin vor. Die Wurzel von *E. purpurea* enthält Cichoriensäure. Im Kraut treten neben Rutin auch Cichoriensäure, Echinacosid, Verbacosid, Chlorogensäure und Isochlorogensäuren auf. Die Zusammensetzung ist im Einzelnen jeweils artspezifisch. Auch die Polysaccharide gehören zu den polaren Inhaltstoffen, eignen sich aber mangels Strukturdaten nicht zum Vergleich der drei Arten. Zu den lipophilen Verbindungen zählen die Ketoalkene und Ketoalkine in den Wurzeln. Alkamide finden sich in den Wurzeln und ebenfalls in den oberirdischen Pflanzenanteilen. *E. purpurea* weist den höchsten Alkamid-Gehalt, vor allem in den Blüten, auf. Der Gehalt an ätherischem Öl der Wurzeln ist insgesamt gering, insbesondere bei *E. purpurea* und *E. angustifolia* (weniger als 0,1 %). Trotzdem ist auch hier eine arttypische Zusammensetzung vorzufinden (BAUER, 1994).

Aus diesen Inhaltstoffen rekrutiert BAUER (1994) vier Stoffklassen als Wirksubstanzen: Kaffeesäurederivate, Alkamide, Polysaccharide und Glykoproteine (Glykoprotein-Polysaccharid-Komplexe). Dabei schreibt er unter den Kaffeesäurederivaten vor allem der Cichoriensäure eine starke immunmodulierende Wirkung in Form einer Phagozytosestimulation zu. Die Phagozytose wurde im *in-vitro*-Granulozytentest und im *in-vivo*-Carbon-Clearance-Test deutlich stimuliert (WAGNER, 1990; ROTH, 1993; BAUER, 1994). In Handelspräparaten wird sie jedoch aufgrund ihrer Instabilität nur eine untergeordnete Bedeutung haben. Ebenfalls einen phagozytosestimulierenden Effekt (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) und antiinflammatorische Wirkung, durch Hemmung der Cyclooxygenase und der 5-Lipoxygenase, beschreibt BAUER (1994) für die Alkamide. Für ein komplexes Polysaccharid stellt er eine Hyaluronidase-Hemmwirkung bzw. eine „kortisonähnliche“ Wirkung fest. Für andere Polysaccharide konnte ebenfalls eine Phagozytosestimulation festgestellt werden. Nach BLASCHEK et al. (1998) sind besonders die Arabinogalaktan-artigen Polysaccharide hinsichtlich einer immunmodulierenden Wirkung interessant. Schon 1991 wiesen ROESLER et al. unter anderem für ein saures Arabinogalaktan phagozytosestimulierende Wirkung nach. Die immunmodulatorische Wirkung konnte an Makrophagenaktivierung (die zur Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin-1 und -6 und zur Phagozytenproliferation führte) vor allem in Milz und Knochenmark und an einer vermehrten Granulozytenauswanderung ins Blut gezeigt werden (LUETTIG et al., 1989 sowie BODINET et al., 1993). Im Gegensatz dazu konnten

ELSÄSSER-BEILE et al. (1996) keine vermehrte Produktion von Interleukinen und TNF- α bei mit Echinacea behandelten Tumorpatienten feststellen. Die letzte Wirkstoffgruppe die BAUER (1994) beschreibt, sind die Glykoproteine bzw. ein Glykoprotein-Polysaccharid-Komplex. Neben der bereits genannten Makrophagenaktivierung beschreibt der Autor eine B-Zell-stimulierende Aktivität.

2.2.4 Allgemeine Wirkungsweisen von Echinacea

Die bisher durchgeführten Studien zum Wirkungsnachweis von Echinacea sind sehr unterschiedlich aufgebaut. Es liegen Untersuchungen zu verschiedenen Indikationen, über die Wirkung einzelner Inhaltsstoffe (siehe 2.1.3), zu einzelnen Komponenten des körpereigenen Abwehrsystems unter Echinaceaeinfluss sowie Kombinationen daraus vor. Zudem wurden für die jeweiligen Studien meist unterschiedliche Echinacea-Arten, Pflanzenanteile, Extrakte oder Kombinationspräparate verwendet, so dass ein Vergleich zusätzlich erschwert wird.

Ganz allgemein untersuchten ROTH-MAIER et al., (2001) den Einfluß von Echinacea pupurea-Fütterung (pelletierte getrocknete oberirdische Pflanzenanteile) in der Ferkel- und Broiler-Aufzucht. Tendenzielle Verbesserungen in der Wachstumsleistung zeigten sich bei den Ferkeln, nicht jedoch bei den Broilern. Der allgemein gute Gesundheitszustand blieb durch den Futterzusatz unbeeinflusst. Zu den häufigsten heutigen Indikationen zählen allerdings Infekte der oberen Luftwege und andere infektiöse Erkrankungen. So berichtet ANETZHOFER (1993) vom erfolgreichen Einsatz des homöopathischen Kombinationspräparates Echinacea compositum ad us. vet. (enthält u.a. E. angustifolia D3) in seiner Gemischtpraxis bei verschiedenen Tierarten und Indikationen (beispielsweise Pneumonien, Mastitis und Analbeutelentzündungen). Er stellte durchweg eine Verminderung der Symptomintensität und Rezidivhäufigkeit sowie eine kurze Heilungsdauer fest. Zum Vergleich dienten dabei rein antibiotisch oder chemotherapeutisch behandelte Fälle. Auch MAY (1994) berichtet aus seiner Praxis vom erfolgreichen Einsatz des gleichen Präparates bei chronischen Bronchitiden des Pferdes. In einer neueren, offenen multizentrischen klinischen Studie untersuchten REICHLING et al. (2003) den klinischen Zustand von Hunden mit chronischen saisonbedingten Infektionen der oberen Atemwege (Pharyngitis, Tonsillitis, Bronchitis und Zwingerhusten). Die Studie wurde unter Praxisbedingungen von verschiedenen Tierärzten durchgeführt und erfasste den Zustand jeweils vor und nach 8-

wöchiger Behandlung. Zum Einsatz kam ein Präparat, welches Wurzelpulver von *E. purpurea* enthält. Bereits nach 4 Wochen konnte eine signifikante Verbesserung der entsprechenden typischen Symptome festgestellt werden. Allerdings gab es bei dieser Studie keine Kontrollgruppe. Auch im Humanbereich wurden zahlreiche Studien im Bereich von Erkältungskrankheiten durchgeführt. So beschreibt MADAUS AG (1997) zum Beispiel eine placebokontrollierte Doppelblindstudie, nach deren Ergebnis die Behandlung der Patienten mit dem Präparat Echinagard[®] (schwedischer Handelsname für Echinacin[®] von Madaus, Wirkstoff: Presssaft aus *E. purpurea*) die Dauer eines Infektes der oberen Atemwege verkürzt. Ganz gegenteilige Ergebnisse lieferten TAYLOR et al. (2003) und BARRETT et al. (2002). TAYLOR et al. (2003) konnten in ihren Untersuchungen keinen Einfluss von Echinacea auf den Verlauf einer Erkältung im Vergleich zur Placebobehandlung feststellen. Es wurden bei dieser Studie Placebo-Kapseln und Kapseln mit getrocknetem Echinacea-Extrakt eingesetzt (entweder Wurzel und Kraut von *E. purpurea* oder Wurzel von *E. angustifolia*). Auch BARRETT et al. (2002) konnten in ihrer randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie keinen Einfluß einer Echinacea-Behandlung auf Infektionen der oberen Atemwege bei Kindern zwischen zwei und elf Jahren feststellen. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich Krankheitsdauer und -schwere nachgewiesen. Eine Entzündungshemmende Wirkung der Polysaccharide aus *E. angustifolia*-Wurzeln stellten TUBARO et al. (1987) fest. Die Verabreichung von EPF (Echinacea polysaccharidic fraction) konnte die Ausbildung eines Pfoten- und Ohrödems nach spezifischen Reizen positiv beeinflussen und teilweise fast völlig verhindern. In einer ähnlichen Studie wiesen auch RASO et al. (2002) eine entzündungshemmende Wirkung für Wurzelpulver aus *E. purpurea* nach. Eine völlig andere Indikation untersuchten SKAUDICKAS et al. (2003). Sie konnten an männlichen Wistar-Ratten eine signifikante Verbesserung bei benigner Prostatahyperplasie, nach 30- und 60-tägiger oraler Verabreichung eines *E. purpurea*-Extraktes, zeigen. Als Parameter dienten hierfür das Prostatagewicht, die Lymphozytenzahlen und histologische Veränderungen.

2.2.5 Wirkungen auf Komponenten des Abwehrsystems

Die meisten heute verfügbaren Studien beziehen sich in ihren Untersuchungen über Echinacea auf die unspezifische Immunabwehr. Sehr häufig Gegenstand der Forschung, und gleichzeitig die wohl bekannteste Wirkung von Echinacea, ist die Steigerung der Phagozytoseaktivität. WAGNER (1986) stellte eine erhöhte Phagozytoseaktivität *in vivo* nach Verabreichung von Echinacea an Mäusen fest. Außerdem isolierte die Arbeitsgruppe um WAGNER (1985) verschiedene Polysaccharide aus Echinacea-Pflanzen. Davon stimulierte ein neutrales Heteroxylylan die Phagozytose. ERHARD et al. (1994) konnten eine Phagozytosestimulation an humanen Granulozyten, durch *E. angustifolia* feststellen. Die Autoren verwendeten hierfür einen standardisierten alkoholischen Auszug von *E. angustifolia*, einzeln sowie in Kombination mit anderen homöopathischen Zubereitungen. Auch WAGNER und JURCIC (1991) sahen eine Phagozytosesteigerung im *in vitro* Granulozytentest und im *in vivo* Carbon-clearance-Test bei der Maus. Zum Einsatz kamen hier ebenfalls Extrakte von *E. angustifolia*, sowie Kombinationen von Echinacea mit anderen Pflanzenextrakten. Ähnlich wie ERHARD et al. (1994), stellten auch WAGNER und JURCIC (1991) fest, dass besonders die Kombinationen von Echinacea mit anderen Pflanzenextrakten in der Wirkung überzeugen können. O'NEILL et al. (2002) stellten eine Verbesserung der Phagozytosefähigkeit bei neutrophilen Granulozyten des Pferdes fest. Ein *E. angustifolia*-Extrakt wurde zuvor über 42 Tage gefüttert. Eine Steigerung der Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen konnten BUKOVSKY et al. (1993) an Mäusen zeigen. Sie verabreichten ethanolisch-wässrige Extrakte von *E. purpurea*- und *E. angustifolia*-Kraut über fünf Tage. Außerdem stellten die Autoren eine erhöhte bakterizide Aktivität der Peritonealmakrophagen fest. Eine Stimulation der Phagozytose von alveolaren Makrophagen fanden GOEL et al. (2002) bei gesunden Ratten. Sie verwendeten aus *E. purpurea* isolierte Alkamide, die zweimal täglich über 4 Tage oral verabreicht wurden. Ebenso konnten die Autoren eine signifikant höhere Produktion von TNF- α in alveolaren Makrophagen dieser Gruppe zeigen (ähnlich auch WAGNER 1985). Diese Ergebnisse gelten jedoch nicht für die Immunzellen der Milz. Hier konnte auch mit isolierten Polysacchariden und Cichoriensäure keine erhöhte Produktion von TNF- α , Interferon- γ oder Interleukin-2 gezeigt werden (GOEL et al. 2002). Eine erhöhte Sekretion von Zytokinen aus Mäuse-Makrophagen durch Echinacea-Pulver (Kraut und Wurzel) konnten RININGER et al. (2000) nachweisen. Auch die Lebensfähigkeit und Proliferation von humanen peripheren mononukleären Blutzellen konnte verbessert werden. Im Gegensatz dazu fanden die Autoren bei chemisch standardisiertem Echinacea-Extrakt und frischem Presssaft

keine immunstimulativen Effekte. Diese Zubereitungen wiesen dafür entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften auf (RININGER et al., 2000).

Eine Steigerung der Sauerstoffradikalbildung in Makrophagen von Mäusen nach Verabreichung von *E. purpurea*-Polysacchariden konnten ROESLER et al. (1991) zeigen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch STIMPEL et al. (1984).

Auch Einflüsse von *Echinacea* auf das Blutbild konnten gezeigt werden. So stellten O'NEILL et al. (2002), nach oraler Verabreichung eines *E. angustifolia*-Extraktes über 42 Tage, eine Vergrößerung und Vermehrung der roten Blutzellen fest. Auch die Hämoglobinkonzentration im Vollblut und der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt konnten gesteigert werden. Im weißen Blutbild wurde eine Erhöhung der Lymphozytenzahl gezeigt. GERHARDS (1995) hingegen konnte bei seinen Untersuchungen zum Einfluß auf die Lymphozytenaktivität bei Pferden keinerlei Auswirkung von verschiedenen *Echinacea*-Dilutionen sowie *Echinacea compositum*[®] feststellen. Er folgerte, dass eine direkte Stimulation der Lymphozyten kein Wirkprinzip, zumindest nicht von homöopathischen *Echinacea*-Präparaten, darstellt. Eine Stimulation der Lymphozytenproliferation durch *Echinacea purpurea*-Extrakte beschreiben BANY et al. (2003) bei verschiedenen Mäusestämmen. CUNDELL et al. (2003) konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls Einflüsse von *Echinacea* (oberflächliche Pflanzenanteile) auf das weiße Blutbild von Ratten feststellen. Die Tiere zeigten erhöhte Leukozytenzahlen und ein verändertes Differentialblutbild. Dabei stiegen die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) an, im Gegenzug verringerte sich der Anteil der Granulozyten.

Auch die antivirale Komponente von *Echinacea*-Präparaten ist häufiger Gegenstand der Forschung. ENGBERS und WOESTMANN (1986) stellten eine protektive Wirkung gegen Virusinfektionen an Zellkulturen fest. Dabei vermuteten sie eine Besetzung der Virus-Bindungsstellen der Zelle durch Inhaltsstoffe von *E. angustifolia* und dadurch eine Hemmung der Adsorption von Viren. Bereits zu einem früheren Zeitpunkt stellten WACKER und HILBIG (1978) in ihren Untersuchungen fest, dass *Echinacea* nicht viruzid wirkt, die Viren aber am Eindringen hindert. Eine Verminderung der Virusproliferation und Verlängerung der Lebensspanne bei mit MuLV (murine leukemia virus) infizierten Mäusen konnten HAYJASHI et al. (2001) finden. Den Mäusen wurden oral oberflächliche Pflanzenanteile von *E. purpurea* zugeführt. Ganz ähnliche Ergebnisse erzielten BODINET et al. (2002) bei Influenza A infizierten Mäusen. Sie verabreichten eine Kombination von *Echinacea*-Extrakten und anderen pflanzlichen Extrakten oral bereits 6 Tage vor der (intranasalen) Infektion mit dem Virus. Auch hier konnte die Lebensspanne signifikant verlängert und der Virustiter herabgesetzt werden. Pathologische Veränderungen der Lunge wurden reduziert. SUN et al.

(1999) führen die virusprotektive Wirkung eines Echinaceawurzel-Extraktes auf die signifikante Erhöhung der Monozytenzahlen und natürlichen Killer- (NK) Zellen zurück. Alle anderen hämatopoetischen Zellpopulationen und Immunzellen in Milz und Knochenmark blieben jedoch von der Behandlung unbeeinflusst. Die Untersuchungen wurden an gesunden Tieren durchgeführt, was auf die prophylaktische Wirkung von Echinacea hinweist (SUN et al., 1999). CURRIER und MILLER (2000) zeigten den Einfluss von *E. purpurea* (14 Tage lang gefüttert) auf NK-Zellen von alternden Mäusen. Die Anzahl, ihre anti-Tumor-Wirkung sowie die zytolytische Aktivität konnten gesteigert werden. Eine antivirale Aktivität (gegen Herpes simplex) *in vitro* sprachen BINNS et al. (2002) insgesamt 8 Echinacea-Arten zu. Andere Autoren, wie SCHUMACHER und FRIEDBERG (1991), konnten unter verschiedenen Versuchsbedingungen keine Effekte auf die unspezifische zelluläre Immunsituation der Maus feststellen.

Zur Beeinflussung der humoralen Immunantwort durch Echinacea-Zubereitungen gibt es erst wenige Studien. REHMAN et al. (1999) untersuchten den Einfluss von *E. angustifolia*, oral an Ratten verabreicht, auf die spezifische Immunabwehr. Die Autoren applizierten den Ratten ein spezifisches Antigen um anschließend die IgG- und IgM-Gehalte des Blutes gegen das Antigen mittels ELISA zu messen. Sie konnten zeigen, dass die IgG-Konzentration gegen das Antigen im Serum der Ratten, die *E. angustifolia*-Wurzelextrakt über das Trinkwasser verabreicht bekommen haben, früher anstieg als bei unbehandelten Ratten. FREIER et al. (2003) konnten eine verbesserte IgM-Antwort bei Mäusen gegen Blutzellen des Schafes feststellen. Sie verabreichten oral einen *E. purpurea*-Extrakt über 4 Tage, jeweils eine Stunde nach Injektion der Blutzellen. Die Untersuchung mit Blutzellen des Schafes, ebenfalls bei Mäusen, verlief bei ROESLER et al. (1991) allerdings negativ. Sie konnten keine verbesserte Antikörperproduktion zeigen, hatten allerdings gereinigte Polysaccharide von *E. purpurea* eingesetzt. Auch HERMANN et al. (2003) stellten eine unbeeinflusste Antikörperantwort von Ferkeln gegen PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) fest. In verschiedenen Gruppen wurde die tägliche Futtermittelration über 42 Tage mit 2 % bzw. 4 % *E. purpurea*-Pulver supplementiert. Untersuchungen zum IgG-Verlauf von Absatzferkeln (LANG, 2004) zeigten in der Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Echinacea- und den Kontrollgruppen. Die Ferkel erhielten ab dem Absatzzeitpunkt getrocknete oberirdische Pflanzenanteile von *E. purpurea* in 1%iger oder 5%iger Konzentration dem Ferkelstarter beigemischt. Auch die im Speichel gemessenen IgA-Konzentrationen der Echinacea- und Kontrollgruppen waren bei 5 %iger Echinaceafütterung

unbeeinflusst. Bei der 1 %igen Echinacea-Pelletfütterung jedoch wies die Echinaceagruppe am 77. Lebenstag geringere IgA-Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe. Die Autorin stellte hier einen negativen Langzeiteinfluss von *E. purpurea* fest. HEMPEL (2002) untersuchte den Immunglobulin-G-Status bei neugeborenen Kaninchen und ihren Müttern. Es handelte sich um einen Fütterungsversuch mit einer Echinacea-Grünmehl-Mischung. Durch Echinacea konnte der IgG-Status nur in geringem Umfang und nur zu bestimmten Zeitpunkten beeinflusst werden. Die Serum-IgG-Konzentrationen der Jungtiere in der Kontrollgruppe lagen am 14. Lebenstag bei 1,6 mg/ml während sie in der Gruppe, die Echinacea erhielt, mit 0,9 mg/ml signifikant geringer ausfielen. Am 28. Lebenstag wiesen die Kaninchen der Echinaceagruppe eine mit 1,1 mg/ml signifikant höhere Serum-IgG-Konzentration auf, als die Tiere der Kontrollgruppe mit 0,8 mg/ml. HEMPEL (2002) vermutet hier einen Einfluss von Echinacea auf die IgG-Konzentration. Die Erkrankung an dem Symptomenkomplex der Enterokolitis konnte durch Echinacea jedoch nicht verhindert werden (HEMPEL, 2002). Einen negativen Effekt auf die spezifische Antikörperproduktion bei weiblichen Ratten stellten SOUTH und EXON (2001) fest. Ein Echinacea-Extrakt wurde über sechs Wochen, in Konzentrationen von 225 mg/kg und 50 mg/kg, verabreicht. Nach zwei Wochen wurde bei den weiblichen Ratten (225 mg/kg) eine signifikant schlechtere Antikörperbildung gemessen, die Antikörpergehalte der männlichen Ratten blieben von der Behandlung ungestört. Die Autoren folgerten, dass Echinacea-Zubereitungen unter bestimmten Bedingungen auch immunsuppressiv wirken können.

Zusammenfassend stellt BARRETT (2003) fest, dass es zahlreiche, qualitativ gute Studien betreffend *E. purpurea* gibt. Die wissenschaftlichen Daten seien aber noch nicht ausreichend, um die Effektivität bei der Behandlung von Krankheiten oder bei der Verbesserung der Gesundheit über einen gewissen Zweifel hinaus zu belegen.

2.2.6 Toxizität von Echinacea

Echinacea-Zubereitungen sind zwar schon seit vielen Jahrzehnten im Einsatz, es liegen aber bisher nur wenige Untersuchungen zu Toxizität und Nebenwirkungen vor. Als mögliche Nebenwirkungen nennt BAUER (1994) Schüttelfrost, Fieberreaktionen, Übelkeit und Erbrechen sowie allergische Reaktionen vom Soforttyp. Ob diese Reaktionen unter Umständen auch auf Verunreinigungen der Ausgangsextrakte mit Endotoxinen zurückzuführen sind ist nicht endgültig geklärt. Als weiteres Risiko führt BAUER (1994) eine mögliche

Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen durch allgemeine Immunstimulation an. Allerdings liegen für Echinacea hierzu keine konkreten Untersuchungen vor, ebenso wenig für nicht immunologische Unverträglichkeitsreaktionen. Als Gegenanzeigen für die innere Anwendung von Echinacea werden trotzdem progressive Systemerkrankungen wie Tuberkulose, Leukosen, Kollagenosen und multiple Sklerose angesehen. Während der Schwangerschaft und bei Allergieneigung sollte keine parenterale Behandlung mit Echinacea-Präparaten erfolgen (BAUER, 1994). KEMP und FRANCO (2002) befürchten auch Nebenwirkungen durch Langzeiteinnahme von Echinacea. Sie berichten von einer Leukopenie bei einer Patientin nach 8-wöchiger Einnahme von Echinacea (3x tägl. 450 mg Echinacea-Extrakt). Die Leukozytenzahlen stiegen nach Absetzen des Präparates wieder an. MENGS et al. (1991) konnten in ihren Studien keine Anhaltspunkte für toxische Effekte bei Ratten und Mäusen feststellen. Bei Ratten konnten die Autoren, nach 4-wöchiger oraler Verabreichung einer die menschliche Dosierung um ein Vielfaches übersteigenden Dosis, keine Beweise für toxische Auswirkungen des Presssaftes finden. In der Sektion der Tiere wurden keine pathologischen Veränderungen festgestellt und somit auch keine Zielorgane definiert. Tests zur Mutagenität führten MENGS et al. (1991) auch an Mikroorganismen und Säugetierzellen *in vitro*, sowie bei Mäusen, durch. Auch hier erhielten sie durchweg negative Ergebnisse. Ebenso wurden in ihrer *in vitro* Studie zur Kanzerogenität von *E. purpurea* an Hamsterembryo-Zellen, keine malignen Transformationen gefunden (MENGS et al., 1991). Die LD50-Werte für Presssaft aus *E. purpurea* werden wie folgt angegeben: Ratten p.o. > 15000 mg/kg KG und i.v. > 5000 mg/kg KG; Mäuse p.o. > 30000 mg/kg KG und i.v. 10000 mg/kg KG (BAUER, 1994; MADDAUS AG, 1997).

Toxische Effekte wurden bisher nur bei einzeln verabreichten Echinacea-Inhaltsstoffen gesehen. So kommt es nach exzessiver Gabe hoher Dosen von isolierten Kaffeesäurederivaten an Ratten und Mäusen zu chronischen Gewebeirritationen. Allerdings ist die Konzentration der Kaffeesäurederivate in *E. purpurea* so gering, dass, zumindest für den Menschen, keine Relevanz dieser Ergebnisse angenommen wird (MADDAUS AG, 1997). Genaue Angaben zu den untersuchten Dosen und Konzentrationen machen die Autoren jedoch nicht. Die Pyrrolizidinalkaloide Tussilagin und Isotussilagin stehen ebenfalls im Verdacht, toxische Wirkungen zu haben (MADDAUS AG, 1997). BAUER (1994) stellt jedoch fest, dass die in *E. purpurea* und *E. angustifolia* enthaltenen Formen kein 1,2-ungesättigtes Necingerüst aufweisen und somit nicht von einer möglichen lebertoxischen Wirkung auszugehen ist.

2.3 Kortisol als Stressparameter bei Pferden

Normalerweise treten bei Säugetieren die Höchstkonzentrationen an Glukokortikoiden im Blut morgens (zwischen 3.00 und 8.00 Uhr) und die geringsten Konzentrationen abends (zwischen 18.00 und 24.00 Uhr) auf (SANDNER, 1987). Ruhewerte des Pferdes liegen bei durchschnittlich 100-200 nmol/l (KRZYWANEK, 1999). TOUTAIN et al. (1988) ermittelten bei ihren stündlichen Messungen an Pferden ein morgendliches Maximum von $162,29 \pm 26,33$ nmol/l (ca. 9 Uhr). Die minimale Hydrokortisonkonzentration im Plasma wurde 12 Stunden später (ca. 21 Uhr) mit $76,87 \pm 18,91$ nmol/l festgestellt. Innerhalb dieser allgemeinen zirkadianen Rhythmik ermittelten die Autoren etwa 10 Peaks (episodische Sekretion), während derer die Kortisolkonzentrationen zusätzlich um $72,34 \pm 10,74$ nmol/l schwankten. Da die Kortisolkonzentrationen im Blutplasma von Pferden diesen physiologischen Regulationsmechanismen unterliegen, muss dies natürlich bei der Interpretation von Konzentrationsveränderungen berücksichtigt werden (KRZYWANEK, 1999). Zusätzlich wird die Menge der Glukokortikoide im Blut von Pferden durch Stress und körperliche Belastung beeinflusst (KRZYWANEK, 1999). Diese Faktoren untersuchten an Pferden beispielsweise IRVINE und ALEXANDER (1994). Sie stellten fest, dass bereits geringe Störfaktoren, wie Verbringen der Tiere in ein anderes Umfeld, ausreichen um den zirkadianen Rhythmus der Kortisolkonzentration im Plasma zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu führte starke körperliche Belastung bei Rennpferden nicht zur Löschung der zirkadianen Rhythmik. Diese Tiere waren an ihre Umwelt gewöhnt und hatten Gelegenheit, sich einer täglichen Routine anzupassen (IRVINE und ALEXANDER, 1994). Eine ungewohnte kurzzeitige körperliche Anstrengung kann die Kortisolkonzentration jedoch beeinflussen. So wurden nach Wettkämpfen Anstiege auf 250-350 nmol/l beobachtet und nach Distanzritten konnten sogar Werte von 500-700 nmol/l gemessen werden (KRZYWANEK, 1999). In Untersuchungen zum Stressgeschehen konnte MASON (1974) nachweisen, dass sich zahlreiche Hormone (wie z. B. Kortisol, Katecholamine) in ihren Plasmakonzentrationen veränderten. Unter Einwirkung eines Stressors stiegen die Spiegel dieser Hormone, die eine katabole Wirkung auf den Organismus haben, während die Konzentrationen von anabolen Hormonen sanken. Nach Beendigung des Stresserfolgte wieder ein kompensatorischer Anstieg der anabolen Hormone. Demzufolge beeinflusst Kortisol den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel und unterstützt damit die Energiebereitstellung (KRZYWANEK, 1999).

RUSHEN (1986) konnte bereits an Ratten zeigen, dass die Kortisolkonzentration auch in physiologischen Situationen, wie etwa bei regulärer Fütterung, ansteigen kann. Diese Erkenntnisse und insbesondere die Untersuchungen von IRVINE und ALEXANDER (1994) machen die Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Kortisolstatus bei Pferden deutlich. Die Messungen sind immer von Tageszeit, zwischenzeitlicher episodischer Sekretion und der Adaption an die Umgebung beeinflusst.

2.4 Respiratory Burst der Granulozyten

Die Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten dient der Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion. Die Inkubation von neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten oder mononukleären Phagozyten mit unterschiedlichen Substanzen führt zur Entstehung mikrobiozider, oxidierender Stoffwechselprodukte (BABIOR, 1978). Da diese Reaktion mit einem starken Anstieg der Sauerstoffaufnahme durch Phagozyten einhergeht, wird sie als Respiratory Burst bezeichnet (BABIOR, 1988). Außerdem werden beim Respiratory Burst große Mengen an Superoxidanion und Peroxid gebildet. Das Wasserstoffperoxid entsteht durch Dismutation von Superoxidanion. Dieses kann nun in einer Myeloperoxidase-katalysierten Reaktion phagozytierte Mikroorganismen oxidativ inaktivieren (ROTHER et al., 1992). Ein starker Anstieg des Glukoseverbrauchs und die Bildung zweier Klassen mikrobiozider Oxidantien - oxidierte Halogene und oxidierende Radikale - sind weitere Merkmale des Respiratory Burst (FÖRSTER, 1991). Bei inflammatorischen Prozessen kommt es durch extrazelluläre Freisetzung solcher Oxidantien auch zur Schädigung körpereigenen Gewebes (ROTHER et al., 1992). Im Test wird intrazelluläres Wasserstoffperoxid durch Oxidation des nichtfluoreszenten Indikators Dihydrorhodamin 123 zu grünfluoreszentem Rhodamin 123 in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion nachgewiesen. Die Maximalstimulation neutrophiler Granulozyten durch Phorbol ester oder Bakterien-Phagozytose bewirkt eine 200- bis 1200-fache Erhöhung der Grünfluoreszenz. Auf eine Abwehrschwäche weist eine verminderte Burstreaktion bei Phagozytose, nicht aber bei Phorbol ester-Stimulation, hin. Wenn ein weniger potenter Stimulus, wie das Bakterienpeptid FMLP, eine gesteigerte Reaktion auslöst, so ist dies ein Zeichen für einen Voraktivierungszustand der Granulozyten. Ein solcher Voraktivierungszustand kann auch bei inflammatorischen Prozessen angetroffen werden (ROTHER et al., 1992). Die Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten wird auch durch

andere Faktoren, wie beispielsweise körperliche Anstrengung, beeinflusst. ROBSON et al. (2003) stellten nach einem Distanzrennen über 80 km eine Abnahme der Respiratory-Burst-Aktivität bei den teilnehmenden Pferden fest. Selbst drei Tage nach dem Rennen wurden die Ausgangswerte nicht wieder erreicht. Diese Erkenntnisse widersprechen allerdings den Ergebnissen von RAIDAL et al. (2000). Die Autoren konnten in ihren Untersuchungen nach körperlicher Anstrengung eine Zunahme des oxidativen Bursts von alveolären Makrophagen bei Pferden feststellen. Diese Ergebnisse zeigten sich unabhängig vom zugrunde liegenden Trainingszustand (RAIDAL et al. 2000). Einflüssen durch den weiblichen Zyklus ist der Respiratory Burst bei Pferden nicht unterworfen. So konnten DA COSTA et al. (2003) bei Stuten keine Veränderungen der Respiratory-Burst-Aktivität in unterschiedlichen Zyklusphasen nachweisen. Auch FÖRSTER (1991) führte durchflusszytometrische Untersuchungen u.a. an equinen polymorphkernigen Blutleukozyten durch. Für die Respiratory-Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten bei Pferden gibt der Autor absolute Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (Leerwerte) zwischen 2,1 und 4,2 (equine neutrophile Granulozyten) an. Ein Einfluss durch Pflanz Zubereitungen, insbesondere Echinacea, ist in der Literatur noch kaum beschrieben. Lediglich SCHUBERTH et al. (2002) untersuchten die Effekte von EquiMun[®] (ein Kombinationspräparat aus *E. purpurea*, *Thuja occidentalis* und elementarem Phosphor) auf bovine Leukozyten. Es handelte sich um eine *in vitro* Studie. Vor den durchflusszytometrischen Bestimmungen wurden die entsprechenden Zellen 44 h mit der jeweiligen Testsubstanz kultiviert. Die Autoren konnten zeigen, dass die spontane Respiratory-Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten unter Phosphor- oder EquiMun[®]-Einfluss zunahm. Einen abschwächenden Effekt auf die Respiratory-Burst-Aktivität durch EquiMun[®] stellten sie für die Phorbol-ester-stimulierte (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) Reaktion fest.

2.5 Antioxidative Kapazität im Plasma

Antioxidantien sind leicht oxidierbare Stoffe, die durch ihr niedriges Redoxpotential andere Stoffe vor Oxidation schützen können. Oxidative Schädigungen stehen im Verdacht, eine wichtige Rolle u.a. bei der Ausprägung von Alterungsprozessen, Entzündungsgeschehen, degenerativen Erkrankungen, verschiedenen Zivilisationserkrankungen und sogar Krebs zu spielen (CERVELLATI et al., 2002; IIZUKA et al., 2004). Als natürliche Antioxidantien gelten etwa die Tocopherole. Die Entstehung freier Radikale kann unter Umständen durch Antioxidantien verhindert werden. Deshalb wird ihnen eine gewisse präventive Wirkung hinsichtlich bestimmter Erkrankungen zugesprochen (IIZUKA et al. 2004). In den letzten Jahren hat sich daher ein beachtliches Interesse an natürlichen Produkten, die antioxidative Wirkungen aufweisen, entwickelt. Etliche bereits traditionell häufig eingesetzte Heilpflanzen wurden wegen ihrer antioxidativen Eigenschaften auch für die menschliche Ernährung empfohlen (CERVELLATI et al., 2002). Sie stehen auch im Interesse der Wissenschaft wegen ihrer protektiven Wirkung auf Blut, Zellen, Gefäßwände und Lipide (IIZUKA et al., 2004). Ihre Wirkung wird auf Inhaltsstoffe wie Vitamin C und E, aber auch auf polyphenolische Komponenten zurückgeführt. Diese Komponenten enthalten eine große Anzahl an phenolischen Hydroxylgruppen, die für die antioxidative Aktivität verantwortlich gemacht werden. Sie treten häufig in glykosidischer Form auf (CERVELLATI et al., 2002). In diese Stoffgruppe können auch die phenolischen Kaffeesäurederivate in Echinacea-Pflanzen eingereiht werden (RINNINGER et al., 2000). RINNINGER et al. (2000) konnten für verschiedene Echinacea-Extrakte und *E. purpurea* Pulver u.a. eine antioxidative Wirkung zeigen. Die verwendeten Extrakte waren hinsichtlich ihrer Gehalte an phenolischen Säuren, Alkamiden und Polysacchariden standardisiert. Die nachgewiesenen Effekte unterlagen starken Schwankungen. Insgesamt zeigten sich die standardisierten Produkte zwar in ihren entzündungshemmenden Eigenschaften, nicht aber in ihrer antioxidativen Wirkung, den Pflanzenpulvern überlegen (RINNINGER et al., 2000). Für das in Echinaceaspezies enthaltene Echinacosid sind ebenfalls bereits antioxidative Wirkungen nachgewiesen worden. CERVELLATI et al. (2002) konnten für Echinacosid eine antioxidative Wirkung ab einer Konzentration von 1,851 μM nachweisen. Echinacosid verhielt sich in ihren Untersuchungen sehr ähnlich wie die Substanz Cyanidin 3-o- β -glucopyranosid (enthalten beispielsweise in Kirschen und Erdbeeren), die von den Autoren als besonders effektiver Sauerstoffradikalfänger herausgestellt wurde. Einen neuroprotektiven Effekt konnten DENG M et al. (2004) für Echinacosid nachweisen. In ihrer Studie zeigten sie, dass nach Inkubation

mit Echinacosid eine TNF- α -induzierte Apoptose in humanen Neuroblastomzellen signifikant geringer ausfiel als ohne Zusatz dieses Wirkstoffes.

2.6 Immunglobulin G als Immunmarker bei Pferden

Immunglobulin G (IgG) ist der wichtigste Antikörper der sekundären Immunantwort und spielt bei der Neutralisierung von Toxinen und Viren eine vorherrschende Rolle (ROITT, 1991). Der IgG-Gehalt im Blut wird, nicht nur bei Jungtieren, als wichtiger Parameter für eine funktionierende spezifische Abwehr gesehen. Für das adulte Pferd werden dabei Gehalte von 25-45 mg/ml im Serum angegeben (BOSTEDT, 1999). Für Stuten in der Zeit um die Geburt liegen die Konzentrationen bei 33-35 mg/ml (WARKO und BOSTEDT, 1993). Etwas niedrigere Werte ermittelten ERHARD et al. (2001). Mittels ELISA wurden bei trächtigen Stuten kurz vor der Geburt IgG-Werte von durchschnittlich 19 mg/ml festgestellt. Ist die kolostrale Versorgung ausreichend gegeben, erreichen auch Fohlen bereits an Tag 42 postnatum Werte um 11,2 mg/ml im Serum (ERHARD et al., 2001). Die Ausbildung einer Immunität unterliegt nach HERRMANN (1984) auch genetischen Einflüssen. Er fand beim Schwein signifikante Rasseunterschiede hinsichtlich der Ig-Serumkonzentrationen und des Antikörperbildungsvermögens gegen Tetanustoxoide. Dies widerspricht allerdings den Untersuchungen von Erhard et al. (2001). Die Autoren konnten keinen Einfluss von Rasse, Alter der Stute, Trächtigkeitshäufigkeit, Gestationsdauer, Geburtszeitpunkt, Geschlecht des Fohlens oder verschiedener Ställe auf die Ausbildung des entsprechenden IgG-Gehaltes bei Fohlen nachweisen.

Untersuchungen zum Einfluss von Echinacea auf den IgG-Gehalt im Serum führten beispielsweise REHMAN et al. (1999) durch (siehe Kap. 2.2.5). Sie konnten durch E. angustifolia-Wurzelextrakt eine verbesserte IgG-Antwort auf ein spezifisches Antigen bei Ratten erzielen. Diese Ergebnisse widersprechen den Erkenntnissen von SATOSHI et al. (2004). Die Autoren untersuchten die strahlenprotektive Wirkung eines getrockneten E. purpurea-Presssaftes an Mäusen. Das Pulver wurde, mit einer Kochsalzlösung vermischt, jeden zweiten Tag über insgesamt drei Wochen intra peritoneal verabreicht (Dosis 360 mg/kg Presssaftpulver). Die Tiere wurden anschließend einer definierten Strahlenbelastung ausgesetzt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei den mit Echinacea behandelten Tieren eine Verringerung des Serum IgG-Gehaltes festgestellt. Die IgG-Produktion schien durch die Behandlung mit Echinacea unterdrückt worden zu sein (SATOSHI et al., 2004).

2.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation sollen nun folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Ist die 2,5 %ige Zufütterung von *E. purpurea* bei Pferden unbedenklich hinsichtlich des allgemeinen Gesundheitszustandes, des Blutbildes und der Verdauung?
- Kann ein Effekt von *Echinacea purpurea* auf das antioxidative Potential im Plasma gezeigt werden?
- Wirkt sich die Fütterung von *E. purpurea* auf die unspezifische Abwehr (Parameter: Respiratory Burst der Granulozyten) und/oder auf die humorale Immunantwort (Parameter: Immunglobulin G im Serum) aus?
- Verbessert eine *Echinacea purpurea*-Fütterung die Ausbildung einer Immunität nach einer Impfung?
- Hat die Fütterung von *E. purpurea* Auswirkungen auf das Stressgeschehen der Pferde?

3. Tierbestand, Material und Methoden

3.1 Tierbestand und Haltungsformen

Die Durchführung der Versuche erfolgte in privaten Pferdehaltungen im Umland vor München. Es handelte sich ausschließlich um Freizeitpferde, im Alter von 2 - 31 Jahren, die fast ausnahmslos regelmäßig geritten wurden. Die Rassen gliederten sich in 8 x Pony-Mix, 7 x Warmblut, 4 x Quarter Horse, 3 x Araber, 3 x Lusitano, 2 x Andalusier, 2 x Andalusier-Mix, 2 x Connemara Pony, 2 x Vollblut, 2 x Warmblut-Mix, 1 x Lusitano-Mix und 1 x Norweger. Das Einverständnis zur Teilnahme erteilte jeder Pferdebesitzer, nach Aufklärung über den Ablauf der Studie und evtl. auftretende Risiken, schriftlich durch eine vorgefertigte Einverständniserklärung (s. Anhang 1). Angaben über Alter, Rasse, Nutzung, Haltung, Entwurmungs- und Impfstatus wurden für jedes Pferd mit Hilfe eines entsprechenden Fragebogens erhoben. Ausgewählt wurden gesunde adulte Tiere, deren letzte Tollwut-Impfung mindestens 6 Monate zurück lag. Während des Studienablaufs durften bei den Probanden keine anderweitigen Impfungen, z.B. gegen Tetanus, Herpes oder Influenza durchgeführt werden. Das Gewicht wurde je nach Stockmaß und Ernährungszustand geschätzt. Die teilnehmenden Tiere lebten entweder in Boxenhaltung mit täglichem Weidegang oder im Offenstall. Alle Pferde wurden zusätzlich zum Weidegang täglich mit Heu, Stroh und einer handelsüblichen, an Leistung/Alter/Gewicht angepassten Kraftfutter- und Mineralstoffmischung versorgt. Wasser stand allen Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Gruppeneinteilung

Insgesamt nahmen 37 Pferde an 2 Versuchsdurchläufen teil. Die zur Verfügung stehenden Tiere waren sehr inhomogen verteilt. Deshalb wurden die teilnehmenden Pferde zunächst, abhängig von Alter und geschätztem Gewicht, in 2 Gruppen eingeteilt die mit A oder B bezeichnet wurden. Durch Randomisierung wurde die Behandlung (Echinaceafütterung oder Kontrolle) der jeweiligen Gruppe bestimmt. Einer Gruppe (Echinaceagruppe) wurde über 35 Tage Echinacea verfüttert, die andere Gruppe diente als Kontrollgruppe, welche über den gleichen Zeitraum ein Placebo in Form von Graspellets erhielt. Die Einteilung der Pferde in

Echinacea- oder Kontrollgruppe war nur dem Versuchsleiter, nicht aber den durchführenden Personen bekannt.

Die Echinacea- bzw. Placebo-Pellets wurden in Tagsportionen einzeln abgepackt an die Pferdebesitzer verteilt und zusammen mit der täglichen Futterration verabreicht. Die Dosierung betrug 2,5 % der durchschnittlich angenommenen täglichen Trockensubstanzaufnahme im Erhaltungsbedarf von 2 kg TS/100 kg LM. Abhängig vom geschätzten Gewicht ergab sich daraus die täglich verabreichte Pelletmenge zwischen 150 g und 300 g pro Pferd.

Als Echinacea-Art wurde *E. purpurea* ausgewählt. Von Echinacea wird für die Herstellung als Arzneimittel in der Regel die Wurzel verwendet. Diese kann jedoch nur alle drei Jahre geerntet werden und eignet sich zudem nicht als Futtermittel. Die oberirdischen Pflanzenteile von Echinacea müssen jedes Jahr eingebracht werden. Es sollte nun geklärt werden, ob diese sinnbringend in der Pferdefütterung eingesetzt werden können, zumal es bereits entsprechende Handelsformen auf dem Markt gibt. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesen Gründen nur die oberirdischen Pflanzenteile von *E. purpurea* in pelletierter Form verwendet.

3.2.2 Zeitlicher Ablauf des Versuchs

Alle Tiere verblieben in ihrer gewohnten Umgebung und wurden, um eine Irritation des Allgemeinzustandes und des Immunsystems durch Parasiten weitgehend herabzusetzen, vor Versuchsbeginn entwurmt (Präparat: Ivomec, Fa. Merial).

Drei Wochen später erfolgte die erste klinische Untersuchung (Allgemeinuntersuchung und Kontrolle der Darmperistaltik) und Blutentnahme. Die Blutprobengewinnung wurde an Tag 0, 10, 21, 28, 35 und 70, jeweils vormittags nach der morgendlichen Fütterung, durchgeführt. Vor jeder Blutentnahme fand eine Allgemeinuntersuchung und Kontrolle der Darmperistaltik statt. Mit der Pelletfütterung wurde am nächsten Tag (Tag 1) begonnen. An Tag 21 erhielten alle Pferde, nach Untersuchung und Blutentnahme, eine Tollwutvakzination. Der aufgebaute Impftiter wurde durch AK-Bestimmungen vor (Tag 21) und nach der Impfung (Tag 35) dokumentiert. Die Pelletfütterung endete zwei Wochen nach der Impfung (Tag 35). Knapp fünf Wochen nach der Impfung, an Tag 70, erfolgte eine Spätkontrolle und letzte Blutentnahme.

3.2.3 Die Allgemeine Untersuchung

Eine Kontrolle des allgemeinen Status erfolgte vor jeder Blutentnahme. Im Einzelnen wurden dabei Haltung, Verhalten, Ernährungszustand, Pflegezustand, Habitus, Schleimhäute, kapilläre Füllungszeit sowie Atmung, Temperatur und Puls untersucht. Es wurden, sofern die anderen Untersuchungspunkte als physiologisch oder ohne besonderen Befund zu beurteilen waren, nur die Parameter Atmung, Temperatur und Puls dokumentiert und zur statistischen Auswertung herangezogen. Zusätzlich erfolgte eine Auskultation der Darmperistaltik. Die auskultierten abdominalen Abschnitte wurden dazu in vier Quadranten, mit links oben (LO), links unten (LU), rechts oben (RO) und rechts unten (RU) bezeichnet, eingeteilt. Eine Beurteilung der Peristaltik erfolgte nach jeweils 3-minütiger Untersuchung der einzelnen Abschnitte im Rahmen eines vorher festgelegten Bewertungsschlüssels. Demnach wurde fehlende Peristaltik mit „0“ bezeichnet, verminderte mit „1“, physiologische Darmgeräusche mit „2“ und verstärkte Darmmotorik mit „3“. Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden dokumentiert und ausgewertet.

3.2.4 Die Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis externa. Das Pferd wurde jeweils von einem Helfer an Halfter oder Kappzaum gehalten. Die Punktion wurde am möglichst ruhig stehenden Pferd, nach vorheriger Desinfektion der Einstichstelle mit einer alkoholischen Lösung (Softasept[®] N, Fa. Braun), im oberen Drittel der Drosselrinne vorgenommen.

Für die Serumgewinnung wurden 9 ml S-Monovetten[®] (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland), für die Plasmagewinnung 9 ml Li-Heparin-Monovetten[®] (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Zur Gewinnung von Vollblut für die Bestimmung der Blutparameter wurden EDTA-beschichtete Gefäße benutzt. Die Proben wurden sofort gekühlt und auf direktem Weg ins Labor transportiert. Dort erfolgte umgehend die Bestimmung der Blutparameter. Die zur Serum- und Plasmagewinnung vorgesehenen Proben wurden für zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -20 °C (Serum) und -80 °C (Plasma) bis zur Messung eingefroren.

3.2.5 Bestimmung der Blutparameter

Die Blutparameter wurden mit Hilfe des Hämatologiegerätes scil Vet abc[®] (VETERINARY ANIMAL BLOOD COUNTER, Fa. Scil) aus EDTA-Vollblut bestimmt. Das Gerät verfügt über ein vollautomatisches, durch einen Mikroprozessor gesteuertes Analysesystem zur Bestimmung des großen Blutbildes. Es wurden folgende 16 Parameter bestimmt und ausgewertet:

- WBC, LYM%, LYM#, MON%, MON#, GRA%, GRA#
- RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, (RDW)
- PLT, MPV

% = prozentualer Anteil

= absoluter Wert

3.2.6 Bestimmung des Kortisols im Plasma

Zur Bestimmung des Kortisols im Plasma wurde ein kommerzieller LIA der Firma IBL (Immuno-Biological Laboratories, Hamburg) benutzt. Er beruht auf einem kompetitiven Bindungsassay, d.h. eine unbekannte Menge des Kortisols aus der Probe und eine bekannte, mit einem Enzym gekennzeichnete, Menge an Kortisol konkurrieren um die Bindungsstellen der Antikörper, mit denen die Kavitäten beschichtet sind.

Reagenzien:

Der Testkit beinhaltet eine 96-Loch Mikrotiterplatte, beschichtet mit einem Ziege-anti-Kortisol-Antikörper. Der Nullstandard (Standard A) besteht aus einem Puffer (PBS-Tween) mit 0,1 % BSA (Bovines Serumalbumin). Der Standard B-G enthält Kortisol im Puffer und ebenfalls 0,1 % BSA (Bovines Serumalbumin). Diese Standards weisen unterschiedliche Konzentrationen des Kortisols auf:

Tab. 1: Kortisol-Konzentrationen der Standardlösungen des Testkits.

Standard	A	B	C	D	E	F	G
nmol/l	0	0,83	1,66	5,52	16,56	41,40	110,40

Weiterhin beinhaltet der Testkit zwei Qualitätskontrollen. Die eine befindet sich im niedrigen, die andere im hohen Bereich der Standardkurve:

Tab. 2: Kortisol-Konzentrationen der Qualitätskontrollen.

	Istwert	Akzeptanzbereich
Kontrolle 1	3,86 nmol/l	2,48-4,97 nmol/l
Kontrolle 2	25,67 nmol/l	19,87-29,53 nmol/l

In dem Testkit ist ein gelbes Enzymkonjugat vorhanden, bestehend aus reinem Kortisol gekoppelt mit einer Meerrettich-Peroxidase. Der Testkit enthält ein chemilumineszierendes Reagenz, das Luminol freisetzt. Ein weiteres Reagenz enthält stabilisierte Peroxidlösung. Zusammen ergeben sie die Substratlösung. Der mitgelieferte Waschpuffer mit PBS-Tween muss noch vor Durchführung des Tests in einem Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt werden.

Durchführung:

Für die Bestimmung des Kortisols aus dem Plasma mussten alle Reagenzien Raumtemperatur aufweisen. Vor der Messung war eine Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:10 (50 µl Plasma + 450 µl Standard A) notwendig.

Zuerst wurden je 20 µl der Standards, der Proben oder der Kontrollen in vorher festgelegte Kavitäten der Platte pipettiert. Anschließend folgten 100 µl des Enzymkonjugates in jede Kavität. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz geschüttelt. Danach musste die Platte bei Raumtemperatur (18-24°C) drei Stunden inkubiert werden. Im Anschluß an diese Inkubationszeit wurde, nach Abgießen des Inhalts der Kavitäten, die Platte 4 mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Die Restflüssigkeit wurde nach jedem Waschgang kräftig auf einer saugfähigen Unterlage ausgeklopft, bis keine Flüssigkeitsspuren mehr sichtbar waren. Jetzt konnten in jede Kavität 50 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung einpipettiert werden.

Danach wurde die Platte wieder kurz geschüttelt und während eines Zeitfensters von 10-40 Minuten mit einem MLP-1 Luminometer (Fa. Berthold-Detection-Systems) gemessen. Mittels des Computerprogramms MicroWin[®] 2000 (Fa. Mikrotek) konnten die Kortisol-Konzentrationen ausgewertet werden.

3.2.7 Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität

Die Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten dient der Bestimmung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion. Der Test wurde nach dem von ROTHE et al. (1992) beschriebenen Prinzip durchgeführt und weist intrazelluläres Wasserstoffperoxid durch Oxidation des nichtfluoreszenten Indikators Dihydrorhodamin (DHR) 123 zu grünfluoreszente Rhodamin 123 in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion nach. Alle hierfür eingesetzten Chemikalien sind in Anhang 2 aufgeführt.

Durchführung:

Zuerst mussten die Leukozyten isoliert werden. Dazu wurden je 3 ml heparinisiertes Vollblut auf 3 ml Ficoll – Paque[™] Plus überschichtet. Nachdem die Erythrozyten sedimentiert waren, konnte nach etwa 15 min der klare Plasmaüberstand abpipettiert und auf Eis überführt werden. Der Plasmaüberstand enthält etwa 2×10^7 unseparierte Leukozyten pro ml sowie Thrombozyten. Zwischenzeitlich wurden aus den vorportionierten Stammlösungen in Dimethylformamid (DMF) die Arbeitslösungen durch Verdünnung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer) hergestellt. Die DHR 123-Stammlösung wurde mit Rosewell Park Memorial Institute Zellkulturmedium (RPMI 1640) verdünnt. Nach Aufschütteln wurden die Arbeitslösungen auf Eis gelagert:

Tab. 3: Stamm- und Arbeitslösungen

	DHR 123	FMLP	PMA	PI
Stammlösung	1,1 mM in DMF + RPMI	1 mM in DMF + PBS	1 mM in DMF + PBS	3 mM in PBS
Arbeitslösung	100 µM	10 µM	10 µM	3 mM

Eine gesteigerte Stimulierbarkeit von Granulozyten lässt sich anhand einer Alles- oder Nichts-Reaktion einer größeren Subpopulation von Granulozyten auf suboptimale, physiologische Stimuli wie N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) nachweisen. Hierzu wurde jede Probe in einem Dreifach-Ansatz analysiert:

Tab. 4: Inkubationsschema

Zeit (min)	Leerwert (Grundreaktion)	FMLP	PMA (Maximalstimulation)
-10	1 ml RPMI	1 ml RPMI	1 ml RPMI
0	20 µl Probe	20 µl Probe	20 µl Probe
20	10 µl DHR	10 µl DHR	10 µl DHR
30		10 µl FMLP	10 µl PMA
45	Proben auf Eis + 10 µl PI		

Es wurden je 1 ml RPMI 1640 + GlutaMax™ vorgelegt und innerhalb von 10 min auf 37°C aufgeheizt. Es folgte die Zugabe von je 20 µl der Probe (Leukozytensuspension in autologem Plasma) und nach 20 min je 10 µl DHR 123. Nach jedem Arbeitsschritt wurden alle Ansätze kurz aufgeschüttelt. Nach 30 min wurden je 10 µl der Arbeitslösungen von Phorbol 12-myrate 13-acetate (PMA) oder FMLP zugesetzt (siehe Inkubationsschema). Nach 45 min Inkubation der Leukozyten wurden die Proben auf Eis überführt und 10 µl der Propidium-iodide (PI)-Lösung zur Gegenfärbung toter Zellen zugegeben. Die anschließende Analyse musste innerhalb von 90 min am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) erfolgen. Hierbei werden hydrodynamisch fokussierte Zellen mit hoher Geschwindigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. In unterschiedlichen Winkeln zum einfallenden Lichtstrahl wird dabei Streulicht gemessen, verstärkt und analysiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) korreliert hier hauptsächlich mit der Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC) hingegen lässt Rückschlüsse auf interne Strukturen der jeweiligen Zelle zu. Zweidimensional dargestellt, können in der resultierenden FSC/SSC-Punktewolke (Dotplot) die verschiedenen Zellpopulationen eingegrenzt und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Dargestellt und ausgewertet wurden die FSC/SSC-Punktewolke und die mittlere Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Computerprogramms WinMDI, Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). Das Programm ermittelt dabei die mittlere Fluoreszenzintensität als absolute Werte ohne Einheit.

3.2.8 Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma

Zur Messung der antioxidativen Kapazität im Plasma wird eine Kationenhaltige Stammlösung mit einer bekannten Extinktion eingesetzt. Die Extinktion wird in Anwesenheit von Antioxidantien erniedrigt, d.h. die Lösung entfärbt sich bzw. wird heller. Der Test wurde nach dem von MILLER et al. (1996) beschriebenen Prinzip durchgeführt. Alle verwendeten Chemikalien sind in Anhang 3 aufgeführt.

Durchführung:

Zunächst musste die 5 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS)-Stammlösung und der PBS-Puffer hergestellt werden. Das entspricht 0,1372 g ABTS auf 50 ml PBS-Puffer. Diese hellgrüne Lösung wurde mittels eines Whatman No.5 Filterpapiers über Mangan Dioxid (MnO₂) gegossen. Dabei entsteht das ABTS⁺-Kation. Die Lösung war nun dunkelgrün gefärbt. Überschüssiges MnO₂ konnte durch Filtration mit einem 0,2 µm Whatman PVDF syringe Filter entfernt werden. Danach wurde die Lösung mit PBS-Puffer bis zu einer Extinktion von 0,700 +/- 0,002 bei einer Wellenlänge von 734 nm verdünnt. Als Null-Abgleich diente PBS-Puffer.

Für den Standard wurde Vitamin C 2,5 mM in PBS-Puffer verwendet. Daraus konnten dann jeweils die Standards für die Kalibrierkurve bereitet werden: 2,5 mM; 2,0 mM; 1,5 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0 mM. Die Verdünnungen erfolgten jeweils mit PBS-Puffer.

Vor der Messung der Proben musste der Nullwert am Photometer (Milton Roy, Spectronic 601) bei einer Wellenlänge von 734 nm mit PBS-Puffer abgeglichen werden. Dann wurden jeweils 10 µl Plasma in einer PMMA-1/2-Mikroküvette mit 990 µl ABTS⁺-Lösung vermischt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 734 nm nach exakt 1 Minute abgelesen. Es wurden Doppelproben gemessen.

Berechnung:

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurde die Total Antioxidant Activity (TAA) herangezogen. Sie berechnet sich aus den Extinktionsmittelwerten wie folgt:

$$(\text{Ext. Nullwert} - \text{Ext. Standard}) / \text{Ext. Nullwert}$$

Auf der X-Achse wurden die Vitamin C-Konzentrationen, auf der Y-Achse die zugehörigen TAA-Werte aufgetragen. Die Formel der sich daraus ergebenden Kalibrierkurve wurde mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft Excel[®] 2000 (Fa. Microsoft Corporation) berechnet (z.B. $y = 0,3709 x - 0,0006$). Nach vorheriger Bestimmung der TAA konnte dann mit Hilfe dieser Funktionsgleichung für alle Proben die so genannte Trolox equivalent antioxidative activity (TEAC) ermittelt werden (anstelle von Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) wurde im vorliegenden Versuch mit Vitamin C als Standard gearbeitet):

$$\text{z.B. } x (\text{TEAC}_{\text{Probe}} \text{ mmol/l}) = (y(\text{TAA}_{\text{Probe}}) + 0,0006)/0,3709$$

Diese Werte wurden dann zur statistischen Auswertung herangezogen.

3.2.9 Bestimmung von Immunglobulin G mittels ELISA

Der ELISA zur Bestimmung von Immunglobulin G (IgG) im Serum von Pferden wurde nach dem bei ERHARD et al. (2001) beschriebenen Prinzip eines Sandwich-ELISA durchgeführt. Die zur Durchführung des IgG-ELISA erforderlichen Puffer und Lösungen sind im Anhang 4 aufgeführt.

Durchführung:

Als erster Schritt erfolgte die Beschichtung. An eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Maxisorb, Nunc[®], Wiesbaden) wurde Kaninchen-anti-Pferde-IgG (Fa. Sigma, Deisenhofen) fixiert. Die Konzentration betrug 0,5 µg pro ml Beschichtungspuffer. Von dieser Lösung wurden 100 µl in jede Kavität der Platte pipettiert, dann über Nacht bei +4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-Tween in einem mechanischem Waschgerät (Tecan Deutschland GmbH, Modell: Columbus, Salzburg) wurde diese auf Zellstoff zur Entfernung von Flüssigkeitsresten mehrfach ausgeklopft. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen blockiert. Dazu wurden 200 µl einer Gelatine-Lösung in jede Kavität pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C erfolgte wieder ein Waschvorgang. Die Serumproben wurden mit PBS-Tween im Verhältnis 1:50 000 verdünnt jeweils in die oberste Kavität der Spalten 2-5 und 7-12 aufgetragen. Daraufhin wurde in jeder Spalte eine zweierlogarithmische Verdünnungsreihe angelegt, so dass schließlich jede Vertiefung mit 50 µl beschickt war. Spalte 1 diente als Leerwert und wurde mit 50 µl PBS-Tween pro Kavität

befüllt. Als Standard wurde in Spalte 6 equines IgG (Fa. Sigma, Deisenhofen) in einer Anfangskonzentration von 1,0 µg/ml aufgetragen und ebenfalls in zweierlogarithmischen Schritten verdünnt. Es folgte wieder eine Stunde Inkubation bei 37 °C mit anschließendem Waschvorgang. Dann wurde das Konjugat hinzugefügt. In jede Kavität wurden 100 µl eines an Peroxidase gekoppelten Kaninchen-anti-Pferde-IgG (Fa. Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 1:5000 (in PBS-Tween) pipettiert. Die Platten wurden erneut für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurden in jede Kavität der Platte 100 µl der Substratlösung pipettiert und anschließend für 10 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl einer einmolaren Schwefelsäure wurde die Farbreaktion gestoppt. Die Intensität der Gelbfärbung war proportional zum IgG-Gehalt der Probe und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines ELISA-Readers (EAR 400 AT, Tecan-Labinstrumente, Overath) bestimmt werden. Um die Auswertbarkeit der Probe sicherzustellen erfolgte zusätzlich jeweils eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Mit Hilfe eines Computerprogramms (Easyfit, Tecan-Labinstrumente, Overath) wurden anhand der Standardkurve die IgG-Konzentrationen der Proben errechnet.

3.2.10 Bestimmung der Tollwuttiter

Die Tollwutimpfung erfolgte an Tag 21 der Studie. Es wurden jeweils ein Ausgangstiter (Tag 21) sowie ein Titer zwei Wochen nach der Impfung (Tag 35) ermittelt. Für die Schutzimpfung wurde der handelsübliche Impfstoff Rabisín[®] (Ch.-B. L22803, Fa. Merial) eingesetzt.

Die Antikörpertiter wurden mittels fluoreszierendem Antikörper Virus Neutralisationstest bestimmt. Dabei lag das obere Detektionslimit gemäß dem O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines bei 10,55 IU/ml Serum. Die Durchführung der Titerbestimmung wurde extern, am Referenzlabor von Herrn Prof. Diel, Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, vorgenommen.

3.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die gemessenen Werte wurden zunächst auf Normalverteilung und Gleichverteilung getestet. Erfüllten die Daten beide Kriterien, so wurden parametrische Tests angewendet und die Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of Mean; SEM) dargestellt. Als parametrische Tests wurde für den Vergleich der beiden Gruppen der ungepaarte t-Test und für den Vergleich von Ergebnissen innerhalb einer Gruppe der gepaarte t-Test nach Student bzw. die einfaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen (One Way Repeated Measures Analyse of Variance; RM-ANOVA) durchgeführt. Bei negativem Ausfall des Tests auf Normal- und Gleichverteilung wurde der Vergleich beider Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney Rangsummentests, der Vorher-Nachher-Vergleich einer Gruppe mittels des Rangtests nach Wilcoxon durchgeführt. Die Werte wurden dann als Boxplots mit Median und Perzentilen (5 %, 25 %, 75 % und 95 %) dargestellt. Nach Auswertung aller Daten wurden die Gruppen entblindet und der Echinacea- bzw. der Kontrollgruppe zugeordnet.

Die Ergebnisabbildungen wurden mit die Computer-Software SigmaPlot[®] 9.0 (Systat, Erkrath, Deutschland) erstellt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeitswerte (p) erfolgte mittels der Computer-Software SigmaStat[®] 3.01 (Systat, Erkrath, Deutschland). Wahrscheinlichkeitswerte (p) kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl der Proben/Tiere ist mit „n“ bezeichnet.

3.4 Versuchsanzeige

Der Versuch wurde gemäß dem Tierschutzgesetz bei der Regierung von Oberbayern angezeigt (Aktenzeichen: 209.1/211-2531.2-3/02).

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluss einer Echinaceafütterung auf den Gesundheitsstatus von Pferden

Um den Gesundheitsstatus der Pferde während des Versuchs zu dokumentieren, wurden eine Allgemeinuntersuchung mit zusätzlicher Kontrolle der Darmmotorik und eine Blutentnahme an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Allgemeinuntersuchung wurden die Ergebnisse der Parameter Atemfrequenz, Temperatur und Pulsfrequenz sowie die Auskultation der vier abdominalen Quadranten herangezogen.

4.1.1 Atmung

Die Atemfrequenzen aller Tiere lagen überwiegend im physiologischen Bereich von 8-16 Atemzügen/min. Die Echinaceagruppe und die Kontrollgruppe unterschieden sich an Tag 35 signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney Rangsummentest, Abb. 1). Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Im Versuchsverlauf ergab sich in der Echinaceagruppe ein Absinken der Werte von Tag 0 zu Tag 70 ($p < 0,05$; Rangtest nach Wilcoxon). In der Kontrollgruppe ergaben sich bereits an Tag 35 etwas niedrigere Werte als an Tag 0 ($p < 0,05$; Rangtest nach Wilcoxon). Diese Unterschiede wurden festgestellt, obwohl der Median in beiden Gruppen zu jedem Untersuchungszeitpunkt bei 12 Atemzügen/min lag.

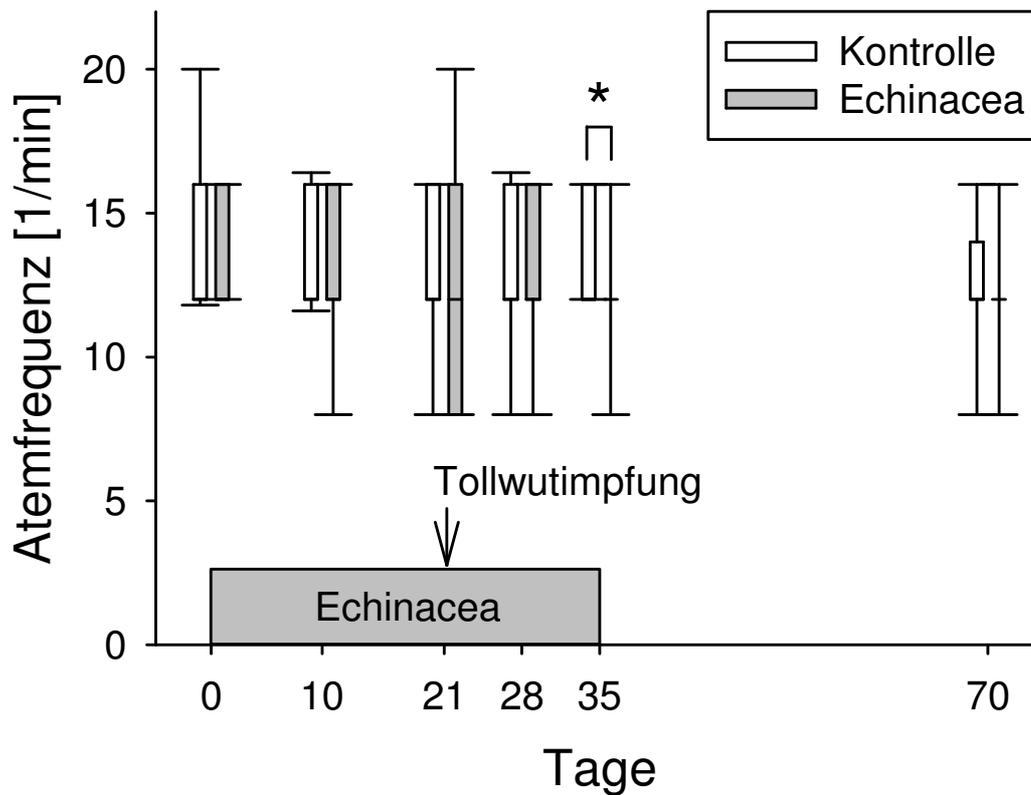


Abb. 1: Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Atemfrequenz. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Die Atemfrequenzen wurden an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 bestimmt ($n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$; Mann-Whitney Rangsummentest).

4.1.2 Temperatur

Zwischen beiden Gruppen bestand zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 2). Die Temperatur lag zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung an Tag 0 bei $37,05 \pm 0,09$ °C in der Kontrollgruppe und $37,22 \pm 0,08$ °C in der Echinaceagruppe. In der Kontrollgruppe ergab sich, bezogen auf Tag 0, ein signifikanter Temperaturanstieg an Tag 35 auf $37,31 \pm 0,08$ °C ($p < 0,05$; einfaktorische Varianzanalyse für wiederholte Messungen). In der Echinaceagruppe konnte ein signifikanter Temperaturabfall zwischen Tag 28 und Tag 35 von $37,40 \pm 0,07$ °C auf $37,24 \pm 0,09$ °C festgestellt werden ($p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM). Im weiteren Verlauf ergaben sich, wie auch zwischen den beiden Gruppen, keine weiteren signifikanten Temperaturschwankungen.

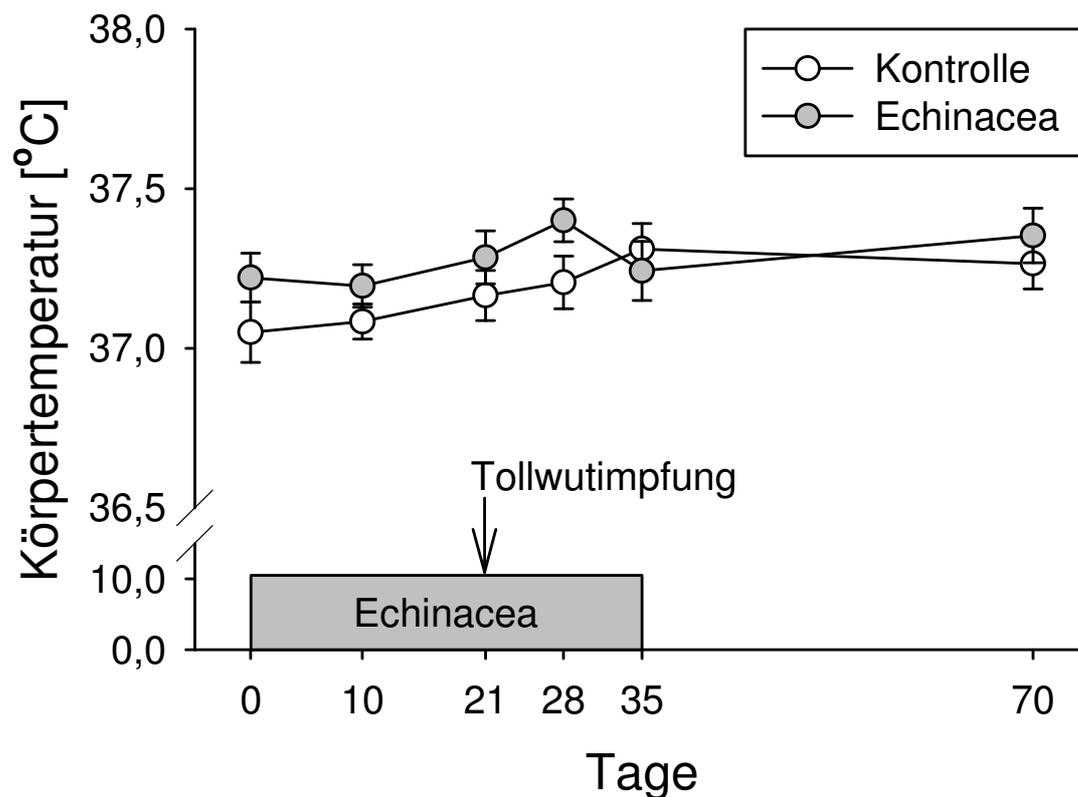


Abb. 2: Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Körpertemperatur. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Die Körpertemperatur wurde an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 gemessen ($n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM).

4.1.3 Pulsfrequenz

Im gesamten Untersuchungszeitraum ergaben sich weder in den beiden Gruppen noch im Versuchsverlauf signifikante Unterschiede in der Pulsfrequenz der Pferde (Abb. 3). Die Pulsfrequenz lag bei der ersten Untersuchung in der Kontrollgruppe bei $36,67 \pm 1,53$ Schläge/min in der Echinaceagruppe bei $34,74 \pm 0,92$ Schläge/min. Bei der letzten Untersuchung an Tag 70 wurden $37,65 \pm 1,03$ Schläge/min in der Kontroll- und $36,21 \pm 1,42$ Schläge/min in der Echinaceagruppe festgestellt. Lediglich an Tag 35 tendierte die Kontrollgruppe zu einer höheren Pulsfrequenz als die Echinaceagruppe ($37,8 \pm 1,3$ zu $34,7 \pm 0,9$ Schläge/min.; $p = 0,058$; t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

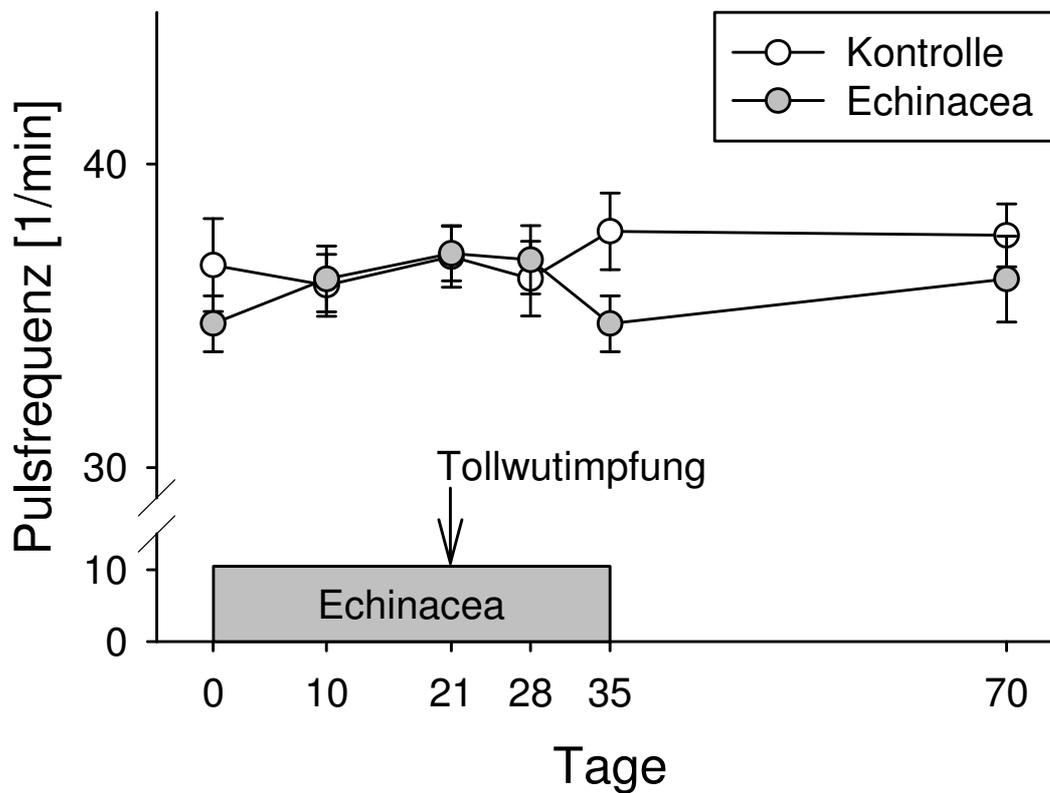


Abb. 3: Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Pulsfrequenz. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Die Pulsfrequenzen wurden an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 durch Palpation der Arteria facialis bestimmt ($n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM).

4.1.4 Auskultation der Darmmotorik

Die Beurteilung der Darmgeräusche erfolgte anhand des Bewertungsschlüssels: 0 = keine Motorik, 1 = vermindert, 2 = physiologisch, 3 = verstärkt. Im linken oberen Quadranten (Hungergrube) war in der Echinaceagruppe eine signifikante Verminderung der Darmgeräusche von Tag 10 (Median 2) auf Tag 21 (Median 1,5) festzustellen ($p < 0,05$; Rangtest nach Wilcoxon). Von Tag 21 (Median 1,5) zu Tag 28 (Median 2) ergab sich in derselben Gruppe ein signifikanter Anstieg in der Bewertung der Darmmotorik ($p < 0,05$; Rangtest nach Wilcoxon). Für die anderen Quadranten ergaben sich weder im Versuchsverlauf noch zwischen den beiden Gruppen weitere signifikante Schwankungen. Der Median lag hier durchwegs bei 2. Beispielfür alle Quadranten sind die Beurteilungen der Darmgeräusche des linken oberen Quadranten in Abb. 4 dargestellt.

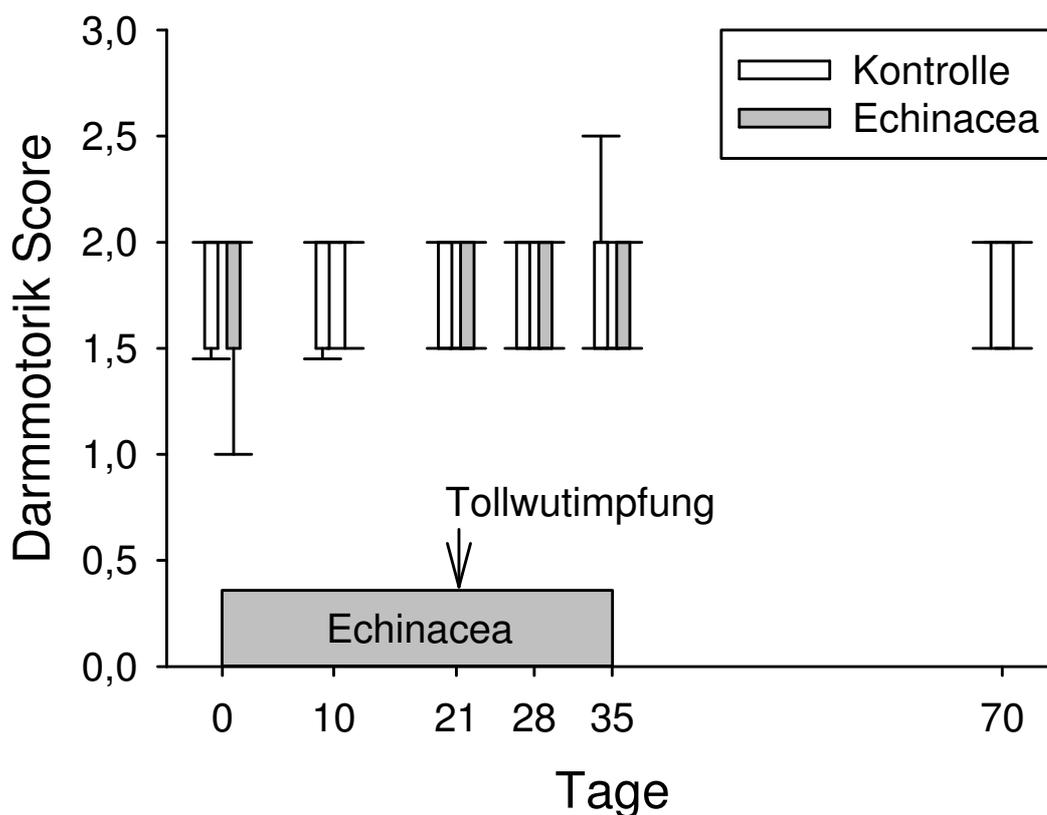


Abb. 4: Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Darmmotorik im linken oberen abdominalen Quadranten. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mittels Auskultation und Bewertung nach einem festgelegten Schlüssel an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 ($n = 18/19$; Boxplot-Darstellung).

4.1.5 Blutparameter

Die Bestimmung von 16 Blutparametern erfolgte an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70. Bestimmt wurden: weiße Blutkörperchen (Leukozyten/WBC), rote Blutkörperchen (Erythrozyten/RBC), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (HCT), mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Verteilungsindex der roten Blutkörperchen (RDW), Blutplättchen (Thrombozyten/PLT), mittleres Thrombozytenvolumen (MPV), sowie im Differentialblutbild: Lymphozyten in Prozent (LYM%), Lymphozyten als absoluter Wert (LYM#), Monozyten in Prozent (MON%), Monozyten als absoluter Wert (MON#), Granulozyten in Prozent (GRA%), Granulozyten als absoluter Wert (GRA#).

Für die **Leukozyten-** und **Erythrozytenzahlen** ergaben sich während des gesamten Versuches keinerlei signifikante Unterschiede, weder zwischen den beiden Gruppen, noch im Verlauf. Die ermittelten Werte lagen durchweg im Normalbereich von $5,0-10,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (WBC) und $6,0-10,0 \times 10^6/\text{mm}^3$ (RBC).

Die Ergebnisse der **Hämoglobinbestimmungen** waren in der Versuchs- und Kontrollgruppe nahezu deckungsgleich, es konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Die Werte lagen stets im Normalbereich von 11,0-17,0 g/dl. In beiden Gruppen konnte zwischen Tag 28 und Tag 35 ein signifikanter Anstieg der Hämoglobinwerte festgestellt werden: von $14,45 \pm 0,33$ g/dl auf $15,62 \pm 0,28$ g/dl in der Kontrollgruppe und von $14,49 \pm 0,35$ g/dl auf $15,31 \pm 0,34$ g/dl in der Echinaceagruppe ($p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

Auch die **Hämatokritwerte** lagen bei jeder Untersuchung im physiologischen Bereich von 32,0-46,0 %. Hier konnten weder zwischen den Gruppen noch im Versuchsverlauf Unterschiede ermittelt werden. Die Ergebnisse stellten sich nahezu identisch dar.

Die **Thrombozytenzahlen** (PLT) lagen bei allen sechs Untersuchungen im Normalbereich von $100-300 \times 10^3/\text{mm}^3$. Von Tag 10 auf Tag 21 konnte ein Anstieg in beiden Gruppen verzeichnet werden. Die Werte stiegen von $192,4 \pm 11,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ auf $245,3 \pm 17,2 \times 10^3/\text{mm}^3$ in der Kontrollgruppe und von $208,0 \pm 10,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ auf $245,5 \pm 18,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ in der Echinaceagruppe an ($p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM). In der Echinaceagruppe fielen die Werte dann von Tag 28 zu Tag 35 signifikant ab, von $227,0 \pm 14,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ auf $193,0 \pm 13,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM). Im weiteren Verlauf ergaben sich, wie auch zwischen den Gruppen, keine weiteren signifikanten Unterschiede.

Die Bestimmung des **mittleren korpuskulären Erythrozytenvolumens** (MCV) ergab signifikant höhere Werte in der Kontrollgruppe zwischen Tag 0 und Tag 10 sowie zwischen Tag 35 und Tag 70 (Tab. 5). Außerdem waren die Anstiege der Werte zwischen Tag 0 und Tag 35 sowie zwischen Tag 0 und Tag 70 in dieser Gruppe signifikant. In der Echinaceagruppe waren die Werte zwischen Tag 28 und Tag 35 sowie zwischen Tag 35 und 70 jeweils signifikant höher. (Tab. 5). Außerdem lag in dieser Gruppe der Durchschnittswert

an Tag 70 signifikant höher als an Tag 0. Weitere Unterschiede ergaben sich, auch zwischen den Gruppen, nicht. Die Werte lagen durchweg im Normalbereich von 37-55 μm^3 .

Tab. 5.: Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV; $n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM; *: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ zum vorhergehenden Wert; gepaarter t -Test/Wilcoxon Rangtest).

MCV μm^3	Tag 0	Tag 10	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 70
Kontrolle	50,72 \pm 0,89	51,06 \pm 0,86*	50,68 \pm 0,83	50,92 \pm 0,8	51,19 \pm 0,84	51,56 \pm 0,83*
Echinacea	49,64 \pm 0,71	49,53 \pm 0,78	49,52 \pm 0,69	49,39 \pm 0,71	49,97 \pm 0,65*	50,08 \pm 0,69*

Die Ergebnisse des **mittleren korpuskulären Hämoglobingehaltes** (MCH) ergaben zwischen den Gruppen zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Im Versuchsverlauf wurde in der Kontrollgruppe ein Anstieg von Tag 0 auf Tag 10 festgestellt. Von Tag 10 zu Tag 21 fielen die Werte ab. Ein erneuter Anstieg war von Tag 28 auf Tag 35 zu verzeichnen. An Tag 70 wurden nochmals höhere Werte in dieser Gruppe ermittelt (Tab 6). Die Werte von Tag 35 und Tag 70 lagen signifikant höher als an Tag 0. Auch in der Echinaceagruppe konnte von Tag 0 auf Tag 10 ein Anstieg verzeichnet werden. Im weiteren Verlauf ergab sich ein Absinken der Werte von Tag 21 auf Tag 28. Wie auch in der Kontrollgruppe fand von Tag 28 auf Tag 35 ein erneuter Anstieg statt. Ein weiterer Anstieg war an Tag 70 festzustellen (Tab. 6). Auch in der Echinaceagruppe lagen die Werte von Tag 35 und Tag 70 signifikant höher als an Tag 0.

Tab. 6: Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH; $n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM; *: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ zum vorhergehenden Wert; gepaarter t -Test/Wilcoxon Rangtest).

MCH pg	Tag 0	Tag 10	Tag 21	Tag 28	35	70
Kontrolle	18,83 \pm 0,34	19,22 \pm 0,31*	18,75 \pm 0,32*	18,78 \pm 0,30	19,70 \pm 0,33*	20,03 \pm 0,34*
Echinacea	18,50 \pm 0,30	18,78 \pm 0,31*	18,53 \pm 0,32	18,37 \pm 0,30*	19,32 \pm 0,29*	19,52 \pm 0,29*

Die Bestimmung der **mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration** (MCHC) ergab im direkten Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Im Versuchsverlauf jedoch

ergab sich in der Kontrollgruppe ein Anstieg der Werte von Tag 0 auf Tag 10. Hin zu Tag 21 fielen die Werte ab. Von Tag 28 zu Tag 35 ergab sich ein weiterer Anstieg (Tab. 7). Verglichen mit Tag 0 lagen die Werte an Tag 35 und Tag 70 in dieser Gruppe signifikant höher. Auch in der Echinaceagruppe wurden im Versuchsverlauf Unterschiede registriert. Von Tag 0 zu Tag 10 stiegen die Werte an. Eine weitere Erhöhung konnte von Tag 28 auf Tag 35 festgestellt werden. An Tag 70 lagen die Werte höher als an Tag 35 (Tab. 7). Verglichen mit Tag 0 waren auch in dieser Gruppe die Ergebnisse der MCHC-Bestimmung an den Tagen 35 und 70 signifikant höher.

Tab. 7: Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC; $n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM; *: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ zum vorhergehenden Wert; gepaarter *t*-Test/Wilcoxon Rangtest).

MCHC g/dl	Tag 0	Tag 10	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 70
Kontrolle	37,14 \pm 0,21	37,75 \pm 0,28*	37,03 \pm 0,19*	36,90 \pm 0,16	38,53 \pm 0,16*	38,88 \pm 0,18
Echinacea	37,28 \pm 0,22	37,95 \pm 0,17*	37,41 \pm 0,18	37,20 \pm 0,18	38,58 \pm 0,18*	38,92 \pm 0,11*

Im mittleren **Thrombozytenvolumen** (MPV) unterschieden sich die beiden Gruppen an Tag 70. Für die Kontrollgruppe wurde ein Median von 5,89 μm^3 ermittelt, in der Echinaceagruppe lag er mit 5,98 μm^3 knapp signifikant höher ($p = 0,049$; Mann-Whitney Rangsummentest). Weitere direkte Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich nicht. Im Versuchsverlauf konnte in der Kontrollgruppe von Tag 10 (5,89 \pm 0,04 μm^3) auf Tag 21 (5,69 \pm 0,07 μm^3) ein Absinken des Thrombozytenvolumens verzeichnet werden. In der Echinaceagruppe ergab sich von Tag 35 (5,88 \pm 0,04 μm^3) auf Tag 70 (5,98 \pm 0,04 μm^3) ein Anstieg der Werte (jeweils $p < 0,05$; gepaarter *t*-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

Bei den Lymphozyten- (LYM#), Monozyten- (MON#) und Granulozytenzahlen (GRA#) im Differentialblutbild, ergaben sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Echinaceagruppe.

Im Versuchsverlauf konnte für die **Lymphozyten** in der Kontrollgruppe ein Anstieg von Tag 0 (2,55 \pm 0,17 $\times 10^3/\text{mm}^3$) auf Tag 10 (2,97 \pm 0,22 $\times 10^3/\text{mm}^3$) verzeichnet werden. Von Tag 10 (2,97 \pm 0,22 $\times 10^3/\text{mm}^3$) zu Tag 21 (2,62 \pm 0,18 $\times 10^3/\text{mm}^3$) fielen die Werte wieder ab.

Verglichen mit Tag 0 konnten auch an Tag 35 ($2,77 \pm 0,20 \times 10^3/\text{mm}^3$) höhere Werte festgestellt werden. In der Echinaceagruppe ergaben sich höhere Werte an Tag 70 ($2,94 \pm 0,21 \times 10^3/\text{mm}^3$) verglichen mit Tag 0 ($2,56 \pm 0,21 \times 10^3/\text{mm}^3$; jeweils $p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

Die **Monozytenzahlen** stiegen in der Kontrollgruppe von Tag 0 ($0,24 \pm 0,02 \times 10^3/\text{mm}^3$) zu Tag 10 ($0,33 \pm 0,03 \times 10^3/\text{mm}^3$) an. In der Echinaceagruppe ergab sich ein Anstieg von Tag 21 ($0,29 \pm 0,02 \times 10^3/\text{mm}^3$) auf Tag 28 ($0,33 \pm 0,02 \times 10^3/\text{mm}^3$). Verglichen mit Tag 0 ($0,28 \pm 0,02 \times 10^3/\text{mm}^3$) lagen hier auch die Werte an Tag 70 ($0,34 \pm 0,03 \times 10^3/\text{mm}^3$) höher (jeweils $p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

Die **Granulozytenzahlen** sanken im Versuchsverlauf der Kontrollgruppe von Tag 0 ($4,52 \pm 0,39 \times 10^3/\text{mm}^3$) zu Tag 10 ($4,03 \pm 0,31 \times 10^3/\text{mm}^3$) ab. Verglichen mit Tag 0 konnten auch an Tag 35 ($4,08 \pm 0,28 \times 10^3/\text{mm}^3$) und an Tag 70 ($3,79 \pm 0,27 \times 10^3/\text{mm}^3$) niedrigere Werte in dieser Gruppe festgestellt werden. In der Echinaceagruppe konnte zwischen Tag 10 ($3,83 \pm 0,27 \times 10^3/\text{mm}^3$) und Tag 21 ($4,31 \pm 0,31 \times 10^3/\text{mm}^3$) ein Anstieg ermittelt werden (jeweils $p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

4.2 Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Plasmakortisol-Konzentration von Pferden

Die Kortisolkonzentration im Plasma der Pferde wurde aus jeder der sechs entnommenen Blutproben (Tag 0, 10, 21, 28, 35, 70) ermittelt. Diese lag an Tag 0 in der Kontrollgruppe ($122,48 \pm 11,82$ nmol/l) niedriger als in der Echinaceagruppe ($180,92 \pm 27,40$ nmol/l; $p < 0,05$; Abb. 5). Weitere direkte Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Im weiteren Verlauf ergab sich in der Kontrollgruppe von Tag 10 ($131,82 \pm 9,44$ nmol/l) zu Tag 21 ($110,74 \pm 4,97$ nmol/l) ein Absinken der Kortisolwerte. An Tag 28 ($125,71 \pm 8,93$ nmol/l) stiegen die Werte wieder an. In der Echinaceagruppe konnten, verglichen mit Tag 0 ($180,92 \pm 27,40$ nmol/l), an Tag 21 ($160,00 \pm 21,93$ nmol/l) niedrigere Werte festgestellt werden. Auch an Tag 28 ($154,75 \pm 17,14$ nmol/l) wurden, verglichen mit Tag 0 in dieser Gruppe niedrigere Werte gefunden (jeweils $p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

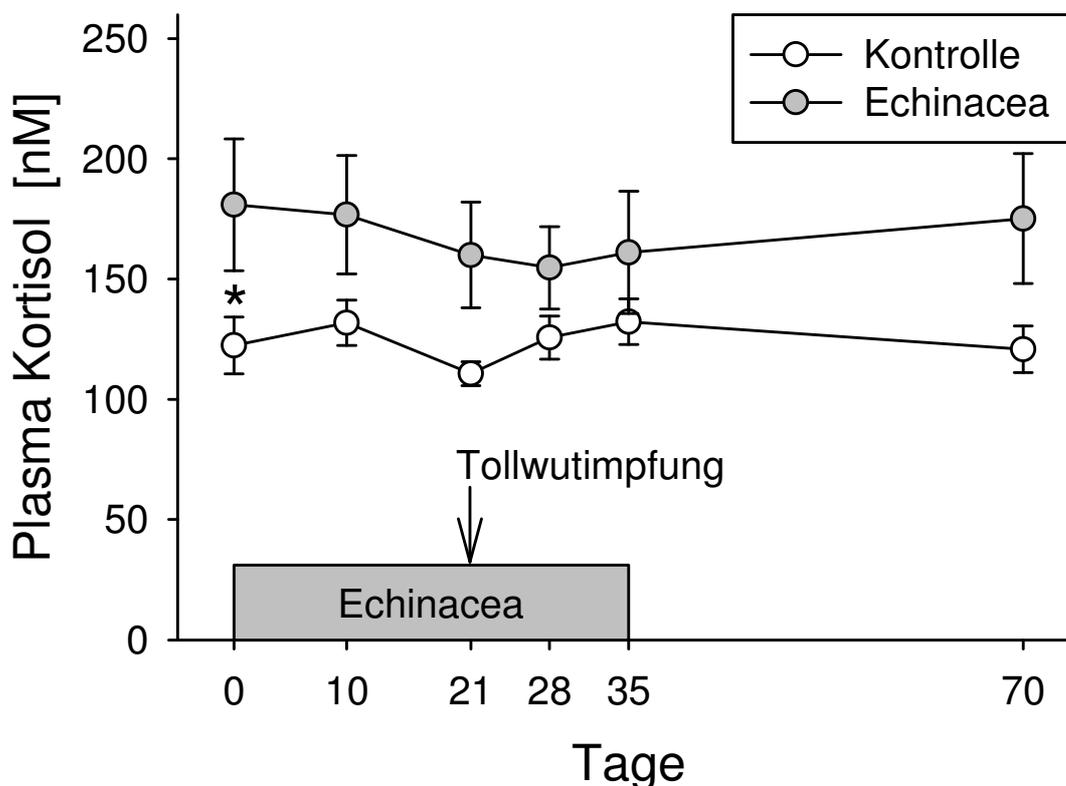


Abb. 5: Entwicklung der Plasmakortisol-Konzentrationen bei Pferden unter Einfluss einer Echinaceafütterung. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. An den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 wurde den Tieren Blut entnommen und das Plasma mittels eines Lumineszenzassay (LIA) auf Cortisol untersucht. (n=18/19; Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$; t-Test).

4.3 Einfluss einer Echinaceafütterung auf Parameter der unspezifischen Immunabwehr von Pferden

4.3.1 Respiratory Burst

Die Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten wurde bei jeweils zehn Pferden der Kontroll- und Echinaceagruppe bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten an den Tagen 0, 21 und 35, also einmal vor Beginn der Echinaceafütterung und einmal vor und nach der Tollwutimpfung während Echinacea- bzw. Placebofütterung. Die Proben wurden dabei in einem Dreifachansatz untersucht. Eine gesteigerte Stimulierbarkeit der Granulozyten sollte mit Hilfe eines suboptimalen, physiologischen Stimulus mit N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) nachgewiesen werden. Dazu diente die Stimulation mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) als Maximalstimulation und ein Leerwert ohne Stimulation als Grundreaktion. Um ein Maß für die Stimulierbarkeit zu erhalten, wurden die Ergebnisse der FMLP- und PMA-Reaktion um den parallel gemessenen Leerwert korrigiert (FMLP-Stimulation siehe Abb. 6).

Die Stimulation mit FMLP, wie auch mit PMA, und die Leerwerte lieferten keine unterschiedlichen Ergebnisse im Gruppenvergleich. Im Versuchsverlauf zeigte sich in allen drei Ansätzen ein Abfallen der mittleren Fluoreszenzintensität.

Die Leerwerte fielen von Tag 0 ($15,70 \pm 3,39$) zu Tag 35 ($6,63 \pm 2,00$) in der Echinaceagruppe signifikant ab. Auch von Tag 21 ($13,86 \pm 2,07$) zu Tag 35 ($6,63 \pm 2,00$) war ein Absinken der mittleren Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Ganz ähnlich verhielten sich die Ergebnisse in der Kontrollgruppe. Auch hier fielen sie von Tag 0 ($17,30 \pm 3,98$) zu Tag 35 ($5,58 \pm 0,90$) signifikant ab, ebenso wie von Tag 21 ($14,52 \pm 1,49$) zu Tag 35 ($5,58 \pm 0,90$); jeweils $p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

In der FMLP- und PMA-Stimulation zeigte sich ein Absinken der Werte zwischen Tag 0 und Tag 35. Für die FMLP-Stimulation in der Kontrollgruppe war der Abfall von Tag 0 ($6,45 \pm 1,84$) zu Tag 35 ($1,08 \pm 0,47$) signifikant (Abb. 6). In der Echinaceagruppe konnte hier bereits von Tag 0 ($6,37 \pm 2,84$) zu Tag 21 ($1,76 \pm 0,69$) ein Absinken in der mittleren Fluoreszenzintensität festgestellt werden (Abb. 6). Durch den früher stattfindenden Abfall der Sauerstoffradikalbildung in der Echinaceagruppe tendierte die Kontrollgruppe am Tag 21 zu höheren Werten ($p = 0,07$; t-Test).

Erwartungsgemäß fielen die Messungen der mittleren Fluoreszenzintensität in der Maximalstimulation (PMA) insgesamt höher aus. Dabei war von Tag 0 ($218,24 \pm 56,28$) zu Tag 21 ($103,63 \pm 29,72$) in der Echinaceagruppe bereits ein tendenzieller Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität festzustellen ($p = 0,059$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM). Von Tag 21 ($95,47 \pm 18,33$) zu Tag 35 ($38,56 \pm 3,29$) fielen die Werte in der Kontrollgruppe signifikant ab. Das Absinken der Werte von Tag 0 zu Tag 35 war in beiden Gruppen signifikant und zwar von $218,24 \pm 56,28$ auf $37,54 \pm 4,68$ in der Echinaceagruppe und von $163,27 \pm 36,95$ auf $38,56 \pm 3,29$ in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; gepaarter t-Test; alle Werte: Mittelwerte \pm SEM).

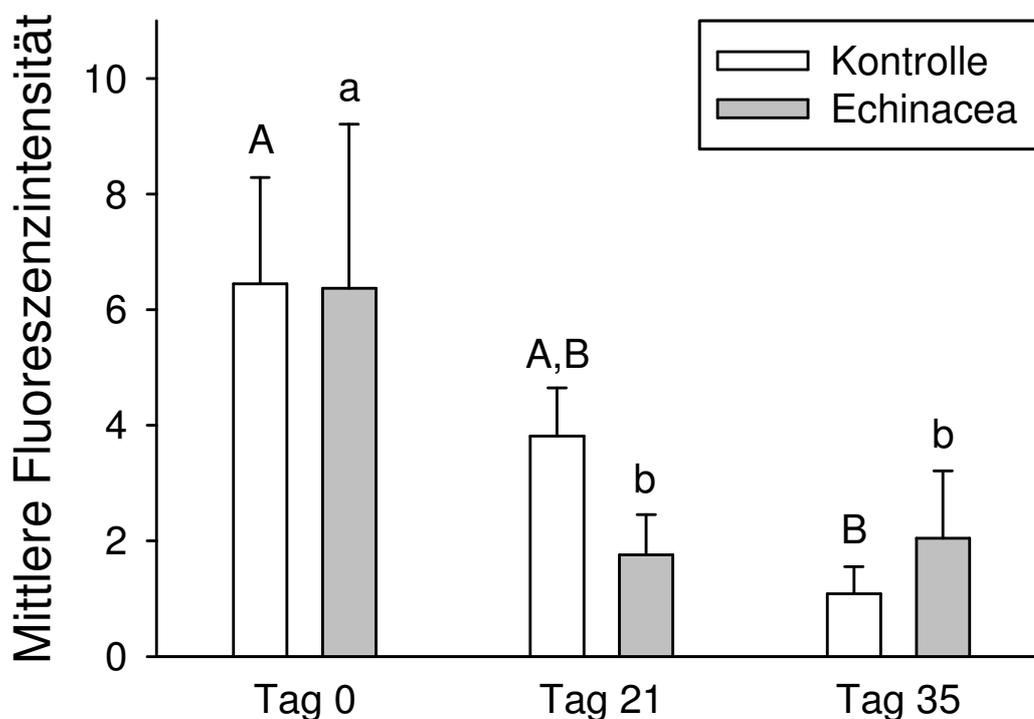


Abb. 6: Einfluss einer Echinaceafütterung auf den Respiratory Burst von Granulozyten im Blut von Pferden nach FMLP-Stimulation. Den Tieren wurde über 35 Tage Echinacea gefüttert, an Tag 21 wurden alle Tiere gegen Tollwut geimpft. An den Tagen 0, 21 und 35 wurden Granulozyten gewonnen und mittels FMLP stimuliert. Das Maß der Sauerstoffradikalbildung ist äquivalent der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität. Die Daten wurden um den parallel gemessenen Leerwert korrigiert ($n = 10$; Mittelwerte \pm SEM; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Veränderungen innerhalb einer Gruppe; $p < 0,05$; einfaktorielles Varianzanalyse für wiederholte Messungen).

4.3.2 Antioxidative Kapazität im Plasma

Die Ermittlung der antioxidativen Kapazität im Plasma erfolgte an den Tagen 0, 10 und 28. Tag 10 wurde gewählt, um einen möglichen frühen Einfluss der Echinacea- oder Placebofütterung festzustellen, Tag 28 sollte Aufschluss über die Wirkung der Tollwut-Vakzination auf die TEAC (Trolox equivalent antioxidative activity) geben. Die Werte der beiden Gruppen unterschieden sich untereinander zu keinem der untersuchten Zeitpunkte. Im Verlauf war jedoch ein deutlicher Anstieg in beiden Gruppen zu verzeichnen (Abb. 7). In der Kontrollgruppe stiegen die Werte von Tag 0 ($0,28 \pm 0,01$ mmol/l) zu Tag 10 ($0,34 \pm 0,02$ mmol/l) an (Abb. 7). Von Tag 10 zu Tag 28 ($0,46 \pm 0,01$ mmol/l) wurden ebenfalls höhere Werte festgestellt. Sehr ähnlich war der Verlauf in der Echinaceagruppe: Die Werte stiegen zunächst von Tag 0 ($0,28 \pm 0,01$ mmol/l) zu Tag 10 ($0,34 \pm 0,01$ mmol/l) an. Zwischen Tag 10 und Tag 28 ($0,45 \pm 0,02$ mmol/l) war ein weiterer Anstieg festzustellen (Abb. 7).

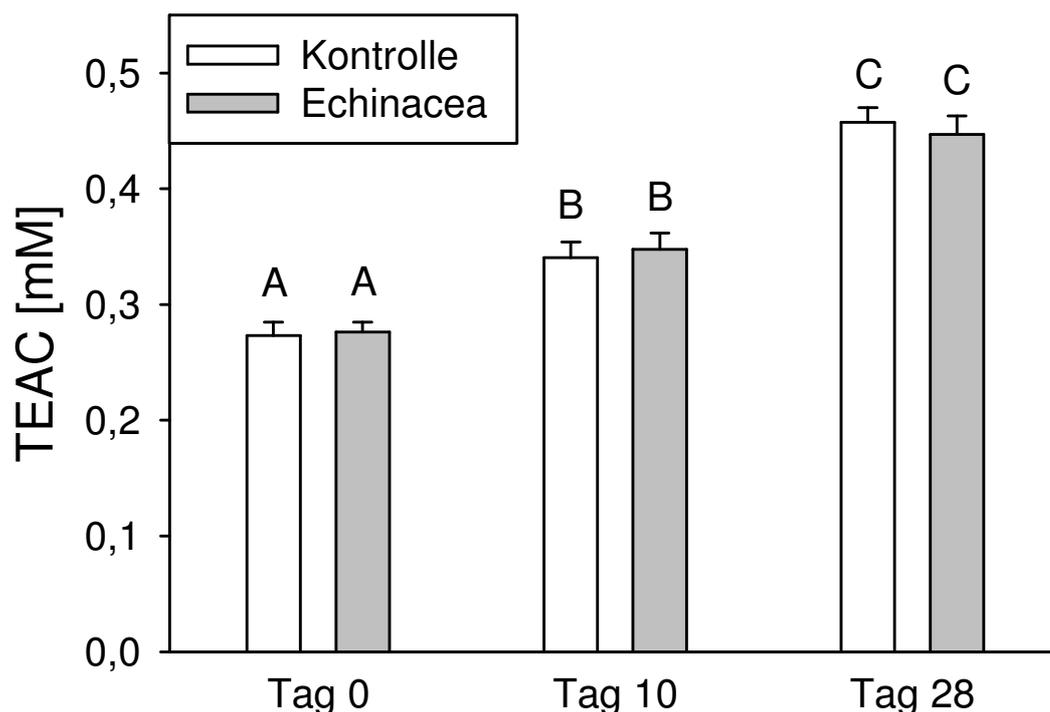


Abb 7: Darstellung der antioxidativen Kapazität im Plasma bei Pferden unter Einfluss einer Echinaceafütterung. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. An den Tagen 0, 10 und 28 wurde den Tieren Blut entnommen und die antioxidative Kapazität als Troloxequivalent (TEAC) gemessen ($n = 18/19$; Mittelwerte \pm SEM; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede; $p < 0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse).

4.4 Einfluss einer Echinaceafütterung auf Parameter der spezifischen Immunabwehr von Pferden

4.4.1 Immunglobulin G im Serum

Die IgG-Konzentrationen der beiden Gruppen unterschieden sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant. Bei der ersten Blutentnahme ergab sich eine gemittelte Serum-IgG-Konzentration von $26,8 \pm 2,4$ mg/ml in der Kontrollgruppe und $24,5 \pm 1,8$ mg/ml in der Echinaceagruppe. In beiden Gruppen kam es im Studienverlauf zu einem signifikanten Abfall der IgG-Konzentrationen, bezogen auf Tag 0. In der Kontrollgruppe war dies bereits ab der zweiten Blutentnahme (Tag 10), in der Echinaceagruppe erst ab der vierten Blutentnahme (Tag 28) zu beobachten ($p < 0,05$; gepaarter t-Test). Bei der letzten Blutentnahme an Tag 70 lagen die IgG-Werte im Serum bei $17,2 \pm 0,8$ mg/ml (Kontrollgruppe) und $17,8 \pm 1,2$ mg/ml (Echinaceagruppe; Abb. 8).

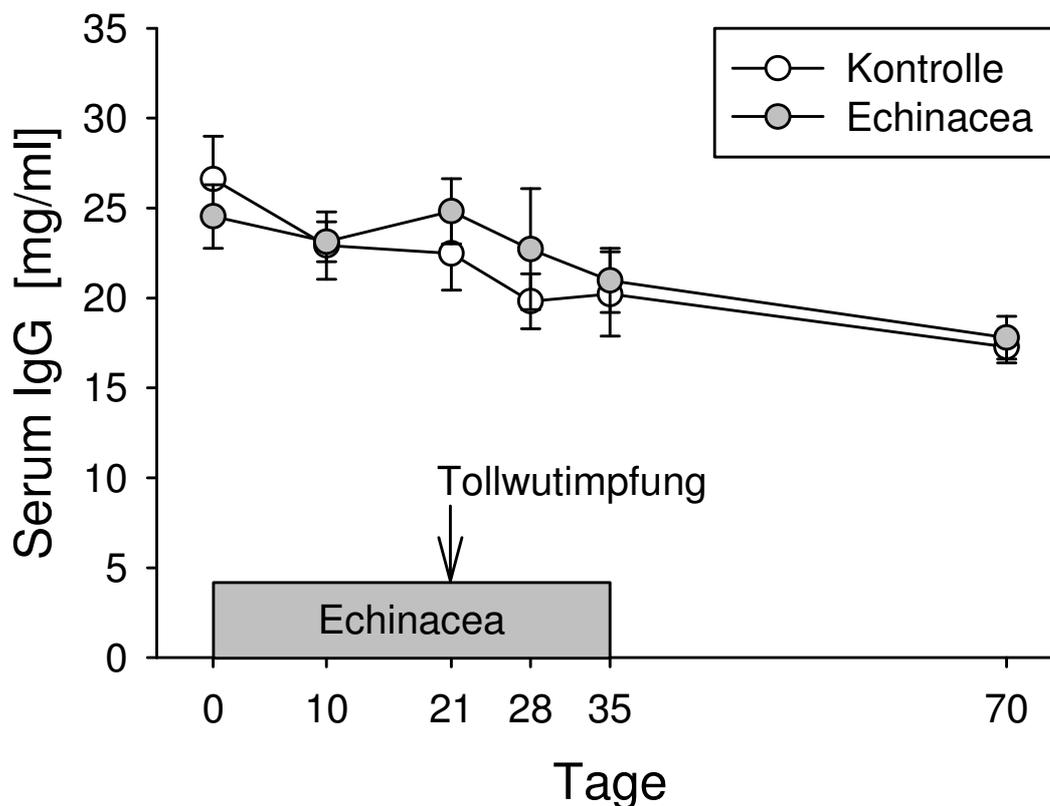


Abb. 8: Entwicklung der Serum-IgG-Konzentrationen bei Pferden unter Einfluss einer Echinaceafütterung. Die Echinacea- bzw. Placebofütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Die Blutproben wurden an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 entnommen. Das Serum wurde mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf IgG untersucht ($n = 18/19$, Mittelwerte \pm SEM).

4.4.2 Tollwuttiter

Die Tollwutvakzination erfolgte nach dreiwöchiger Echinacea- bzw. Placebofütterung (an Tag 21). Um einen eventuellen Einfluss von Echinacea auf die Titerausbildung feststellen zu können, wurde ein Ausgangstiter vor der Impfung (Tag 21) sowie die Antikörpertiter zwei Wochen nach der Impfung (Tag 35) ermittelt. Die Antikörpertiter wurden mittels fluoreszierendem Antikörper Virus Neutralisationstest bestimmt. Dabei lag das obere Detektionslimit gemäß dem O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines bei 10,55 IU/ml Serum.

Die Ausgangstiter lagen in der Kontrollgruppe bei einem Median von 10,55 IU/ml und in der Echinaceagruppe bei 3,52 IU/ml, sie unterschieden sich jedoch nicht signifikant. An Tag 35 wurden in beiden Gruppen Antikörpertiter mit einem Median von 10,55 IU/ml festgestellt. Der Anstieg der Antikörpertiter von Tag 21 zu Tag 35 war erwartungsgemäß signifikant ($p < 0,05$; $n = 18/19$; Rangtest nach Wilcoxon). Zwischen den beiden Gruppen ergab sich jedoch kein Unterschied. Auch die getrennte Betrachtung von Erst- und Wiederholungsimpfungen zeigte keine Gruppenunterschiede. An Tag 35 wurde für die Erstimpfungen ein Median von 9,28 IU/ml in der Kontrollgruppe und 7,04 IU/ml in der Echinaceagruppe festgestellt (jeweils $n = 4$; Abb. 9), wobei jeweils 2 von 4 Tieren den maximal möglichen Titer von 10,55 IU/ml erreichten. Bei den Wiederholungsimpfungen konnten 14 von 14 Tieren in der Kontrollgruppe und nur 13 von 15 Tieren in der Echinaceagruppe den Maximaltiter erreichen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen stellte dies nicht dar. Für beide Gruppen wurde an Tag 35 ein Median von 10,55 IU/ml bestimmt (Abb. 9).

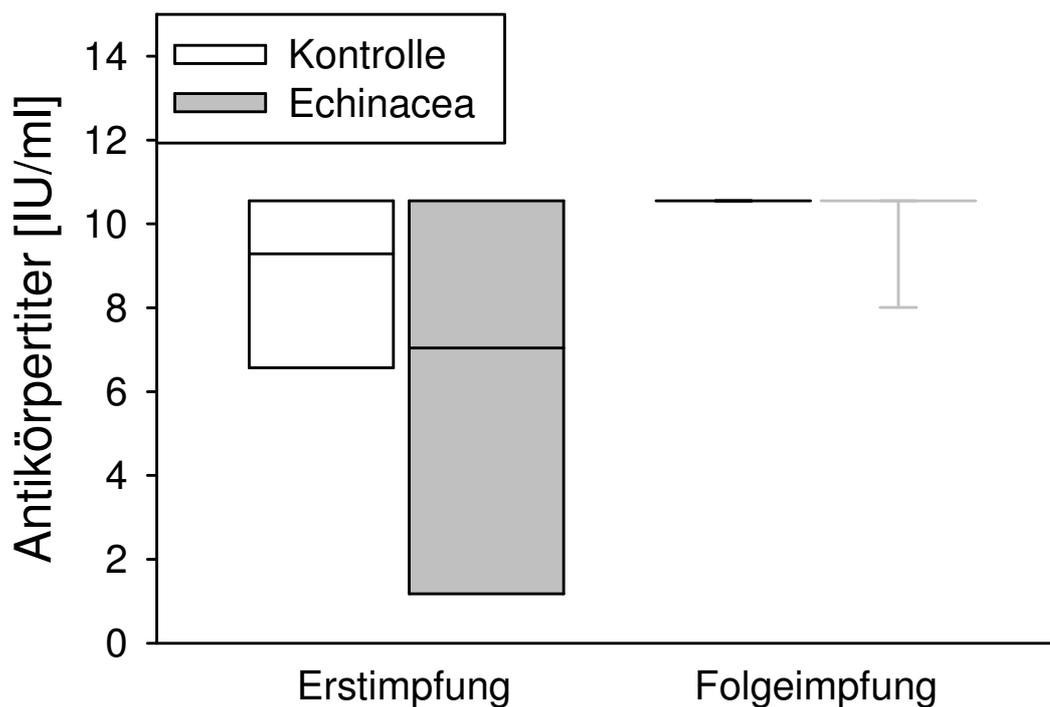


Abb. 9: Tollwut-Antikörpertiter bei Pferden unter Einfluss einer Echinacea-Fütterung. Die Echinacea- bzw. Placebo-Fütterung erfolgte bis Tag 35. Die Tollwutimpfung wurde an Tag 21 durchgeführt. Am Tag 35 wurde den Tieren Blut entnommen und im Serum der Antikörpertiter mittels fluoreszierendem Antikörper Virus Neutralisationstest (oberes Detektionslimit: 10,55 IU/ml Serum) bestimmt (Erstimpfung: $n = 4$, Wiederholungsimpfungen: $n = 14/15$; Boxplot-Darstellung).

5. DISKUSSION

Echinaceapräparate in Form von Ergänzungsfuttermitteln erfreuen sich gerade bei Pferdehaltern immer größerer Beliebtheit. Durch die Echinaceafütterung soll das Immunsystem gestärkt werden und das Pferd in Zeiten erhöhter Belastung vor Infektionen geschützt sein. Es gibt bislang wenige wissenschaftliche Untersuchungen zur Echinaceafütterung bei Tieren, insbesondere beim Pferd. Genaue Fütterungsempfehlungen und der Nachweis der Unbedenklichkeit fehlen bisher völlig. Deshalb wurde in der vorliegenden placebokontrollierten Doppelblindstudie ein möglicher Einfluss auf den Gesundheitszustand und das Immunsystem von Pferden durch die Fütterung von *E. purpurea* (oberflächliche Pflanzenanteile, pelletiert) untersucht.

Die 37 einbezogenen Pferde wurden nach Alter und geschätztem Gewicht in eine Echinacea- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Tiere erhielten von Tag 1 bis Tag 35 täglich Echinacea- bzw. Placebopellets. Eine Tollwutvakzination wurde an Tag 21 vorgenommen. Eine allgemeine Untersuchung mit Kontrolle der Darmmotorik und anschließende Blutentnahme erfolgten jeweils an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70. Da konkrete Dosierungsangaben in der Literatur und vom Hersteller fehlten, wurden 2,5 % der durchschnittlich angenommenen täglichen Trockensubstanzaufnahme im Erhaltungsbedarf (entspricht 2 kg TS/100 kg LM) festgelegt. Eine höhere Konzentration wurde nicht angestrebt, da LANG (2004) in ihren Untersuchungen zur Echinaceafütterung bei Ferkeln zeigen konnte, dass bereits ein 5 %iger Echinaceazusatz im Futter zu einem negativen Geschmackseinfluss und so zu verminderter Futteraufnahme führen kann. Abhängig vom geschätzten Gewicht der Pferde ergab sich eine täglich verabreichte Pelletmenge zwischen 150 g und 300 g pro Pferd. Diese Mengen konnten der täglichen Kraftfütterration gut zugesetzt werden und wurden von den Pferden problemlos aufgenommen.

5.1 Beurteilung des Allgemeinzustand und der Blutparameter

Die Allgemeinuntersuchung mit zusätzlicher Kontrolle der Darmmotorik wurde durchgeführt, um den klinischen Gesundheitszustand der Pferde während des Versuchs zu dokumentieren. Die Auskultation der Darmgeräusche sollte insbesondere vor dem Hintergrund möglicher Veränderungen der Darmmotorik durch pflanzliche Wirkstoffe, welche die nervale und/oder

motorische Aktivität des Darms verändern könnten, und der dadurch erhöhten Kolikgefahr für die Tiere gesehen werden.

Das Allgemeinbefinden der einbezogenen Pferde konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt als ungestört beurteilt werden. Die wenigen signifikanten Schwankungen der statistisch ausgewerteten Parameter Atmung, Temperatur und Pulsfrequenz in der Echinaceagruppe und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Gruppen gaben keine Hinweise auf einen positiven oder negativen Einfluss der Echinaceafütterung (s. Kap. 4.1.1-4.1.3). Ähnlich ist auch der Einfluss auf die Darmmotorik zu beurteilen. Zwar ergab sich in der Echinaceagruppe hier ein signifikanter Abfall von Tag 10 zu Tag 21 und ein erneuter Anstieg an Tag 28 in der Beurteilung des linken oberen abdominalen Quadranten (Hungergrube; s. Kap. 4.1.4), insgesamt betrachtet handelte es sich aber um eine geringfügige Schwankung in einem einzelnen Quadranten. Da das Allgemeinbefinden insgesamt ungestört war und die Darmgeräusche der anderen abdominalen Quadranten ebenfalls zu allen Untersuchungszeitpunkten regelmäßig weder verstärkt noch vermindert waren, kann hiervon kaum ein negativer Einfluss durch die Echinaceafütterung abgeleitet werden. Allerdings konnte durch die Zufütterung der oberirdischen Pflanzenteile von *E. purpurea* (pelletiert) auch keine objektive Verbesserung des klinischen Gesundheitszustandes erzielt werden. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen der Untersuchungen von ROTH-MAIER et al. (2001) überein. Die Autoren untersuchten dabei die Wirkung der oberirdischen Pflanzenteile von *E. purpurea* (pelletiert) auf Leistungsparameter und den Gesundheitszustand von Mastkühen und Aufzuchtferkeln. Während sich im Ferkelversuch tendenzielle Verbesserungen der Wachstumsleistungen abzeichneten, konnte der insgesamt hohe Gesundheitsstatus weder im Broiler-, noch im Ferkelversuch durch die Echinaceafütterung beeinflusst werden.

Neben der Bestimmung des Allgemeinbefindens durch eine allgemeine Untersuchung wurde der Gesundheitszustand auch labordiagnostisch anhand eines großen Blutbildes erfasst. Alle teilnehmenden Tiere wiesen zu jedem untersuchten Zeitpunkt Werte innerhalb der physiologischen Normbereiche auf. Dieses Ergebnis bestätigt den bereits in der allgemeinen klinischen Untersuchung festgestellten guten Gesundheitszustand der Tiere. In den Untersuchungen an Pferden von O'NEILL et al. (2002) stellten die Autoren, nach oraler Verabreichung eines *E. angustifolia*-Extraktes über 42 Tage, eine Vergrößerung und Vermehrung der Erythrozyten fest. Diese Ergebnisse konnten in den eigenen Untersuchungen mit *E. purpurea* nicht bestätigt werden. Die Erythrozytenzahlen blieben während des

Versuches unverändert, stets im physiologischen Bereich und ohne Schwankungen im Verlauf sowie zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe (s. Kap. 4.1.5). Eine Zunahme des mittleren korpuskulären Erythrozytenvolumens (MCV) konnte in den eigenen Versuchen ebenfalls nicht bestätigt werden. Die geringfügigen Schwankungen im MCV-Verlauf des Versuchs lassen keinen gesicherten Rückschluss auf einen Einfluss der Echinaceafütterung zu, da sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe ergaben (s. Kap. 4.1.5). Ergänzt werden diese Feststellungen durch die Ergebnisse der Hämatokrit-Bestimmungen, die weder im Verlauf noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede aufwiesen. O'NEILL et al. (2002) beschreiben in der genannten Studie weiterhin eine gesteigerte Hämoglobinkonzentration im Vollblut sowie einen erhöhten mittleren korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH). In den eigenen Untersuchungen gibt es keinerlei Hinweise auf derartige Einflüsse der Echinaceafütterung. Ein signifikanter Anstieg der Hämoglobinwerte im Vollblut zwischen Tag 28 und Tag 35 kann kaum als Effekt der Echinaceafütterung gedeutet werden, da er sowohl in der Echinacea- als auch in der Kontrollgruppe festgestellt wurde (s. Kap. 4.1.5). Auch die Parameter mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) stiegen zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen signifikant an. Diese Schwankungen könnten möglicherweise auf die Impfung an Tag 21 zurückgeführt werden. Insgesamt war das Ausmaß der festgestellten Unterschiede jedoch gering. Zudem konnten für den MCH und die MCHC bereits zu früheren Zeitpunkten ebenfalls signifikante Schwankungen ermittelt werden (s. Kap. 4.1.5, Tab. 6, Tab. 7), so dass ein Einfluss der Impfung auf die Hämoglobinwerte unwahrscheinlich bleibt. Zwischen den Gruppen ergaben sich für diese Parameter zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Dies macht wiederum deutlich, dass die festgestellten Schwankungen des MCH und der MCHC nicht auf eine Wirkung von Echinacea zurückzuführen sein sollten. Im weißen Blutbild konnten O'NEILL et al. (2002) eine Erhöhung der peripheren Lymphozytenzahl zeigen. Dieses Ergebnis konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Zwar ergaben sich, bezogen auf Tag 0, an Tag 70 höhere Lymphozytenzahlen in der Echinaceagruppe. Dies kann aber nur schwer als Nachweis einer Echinacea-Wirkung angenommen werden, da die Zufütterung der Echinaceapellets nur bis Tag 35 erfolgte und sich zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe keinerlei signifikante Unterschiede zeigten (s. Kap. 4.1.5). Auch GERHARDS (1995) konnte in seinen Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Echinacea-Dilutionen sowie von Echinacea compositum[®] auf die Lymphozyten bei Pferden keine Wirkung feststellen. Hingegen zeigten CUNDELL et al. (2003) Einflüsse von Echinacea (oberflächliche

Pflanzenanteile) auf das weiße Blutbild von Ratten. Die Tiere wiesen erhöhte Zellzahlen und ein verändertes Differentialblutbild auf. Dabei stiegen die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) an, im Gegenzug verringerte sich der Anteil der Granulozyten. Diese Erkenntnisse konnten in der vorliegenden Arbeit für Pferde nicht bestätigt werden. Die Monozytenzahlen in der Echinaceagruppe stiegen zwar von Tag 21 zu Tag 28 und von Tag 0 zu Tag 70 an (s. Kap. 4.1.5). Da sich aber auch in der Kontrollgruppe Schwankungen im Verlauf ergaben und die Gruppen zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede untereinander aufwiesen (s. Kap. 4.1.5), lässt dies keine gesicherten Rückschlüsse auf eine Echinacea-Wirkung auf die Monozyten zu. Die Granulozytenzahlen zeigten ebenfalls keine Veränderungen, die durch die Echinaceafütterung bedingt sein sollten. In der Echinaceagruppe stiegen die Granulozytenzahlen zwischen Tag 10 und Tag 21 an, während sich in der Kontrollgruppe im Versuchsverlauf abfallende Werte ergaben (s. Kap. 4.1.5). Aber auch hier traten bei keiner Untersuchung zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede auf, so dass hier kein deutlicher Hinweis auf einen möglichen Effekt durch Echinaceafütterung vorliegt. Leider machen die Autoren CUNDELL et al. (2003) keine Aussage darüber welche Echinacea-Art sie in ihren Untersuchungen (s.o.) einsetzten. Deshalb kann nicht geklärt werden, ob die zur vorliegenden Studie unterschiedlichen Ergebnisse, abgesehen von den verschiedenen eingesetzten Tierarten, möglicherweise in der Wahl einer anderen Echinacea-Art begründet sein könnten. Einflüsse einer Echinaceafütterung auf die Thrombozytenzahlen (PLT) und das Thrombozytenvolumen (MPV) wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Da sich in den eigenen Untersuchungen keine Signifikanzen zwischen den Gruppen bezüglich der Thrombozytenzahlen ergaben, können der Anstieg zwischen Tag 10 und Tag 21 in beiden Gruppen und der Abfall von Tag 28 zu Tag 35 nur in der Kontrollgruppe (s. Kap. 4.1.5) keinen Hinweis auf einen möglichen Echinacea-Einfluss bieten. Das signifikant höhere (s. Kap. 4.1.5) mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) der Echinaceagruppe an Tag 70 sollte ebenfalls keinen Echinacea-Einfluss darstellen, da die Echinaceafütterung nur bis Tag 35 erfolgte und sich keine weiteren Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben.

Somit konnte in den vorliegenden Untersuchungen kein nachweislicher Effekt durch die Fütterung von Pellets aus *E. purpurea*, weder in positiver noch negativer Hinsicht, auf den Allgemeinzustand und das Blutbild von Pferden festgestellt werden.

5.2 Beurteilung der Plasmakortisol-Konzentration

Beim Pferd wird Plasmakortisol als guter Indikator für die adrenokortikale Funktion angesehen, da es den größten Anteil der zirkulierenden Steroide beim Pferd ausmacht (MASSOCO und PALERMO-NETO, 2003). In Untersuchungen zum Stressgeschehen konnte gezeigt werden, dass der Kortisolspiegel unter Einwirkung eines Stressors ansteigt (MASON, 1974). Bei der Interpretation von Veränderungen im Plasmakortisolspiegel müssen jedoch die zirkadiane Rhythmik und episodische Sekretion berücksichtigt werden, die zu erheblichen Schwankungen der Werte im Tagesverlauf führen (IRVINE und ALEXANDER, 1994). Zusätzlich wird die Kortisolkonzentration von körperlicher Anstrengung und dem Grad der Adaption an Umgebung und Tagesablauf beeinflusst (IRVINE und ALEXANDER, 1994; KRZYWANNEK, 1999). Normalerweise treten bei Säugetieren die Höchstkonzentrationen morgens (zwischen 3.00 und 8.00 Uhr) und die geringsten Konzentrationen abends (zwischen 18.00 und 24.00 Uhr) auf (SANDNER, 1987). Um vergleichbare Werte zu erhalten wurden daher bei der eigenen Untersuchung die Blutentnahmen immer in etwa zum gleichen Zeitpunkt (bis 10 Uhr morgens) durchgeführt. Dies sollte den zeitlichen Einfluss auf die Kortisolwerte möglichst gering halten.

In der vorliegenden Studie wurden gemittelte Werte zwischen $110,74 \pm 4,97$ nmol/l und $180,92 \pm 27,40$ nmol/l bestimmt. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur angegebenen physiologischen Normwerten (100-200 nmol/l; KRZYWANNEK, 1999).

Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede von Tag 10 bis Tag 70 (s. Kap. 4.2) festgestellt. Warum in der Kontrollgruppe zu Versuchsbeginn (Tag 0) niedrigere Werte als in der Echinaceagruppe festgestellt wurden kann nicht geklärt werden (s. Kap. 4.2). Gegen Tag 21 sanken die Werte in beiden Gruppen ab (s. Kap. 4.2). Insgesamt betrachtet handelt es sich hierbei aber um vergleichsweise geringe Schwankungen, die vermutlich individueller Natur sind. Möglicherweise fand im Laufe des Versuchs auch eine Gewöhnung an das Prozedere der Untersuchung und Blutentnahme bei den einzelnen Tieren statt. Dies könnte ebenfalls zu den niedrigeren Werten im Versuchsablauf geführt haben. Ein Einfluss durch die Echinaceafütterung erscheint mangels Gruppenunterschiede hier nicht wahrscheinlich. Dies entspricht auch den Ergebnissen von LANG (2004), die in ihren Untersuchungen zur Echinaceafütterung bei Absatzferkeln keinen Einfluss auf den Kortisolspiegel der Tiere nachweisen konnte. Weitere Erkenntnisse zum Einfluss von Echinacea auf das Stressgeschehen bei Tieren finden sich in der Literatur bisher nicht. Da sich

auch nach der Tollwutimpfung (Tag 21) keine auffälligen Veränderungen im Plasmakortisolspiegel zeigten, scheint auch diese keinerlei Einfluss hierauf auszuüben.

In der vorliegenden Untersuchung konnte keine Wirkung von *E. purpurea* auf die Kortisolkonzentration im Plasma der Pferde gezeigt werden.

5.3 Beurteilung des Immunstatus von Pferden

Das Untersuchungsziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die Fütterung der oberirdischen Pflanzenteile (pelletiert) von *E. purpurea* einen verbesserten Immunstatus der Pferde zur Folge hat.

5.3.1 Beurteilung des Immunstatus anhand von Respiratory Burst und antioxidativer Kapazität im Plasma

Die **Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten** wurde in der vorliegenden Arbeit bei jeweils zehn Pferden der Kontroll- und Echinaceagruppe bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten an den Tagen 0, 21 und 35, also einmal vor Beginn der Echinaceafütterung und einmal jeweils vor und nach der Tollwutimpfung während Echinacea- bzw. Placebofütterung. Die Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten dient der Bestimmung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion. Zur extrazellulären Freisetzung solcher Oxidantien kommt es beispielsweise bei inflammatorischen Prozessen (ROTHER et al., 1992). Ein erhöhter Voraktivierungszustand der Granulozyten wäre gekennzeichnet durch eine gesteigerte Freisetzung von Oxidantien auf einen gering-potenten Stimulus, wie er durch das Bakterienpeptid FMLP hervorgerufen wird (ROTHER et al., 1992). Ob der Aktivierungszustand der Granulozyten durch eine Echinaceafütterung zu beeinflussen ist, sollte durch die Messung der Respiratory-Burst-Aktivität in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden. In der Literatur gibt es bislang wenige Angaben zur Respiratory-Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten bei Pferden. FÖRSTER (1991) führte durchflusszytometrische Untersuchungen an equinen und humanen polymorphkernigen Blutleukozyten durch. Unter anderem beschäftigte er sich mit Virusphagozytose und Respiratory-Burst-Aktivität. Der Autor gibt die mittlere Fluoreszenzintensität der

Grundreaktion von equinen neutrophilen Granulozyten zwischen 2,1 und 4,2 an. Diese Ergebnisse liegen unter den in den eigenen Untersuchungen festgestellten Werten (5,32-15,7; s. Kap. 4.3.1). Allerdings beziehen sich die Angaben von FÖRSTER (1991) in diesem Punkt lediglich auf drei Tiere. SCHUBERTH et al. (2002) untersuchten die Effekte von EquiMun[®] (ein Kombinationspräparat aus *E. purpurea*, *Thuja occidentalis* und elementarem Phosphor) auf bovine Leukozyten. Vor den durchflusszytometrischen Bestimmungen wurden die entsprechenden Zellen bis zu 44 h mit der jeweiligen Testsubstanz kultiviert. Die Autoren konnten zeigen, dass die spontane (Leerwert ohne weitere Stimulation) Respiratory-Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten unter Phosphor- oder EquiMun[®]-Einfluss zunahm. Einen abschwächenden Effekt auf die Respiratory-Burst-Aktivität durch EquiMun[®] stellten sie für die PMA Reaktion fest. In den eigenen Untersuchungen lieferten die Stimulation mit FMLP, wie auch die Maximalstimulation (PMA) und Grundreaktionen (Leerwerte), keine unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zwischen der Echinacea- und Kontrollgruppe (s. Kap. 4.3.1 und Abb. 6). Im Versuchsverlauf wurde aber für beide Gruppen in allen drei Versuchsansätzen ein Abfallen der mittleren Fluoreszenzintensität beobachtet. So zeigten sich signifikant niedrigere Werte jeweils für Tag 35, verglichen mit Tag 0 (s. Kap. 4.3.1). In der Grundreaktion (Leerwert) wiesen beide Gruppen auch zwischen Tag 21 und Tag 35 einen signifikanten Abfall der Respiratory-Burst-Aktivität auf (s. Kap. 4.3.1). Hier ließe sich ein Zusammenhang mit der an Tag 21 erfolgten Impfung vermuten. Allerdings gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise auf einen abschwächenden Effekt einer Impfung auf die Sauerstoffradikalbildung der Granulozyten. Eher wäre eine Verstärkung des Respiratory Burst zu erwarten. So zeigte FÖRSTER (1991), ganz im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, in seinen *in vitro* Untersuchungen einen stimulativen Effekt auf die Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten nach Inkubation mit verschiedenen Virusproteinen und Immunsereen. Vor diesem Hintergrund scheint es eher unwahrscheinlich, dass die Tollwutimpfung ursächlich am Abfall des Respiratory Burst im Versuchsverlauf der eigenen Studie beteiligt war. Zudem wies die Echinaceagruppe in der FMLP-Stimulation bereits an Tag 21 (also vor der Impfung) niedrigere Werte auf und auch in der PMA-stimulierten Reaktion war von Tag 0 zu Tag 21 in dieser Gruppe bereits ein tendenzieller Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität festzustellen ($p = 0,059$; s. Kap. 4.3.1). Die Ursache für die genannten Schwankungen in der vorliegenden Untersuchung kann nicht abschließend geklärt werden. Ein Zusammenhang mit der Echinaceafütterung scheint allerdings mangels signifikanter Gruppenunterschiede unwahrscheinlich.

Die Bestimmung der **antioxidativen Kapazität im Plasma** erfolgte in der vorliegenden Untersuchung an den Tagen 0, 10 und 28, also einmal vor Beginn der Echinaceafütterung und einmal jeweils vor und nach der Tollwutimpfung während Echinacea- bzw. Placebofütterung. Eine erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma könnte die Entstehung freier Radikale verhindern und somit eine präventive Wirkung gegen Erkrankungen haben (IIZUKA et al. 2004). Antioxidativ wirkende Substanzen, in Form von Kräutern, stehen vor allem im Interesse der Wissenschaft aufgrund der protektiven Wirkung auf Blut, Zellen, Gefäßwände und Lipide (IIZUKA et al., 2004). So untersuchten IIZUKA et al. (2004) die schützende Wirkung antioxidativer Rhabarberinhaltsstoffe auf LDL (Low density lipoprotein) in Kaninchenplasma. Es gelang den Autoren in ihren Untersuchungen, antioxidative Wirkstoffe im Rhabarberkraut zu ermitteln und ihre protektive Wirkung auf LDL nachzuweisen. RININGER et al. 2000 zeigten für chemisch standardisierte Echinacea-Extrakte und *E. purpurea*-Pulver entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften. Ein Einfluss von *E. purpurea* auf die antioxidative Kapazität im Plasma von Pferden ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. In den eigenen Untersuchungen wiesen die Werte der antioxidativen Kapazität im Plasma keine signifikanten Unterschiede zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe auf (s. Kap. 4.3.2). Im Versuchsverlauf war jedoch ein deutlicher Anstieg in beiden Gruppen zu verzeichnen (s. Kap. 4.3.2). Da die Werte in Echinacea- und Kontrollgruppe gleichermaßen anstiegen, sollte hier eine Wirkung der Echinaceafütterung ausgeschlossen werden. Auch die Impfung scheint hier keinen Einfluss auszuüben, da sich der Anstieg bereits zwischen Tag 0 und Tag 10, also vor dem Impfzeitpunkt, zeigt.

Ein nachweislicher Effekt durch die Fütterung von Pellets aus *E. purpurea* auf das unspezifische Immunsystem der Pferde konnte in der vorliegenden Untersuchung weder in positiver noch negativer Hinsicht festgestellt werden.

5.3.2 Beurteilung des Immunstatus anhand von Serum IgG und der Reaktion auf eine Tollwutimpfung

Durch Messung der Immunglobulin G-Konzentrationen im Serum und der Titerausbildung auf eine Tollwutimpfung sollte das humorale Immunsystem von Pferden beurteilt werden. Erhöhte IgG-Konzentrationen würden für eine erhöhte Abwehrbereitschaft sprechen und könnten eventuell das Auftreten von Infektionskrankheiten in Zeiten erhöhter Belastung reduzieren. Eine erhöhte Abwehrbereitschaft könnte sich weiterhin auf eine Impfung positiv auswirken, da sich ein höherer Impftiter bilden könnte.

Der **Immunglobulin G**-Gehalt im Blut wird allgemein als wichtiger Parameter für eine funktionierende spezifische Abwehr gesehen. Zudem ist es das Immunglobulin, welches im Blut in der höchsten Konzentration vorliegt, und stellt somit auch einen gut messbaren Marker für das spezifische Immunsystem dar. Um eine Übersicht über die IgG-Konzentrationen im Serum der Pferde zu erhalten, wurde den Tieren an den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 Blut entnommen. In der vorliegenden Untersuchung wurden Serum IgG-Werte zwischen $17,2 \pm 0,8$ mg/ml und $26,8 \pm 2,4$ mg/ml festgestellt (s. Kap. 4.4.1). Diese Ergebnisse entsprechen im wesentlichen dem von BOSTEDT (1999) angegebenen Normbereich für das adulte Pferd mit Werten von 25-45 mg/ml, sowie den von ERHARD et al. (2001) bei trächtigen Stuten ermittelten Serum-IgG-Werten von durchschnittlich 19 mg/ml.

Bisher fehlen in der Literatur Angaben zum Einfluss einer Echinaceafütterung auf den Serum-IgG-Gehalt bei adulten klinisch gesunden Pferden. Dies sollte in der vorliegenden Untersuchung geklärt werden. Ein signifikanter Unterschied der IgG-Konzentrationen zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen werden. Am Ende des Versuchs (Tag 70) waren die IgG-Konzentrationen in beiden Gruppen signifikant niedriger als zu Beginn (Tag 0). In der Kontrollgruppe waren erniedrigte Werte bereits ab Tag 10, in der Echinaceagruppe erst ab Tag 28 zu beobachten (s. Kap. 4.4.1). Die Veränderungen der Serum-IgG-Gehalte sollten aufgrund fehlender Gruppenunterschiede nicht durch die Echinaceafütterung bedingt sein. Dass die Werte in der Echinaceagruppe interessanterweise erst ab Tag 28 absinken, während dies in der Kontrollgruppe schon ab Tag 10 zu beobachten ist, könnte möglicherweise auf eine veränderte Reaktion auf einen Umwelteinfluss hindeuten. Die Impfung kommt hier als möglicher Faktor zwar ebenfalls in Betracht, allerdings wurde sie erst an Tag 21, also bereits

nachdem die Werte in der Kontrollgruppe abgesunken waren, vorgenommen. Somit kann die Tollwutimpfung hinsichtlich der festgestellten Veränderungen im IgG-Verlauf zumindest nicht als alleiniger Auslöser betrachtet werden. Da der Versuch innerhalb einer Jahreszeit durchgeführt wurde und die einbezogenen Tiere zum Teil geographisch getrennt untergebracht waren, bleibt auch ein übergreifend starker Umwelteinfluss unwahrscheinlich. Untersuchungen zum IgG-Verlauf unter Echinaceafütterung bei Jungtieren führten LANG (2004) und HEMPEL (2002) durch. Bei Absatzferkeln konnte durch eine 1 %ige sowie 5 %ige Futterbeimischung von *E. purpurea* (getrocknete oberirdische Pflanzenanteile) der IgG-Verlauf jedoch nicht beeinflusst werden (LANG, 2004). HEMPEL (2002) untersuchte den Immunglobulin-G-Status bei neugeborenen Kaninchen in einem Fütterungsversuch mit einer Echinacea-Grünmehl-Mischung. Durch Echinacea konnte der IgG-Status nur in geringem Umfang und nur zu bestimmten Zeitpunkten beeinflusst werden. So waren die Serum-IgG-Konzentrationen am 14. Lebenstag in der Echinaceagruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Am 28. Lebenstag (Absetzzeitpunkt) lagen jedoch die Werte der Echinaceagruppe höher. Ab dem 42. Lebenstag gab es keine Unterschiede mehr in der Entwicklung der IgG-Konzentrationen. Die IgG-Konzentrationen im Serum der Kaninchen konnten somit durch Echinacea beeinflusst werden. Ein positiver Effekt auf die Erkrankungsrate an Enterokolitis nach dem Absetzen ergab sich daraus jedoch nicht. Die Verluste waren in der Echinaceagruppe sogar höher als in der Kontrollgruppe (HEMPEL, 2002). In den eigenen Untersuchungen konnte kein positiver Effekt auf die IgG-Werte im Serum nachgewiesen werden. Nachteilige Wirkungen zeigten sich durch die Echinaceafütterung jedoch ebenso wenig.

Die **Tollwutimpfung** erfolgte in der vorliegenden Untersuchung nach dreiwöchiger Fütterung der Echinacea- bzw. Placebopellets (an Tag 21). Um die Titerbildung beurteilen zu können, wurde ein Ausgangstiter (Tag 21) sowie der Antikörpertiter zwei Wochen nach der Impfung (Tag 35) bestimmt. Das obere Detektionslimit lag dabei gemäß dem O.I.E. Manual bei 10,55 IU/ml Serum.

Die Reaktion auf ein spezifisches Antigen unter Echinacea-Einfluss ist bisher in der Literatur wenig untersucht. Die Ergebnisse der bisherigen Studien sind zudem uneinheitlich. REHMAN et al. (1999) beispielsweise applizierten Ratten ein spezifisches Antigen und bestimmten anschließend die IgG- und IgM-Gehalte des Blutes gegen das Antigen mittels

ELISA. Sie konnten zeigen, dass die IgG-Konzentration gegen das Antigen im Serum der Ratten, die *E. angustifolia*-Wurzelextrakt über das Trinkwasser verabreicht bekamen, früher anstiegen als bei unbehandelten Ratten. Eine verbesserte IgM-Antwort bei Mäusen gegen Blutzellen des Schafes konnten die Autoren FREIER et al. (2003) feststellen. Sie verabreichten oral einen *E. purpurea*-Extrakt über 4 Tage, jeweils eine Stunde nach Injektion der Blutzellen. Ähnliche Untersuchungen von ROESLER et al. (1991) mit gereinigten Echinacea-Polysacchariden konnten diesen Effekt nicht zeigen. Unbeeinflusst zeigte sich auch die Antikörperantwort von Ferkeln auf PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus). Diese erhielten über 42 Tage 2 % oder 4 % *E. purpurea*-Pulver dem Futter beigemischt (HERMANN, 2003). Auch in den eigenen Untersuchungen zeigten weder die Ausgangstiter noch die an Tag 35 gebildeten Antikörpertiter signifikante Unterschiede in der Echinacea- und Kontrollgruppe. Eine getrennte Betrachtung von Erst- und Wiederholungsimpfungen zeigte ebenfalls keine Gruppenunterschiede (s. Kap. 4.4.2). Bei dem durchgeführten Testverfahren (fluoreszierender Antikörper Virus Neutralisationstest) war allerdings mit einem Titer von 10,55 UI/ml der zu bestimmende Höchstwert (maximaler Titer) erreicht. Möglicherweise ist hier die Ursache für mangelnde Signifikanzen begründet. Andere Autoren stellten in ihren Untersuchungen zur spezifischen Antikörperproduktion sogar negative, also immunsuppressive, Effekte durch Echinacea fest. So führte die Verabreichung eines Echinacea-Extraktes über 6 Wochen bei weiblichen Ratten zu einer signifikant schlechteren spezifischen Antikörperproduktion (SOUTH und EXON, 2001). In der eigenen Untersuchung erreichten bei den Wiederholungsimpfungen in der Echinaceagruppe nur 13 von 15 Tieren den maximalen Impftiter, während dies in der Kontrollgruppe bei allen 14 Tieren der Fall war (s. Kap. 4.4.2). Da dieser Unterschied aber insgesamt nicht signifikant war und sich auch bei den Erstimpfungen keine derartige Tendenz zeigte (hier erreichten in beiden Gruppen 2 von 4 Tieren den maximalen Titer), sollte hier nicht auf einen negativen Effekt durch die Echinaceafütterung geschlossen werden. Trotzdem ist vermutlich eine längerdauernde Echinaceafütterung (> 5 Wochen) für die Pferde kaum vorteilhaft.

Letztendlich konnte durch die Echinaceafütterung weder eine positive noch negative Wirkung auf die spezifische Immunabwehr der Pferde gezeigt werden.

5.4 Schlußbetrachtung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einer Fütterung oberirdischer Pflanzenteile von *E. purpurea* auf die Gesundheit und den Immunstatus von adulten Pferden unter normalen Haltungsbedingungen zu untersuchen.

Die Allgemeinuntersuchung und das Blutbild sollten den Gesundheitszustand der Pferde erfassen. Ein möglicher Einfluss auf das Stressgeschehen sollte durch den Parameter Kortisol gezeigt werden. Um den Immunstatus der Tiere zu dokumentieren, wurden stellvertretend für die unspezifische Abwehr der Respiratory Burst der Granulozyten und die antioxidative Kapazität im Plasma herangezogen. Als wichtige Parameter der spezifischen Abwehr dienten der IgG-Gehalt im Serum sowie die Titerbildung nach einer Tollwutimpfung. Positive Effekte durch die Fütterung von *E. purpurea* auf den Gesundheitszustand und das Immunsystem könnten möglicherweise in Zeiten erhöhter Belastung eine verbesserte Reaktionslage des Organismus zur Folge haben und so beispielsweise Infektionserkrankungen vorbeugen.

Für keinen der oben genannten Parameter wurden in der vorliegenden Studie relevante Unterschiede zwischen der Echinacea- und der Kontrollgruppe ermittelt. Warum im Gegensatz hierzu in anderen Studien häufig positive Auswirkungen auf das Immunsystem durch Echinacea festgestellt werden konnten, kann verschiedene Gründe haben: Oft handelte es sich bei der eingesetzten Echinacea Art nicht um *E. purpurea* sondern um *E. angustifolia*, so beispielsweise in der Studie von O'NEILL et al. (2002). Zudem wurden meist, so auch in der genannten Untersuchung, standardisierte Extrakte aus Echinacea, recht häufig aus den Wurzeln, eingesetzt. Diese können sich hinsichtlich ihres Wirkstoffgehalts erheblich von dem in der vorliegenden Studie verwendeten getrockneten Grünschnitt unterscheiden. Studien, die Einflüsse auf einzelne Zellpopulationen nachweisen konnten, sind zudem in der Regel *in vitro* Studien. In der vorliegenden eigenen Untersuchung zur Echinaceafütterung ist dagegen nicht auszuschließen, dass es beispielsweise infolge der Verdauung zu unvollständiger Resorption der Wirkstoffe und somit nicht zu messbaren Effekten kam. Bei den meisten Veröffentlichungen klinischer Studien handelt es sich außerdem nicht, wie bei der vorliegenden Untersuchung, um placebokontrollierte Doppelblindstudien. Derartige Untersuchungen konnten bisher meist ebenfalls keine positiven Effekte durch Echinacea belegen (CARUSO und GWALTNEY, 2005).

Abschließend kann gesagt werden, dass *E. purpurea* unter den getesteten Bedingungen (Pferdehaltung im privaten Bereich, placebokontrollierte Doppelblindstudie) keine positiven aber auch keine negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand, die Kortisolkonzentration im Plasma und den Immunstatus bei adulten Pferden hat. Eine Fütterung in 2,5 %iger Konzentration über 35 Tage sollte somit unbedenklich sein. *E. purpurea* scheint jedoch auch nicht sinnbringend in der Pferdefütterung eingesetzt werden zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss einer Echinaceafütterung auf die Gesundheit und den Immunstatus von Pferden

Immunmodulatorisch wirksame Phytotherapeutika stellen eine mögliche Alternative zu generell bakterizid oder entzündungshemmenden Wirkstoffen dar. Einen nicht unwesentlichen Anteil in diesem phytotherapeutischen Bereich nimmt die Gattung Echinacea mit über 300 phytotherapeutischen oder homöopathischen Zubereitungen ein. Als Zusatzfuttermittel ist sie bereits im Pferdesektor eingeführt. Die vorliegende Arbeit sollte daher überprüfen, ob die 2,5 %ige Fütterung von Echinacea purpurea (Roter Sonnenhut) mit der täglichen Futterrationsration für die Tiere unbedenklich ist und evtl. sogar einen positiven Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitszustand, das Stressgeschehen und das Immunsystem des Pferdes nehmen kann.

In die placebokontrollierte Doppelblindstudie wurden insgesamt 37 Pferde in zwei Versuchsdurchläufen einbezogen. Die oberflächlichen Pflanzenanteile von E. purpurea in pelletierter Form wurden über 35 Tage zugefüttert. Die Dosierung betrug 2,5 % der durchschnittlich angenommenen täglichen Trockensubstanzaufnahme im Erhaltungsbedarf von 2 kg TS/100 kg LM. An den Tagen 0, 10, 21, 28, 35 und 70 wurden das Allgemeinbefinden, die Blutwerte sowie die Kortisolkonzentration im Plasma und die Immunglobulin G-Konzentration im Serum bestimmt. Zusätzlich erfolgten die Messung der Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten und die Bestimmung des antioxidativen Potentials im Plasma. Eine Tollwutschutzimpfung wurde eingesetzt, um mögliche Einflüsse auf die Ausprägung des Impftiters festzustellen.

Das Allgemeinbefinden und der Gesundheitszustand der einbezogenen Pferde konnten zu jedem untersuchten Zeitpunkt als gut beurteilt werden. Die statistisch ausgewerteten Parameter Atmung, Temperatur, Puls und Verdauung zeigten keine signifikanten Schwankungen in oder zwischen den Gruppen in Versuch und Kontrolle, welche einen Hinweis auf einen positiven oder negativen Einfluss der Echinaceafütterung geben. Für die Plasmakortisol-Konzentrationen konnte ebenfalls mangels Gruppenunterschieden ein Echinacea-Einfluss ausgeschlossen werden. Die Respiratory-Burst-Aktivität der Granulozyten wurde an den Tagen 0, 21 und 35 bei jeweils 10 Pferden aus Echinacea- und Kontrollgruppe bestimmt. Im Versuchsverlauf wurde ein Abfallen der mittleren Fluoreszenzintensität beobachtet. Zwischen Echinacea- und Kontrollgruppe ergaben sich jedoch keine signifikanten

Unterschiede. Die antioxidative Kapazität im Plasma wurde an den Tagen 0, 10 und 28 bestimmt. Sowohl in der Echinacea- als auch in der Kontrollgruppe stiegen die Werte im Versuchsverlauf an. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Immunglobulin G-Bestimmungen ergaben Serumwerte zwischen 17,15 mg/ml und 26,82 mg/ml. Während des Versuches kam es zu einer Abnahme der IgG-Konzentrationen, bezogen auf Tag 0. In der Kontrollgruppe war dies ab der zweiten Blutentnahme, in der Echinaceagruppe erst ab der vierten Blutentnahme zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich jedoch nicht. Die Tollwutvakzination erfolgte an Tag 21 der Studie. Titerbestimmungen wurden an Tag 21 und an Tag 35 durchgeführt. Die Titerausbildung unterschied sich nicht signifikant in Echinacea- und Kontrollgruppe. Auch eine getrennte Betrachtung von Erst- und Wiederholungsimpfungen zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Eine Zufütterung von 2,5% *E. purpurea* kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als unbedenklich für gesunde Pferde eingestuft werden. Allerdings sind auch keine positiven Einflüsse auf den Gesundheitszustand und das Immunsystem zu erwarten. Für keinen der oben genannten Parameter konnte unter den getesteten Bedingungen (private Pferdehaltung, placebokontrollierte Doppelblindstudie) eine positive oder negative Auswirkung durch die Echinaceafütterung gezeigt werden.

7. Summary

Efficacy of Echinacea-Supplemented Feeding on Health and Immune Status of Horses

Phytotherapeutic medication with immunomodulatory efficacy represent one possible alternative to general bactericidal or anti-inflammatory agents. The genus *Echinacea* with its more than 300 phytotherapeutic or homeopathic preparations takes up a significant part of the phytotherapeutic medication segment. It is already well-established as a feeding supplement for horses. The aim of this study is to examine whether a 2.5 percent supplement of *Echinacea Purpurea* (Purple Coneflower) in the day to day feeding of healthy horses has no adverse affects but may rather have a positive effect on the level of stress, the general health condition as well as the immune system.

The placebo-controlled double blind study included 37 horses. Aerial plant parts of *E. purpurea* were added to the feeding ration in the form of pellets over a period of 35 days. The dosage made up 2.5 percent of the estimated average daily dry matter intake based on sustenance requirements of 2 kg TS/100 kg LM. General well-being, blood results, the plasma cortisol concentration as well as the serum concentration of immune globuline G were determined on Day 0, 10, 21, 28, 35, and 70. The respiratory burst activity of granulocytes was measured as well as the plasma's anti-oxidative potential. An anti-rabies vaccination was used to detect a possible influence on the development of vaccine titer.

General well-being and health condition of the included horses rated good throughout the examinations conducted in the course of the study. The statistically evaluated parameters respiration, temperature, pulse, and digestion showed no significant fluctuations within or between comparison and control groups, which would suggest a positive or negative impact of the *Echinacea* feeding supplement. For lack of difference between groups an influence of *Echinacea* on plasma cortisol concentrations may also be ruled out. The granulocytes' respiratory burst activity was determined on Days 0, 21, and 35 for ten horses at a time from the *Echinacea*-group as well as the control group. In the course of the experiment a decline of the Median Fluorescence Intensity was observed. Still, a causal connection to the *Echinacea*-supplement could not be concluded, because tests showed no significant differences between the *Echinacea*-group and the control group. The plasma's anti-oxidative capacity was determined on Days 0, 10, and 28. In the course of the experiment, values increased in the *Echinacea*-group as well as the control group. No significant difference was detected between

the groups. Determination of immunoglobulin G fostered serum results between 17.15 mg/ml and 26.82 mg/ml. During the experiment, there was a decline in IgG-concentrations after Day 0. In the control group this became visible from the second blood sample on. In the Echinacea-group, this became visible only in the fourth and subsequent blood samples. There were however no significant differences between groups. The anti-rabies vaccination was administered on Day 21. The titer was determined on Day 21 and Day 35. Titer development did not differ between Echinacea-group and control group. A separate consideration of first and refresh vaccinations did not yield significant differences between groups either.

Concluding from the results of this study, feeding supplemented with 2.5 percent *E. purpurea* has no adverse affects on healthy horses. However, there also is no positive influence on the condition of health and immune system to be expected. It was not possible to determine a positive or negative influence of Echinacea-supplemented feeding on any of the discussed parameters under this test conditions (typical horse keeping conditions, placebo-controlled double blind study).

8. Literaturverzeichnis

- Anetzhofer J (1993). Echinacea compositum ad us. Vet. In der Therapie von Infektionskrankheiten. *Biolog Tiermed* 10:46-60
- Babior BM (1978). Oxygen-dependent microbicidal killing by phagocytes. *N Engl J Med* 298:659-666
- Babior BM (1988). The respiratory burst oxidase. *Hematol Oncol Clin North Am* 2:201-212
- Bany J, Siwicki AK, Zdanowska D, Sokolnicka I, Spopinska-Rozewsky, Kowalczyk M (2003). Echinacea purpurea stimulates cellular immunity and antibacterial defence independently of the strain of mice. *Pol J Vet Sci* 6:3-5
- Barrett BP, Brown RL, Locken K, Maberry R, Bobula JA, D'Alessio D (2002). Treatment of the Common Cold with Unrefined Echinacea. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med* 137:939-946
- Barrett BP (2003). Medicinal properties of Echinacea: a critical review. *Phytomed* 10:66-86
- Bauer R, Jurcic K, Puhmann J und Wagner H (1988). Immunologische In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten. *Arzneimittelforschung* 38:276-81
- Bauer R und Wagner H (1990). Echinacea Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. ISBN 3-8047-0999-0:9-19
- Bauer R (1994). Echinacea. Eine Arzneidroge auf dem Weg zum rationalen Phytotherapeutikum. *Dtsch Apoth Ztg* 134:18-27
- Bauer R (1997). Echinacea - Pharmaceutical quality and therapeutical value; Echinacea-pharmazeutische Qualität und therapeutischer Wert. *Z Phytother* 18:207-214
- Binns SE, Hudson J, Merali S, Arnason JT (2002). Antiviral activity of characterized extracts from echinacea spp. (Heliantheae: Astraceae) against herpes simplex virus (HSV-1). *Planta Med* 68:780-783
- Blasckek W, Döll M, Franz G (1998). Echinacea Polysaccharide. Analytische Untersuchungen an Preßsaft und am Fertigarzneimittel Echinacin®. *Z Phytother* 19:255-262. ISSN: 0722-348-X
- Bodinet C, Willigmann I and Beuscher N (1993). Host resistance increasing activity of root extracts from Echinacea species. *Planta Med* 59:A672-A673
- Bodinet C, Mentel R, Wegner U, Lindequist U, Teuscher E, Freudenstein J (2002). Effect of oral application of an immunomodulating plant extract on Influenza virus type A infection in mice. *Planta Med* 68:896-900
- Borchers AT, Keen CL, Stern JS and Gershwin ME (2000). Inflammation an Native American medicine: the role of botanicals. *Am J Clin Nutr* 72:339-347

- Bostedt H (1999). Erkrankungen des neugeborenen Fohlens. In: Olof Dietz und Bernhard Huskamp (Hrsg.) Handbuch Pferdepraxis. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. Aufl., ISBN 3-432-29262-7:150-151
- Braunig B, Dorn M und Knick E (1992). Enhancement of resistance in common cold by *Echinacea purpurea* radix. *Echinacea purpurea* radix: Zur Stärkung der körpereigenen Abwehr bei grippalen Infekten. *Z Phytother* 18:155-162
- Bukovsky M, Kostalova D, Magnusova R, Vaverkova S (1993). Testing for immunomodulating effects of ethanol-water extracts of the above-ground parts of the plants *Echinacea* (Moench) and *Rudbeckia* L. *Cesk Farm* 5:228-31
- Caruso TJ, Gwaltney JM Jr. (2005). Treatment of the common cold with *Echinacea*: a structured review. *Clin Infect Dis* 40:807-810
- Cervellati R, Renzulli C, Guerra MC, Speroni E (2002). Evaluation of Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenolic Compounds Using the Briggs–Rauscher Reaction Method. *J Agric Food Chem* 50:7504-7509
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12:564-582
- Cundell DR, Matrone MA, Ratajczak P, Pierce JD Jr. (2003). The effect of aerial parts of *Echinacea* on the circulating white cell levels and selected immune functions of the aging male Sprague-Dawley rat. *Int Immunopharmacol* 3:1041-1048
- Currier NL, Miller SC (2000). Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated. *Exp Gerontol* 35:627-639
- Da Costa RP, Carvalho H, Agricola R, Alpoim-Moreira J, Martins C, Ferreira-Dias G (2003). Peripheral blood neutrophil function and lymphocyte subpopulations in cycling mares. *Reprod Domest Anim* 38:464-469
- Deng M, Zhao JY, Tu PF, Jiang Y, Li ZB, Wang YH (2004). Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *European J of Pharmacol* 505:11-18
- Dorsch W (1996). Klinische Anwendung von Extrakten aus *Echinacea purpurea* oder *Echinacea pallida*. Kritische Wertung kontrollierter klinischer Studien; Clinical application of extracts of *Echinacea purpurea* or *Echinacea pallida*. Critical evaluation of controlled clinical studies. *Z Ärztl Fortbild (Jena)* 90:117-122
- Elsässer-Beile U, Willenbacher W, Bartsch HH, Gallati H, Schulte-Monting J and von Kleist S (1996). Cytokine production in leukocyte cultures during therapy with *Echinacea* extract. *J Clin Lab Anal* 10:441-445
- Engbers H und Wöstmann A (1986). Untersuchungen zur Stimulierung der Phagozytoseaktivität von peripheren Leukozyten durch verschiedene Dilutionen von *Echinacea angustifolia*, gemessen an der Chemilumineszenz aus dem Vollblut. *Tierärztl Umsch* 41:878-885

- Erhard M, Kellner J, Wild J, Lösch U (1994). Effect of Echinacea, Aconitum, Lachesis and Apis Extracts, and their Combinations on Phagocytosis of Human Granulocytes. *Phytother Res* 8:14-17
- Erhard M, Luft C, Remler H-P and Stangassinger M (2001). Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in newborn foals using a newly developed ELISA system. *J Anim Phys Anim Nutr* 85:164-173
- Förster RJ (1991). Durchflußzytometrische Untersuchungen bezüglich Virusphagotzytose, Phagozytose von Latexpartikeln und Respiratory-Burst-Aktivität von equinen und humanen polymorphkernigen Blutleukozyten nach in vitro Inkubation mit verschiedenen Pockenviruspräparationen. Diss. vet. med., München
- Freier DO, Wright K, Klein K, Voll D, Dabiri K, Cosulich K, George (2003). Enhancement of the humoral immune response by Echinacea purpurea in female swiss mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25: 551-560
- Gerhards C (1995). Zur Wirkung verschiedener homöopathischer Dilutionen von Echinacea angustifolia sowie Echinacea compositum[®] auf periphere Blutlymphozyten von Pferden. Diss. vet. med., Berlin
- Goel V, Chang C, Slama JV, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu TK (2002). Alkylamides of Echinacea purpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *Int Immunopharmacol* 2-3:381-387
- Hayashi I, Ohotsuki M, Suzuki I, Watanebe T (2001). Effects of oral administration of Echinacea purpurea (American herb) on incidence of spontaneous leukemia caused by recombinant leukemia viruses in AKR/J mice. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 24:10-20
- Hempel M (2002). Untersuchungen zum Immunglobulin-G Status bei neugeborenen Kaninchen und deren Häsinen unter Berücksichtigung der Verfütterung von Phytotherapeutika. Diss. vet. med., München
- Hermann JR, Honeyman MS, Zimmerman JJ, Thackert BJ, Holden PJ, Chang CC (2003). Effect of dietary Echinacea purpurea on viremia and performance in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected nursery pigs. *J Anim Sci* 81:2139-2144
- Herrmann H (1984). Immunologische Parameter als Selektionskriterium in der Tierzucht-ein Immunkompetenzprofil des Schweins., Diss., Landwirtsch. Fak., Göttingen
- Iizuka A, Iijima OT, Kondo K, Itakura H, Yoshie F, Miyamoto H, Kubo M, Higuchi M, Takeda H and Matsumiya T (2004). Evaluation of Rhubarb using antioxidative activity as an index of pharmacological usefulness. *J Ethnopharmacol* 91:89-94
- Irvine CH and Alexander SL (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest Anim Endocrinol* 11:227-38
- Kemp HE and Franco KN (2002). Possible leukopenia associated with long - term use of Echinacea. *J Am Board Fam Pract* 15:417-419

- Kryzwanek H (1999). Leistungsphysiologie: In: Olof Dietz und Bernhard Huskamp (Hrsg.) Handbuch Pferdepraxis. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. Aufl., ISBN 3-432-29262-7:50-51
- Lang E (2004). Einfluss einer Echinaceafütterung auf Immunstatus und Verhalten bei Ferkeln in den ersten Lebenswochen. Diss. vet. med., München
- Luettig B, Steinmüller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1989). Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. J Natl. Cancer Inst 9:669-75
- Madaus AG (1997). Echinacin® Madaus. Pflanzliches Arzneimittel zur Stärkung der Immunabwehr. Eine wissenschaftliche Informationsbroschüre:16-23
- Mason JW (1974). Specificity in the organisation of neuroendocrine response profiles. In: Seemann P und Brown G (Hrsg.): Frontiers in Neurology and Neuroscience Research. Univ. of Toronto:68-80
- Massoco C, Palermo-Neto J (2003). Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. Vet Immuno Immunopatho 95:11-19
- May T (1994). Bericht aus der Praxis: Behandlung chronischer Bronchitiden beim Pferd mit *Mucosa compositum* und *Echinacea compositum*. Biolog Tiermed 11:93-97
- Mayr A (1994). Krankheiten der Atmungsorgane. In: Olof Dietz und Bernhard Huskamp (Hrsg.) Handbuch Pferdepraxis. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. Aufl., ISBN 3-432-29262-7:361
- McGregor RL (1968). The Taxonomy of the Genus *Echinacea* (Compositae). The University of Kansas Science Bulletin 48:113-142
- Mengs U, Clare CB, Poiley JA (1991). Toxicity of *Echinacea purpurea*. Acute, subacute and genotoxicity studies. Arzneimittelforschung 10:1076-81
- Miller LG (1998). Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. Arch Intern Med 158:2200-2211
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Letters 284:240-242
- O'Neill W, McKee S, Clarke AF (2002). Immunological and haematologic consequences of feeding a standardised *Echinacea* (*Echinacea angustifolia*) extract to healthy horses. Equine Vet J 3:222-227
- Perry NB, Van Klink JW, Burgess EJ und Parmeter GA (2000). Alkamide levels in *Echinacea purpurea*: Effects of processing, drying and storage. Planta Med 66:54-56
- Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ (2000). The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. Res Vet Sci 68:249-253

- Raso GM, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R (2002). In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *J Pharm Pharmacol* 10:1379-1383
- Rehman J, Dillow JM, Carter SM, Chou J, Lee B and Maisel AS (1999). Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following in vivo treatment with medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*. *Immunol Lett* 68:391-395
- Reichling J, Fitzi J, Furst-Jucker J, Bucher S, Saller R (2003). *Echinacea* powder: Treatment for canine chronic and seasonal upper respiratory tract infections. *Echinacea Pulver: Behandlung bei Hunden mit chronischen und saisonal bedingten Infektionen der oberen Atemwege*. *Schweiz Arch Tierheilkd* 145:223-31
- Rinninger JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z (2000). Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 4:503-510
- Robson PJ, Alston TD, Myburgh KH (2003). Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80km endurance race. *Equine Vet J* 35:133-7
- Roesler J, Steinmueller C, Kiderlein A, Emmendoerffer A, Wagner H and Lohmann-Matthes ML (1991). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Lysteria monocytogenes* and *Candida albicans*. *Int J Immunopharmacol* 13:27-38
- Roitt IM, Brostoff D und Male K (1991). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.. ISBN 3137021030:2
- Roth R (1993). Phytotherapeutic agents of the future: *Viscum album*, *Thuja occidentalis* and *Echinacea angustifolia*; *Phytotherapeutika der Zukunft: Viscum album, Thuja occidentalis und Echinacea angustifolia*. *Dtsch Z Onkol* 25:102-104
- Rothe G, Kellermann W, Schaerer B, Valet G (1992). Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion von Granulozyten und Monozyten mit Dihydrorhodamin 123. Testbeschreibung Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; Institut für Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, München
- Roth-Maier DA, Maaß N, Paulicks BR (2001). First Results on the use of *Echinacea* - Cobs (*Echinacea Purpurea*) in animal feeding. Symposium Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. Verant.: Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften
- Rushen J (1986). Some problems with the physiological concept of "stress". *Austr Vet J* 63:359-361
- Sandner N (1987). Tracerkinetische Untersuchungen zur Glukokortikoid-Wirkung auf den Glukosestoffwechsel von Zwergziegen. Diss. vet. med., München

- Satoshi M, Kiyoto S, Hiroe M, Makoto I, Takenori Y, Torao I, Yeunhwa G (2004). Antioxidant and Immuno-Enhancing Effects of *Echinacea purpurea*. *Biol Pharm Bull* 27:1004-1009
- Schuberth H-J, Riedel-Caspari G, Leibold W (2002). Flow cytometric testing of immunological effects of a phytomedicinal combination (EquiMun) and its compounds on bovine leucocytes. *J Vet Med* 49:291-298
- Schumacher A, Friedberg KD (1991). The effect of *Echinacea angustifolia* on non-specific cellular immunity in the mouse. *Arzneimittelforschung* 41:141-147
- Skaudickas D, Kondrotas AJ, Baltrusaitis K, Vaitiekaitis G (2003). Effect of *Echinacea* (*Echinacea Purpurea* L. Moench) preparations on experimental prostate gland. *Medic* 8:761-766
- South EH, Exon JH (2001). Multiple immune functions in rats fed *Echinacea* extracts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23:411-421
- Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1984). Macrophage activation and introduction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect Immun* 3:845-849
- Strey A (1996). Immunpharmaka. In: Frey H.H. und W. Löscher (Hrsg.), *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ISBN 3777317977:612-621
- Stuart DL and Wills RBH (2003). Effect of drying temperature on alkylamide and cichoric acid concentrations of *Echinacea purpurea*. *J Agric Food Chem* 51:1608-1610
- Sun LZ, Currier NL, Miller SC (1999). The American coneflower: a prophylactic role involving nonspecific immunity. *J Altern Complement Med* 5:437-446
- Sur SV, Tuljupa FM, Sur LI (1991). Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal of plants. *J Chromatogr* 542:451-458
- Taylor JA, Weber W, Standish L, Quinn H, Goesling J, McGann M, Calabrese C (2003). Efficacy and safety of *Echinacea* in treating upper respiratory tract infections in children. *Jama* 290:2824-2830
- Toutain PL, Oukessou M, Autefage A, Alvinerie M (1988). Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domest Anim Endocrinol* 5:55-59
- Tubaro A, Tragni E, Del Negro P, Galli CL, Della Loggia R (1987). Anti-inflammatory activity of a polysaccharidic fraction of *Echinacea*. *J Pharm Pharmacol* 7:567-569
- Wacker A und Hilbig G (1978). Virushemmung mit *Echinacea purpurea*. *Planta Med* 33:89-102
- Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, Jurcic K, Le Turdu M und Fang JN (1985). Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen. *Drug Res* 35:1069-1075

Wagner H (1986). Immunstimulantien und Phytotherapeutika. Z Phytother 7:91-98

Wagner H (1990). Echinacea immunostimulation. Immunstimulation durch Echinacea. Ars Med 80:294-299

Wagner H, Jurcic K (1991). Immunologic studies of plant combination preparations. In-vitro and in-vivo studies on the stimulation of phagocytosis. Arzneimittelforschung 10:1072-6

Warko G, Bostedt H (1993). The development of the IgG concentration in the blood of newborn foals. Tierärztl Prax 21:528-35

Wills RBH, Stuart DL (2000). Effect of handling and storage on alkalylamides and cichoric acid in Echinacea purpurea. J Science Food Agricul 80:1402-1406

9. ANHANG

Anhang 1: Einverständniserklärung der Pferdebesitzer

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG zur Teilnahme am Versuch "Echinaceafütterung beim Pferd"

Liebe/r Besitzer/in!

Sie haben sich bereits mündlich damit einverstanden erklärt, Ihr Pferd an der Studie "Echinaceafütterung beim Pferd" teilnehmen zu lassen. Aus tierschutzrechtlichen Gründen (Versuchsdokumentation) ist zusätzlich eine schriftliche Einverständniserklärung notwendig. Nachfolgend finden Sie eine kurze Beschreibung des Versuchsablaufs.

Drei Wochen vor dem eigentlichen Beginn der Studie werden alle teilnehmenden Pferde entwurmt (Präparat: Ivo-mec). Im Anschluss an diese dreiwöchige Vorlaufzeit erhalten die Tiere über 35 Tage (fünf Wochen), entsprechend ihres Gewichtes, täglich eine bestimmte Menge an Echinacea- oder Placebo-Pellets. Die Einteilung Ihres Pferdes in die Versuchsgruppe (Echinacea-Pellets) oder in die Kontrollgruppe (Placebo-Pellets) erfolgt per Losverfahren und ist nur dem Versuchsleiter, nicht aber den versuchsdurchführenden Personen bekannt. 3 Wochen nach Start der Pelletfütterung werden alle Pferde Tollwut-schutzgeimpft. Im Verlauf der Studie werden pro Pferd 6 Blutproben entnommen. Die Gesamtdauer des Versuchs beträgt 13 Wochen und endet mit der letzten Blutentnahme am Tag 92. Die Blutentnahme erfolgt aus der Drosselvene (Vena jugularis externa).

Bitte nehmen Sie zur Kenntnis, dass eine völlige Risikofreiheit des Versuches nicht garantiert werden kann und dass Komplikationen, z.B. eine Venenentzündung (Thrombophlebitis) infolge einer Blutentnahme, theoretisch möglich sind. Das Entwurmungspräparat, der Tollwut-Impfstoff sowie die Echinacea- oder Placebo-Pellets werden vom Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene der LMU München für diesen Versuch zur Verfügung gestellt.

Falls die teilnehmenden Pferde zur **Schlachtung** vorgesehen sind, darf dies nicht vor Ablauf einer **Wartezeit von 28 Tagen** nach Beendigung der Fütterung mit Echinacea-Pellets erfolgen. Alle im Laufe der Untersuchung erhobenen Daten bezüglich der Pferde werden vertraulich behandelt. Die Veröffentlichung der Ergebnisse ist im Rahmen einer Dissertation und in einer Fachzeitschrift geplant.

Mit nachfolgender Unterschrift erklären Sie sich einverstanden, dass Ihr Pferd/Ihre Pferde an der oben beschriebenen Studie teilnimmt/teilnehmen. Sie haben die Möglichkeit, Ihre Einverständniserklärung jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückzuziehen.

Zur Kenntnis genommen, am _____ Unterschrift: _____

Name, Anschrift des Besitzers: _____

Name des/der Pferde(s), Stall: _____

Anhang 2: Chemikalien zur Bestimmung des Respiratory Burst

Ficoll-Paque TM Plus, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsula, Sweden, 17-1440-03

Dimethylformamid (DMF), Aldrich-Chemie, Steinheim, 27,054-7

Rosewell Park Memorial Institute Zellkulturmedium (RPMI) 1640 + GlutaMaxTM, Invitrogen life technologies, 61870-010

Dihydrorhodamin (DHR) 123, Becton Dickinson, Heidelberg, D 632

Phorbol 12-mystrate 13-acetate (PMA), Fa. Sigma Deisenhofen, P 8139

N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP), Fa. Sigma, Deisenhofen, F 3506

Propidium-iodide (PI), Fa. Serva Heidelberg, 33671

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer): wie für ELISA

Anhang 3: Chemikalien zur Messung der antioxidativen Kapazität im Plasma

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, A-1888

Manganese Dioxide (MnO₂), Activated, Fa. Sigma, M-1656

Vitamin C, L-Ascorbic Acid, Fa. Sigma, A-1417

PBS-Puffer:**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 5 mM pH 7,4**

1,79g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

0,66g Natriumhydrogenphosphat

9,00g Natriumchlorid

ad 1000ml Aqua bidest.

(Soweit nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen)

*Anhang 4: Puffer und Lösungen zur Durchführung des ELISA***Beschichtungspuffer: Carbonatpuffer pH 9,6**

3,11g Natriumcarbonat
6,00g Natriumhydrogencarbonat
ad 1000ml Aqua bidest.

PBS-Puffer: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,2

8,00g Natriumchlorid
1,45g Dinatriumhydrogenphosphat
0,20g Kaliumchlorid
0,20g Kaliumhydrogenphosphat

Zur Herstellung von PBS-Tween (pH 7,2) wurde zusätzlich 500µl Tween 20 zugesetzt.

Waschpuffer: PBS-Tween**TMB-Puffer: Natriumacetat-Citrat Puffer pH 5,0**

8,20g Natriumacetat
3,15g Zitronensäure-Monohydrat
ad 1000ml Aqua bidest.

TMB-Stammlösung: 0,06g TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Sigma, Deisenhofen)
ad 10ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. AppliChem, Darmstadt)

Substratlösung: 332µl TMB-Stammlösung
3,00µl 30% H₂O₂
10ml TMB-Puffer

Stoppreagenz: 1-molare Schwefelsäure pH 1

472ml Aqua bidest.
28ml 96%ige Schwefelsäure

Gelatinelösung: 0,5% Gelatine (Fa. Serva GmbH, Heidelberg) in PBS pH 7,2

(soweit nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von Fa. Merck, Darmstadt bezogen)

Danksagung

Herrn Professor Dr. M. Erhard gilt mein besonderer Dank für sein Interesse an dem Dissertationsthema, die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung in jeder Phase der Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. F. Ahrens für die stets freundliche und hilfsbereite Betreuung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch Herrn Prof. Dr. Göbel und Herrn Dr. Storer, sowie deren Labormitarbeitern/innen sei für die besonders freundliche und großzügige Zusammenarbeit gedankt.

Für die Durchführung der Antikörpertiterbestimmung gilt dem Referenzlabor von Herrn Prof. Diel, Gießen, ebenfalls besonderer Dank.

Danken möchte ich zudem den Laboranten Frau N. Zobel, Herrn H. Kuchler und Herrn L. Matchull, so wie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die immer freundliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima bei den Laborarbeiten.

Besonderer Dank gilt außerdem Herrn Franz Beck, Heinrichshofen, und Herrn Walter Sturm, Berghof-Kräuter GmbH, Heilsbronn, für die großzügige Überlassung der eingesetzten Echinacea- und Placebo-Pellets.

Ganz herzlich danke ich allen Pferdebesitzern die mir freundlicherweise ihre Tiere für diese Studie zur Verfügung gestellt haben. Besonders danke ich Frau Dr. M. Herzog und Frau S. Römmich für ihre Hilfe bei den Probenentnahmen.

Meinen Eltern danke ich außerordentlich für die großzügige Förderung meiner Ausbildung und die immerwährende Unterstützung, die wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen hat.

Recht herzlich gedankt sei allen Freunden für ihre ehrliche Anteilnahme, Ratschläge und das Korrekturlesen.

Besonders danke ich auch meinem Lebensgefährten P. Mertens für die immer fortwährende moralische Unterstützung und den häufigen Ansporn besonders in schwierigen Phasen der Arbeit.

