

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Neuer Therapieansatz zur Behandlung der COB des Pferdes durch Immunstimulation von BAL-Zellen mit verschiedenen CpG- Klassen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
John Karl Kurt Klier
aus Rosenheim

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gehlen

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Göbel
Univ.-Prof. Dr. Ammer
Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Univ.-Prof. Dr. Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

*Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die H. Wilhelm Schauman Stiftung
(Hamburg, Deutschland).*

In gratissimam memoriam Leila, Bonito, Judy, Rouge & Spocky

Salus mea in vos

Teile dieser Dissertation wurden von Herrn John Klier im Rahmen der

21. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,
Fachgruppe Pferdekrankheiten, vom 12.-13. März 2010 unter dem Titel:

**„Immunstimulation von BAL-Zellen mit verschiedenen CpG-Klassen bei
Pferden mit COB“**

vorgetragen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
I EINLEITUNG	1
II LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. CHRONISCHE ATEMWEGSERKRANKUNGEN DES MENSCHEN	3
1.1 <i>Humanes Asthma bronchiale</i>	3
1.2 <i>Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)</i>	4
2. CHRONISCHE ATEMWEGSERKRANKUNGEN DES PFERDES	4
2.1 <i>Chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes</i>	4
2.1.1 Begriffsbestimmung.....	4
2.1.2 Pathogenese der COB	5
2.1.3 Erbllichkeit der COB.....	8
2.1.4 Immunologie der COB.....	9
2.1.5 Konventionelle Therapieverfahren der COB.....	12
2.2 <i>Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD)</i>	14
2.3 <i>Inflammatory airway disease (IAD)</i>	15
3. CYTOSIN-PHOSPHAT-GUANIN-OLIGODEOXYNUKLEOTIDE (CpG-ODN).....	17
3.1 <i>Immunstimulatorische DNA</i>	17
3.2 <i>CpG-Klassen</i>	19
3.3 <i>Immunologie der CpG-ODN</i>	21
3.4 <i>Toll-like Rezeptoren</i>	24
3.5 <i>Bedeutung des Zuckerrückgrates auf die TLR-Aktivierung</i>	25
3.6 <i>Molekularer Mechanismus der CpG-Signaltransduktion</i>	27
3.7 <i>In vitro-Einsatz von CpG-ODN</i>	29
3.8 <i>In vivo-Einsatz von CpG-ODN</i>	29
3.8.1 <i>Vakzinestudien mit CpG-ODN</i>	29
3.8.2 <i>Allergenspezifische Immuntherapie mit CpG-ODN</i>	31
4. BEDEUTUNG DER TH1/TH2-BALANCE	32
5. GELATINENANOPARTIKEL (GNP)	33
5.1 <i>Nanopartikuläre Trägersysteme</i>	33
5.2 <i>Gelatinenanopartikel</i>	34
5.3 <i>Vernebelung von GNP</i>	36
5.4 <i>In vitro-Einsatz von CpG-ODN/GNP</i>	36
5.5 <i>In vivo-Anwendung von CpG-ODN/GNP</i>	37
III MATERIAL UND METHODEN	38
1. STUDIENDESIGN UND ZIELE	38
2. PATIENTENGUT	38
3. SIGNALEMENT UND ANAMNESE.....	39

4.	ALLGEMEINUNTERSUCHUNG	39
5.	SPEZIELLE UNTERSUCHUNG	39
5.1	<i>Spezielle Untersuchung des Atmungstraktes</i>	39
5.2	<i>Auskultation</i>	40
5.3	<i>Lungenperkussion</i>	40
5.4	<i>Arterielle Blutgasbestimmung</i>	41
5.5	<i>Endoskopische Untersuchung</i>	41
5.6	<i>Zytologie des TBS</i>	42
5.7	<i>Röntgenologische Lungenuntersuchung</i>	45
6.	SCORINGSYSTEM	46
7.	IN VITRO-STUDIE	47
7.1	<i>Studiendesign und Ziel</i>	47
7.2	<i>Bronchoalveoläre Lavage (BAL)</i>	47
7.3	<i>Zellkultur der BAL-Zellen</i>	48
7.4	<i>CpG-ODN-Sequenzen</i>	51
7.5	<i>Beladung der GNP mit CpG-ODN</i>	52
7.6	<i>Sandwich-ELISA</i>	54
7.7	<i>Zellvitalitäts-Test (MTT-Test)</i>	58
8.	IN VIVO-STUDIE.....	60
8.1	<i>Studiendesign und Ziel</i>	60
8.2	<i>Verträglichkeit</i>	61
8.3	<i>BAL-Gewinnung</i>	61
8.4	<i>Zytokinbestimmung aus BAL</i>	61
8.5	<i>CpG-ODN und GNP</i>	61
8.6	<i>Inhalationsprotokoll</i>	62
9.	STATISTISCHE ANALYSEN	64
IV	ERGEBNISSE	65
1.	ERGEBNISSE DER DER KLINISCHEN LUNGENUNTERSUCHUNG	65
1.1	<i>Allgemeinuntersuchung</i>	65
1.2	<i>Spezielle Lungenuntersuchung</i>	65
2.	IN VITRO-ERGEBNISSE	66
2.1	<i>Zytokinfreisetzung in Zellkultur nach CpG/CpG-GNP-Stimulation</i>	66
2.1.1	<i>IL-10-Freisetzung</i>	66
2.1.2	<i>IL-4-Freisetzung</i>	69
2.1.3	<i>IFN-γ-Freisetzung</i>	70
2.2	<i>MTT-Test</i>	72
3.	IN VIVO-ERGEBNISSE.....	74
3.1	<i>Einfluss der Inhalation auf in vitro Zellkultur</i>	74
3.1.1	<i>IL-10-Freisetzung in vitro</i>	74
3.1.2	<i>IL-4-Freisetzung in vitro</i>	77

3.1.3	IFN- γ -Freisetzung <i>in vitro</i>	78
3.2	Einfluss der Inhalation auf die <i>in vivo</i> -Zytokinfreisetzung.....	79
3.2.1	IL-10-Freisetzung <i>in vivo</i>	79
3.2.2	IL-4-Freisetzung <i>in vivo</i>	80
3.2.3	IFN- γ -Freisetzung <i>in vivo</i>	80
3.3	Klinische Parameter.....	81
3.3.1	Verträglichkeit.....	81
3.3.2	Ruheatemfrequenz.....	82
3.3.3	Sauerstoffpartialdruck.....	83
3.3.4	TBS-Scoring.....	84
3.3.5	Neutrophile Granulozyten.....	85
3.3.6	Röntgenologische Untersuchung.....	86
V	DISKUSSION	87
1.	ZIELE DER STUDIE.....	87
2.	STUDIENDESIGN.....	87
3.	BEDEUTUNG DER ZELUZUSAMMENSETZUNG DER BAL.....	88
4.	SPEZIESSPEZIFISCHE CPG-ODN-SEQUENZEN.....	90
5.	IN VITRO-STUDIE.....	91
5.1	Bedeutung der IL-10-Freisetzung.....	91
5.2	Bedeutung der IL-4-Freisetzung.....	93
5.3	Bedeutung der IFN- γ -Freisetzung.....	94
5.4	Zellvitalität.....	94
6.	IN VIVO-INHALATIONSSTUDIE.....	95
6.1	Studiendesign.....	95
6.2	Inhalationsregime.....	96
6.3	Verträglichkeit der CpG-GNP-Inhalation.....	98
6.4	IL-10-Freisetzung.....	99
6.5	IL-4-Freisetzung.....	100
6.6	IFN- γ -Freisetzung.....	101
6.7	Klinische Ergebnisse.....	102
6.7.1	Ruheatemfrequenz.....	102
6.7.2	Röntgenologische Befunde.....	102
6.7.3	Sauerstoffpartialdruck.....	102
6.7.4	Endoskopische Untersuchung.....	103
6.7.5	Neutrophile Granulozyten.....	103
7.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	104
VI	ZUSAMMENFASSUNG	106
VII	SUMMARY	108
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	110
IX	ANHANG	126

1.	COB LUNGENSCHÖRNING.....	126
2.	AUFZEICHNUNGSPLAN.....	133
3.	GERÄTE, REAGENZIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN	139
4.	DANKSAGUNG	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin, Adenosin
AaDO₂	Arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
C	Cytosin, Cytidin
CD	Cluster of differentiation
COB	Chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CpG-GNP	Gelatinenanopartikel-gebundene Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynukleotide
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (double stranded)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropylcarbodiimid)
EIPH	Exercise-induced pulmonary hemorrhage
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Europäisches Patent
et al.	und andere (et alii)
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Beschleunigung
G	Guanin, Guanosin
GNP	Gelatinenanopartikel
HPW	Highly purified water
HRP	Horseradishperoxidase
IAD	Inflammatory airway disease
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulatory factor
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm Körpermasse
L	Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl (n-fach)
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88), Signaladaptormolekül
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Phosphat-Dinukleotid
NF-κB	Nuclear factor-κB
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodeoxynukleotide
p	Signifikanzniveau
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pCO₂	Kohlendioxidpartialdruck
PD	Phosphodiester
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PG	Prostaglandin
pg	Pikogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PS	Phosphothioester
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
Poly-G	Poly-Guanosin
RAO	Recurrent airway obstruction

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
S, D,	Standardabweichung
SIT	Spezifische Immuntherapie
S-ODN	Suppressive Oligodeoxynukleotide
SPAOPD	Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease
SP-RAO	Summer pasture-recurrent airway obstruction
ss	einzelsträngig (single stranded)
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TpG	Thymin-Phosphat-Guanosin
Treg	T-regulatorische Zelle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V/V	Volumen pro Volumen
VLP	Virus-like particles

I Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist es, insbesondere auf der Nordhalbkugel, zu einem deutlichen Anstieg der allergischen Atemwegserkrankungen gekommen. Dies betrifft sowohl das Pferd als auch den Menschen. Die „chronisch obstruktive Bronchitis“ (COB) bzw. „recurrent airway obstruction“ (RAO) entwickelte sich zur häufigsten Atemwegserkrankung beim Pferd. Diese allergische Überempfindlichkeitsreaktion, welche bei mehr als 50 % der erwachsenen Pferde in den hiesigen Breitengraden vorkommt, besitzt einige Ähnlichkeit mit dem allergischen humanen Asthma. Neben einer genetischen Prädisposition wird vor allem die weit verbreitete Stallhaltung der Pferde mit permanenter Allergenexposition für die hohe Prävalenz der COB verantwortlich gemacht.

Neben der konventionellen symptomatischen Therapie mit Entzündungshemmern, Schleimlösern und Bronchodilatoren, stellt sich deshalb die Frage, ob es möglich ist auf immunologischer Ebene in die Pathophysiologie einzugreifen und die Entstehung einer allergischen Überempfindlichkeitsreaktion zu verhindern bzw. zu reduzieren.

Vor diesem Hintergrund rückten unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) in das Zentrum des Forschungsinteresses. Die unmethylierten CpG-Motive kommen hauptsächlich in prokaryontischer DNA vor und sind in der Lage, überschießende allergische Immunreaktionen herunter zu regulieren. Mit Hilfe synthetisch hergestellter CpG-ODN imitiert man den Effekt einer bakteriellen oder viralen Infektion und nutzt dabei die gesteigerte Reaktion des Immunsystems. CpG-ODN kommen damit ein großes therapeutisches Potential bei allergischen Erkrankungen zu.

Gelatinen nanopartikel (GNP) als molekulares Transportsystem schützen CpG-ODN vor frühzeitigem Abbau durch ubiquitäre Nukleasen und verbessern gleichzeitig die zelluläre Aufnahme der DNA-Moleküle in die Zielzellen des Immunsystems.

Ziel dieser Studie war es im *in vitro*-Teil, aufgrund bestehender sequenzabhängiger Spezifität, ein geeignetes CpG-Motiv bei equinen bronchoalveolären Zellen (BAL-Zellen) zu identifizieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, in wie weit ein spezifisch immunmodulatorischer Effekt bei equinen BAL-Zellen durch die eingesetzten CpG-ODN nachzuweisen ist. GNP sollten dabei auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, als effektives molekulares Transportsystem für CpG-ODN bei equinen BAL-Zellen zu dienen.

Im *in vivo*-Teil der Studie sollte die zuvor identifizierte CpG-Sequenz gesunden und an COB erkrankten Pferden inhalativ verabreicht und dabei auf ihre lokale und systemische Verträglichkeit und ihre therapeutische Wirkung untersucht werden.

II Literaturübersicht

1. Chronische Atemwegserkrankungen des Menschen

1.1 Humanes Asthma bronchiale

Aufgrund einiger Parallelen in Ätiologie und Pathogenese zwischen dem humanen Asthma und der humanen „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) auf der einen und der equinen „chronisch obstruktiven Bronchitis“ (COB) auf der anderen Seite sollen hier noch einmal kurz die beiden, unter diesen Gesichtspunkten, wichtigsten chronischen Atemwegserkrankungen des Menschen dargestellt werden.

Das Asthma bronchiale des Menschen lässt sich klinisch durch folgende Punkte definieren: Hyperreagibilität der Atemwege mit einer eosinophilen Entzündung und einer reversiblen Einengung der Atemwege (TRAUB, 2005). Die zwei häufigsten Formen des humanen Asthmas sind das allergische, extrinsische Asthma und das nicht allergische, intrinsische Asthma (TRAUB, 2005). Das atopische, allergische Asthma tritt nach TRAUB (2005) häufig schon im Kindesalter auf und beinhaltet eine genetische Prädisposition in Verbindung mit auslösenden Umweltfaktoren (extrinsische Form). Das nicht allergische Asthma (non atopic asthma, intrinsische Form) wird eher durch respiratorische Infektionen ausgelöst und kommt häufiger im höheren Alter vor (TRAUB, 2005). In manchen Fällen lässt sich auch ein belastungsbedingtes Asthma bei Kindern feststellen (TRAUB, 2005). Auch die Form eines Analgetika-induzierten Asthmas wird berichtet (TRAUB, 2005).

Auslöser des saisonal auftretenden allergischen Asthmas sind unter anderem: Schimmelpilzsporen, Hausstaubmilben, Protein tierischen Ursprungs, Medikamente (Acetylsalicylsäure), Pollen, Schadgase (Stickoxide, Ozon, Schwefeldioxid) und Virusbestandteile (TRAUB, 2005). Im Gegensatz zur „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) kann es beim Asthma nach Beseitigung der Ursache zu einer teilweisen Regeneration der Lungenfunktion kommen (TRAUB, 2005). Dieses Krankheitsbild des allergischen Asthmas ähnelt mehr der equinen „chronisch obstruktiven Bronchitis“ (COB) bzw. der „recurrent airway obstruction“ (RAO) als die humane COPD (ROBINSON, 2001;

HOROHOV et al., 2009), weshalb in manchen Fällen auch von „Pferdeasthma“ gesprochen wird (GERBER und NUSSBAUMER, 2008)

1.2 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Gemäß den Leitlinien der „Global Initiative for Chronic Obstrucive Lung Disease“ ist die „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) des Menschen eine progressiv verlaufende chronische Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch eine nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion (TRAUB, 2005). Ursächlich ist eine entzündliche Reaktion der Atemwege, hervorgerufen durch inhalative Schadstoffe (PAUWELS, 2001). Damit erfolgt eine Abgrenzung zum Lungenemphysem und zur chronischen Bronchitis. Die Atemwegsobstruktion der COPD ist nur von geringer Variabilität, was bedeutet, dass Anstrengung nicht zu einer vermehrten Bronchokonstriktion führt (TRAUB, 2005).

Zu den inhalativen Schadstoffen, welche eine COPD auslösen können, zählen: Emissionsnoxen (Schwefeldioxid), partikuläre Substanzen (Dieselruß), photochemische Oxidationsprodukte (Ozon, Stickoxide) (TRAUB, 2005). Schließlich können auch Virusinfektionen zu entzündlichen Prozessen in den peripheren Atemwegen führen (BARNES, 2000). Eine Kombination aus Asthma und COPD tritt bei 10 % der Betroffenen auf und wird als „wheezy bronchitis“ (keuchende Bronchitis) bezeichnet (TRAUB, 2005).

2. Chronische Atemwegserkrankungen des Pferdes

2.1 Chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes

2.1.1 Begriffsbestimmung

Aufgrund der Einteilung der Lungenerkrankungen in der Humanmedizin, wurde in einem internationalen Konsens im Jahre 2000 der Begriff der COPD beim Pferd durch den Terminus „recurrent airway obstruction“ (RAO), „heaves“ („Dampf“) oder „broken wind“ ersetzt (ROBINSON, 2001). Im deutschsprachigen Raum hat sich allerdings der Begriff der „chronisch

obstruktiven Bronchiolitis“ bzw. „Bronchitis“ (COB) durchgesetzt, da dieser hinsichtlich der Dauer, der Lokalisation und der entzündlichen Genese eine präzisere Beschreibung des Krankheitsbildes darstellt (FEY, 2006). Da sich die Erkrankung im wesentlichen im Bereich der drüsenfreien und knorpelfreien Bronchioli abspielt, ist die Bezeichnung Bronchiolitis korrekter, wenn auch im Zuge des Krankheitsgeschehens eine Ausbreitung auf die übrigen Abschnitte der Lunge stattfindet (FEY, 2006).

Der Begriff der „Dämpfigkeit“ aus der kaiserlichen Verordnung von 1899 ist mit der Abschaffung der Hauptmangelregelung zum 01.01.2002 und der Modernisierung des Schuldrechts nicht mehr zeitgemäß (OHNESORGE, 2009). Zudem wurde der Terminus auch fälschlicherweise für weniger schwere Formen verwendet (OHNESORGE, 2009). Die Verbreitung des Begriffs „heaves“ im englischsprachigen Raum, welcher eine erschwerte Atmung bezeichnet, ist unter traditionellen Gesichtspunkten zu erklären und schließt nach hiesigem Verständnis nur einen Teil des Krankheitsbildes der COB ein (OHNESORGE, 2009). Eine Gleichsetzung von COB und RAO erscheint nach OHNESORGE (2009) problematisch, da zwar die gleiche Erkrankung gemeint ist, aber die jeweiligen Definitionen verschiedene Krankheitsbilder einschließen. Nach diesem Verständnis kann die COB als Überbegriff der verschiedenen Phänotypen benutzt werden und die Bezeichnungen RAO sowie „inflammatory airway disease“ (IAD) zur Eingrenzung einzelner spezifischer Pathogenesebilder (OHNESORGE, 2009). Allerdings ist der Begriff der COB international nicht verbreitet, weshalb zur besseren Verständigung die Benutzung der englischen Begriffe RAO und IAD mit Rücksicht auf deren Definition empfohlen wird.

2.1.2 Pathogenese der COB

Die COB des Pferdes hat sich in den letzten Jahrzehnten zur häufigsten Atemwegserkrankung der Pferde in den hiesigen Breitengraden entwickelt (MCPHERSON und THOMSON, 1983; FEY, 2006). Mehr als 50 % der erwachsenen Pferde leiden unter dieser allergischen Atemwegserkrankung (FEY, 2006). Diese ist durch eine Typ-I (anaphylaktoide Reaktion) und Typ-IV (verzögerte Reaktion) Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems auf

Heustaub, Schimmelpilzsporen und andere allergen wirkende organische und anorganische Partikel der Stallluft charakterisiert (HOROHOV et al., 2009).

Durch eine chronisch bestehende Reizwirkung wie den Heustaub in vielen Ställen (MILLERICK-MAY, 2009), kommt es zu einer Störung der Reinigungsfunktion (mukoziliäre Clearance) der Atemwege mit vermehrter Produktion viskösen Schleims (ROBINSON, 2001; GEHLEN und MAY, 2011). Diese Dys- und Hyperkrinie zerstört die zweiphasige Schichtung (Gel- und Solschicht) des physiologischen Sekrets, welches als Teil der mukoziliären Clearance durch die orale Bewegung des Flimmerepithels zum Abtransport von eingedrungenen Partikeln dient (TRAUB, 2005). Schließlich kommt es bei sensibilisierten Pferden nach wiederholtem Allergenkontakt zu einer reversiblen reflektorischen cholinergen Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege (Bronchospasmus, vergleichbar mit humanem Asthma), was zu einer Einengung des Lumens der Bronchien führt (ROBINSON, 2006; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010) (Abb.1). Nach Allergenkontakt kommt es innerhalb von sechs bis acht Stunden zur Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten in die Atemwege (ROBINSON, 2001).

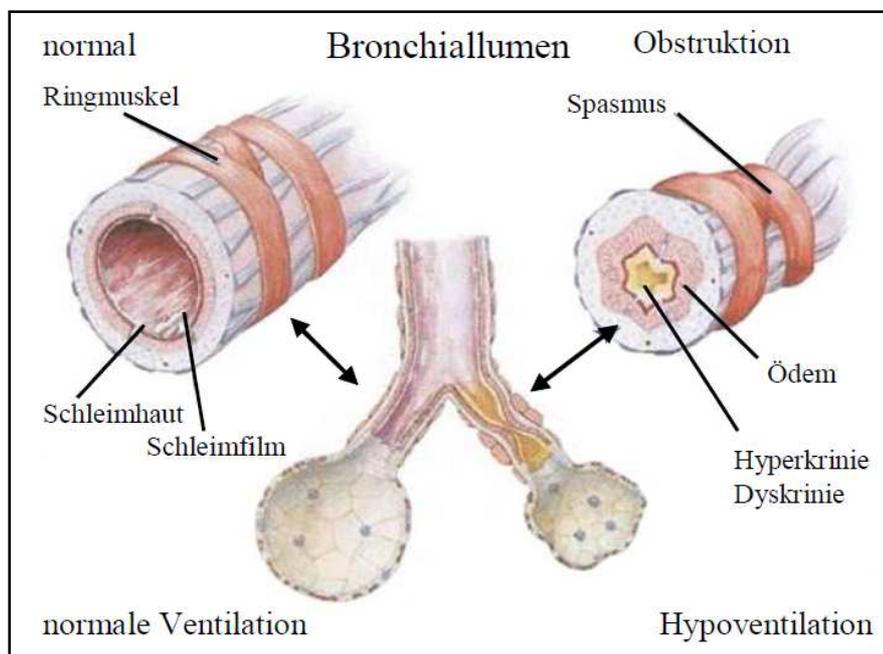


Abb. 1: Schemazeichnung der pathognomonischen Bronchokonstriktion im Rahmen der COB. (FENNER und OTTO, 2002. Die obstruktive Bronchitis beim Pferd. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH)

Klinische Symptome der COB sind chronischer Husten, Leistungsintoleranz, erschwerte Atmung, übermäßige Schleimsekretion aus den Nüstern und damit zusammenhängend pathologische Atemgeräusche (ROBINSON, 2001; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Aufgrund der Einengung der Luft leitenden Wege durch Bronchokonstriktion und Hyperkrinie kann die eingeatmete Luft nicht mehr vollständig entweichen (FEY, 2006; ROBINSON, 2006; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Es kommt zum so genannten „air trapping“ Phänomen bis hin zum irreversiblen Emphysem (FEY, 2006; ROBINSON, 2006). Die Elastizität der Lunge, welche eine passive Expiration ermöglicht, geht verloren (ROBINSON, 2006). Die Luft muss aktiv mit Hilfe der Bauchmuskulatur aus der Lunge herausgepresst werden (FEY, 2006). Dies zeigt sich klinisch in einem vergrößerten Lungenfeld und verstärkter abdominaler Atmung mit Einsetzen der Bauchmuskulatur (Abb. 2) (ROBINSON, 2006; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).



Abb. 2: Klinisches Bild einer hochgradigen COB. Sichtbare „Dampfrinne“ durch Hypertrophie des *Musculus obliquus abdominis externus* sowie des *Musculus rectus abdominis* in Folge aktiver expiratorischer Atemtätigkeit. So genannte „Zwischenrippenatmung“, erkennbar an der Zuhilfenahme der Zwischenrippenmuskulatur bei der Atemtätigkeit. Schlechter Allgemeinzustand mit generalisierter Muskelatrophie (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Heidrun Gehlen).

Es führt im chronischen Zustand zu verringerter Leistung, verlängerten Erholungsphasen und verstärkter expiratorischer Atemtätigkeit mit Bauchpresse (Dämpfigkeit) (ROBINSON, 2001; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Aus diesem pathologischen Krankheitsbild ergaben sich die Bezeichnungen „heaves“, „broken wind“ und „Dampf“ (ROBINSON, 2001, 2006; FEY, 2006; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Die Elastizität des Lungengewebes ist irreversibel zerstört, die elastischen Fasern sind durch fibröses Bindegewebe ersetzt (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Bei betroffenen Pferden konnte auch ein erhöhter Gehalt an Matrix-Metalloproteinasen im Trachealsekret nachgewiesen werden (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Diese Proteinasen wirken unter anderem lytisch auf Kollagen, Gelatin und Elastin (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Auch Arachidonsäuremetaboliten sind an diesem Pathogenesemechanismus beteiligt (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Reaktive Sauerstoffspezies als Produkte der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie damit in Verbindung stehender oxidativer Stress, scheinen auch am Entzündungsgeschehen der COB und dessen Exazerbation beteiligt zu sein (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

2.1.3 Erbllichkeit der COB

Bereits vor 70 Jahren wurde eine genetische Prädisposition zur COB vermutet (SCHAEPER, 1939; GEHLEN und MAY, 2011). In den letzten Jahren wurden umfangreiche Studien zur Erbllichkeit der COB durchgeführt. So konnten GERBER und Kollegen (2008a, 2009) bei den Nachkommen von zwei Hengsten mit COB ein signifikant höheres Auftreten (fünfmal häufiger) der Erkrankung feststellen als in anderen Familienlinien. Es wird ein polygenetischer autosomaler Erbgang vermutet (GERBER et al., 2008a, 2009; GEHLEN und MAY, 2011). Mittlerweile konnten auf dem Chromosom 13 sieben Regionen dafür verantwortlich gemacht werden (GERBER et al., 2009). Auf diesem Chromosom liegt das IL-4 Rezeptor-Gen α (IL-4R α), welches eine starke Korrelation und Assoziation mit dem COB-Phänotyp, mit Asthma, Atopie, sowie der Abwehr von Parasiten aufweist (GERBER et al., 2009; GEHLEN und MAY, 2011).

Außerdem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der klinischen Manifestation der COB und dem Vorkommen von intestinalen Würmern bei Pferden festgestellt (GERBER und NUSSBAUMER, 2008; GERBER et al., 2009; NEUHAUS et al., 2010; GEHLEN und MAY, 2011). Es konnte gezeigt werden dass Pferde mit einer klinisch manifesten COB weniger Würmer ausscheiden als gesunde Pferde (GERBER et al., 2009; NEUHAUS et al., 2010; GEHLEN und MAY, 2011). GERBER und Mitarbeiter (2009) gehen daher von einer höheren Resistenz der COB-Pferde gegenüber intestinalen Parasiten aus. Sie bezeichnen diese Beobachtung als inverse Beziehung zwischen Asthma und Parasitenabwehr, welche augenscheinlich mit den IgE-Leveln korrelieren (GERBER et al., 2009; NEUHAUS et al., 2010; GEHLEN und MAY, 2011).

Diese Ergebnisse erlauben einen Einblick in die ursprüngliche Funktion und Bedeutung von IgE, nämlich der Abwehr intestinal vorkommender Würmer (KLINE, 2007; GEHLEN und MAY, 2011). Es wird vermutet dass die systematische Bekämpfung intestinaler Parasiten durch intensive Hygienemaßnahmen und regelmäßige Entwurmungen dazu beigetragen hat, die Inzidenz der allergischen Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten deutlich zu erhöhen (UMETSU und DEKRUYFF, 2006; KLINE, 2007; GEHLEN und MAY, 2011). In den frühen 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts waren intestinale Würmer bei Menschen häufig, Allergien hingegen kaum bekannt (BRAUN-FAHRLÄNDER, 2003; WASER et al., 2005; BRAUN-FAHRLÄNDER, 2009). Diese Erkenntnisse werden als „Hygiene-Hypothese“ zusammengefasst (UMETSU und DEKRUYFF, 2006; KLINE, 2007).

2.1.4 Immunologie der COB

Die immunologischen Mechanismen, die der COB zugrunde liegen, sind nach wie vor nicht restlos aufgeklärt (GEHLEN und MAY, 2011). Zahlreiche Studien weisen eine übermäßige Expression von Th2-Zytokinen in der Lunge bei COB-Pferden nach (LAVOIE et al., 2001; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2005). Daneben wurden aber auch erhöhte Th1-Zytokine bei COB-Pferden nachgewiesen (GIGUERE et al., 2002; AINSWORTH et al., 2003), was zusätzlich für eine Beteiligung der proinflammatorischen Schiene am

Pathogenesemechanismus der COB und gegen eine alleinige Th2-Überreaktion spricht. Man geht trotz all dessen von einer gestörten Th1/Th2-Balance mit einer Verschiebung zur übermäßigen Th2-Antwort aus (HOROHOV et al., 2009).

In den letzten Jahren konnte auch für das proinflammatorische und chemotaktisch wirkende IL-17 von Th17-Zellen eine Beteiligung im Pathogenesemechanismus der COB nachgewiesen werden (DEBRUE et al., 2005; AINSWORTH, 2009). Th17-Zellen als dritte Subklasse der T-Helferzellen wurden erst in jüngster Zeit entdeckt. Ihre Bedeutung und ihre Beteiligung an der Genese verschiedener entzündlicher Pathomechanismen werden intensiv erforscht (IWAKURA und ISHIGAME, 2006).

Die Obstruktion der Atemwege ist sowohl bei der COB der Pferde als auch beim allergischen Asthma des Menschen reversibel und lässt sich durch Allergenkontakt provozieren (HOROHOV et al., 2009, GEHLEN und MAY, 2011). Allerdings gibt es neben diesen Ergebnissen auch einige klinische Anzeichen, welche nicht mit der klassischen Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion, wie sie für humanes Asthma typisch ist, in Einklang gebracht werden können. Im Unterschied zum humanen Asthma, bei dem der Bronchospasmus innerhalb weniger Minuten nach Allergenkontakt auftritt, zeigen COB-Pferde eine Verzögerung in der Ausprägung der klinischen Symptomatik von einigen Stunden (ART et al., 2008; GEHLEN und MAY, 2011). Da sich IgE als Allergie-vermittelndes Immunglobulin nicht immer nachweisen lässt (MARTI, 2009) und Mastzellen als Effektorzellen nur eine geringe Rolle im Krankheitsgeschehen spielen (COUËTIL et al., 2007; GEHLEN und MAY, 2011), ist eine alleinige Typ-I-Reaktion unwahrscheinlich (HOROHOV et al. 2009; MARTI, 2009). Daher geht man nach neuerer Erkenntnis eher von einer verzögerten, IgE-unabhängigen Typ-IV-Immunreaktion als vorherrschenden Pathogenesemechanismus im allergischen Geschehen der COB aus (MARTI, 2009; GEHLEN und MAY, 2011).

Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen den Pathogenesemechanismen der COB des Pferdes und dem humanen Asthma stellen die beteiligten Zellen dar, welche nach Allergenstimulation in die Atemwege einwandern (GEHLEN und MAY, 2011). Die vorherrschenden Zellen bei COB sind neutrophile Granulozyten, welche durch die lokale Bildung des chemotaktisch wirkenden

Interleukin-8 (IL-8) in die Atemwege gelockt werden (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Dies steht im Gegensatz zur scheinbar dominanten Rolle der eosinophilen Granulozyten bei allergischem Asthma im Mensch- und Mausmodell (HOROHOV et al., 2009). Allerdings zeigen schwere und chronische Asthmafälle häufig auch erhöhte Neutrophilenzahlen (HOROHOV et al., 2009). Die Dominanz von eosinophilen Granulozyten bei Asthma ist darüber hinaus weniger häufig als allgemein angenommen (HOROHOV et al., 2009). Weniger als 50 % der Asthmafälle sind auf eine eosinophile Entzündungsreaktion zurückzuführen (MACDOWELL und PETERS, 2007).

Darüber hinaus existiert eine weitere Form des Asthmas, welche mit einer akuten Entzündung, der Einwanderung neutrophiler Granulozyten und dem Vorhandensein proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) einhergeht (HOROHOV et al., 2009). Demnach scheinen größere Parallelen innerhalb der Pathogenesemechanismen der COB des Pferdes und dem humanen Asthma zu bestehen (GEHLEN und MAY, 2011).

Die Bedeutung von IgE und seine Beteiligung am Pathogenesemechanismus der COB sind nach wie vor nicht restlos geklärt. Anfängliche Untersuchungen, um zugrunde liegende immunologische Mechanismen der COB aufzuklären, konnten signifikante Level von IgE in den Atemwegen betroffener Pferde nachweisen (HALLIWELL et al., 1993; SCHMALLENBACH et al., 1998). IgE-Antikörper sind allerdings nicht immer nachweisbar (MARTI, 2009) und ihr Vorliegen scheint auch durch genetische Faktoren beeinflusst zu sein (GERBER et al., 2009). Der Versuch IgE im Serum betroffener Pferde nachzuweisen ist nach LEIBOLD (2009) aufgrund dessen kurzer Halbwertszeit und der Abhängigkeit von kompetitiven IgG-Antikörpern nicht sinnvoll. Die Halbwertszeit von Antikörpern im Serum beträgt 48 Stunden, auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten hingegen können sie Monate bis Jahre nachweisbar sein (LEIBOLD, 2009). Zudem müssen nach LEIBOLD (2009) IgE-Antikörper nicht zwangsläufig bei einer allergischen Typ-I-Reaktion vorhanden sein, da sensible IgG die Allergien ebenfalls auslösen können. Dies erklärt womöglich die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Forschergruppen.

2.1.5 Konventionelle Therapieverfahren der COB

Nach Ausschluss einer akuten Atemwegserkrankung und Diagnosestellung durch eingehende klinische, endoskopische und laborchemische Untersuchungen sollte in erster Linie eine Haltungsoptimierung erfolgen, um potentielle Allergene weitgehend zu eliminieren (ROBINSON, 2001). Dies bedeutet die Umstellung auf Offenstallhaltung oder die Haltung in einer Aussenbox mit ausreichend Auslauf und Weidegang, sowie regelmäßige und kontrollierte Bewegung in staubarmer Umgebung (ROBINSON, 2001). Dadurch wird eine natürliche Sekretolyse und Anregung der mukoziliären Clearance erreicht (FEY, 2006). Die Haltungsoptimierung ist der Grundpfeiler eines jeglichen Therapieversuchs der COB (ROBINSON, 2001; FEY und OHNESORGE, 2009; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Unterstützend kann eine medikamentöse Bronchospamolyse und Sekretolyse erfolgen (ROBINSON, 2001; FEY, 2006). Als Therapeutika der Wahl zählen hierzu β_2 -Sympathomimetika wie das Clenbuterol (FEY, 2006). Die Dosierungsempfehlung im deutschsprachigen Raum liegt bei 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zweimal täglich über zehn bis 20 Tage (FEY, 2006; FEY und OHNESORGE, 2009). In den USA werden bis zu vierfach höhere Dosierungen eingesetzt (ROBINSON, 2001). Zu beachten ist, dass es bei längerer Anwendung zu einer Herunterregulation der β_2 -Rezeptoren kommen kann (FEY und OHNESORGE, 2009). Aufgrund dessen sollte die Anwendung in Kuren erfolgen. Als Sekretolytika eignen sich insbesondere Dembrexin (0,2 mg/kg, 2 x tägl., sieben bis 14 Tage) und Acetylcystein (10 mg/kg, 2 x tägl.) (FEY, 2006; FEY und OHNESORGE, 2009).

Auch eine Inhalation saliner Lösungen zur Verflüssigung des Tracheobronchialsekrets ist von therapeutischem Nutzen (FEY, 2006). Geeignet dafür sind hyperosmolare Lösungen (> 0,9%) wie beispielsweise Emser-Sole, welche mit Hilfe geeigneter Ultraschallvernebler zu einer Tröpfchengröße von < 5 μm vernebelt werden können (FEY und OHNESORGE, 2009). Dies ist Voraussetzung, um alveolargängig zu sein (FEY, 2006; NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Tröpfchen mit einer Größe < 0,5 μm werden höchstwahrscheinlich wieder ausgeatmet (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

Bei einem Durchmesser über 5 µm kommt es bereits zur Abscheidung der Tröpfchen innerhalb der oberen Atemwege, wo sie dann meist abgeschluckt werden (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Dies kann unter Umständen zu ungewollten systemischen Wirkungen führen.

Tritt innerhalb von zwei Wochen keine Verbesserung der Symptomatik auf, können zusätzlich Glukokortikoide eingesetzt werden. Sie vermindern die Herunterregulation der β_2 -Rezeptoren durch Clenbuterol (ABRAHAM et al., 2002). Allerdings potenzieren sich auch die negativen Effekte der beiden Wirkstoffgruppen (Glukokortikoide und β -Sympathomimetika) was zu Unruhe, Tachykardie, Tremor, Schwitzen u.a. führen kann. Empfehlenswert hierbei ist beispielsweise Prednisolon (0,5 - 1,0 mg/kg, *per os*, in ausschleichender Dosierung; kein für Pferde zugelassenes Präparat auf dem Markt) über sechs bis acht Wochen (FEY und OHNESORGE, 2009; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Mit dieser antientzündlichen Therapie ist eine erfolgversprechende Unterbrechung der chronischen Entzündungsreaktion der Atemwege möglich (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Die inhalative Verabreichung von Glukokortikoiden ist nach FEY und OHNESORGE (2009) nicht so wirkungsvoll wie die systemische Anwendung, da bei bestehendem Bronchospasmus weniger Luft in die tiefen Atemwege gelangt und damit auch weniger Aerosol das Bestimmungsziel erreicht. Die Vorteile der topischen inhalativen Anwendung sind allerdings die geringeren systemischen Nebenwirkungen, was gerade bei Glukokortikoiden von großer Bedeutung ist, sowie die direkte lokale Entfaltung der Wirkung (FEY, 2006).

Beim Pferd hat sich die inhalative Verabreichung von Dosieraerosolen aus der Humanmedizin wie Beclomethason (200 µg/Sprühstoß) als Kortikosteroid und Salbutamol (0,1 mg/Sprühstoß) als Bronchodilatator, wie sie auch bei humanem Asthma eingesetzt werden, als äußerst wirksam erwiesen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Das Inhalationsprotokoll sieht für ein 500 kg Pferd eine tägliche Anwendung, beginnend mit je neun Hüben beider Substanzen mit ausschleichender Gabe über zwölf Wochen vor. Als Atemmaske kann beispielsweise der „Equine Haler“ (Equine Health Care, Dänemark) dienen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Je nach verwendetem Inhalationssystem und durchschnittlicher Aerosoltröpfchengröße werden unterschiedliche

Sedimentationsraten in den Alveolen erreicht (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009). Für den „Equine Haler“ konnte über radioaktiv markierte Dosieraerosole eine Sedimentationsrate von 8 % identifiziert werden (FUNCH-NIELSSEN et al., 2001). Der Rest verbleibt in den Nüstern und oberen Atemwegen.

Eine weitere therapeutische Option stellt die Hyperinfusionstherapie dar. An drei aufeinanderfolgenden Tagen kann entweder per Nasenschlundsonde (6 L/100 kg) oder über eine i.v. Infusion (30 L/600 kg) 0,9 % Kochsalzlösung verabreicht werden, um ein mildes alveoläres Ödem zu erzielen (FEY, 2006; FEY und OHNESORGE, 2009). Kontraindiziert ist diese Methode bei deutlicher Dyspnoe, großen Sekretmengen, einer bakteriellen Infektion der Atemwege, einem Lungenemphysem, sowie einer Herz- oder Niereninsuffizienz (FEY, 2006). Diese Hyperinfusionstherapie soll zur einer Verflüssigung des Sekrets führen, wodurch es leichter über die mukoziliäre Clearance abtransportiert werden kann (FEY, 2006). Im englischsprachigen Raum wird diese Methode als nicht wirkungsvoll erachtet (FEY und OHNESORGE, 2009).

2.2 Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD)

Der COB sehr nahe stehend, ist die Erkrankung der “summer pasture-associated recurrent airway obstruction” (SP-RAO) oder “summer pasture-associated obstructive pulmonary disease” (SPAOPD). Diese ist nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) klinisch nicht von der COB unterscheidbar, mit Ausnahme, dass betroffene Pferde klinische Symptome nur oder vorwiegend während des Weideaufenthaltes entwickeln.

Die Abgrenzung zur „inflammatory airway disease“ (IAD) ist nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) durch die Symptome einer erschwerten Atmung oder schweren Leistungsinsuffizienz möglich. Allerdings können die klinischen Anzeichen während einer Remission sehr subtil ausfallen, was eine Erkennung deutlich erschweren dürfte. COUËTIL und Mitarbeiter (2007) empfehlen in diesen Fällen eine Zytologie aus einer bronchoalveolären Lavage, einen Lungenfunktionstest oder einen Allergenexpositionsversuch mit staubigem Heu. Eine Neutrophilie in den Atemwegen zeigt sich bei allen drei Krankheitsbildern

(COB/RAO, SPAOPD, IAD), wobei sie bei der IAD am geringsten ausgeprägt ist (< 20 %) (COUËTIL et al., 2007). Das Auftreten einer erhöhten Anzahl von Mastzellen, basophilen und auch eosinophilen Granulozyten wurde bei der IAD beschrieben (HOFFMAN, 1999; COUËTIL et al., 2007). Diese Zellen sind für die COB/RAO und SPAOPD nicht typisch (COUËTIL et al., 2007).

2.3 Inflammatory airway disease (IAD)

Gemäß des internationalen Konsens des „American College of Veterinary Internal Medicine“ (ACVIM) im Jahr 2007 kommt die „inflammatory airway disease“ (IAD) bei allen Altersgruppen und verschiedenen Rassen vor. Besonders häufig zeigt sie sich allerdings bei jungen, im Training stehenden Rennpferden (AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Aber auch bei „pleasure horses“ (Disziplin des Westernreitens) tritt die IAD gehäuft auf (COUËTIL et al., 2007). Man vermutet die Ursache dafür vor allem in der frühen hohen Belastung der jungen Pferde (COUËTIL et al., 2007). Als Ursachen werden außerdem die Fütterung, Haltung, medikamentöse Vorbehandlung, Infektionen und genetische Einflüsse diskutiert (COUËTIL et al., 2007; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010).

Die Abgrenzung zur COB/RAO fällt in manchen Fällen schwer, jedoch zeigen Pferde mit IAD keine verstärkte Atemtätigkeit in Ruhe, was jedoch für COB typisch wäre (COUËTIL et al., 2007). Klinische Symptome in Ruhe sind meist geringgradig ausgeprägt (COUËTIL et al., 2007). Dazu zählen Leistungsinsuffizienz, evtl. chronisch intermittierender Husten, verstärkte Mukusbildung, pharyngeale lymphoide Hyperplasie, eine milde Neutrophilie in den Atemwegen, Atemwegsobstruktion und Überempfindlichkeit, sowie ein verminderter Gasaustausch mit beginnender Partialinsuffizienz der Lunge (COUËTIL et al., 2007). Der Zusammenhang zwischen Husten und Entzündung der kleinen Atemwege bei IAD ist unbekannt (COUËTIL et al., 2007). Die höchste Prävalenz der zum Teil exzessiven Mukusbildung liegt weltweit bei Rennpferden im Alter von ein bis zwei Jahren (COUËTIL et al., 2007). Mit zunehmendem Alter nimmt sie ab. Ältere „pleasure horses“ zeigen häufiger exzessive Mukusbildung in der Trachea als Rennpferde (COUËTIL et al., 2007).

Der Hauptumweltfaktor, die Haltung, scheint von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der Erkrankung zu sein (COUËTIL et al., 2007). Hierbei spielen organische und anorganische Partikel wie Endotoxin, 1-3- β -D-Glucan, Feinstaub (< 100 nm), Mikroorganismen, Milbenantigen, anorganische Staubpartikel, organisches Material und Schadgase eine bedeutende Rolle (COUËTIL et al., 2007). Inwieweit Infektionen der Atemwege zur Entstehung der IAD beitragen ist nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) nicht restlos geklärt. Das Auftreten von hohen Zahlen an Eosinophilen und Mastzellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) mancher IAD-Pferde spricht nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) für eine Beteiligung von aerogenen Allergenen bei der Entwicklung des Krankheitsbildes.

Der Zusammenhang zwischen Nasenausfluss und IAD ist nach wie vor ungeklärt (COUËTIL et al., 2007). In schweren Fällen der IAD kann es zum einem geringen Anstieg der Atemfrequenz mit verstärkter expiratorischer Bauchatmung, sowie pleuralen Druckänderungen kommen (COUËTIL et al., 2007). Gemäß der Definition bleiben diese Änderungen allerdings unter den typischen Werten für eine COB (> 15 cm).

Es konnte bei Vollblütern gezeigt werden, dass eine Neutrophilie in der BAL mit verringerter Rennleistung assoziiert ist (COUËTIL et al., 2007). IAD-Pferde zeigen nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) zudem eine Verschlechterung im Gasaustausch mit einhergehender leistungsabhängiger Hypoxämie. Die Leistungsintoleranz zeigt sich auch in einer verlängerten Erholungszeit nach Belastung und deutlich erhöhter Atemtätigkeit während der Arbeit.

Die Thoraxauskultation ist in den meisten Fällen unauffällig. Nur in schweren Fällen zeigen sich pathologische Atemgeräusche. Bei Nicht-Rennpferden können nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) klinische Symptome über Monate bis Jahre bestehen bleiben.

Hier zeigt sich bereits das Problem der Abgrenzung zur COB/RAO. Ausschlusskriterien für eine IAD sind nach COUËTIL und Mitarbeitern (2007) Fieber und eine systemische Infektion. Der Zusammenhang zwischen der COB und der IAD ist bis dato noch nicht geklärt. Ob es sich um verschiedene Phänotypen derselben Erkrankung oder um zwei eigenständige Krankheitsbilder

handelt ist unklar (ROBINSON, 2009a). Auch die Möglichkeit, dass die IAD ein frühes klinisches Bild der COB darstellen könnte und dem entsprechend eine IAD die Frühform einer COB sein könnte, wurde diskutiert (ROBINSON, 2009a).

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

3.1 Immunstimulatorische DNA

Dr. William Coley unternahm 1890 in New York erste dokumentierte Versuche zur immunstimulatorischen Therapie nichtbakterieller Erkrankungen (WEINER, 2000). Er applizierte Streptokokken in humane Tumore, was teils zur Tumorregression führte (MUTWIRI et al., 2003). Dies wurde unter der Bezeichnung „Coley`s Toxin“ bekannt. Welche Komponenten der verabreichten Bakterien dabei den Therapieerfolg bewirkten, war zu dieser Zeit noch nicht bekannt. Dieser erste immunstimulatorische Therapieansatz geriet allerdings wieder in Vergessenheit. Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde dieser Ansatz erneut aufgegriffen. Die Erkenntnis, dass DNA nicht nur das Speichermedium der genetischen Information der Lebewesen darstellt, sondern darüber hinaus auch selbst immunstimulatorische Wirkung besitzt, ist damit noch gar nicht alt.

KRIEG und Mitarbeiter (1995) untersuchten schließlich in den 90iger Jahren welche Abschnitte der DNA für die beobachtete immunstimulatorische Wirkung verantwortlich waren. Sie konnten 1995 nachweisen, dass es sich um bestimmte stimulatorische Motive aus zwei Purinbasen (P1, P2), einem zentralen unmethylierten Cytosin-Guanin-Motiv (CpG) und darauf folgend, zwei Pyrimidinbasen (Py1, Py2) handelt (KRIEG et al., 1995). Dies lässt sich in einer allgemeinen Formel ausdrücken:



Für P1 besteht hierbei eine Präferenz für Guanin, für P2 eine Präferenz für eine Purinbase oder ein Thymin (WEINER, 2000). Allerdings wurde bald erkannt, dass nicht jede Sequenz gleichermaßen bei jeder Spezies eine Immunstimulation auszulösen vermochte (BAUER et al., 2001). Man bezeichnete diese Beobachtung

als sequenzabhängige Speziesspezifität (MUTWIRI et al., 2003). Die spezifischen CpG-Motive setzten sich aus so genannten Hexameren zusammen (WEINER, 2000; VOLLMER und KRIEG, 2009). Dies bedeutet, dass zusammen mit dem zentralen Cytosin-Guanin-Dinukleotid vier weitere Basen ein CpG-Motiv bilden. Die flankierenden Basen scheinen von entscheidender Bedeutung bei der speziesspezifisch unterschiedlichen Erkennung der Motive zu sein (WEINER, 2000). Dies verdeutlicht wieder einmal die enge Struktur-Wirkungsbeziehung auf molekularer Ebene.

Im Jahr 2000 gelang es HARTMANN und KRIEG, die optimale Sequenz für den Menschen zu bestimmen: 5'-GTCGTT-3'. Im folgenden Jahr gelang dies auch für die Maus: 5'-GACGTT-3' (BAUER et al., 2001). RANKIN und Mitarbeiter (2001) untersuchten 30 verschiedene CpG-ODN Motive bei zehn verschiedenen Tierarten und konnten das Motiv 5'-GTCGTT-3' als besonders effektiv bei fast allen untersuchten Spezies (Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Hund, Katze, Huhn) identifizieren, einschließlich des Pferdes. ÓLAFSDÓTTIR und Mitarbeiter beschrieben 2004 eine ideale Sequenz für das Pferd: 5'-CTCGTT-3', allerdings wurde diese Sequenz in keiner weiteren Publikation bestätigt oder erwähnt. Welches also die beste Sequenz bei Pferden ist, auch im Hinblick auf unterschiedliche Zellsubpopulationen, welche in den Versuchen zum Einsatz kamen, bleibt zu prüfen. Das ubiquitäre Bakterium *Rhodococcus equi* enthält zwei sehr häufige Sequenzen, welche als zentrale Elemente der immunstimulatorischen Wirkung angesehen werden: -GACGTT- und -GTCGTT- (LIU et al., 2009).

Diese so genannten Cytosin-Phosphat-Guanin-reichen Sequenzen (CpG-Motive), welche für die beobachteten immunstimulatorischen Effekte verantwortlich gemacht wurden, sind in bakterieller und viraler DNA besonders häufig (KRIEG et al., 1995). Sie kommen dort durchschnittlich alle 16 Nukleotide vor, wohingegen ihr Auftreten im Säuger-Genom deutlich seltener ist, durchschnittlich nur alle 60 Basen (BIRD, 1987). Dieses Phänomen bezeichnet man als CpG-Suppression in eukaryontischer DNA (KRIEG et al., 1995).

Ein weiterer entscheidender Unterschied der CpG-Motive zwischen prokaryontischer und eukaryontischer DNA liegt in ihrem Methylierungsgrad. Im Säuger-genom sind ca. 70 % der CpG-Motive am Cytosin methyliert, wohingegen diese Motive in prokaryontischer DNA meist unmethyliert vorliegen (BOHLE,

2002). Diese Unterschiede, sowohl im Methylierungsgrad als auch in der Anzahl der auftretenden Motive, erklären die Wirkung der CpG-Motive bei Kontakt zum Säuger-Immunsystem (WEINER, 2000). Die CpG-Suppression ist dabei möglicherweise im Zuge der Evolution zur Unterscheidung von körpereigener und -fremder DNA entstanden (BOHLE, 2002). Die Methylierungen sind so genannte „hot spots“ für Mutation des Cytosins zu Thymin-Guanin-Dinukleotiden (TpG) (BOHLE, 2002). Dies ist nach BOHLE (2002) der Grund für die deutlich geringere Zahl der CpG-Motive im Säuger genom. Die Methylierung ist eine Form der Genregulation und kann die Transkription des betroffenen Genabschnittes verhindern (EWART, 2009). Sie wird bei der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben. Es handelt sich hierbei um einen epigenetischen Mechanismus des „silencing“, also Abschalten bestimmter Genabschnitte (EWART, 2009). Die Erkennung unmethylierter CpG-Motive dient dem Körper als Früherkennung von mikrobiellen Eindringlingen und aktiviert das körpereigene Abwehrsystem (BOHLE, 2002). Obwohl Bakterien ihre Basen auch methylieren können, ist dies bei den angesprochenen CpG-Motiven kaum der Fall.

3.2 CpG-Klassen

Die verschiedenen CpG-Motive wurden entsprechend ihrer unterschiedlichen Wirkung auf spezielle Zellen des Immunsystems in verschiedene Klassen eingeteilt. Entscheidend dabei sind unter anderem das Zuckerrückgrat, die enthaltenen CpG-Sequenzen und ihre flankierenden Basenmotive, das Vorhandensein spezieller palindromischer Sequenzen und das Auftreten von Poly-Guanin Abschnitten. Es werden drei Hauptklassen (A-, B- und C-Klasse) unterschieden (KRIEG, 2006).

Die A-Klasse, auch als D-Typ bezeichnet, besitzt eine zentrale palindromische Sequenz, flankiert von Poly-Guanin-Schwänzen am 5` und 3` Ende, sowie einem gemischten Zuckerrückgrat aus Phosphodiester und Phosphothioester (SENTI et al., 2009). Die Poly-G-Motive an den Flanken sorgen für eine verstärkte Stabilität und erhöhte endosomale Aufnahme (VOLLMER und KRIEG, 2009). Diese so genannte Rückgratchimere ist besonders anfällig für Nukleasen, weshalb der *in vivo*-Einsatz bis dato limitiert war (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Die A-Klasse besitzt eine nur schwache Wirkung auf B-Lymphozyten, aber eine starke auf Antigenpräsentierende Zellen (APC) (SENTI et al., 2009). Dies führt vor allem zur Freisetzung von IFN- α und IFN- β durch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) und zur Aktivierung von NK-Zellen (SENTI et al. 2009; VOLLMER und KRIEG, 2009). Als Prototyp der A-Klasse gilt ODN 2216 (KRIEG, 2006).

Die B-Klasse (K-Typ) besitzt ein durchgehendes Phosphothioesterrückgrat und ist damit deutlich stabiler gegenüber ubiquitären DNAsen (VOLLMER und KRIEG, 2009). Sie wirkt hauptsächlich auf B-Zellen und führt zur Reifung und Aktivierung von pDC mit nur einer geringen IFN- α und IFN- β Antwort (SENTI et al., 2009). Durch Aktivierung der B-Zellen kommt es vor allem zur Freisetzung von IgM-Antikörpern und IL-6 (VOLLMER und KRIEG, 2009). Als Prototyp gilt ODN 2006 (KRIEG, 2002).

Die C-Klasse vereint die Wirkung von A- und B-Klasse in sich und stimuliert damit sowohl B-Lymphozyten als auch pDC (VOLLMER und KRIEG, 2009). Dies führt vor allem zur Freisetzung von IL-6 und IFN- α , sowie zur Bildung von Immunglobulinen des Typs M (IgM) (SENTI et al., 2009). Die B- und C-Klassen haben eine Halbwertszeit von zwei Tagen im Gewebe (SENTI et al., 2009). Als Prototyp der C-Klasse gilt ODN M362 (HARTMANN et al., 2003; VOLLMER et al., 2004).

Neben den bereits erwähnten drei CpG-Klassen A, B und C existieren nach VOLLMER und KRIEG (2009) noch zwei weitere Gruppen. Eine so genannte S-Klasse und eine P-Klasse. Die S-Klasse steht für suppressive Oligodeoxynukleotide und kleine Moleküle wie Chloroquin, welche den immunstimulatorischen Effekt der CpG-Motive hemmen. Interessanterweise hemmen S-ODN auch die TLR-7 und TLR-8 (RNA) mediierten Immunantworten (VOLLMER und KRIEG, 2009). Dies würde nach VOLLMER und KRIEG (2009) einen therapeutischen Einsatz bei rheumatischer Arthritis und systemischem Lupus erythematosus denkbar machen. Die P-Klasse enthält ein doppeltes Palindrom, daher die Bezeichnung P-Klasse (VOLLMER und KRIEG, 2009). Diese bilden so genannte Haarnadelstrukturen („hairpins“) im Bereich der GC-reichen Regionen und so genannte „Konkatamere“ (Wiederholungssequenzen) im Bereich des 5'-Palindroms aus (VOLLMER und

KRIEG, 2009). Diese höher molekularen Strukturen sind wahrscheinlich verantwortlich für die bis dato stärkste beobachtete Typ-1-IFN-Induktion durch eine CpG-Klasse (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Es existieren auch so genannte „suppressive ODN“, bestehend aus multiplen TTAGGG-Motiven (KLINMAN et al., 2008). Diese imitieren die immunsuppressive Wirkung körpereigener DNA und führen damit zu einer Herunterregulation von proinflammatorischen Th1-Zytokinen (KLINMAN et al., 2008). Präklinische Studien konnten die Wirkung der suppressiven ODN bei Autoimmunprozessen und septischem Schock nachweisen (KLINMAN et al., 2008).

3.3 Immunologie der CpG-ODN

Natürliche Infektionen durch Bakterien und Viren trainieren das Immunsystem in Richtung einer zellvermittelten, proinflammatorischen Th1-Immunantwort (KLINE, 2007). Im Gegensatz dazu reagiert ein neonatales Immunsystem mit einer Allergie-vermittelnden, humoralen Th2-Antwort (KLINE, 2007).

Das vorherrschende Zytokinmilieu, eine Balance zwischen Th1 und Th2, ist verantwortlich für die weiteren immunologischen Reaktionen (KLINE, 2007). Durch den Kontakt zu mikrobiellen Erregern, oder synthetisch hergestellter CpG-ODN, kommt es zur Differenzierung von naiven CD 4⁺-T-Helfer-Zellen in Richtung einer spezialisierten Subklasse, die Th1-Lymphozyten (BOHLE, 2002) (Abb. 3). Diese setzen nun ihrerseits unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 frei, welche einen Anstieg von IFN- γ vermitteln (BOHLE, 2002). Dieses zentrale Th1-Zytokin wirkt inhibitorisch auf Allergie-vermittelnde Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 (FONSECA und KLINE, 2009) (Abb. 3). Diese Differenzierung zu Gunsten von Th1-Zellen (Th1-Shift) ist entscheidend von der IL-12-Synthese abhängig (BOHLE, 2002). Mäuse, welche mit anti-IL-12-Antikörpern behandelt wurden, verloren den CpG-induzierten immunmodulatorischen Effekt (BOHLE, 2002).

Von besonderer Bedeutung im immunologischen Geschehen erscheint die Aktivierung von allergenspezifischen regulatorischen T-Zellen (Treg) durch CpG-ODN (MOSEMAN et al., 2004; JARNICKI et al., 2008). Es kommt hierbei unter anderem zur Bildung von IL-10, welches eine periphere T-Zell Toleranz verursacht und antiinflammatorische sowie antiallergische Wirkung besitzt (TAYLOR et al. 2006). IL-10 ist als inhibitorisches Zytokin in der Lage, sowohl Th1-Zytokine (IFN- γ) als auch Th2-Zytokine (IL-4) zu hemmen (VAN SCOTT et al., 2000) und ist damit von besonderem Interesse bei überschießenden allergischen und entzündlichen Erkrankungen, wie sie die COB des Pferdes darstellt (Abb. 3).

Durch eine Kaskade von Enzymreaktionen und Freisetzung von Botenstoffen kommt es zu einer Immunglobulinverschiebung von Allergie-vermittelnden Immunglobulinen der Klasse E (IgE) zu IgG2-Subtypen (Isotypenswitch) (WEINER, 2000; FONSECA und KLINE, 2009). Bei Vorhandensein großer Mengen IgG2 konkurrieren diese um die gemeinsame Bindungsstelle an Mastzellen und verdrängen schließlich die IgE-Subtypen (FONSECA und KLINE, 2009) (Abb. 3). Eine IgE-vermittelte Mastzelldegranulation bleibt aus und damit auch die unerwünschten allergischen Symptome (FONSECA und KLINE, 2009).

Die CpG-Sequenzen aktivieren innerhalb von 15 Minuten die Transkription der Zelle und führen innerhalb weniger Minuten nach Kontakt mit der Zelle zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (WEINER, 2000). Dies induziert die Bildung von T-Helfer-1 (Th1)-Zytokinen durch APC (WEINER, 2000) (Abb. 3). Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten Expressierung von „major histocompatibility complex“ (MHC-I und -II) und costimulatorischen Molekülen durch APC (KRIEG et al., 1995). T-Zellen können Antigen nur in prozessierter Form in Anwesenheit von körpereigenen Molekülen (MHC-Restriktion) erkennen. Werden CD 4⁺-T-Helferzellen bei Antigenkontakt durch APC einem Zytokinmilieu von IL-4 ausgesetzt, wird die Th2-Schiene eingeschlagen, was in der Folge zur IgE-Bildung der aktivierten B-Lymphozyten führt (RYANNA, et al., 2009) (Abb. 3).

Daneben existiert auch eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung über so genannte „toll-like receptor-9“ (TLR-9) (FONSECA und KLINE, 2009). Die B-Lymphozyten als Teil der APC differenzieren sich in kurzlebige Plasmazellen und Gedächtniszellen. Die antikörperproduzierenden Plasmazellen bilden initial IgM-Antikörper, welche nur eine geringe Affinität zum auslösenden Antigen besitzen (LUNN und HOROHOV, 2010). Durch eine gleichzeitige Komplementaktivierung wird dies allerdings ausgeglichen. Nach dieser initialen IgM-Bildung kommt es zum Isotypenswitch und der Produktion von IgG mit deutlich höherer Antigenaffinität (LUNN und HOROHOV, 2010). Die aus den B-Lymphozyten hervorgegangenen Gedächtniszellen verursachen nach erneutem Antigenkontakt eine acht- bis zehnfach höhere Antikörperproduktion (LUNN und HOROHOV, 2010).

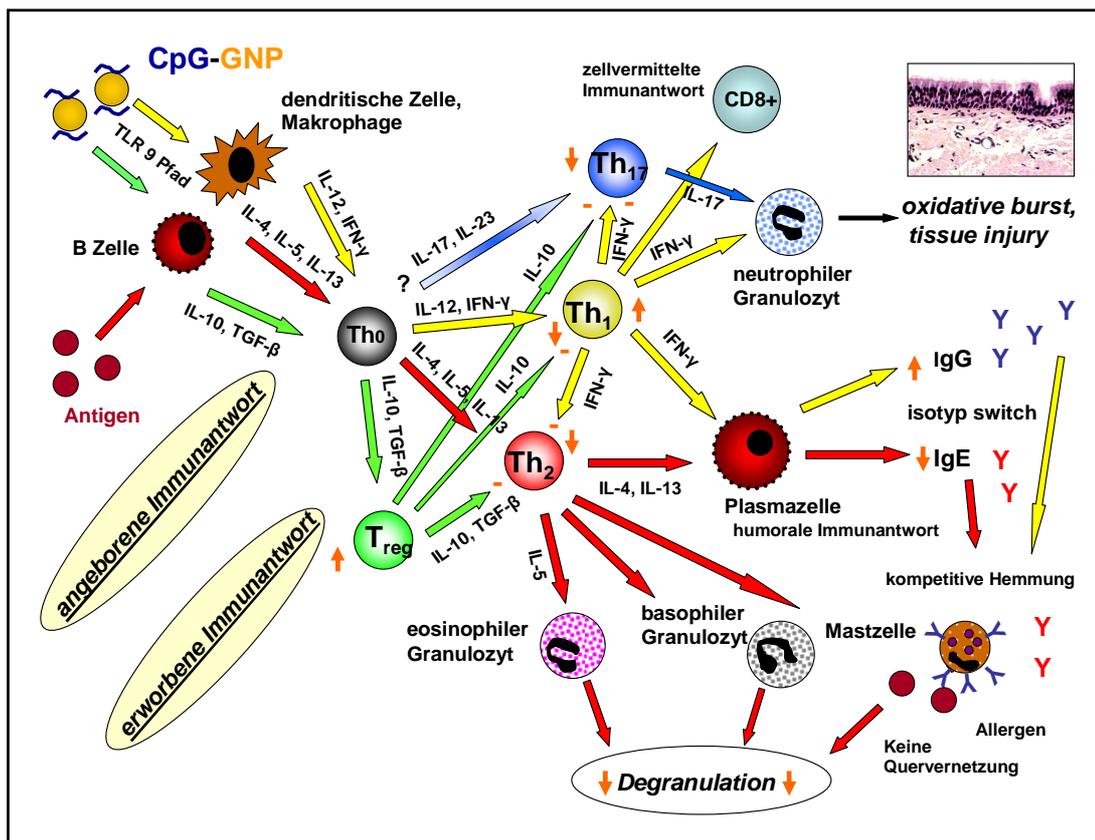


Abb. 3: Schemazeichnung der CpG-induzierten immunologischen Mechanismen. Einfluss von CpG-GNP auf das angeborene und erworbene Immunsystem unter besonderer Berücksichtigung der T-Helfer-Zellsubklassen.

3.4 Toll-like Rezeptoren

Die intrazelluläre Erkennung der CpG-Motive erfolgt über den toll-like receptor-9 (TLR-9), einen der wichtigsten „pathogen recognition receptor“ des angeborenen Immunsystems (KRIEG, 2002). Die Klasse der „toll-like receptors“ (TLRs) gehört zu den evolutionär hochkonservierten Typ-I-Transmembranproteinen (ANDERSON, 2000). Beim Menschen sind bis dato zehn verschiedene TLR-Klassen bekannt, bei Vertebraten bereits 13 (RICHTER, 2006). Aufgrund ihrer individuellen Ligandenspezifität erkennt jede Rezeptorklasse nur ganz bestimmte Bindungspartner. So interagiert TLR-3, TLR-7 und TLR-8 nur mit RNA, TLR-4 mit LPS und TLR-9 nur mit DNA (HAAS et al., 2008).

TLRs können zwischen „körpereigen“ und „fremd“ unterscheiden und reagieren nur auf „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) während einer Infektion (AKIRA et al., 2006; HAAS et al., 2008). Die Mehrzahl der TLRs (TLR-1, -2, -4, -5, -6 und -11) befinden sich auf der Zelloberfläche (FONSECA und KLINE, 2009), wohingegen TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 intrazellulär in Endosomen lokalisiert sind (AKIRA et al., 2006). Die Ligandenbindung erfolgt dabei im sauren Milieu der Endosomen, was Voraussetzung für die zelluläre Aktivität, die Dimerisierung der TLRs und deren Stabilisierung ist (HAAS et al., 2008). Die verschiedenen TLRs erkennen jeweils unterschiedliche PAMPs. TLR-3 erkennt beispielsweise „double stranded“ (doppelsträngige) RNA (ds RNA), TLR-7 und TLR-8 erkennen hingegen „single stranded“ (einzelssträngige) RNA (ss RNA) und TLR-9 ist spezialisiert auf „single stranded“ CpG-DNA (HAAS et al., 2008).

TLR-9 wurde beim Menschen bereits in B-Lymphozyten und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) identifiziert (KRIEG, 2006). Nach Zellaktivierung war TLR-9 auch in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, CD 4⁺-Zellen, Lungenepithelzellen, Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen nachweisbar (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Beim Pferd konnten SCHNEBERGER und Mitarbeiter (2009) in der Lunge diverse Zellen identifizieren, welche TLR-9 exprimieren. Dazu zählen intravaskuläre Makrophagen, Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen, Kapillarendothelzellen der Lunge, Typ-II-Epithelzellen der Alveolarsepten und auch neutrophile Granulozyten. Auch konnte durch eine Lipopolysaccharid

(LPS)-Behandlung sowohl die Zahl der TLR-9-Expression als auch die Anzahl der TLR-9-positiven Zellen deutlich erhöht werden (SCHNEBERGER et al., 2009). Die Methylierung des Cytosins, wie sie im Säuger-Genom meist vorliegt, oder eine Inversion des Cytosin-Guanin Dinukleotids (GC), verhindern die TLR-9-Aktivierung (KRIEG, 2002). Aus dieser Erkenntnis wurde das Paradigma der Unterscheidung zwischen körpereigener und -fremder DNA in Abhängigkeit vom niedrigen CpG-Gehalt und der hohen Methylierungsrate des Cytosins aufgestellt (BIRD, 1986). Allerdings lieferten Ligandenbindungsstudien entgegengesetzte Ergebnisse (LATZ et al., 2004; YASUDA et al., 2006). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die endosomale Lokalisation der TLR-9 vor konstanter Aktivierung durch eigene DNA schützt.

3.5 Bedeutung des Zuckerrückgrates auf die TLR-Aktivierung

Von entscheidender Bedeutung für die TLR-9-Aktivierung scheint auch das Zuckerrückgrat der Nukleotide zu sein. In diesem Hintergrund sind auch die speziesspezifischen Unterschiede hinsichtlich der optimalen CpG-Motive zu sehen (HAAS et al., 2008). Die Versuche zur optimalen Stimulation mittels speziesspezifischer unterschiedlicher CpG-Motiven wurden an synthetisch hergestellten Oligodeoxynukleotiden (ODN) durchgeführt (KRIEG, 2002). Diese synthetischen ODN besitzen ein modifiziertes Zuckerrückgrat (Phosphothioester) im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden ODN (Phosphodiester) (HAAS et al., 2008). Die 2'-Desoxyribose des DNA-Rückgrates konnte als primäre Determinante der ss-DNA-TLR-9-Interaktion identifiziert werden (HAAS et al., 2008).

Natürliche Phosphodiester (PD) 2'-Desoxyribose-Homopolymere ohne Basen wirken als basale TLR-9-Agonisten. Erstaunlicherweise wurden Phosphothioester (PS)-modifizierte Basen als TLR-9- und TLR-7-Antagonisten identifiziert. Das diese trotz dessen eine TLR-9-stimulatorische Aktivität aufweisen, kommt erst durch die CpG-Motive zustande (HAAS et al., 2008). CpG-Motive verändern demnach eine TLR-9-Inhibition, bedingt durch das PS-Rückgrat in eine Stimulation (HAAS et al., 2008).

Verschiedene DNA-Sequenzen können die Stärke der Immunantwort verändern, jedoch scheint die strikte CpG-Motivabhängigkeit der TLR-9-Aktivierung ein exklusives Charakteristikum des PS-modifizierten Rückgrates zu sein, welches als TLR-7- und TLR-9-Antagonist wirkt (HAAS et al., 2008). PS-modifizierte ODN ohne CpG aktivieren TLR-9 nicht. PD-ODN ohne CpG hingegen aktivieren mit so genannten Poly-Guanin-Schwänzen (Poly-G-Schwänze) TLR-9 (HAAS et al., 2008). Ausgedehnte Poly-G-Schwänze am 3`Ende von PD-ODN schützen zum Einen vor Abbau der DNA durch DNAsen (DNA-spaltende Enzyme) und verstärken gleichzeitig auch die endosomale Translokation (HAAS et al., 2008). Die endosomale Translokation ist wiederum wahrscheinlich entscheidend für die TLR-9-Aktivierung (HAAS et al., 2008). Die Poly-G-Schwänze enthalten bis zu 24 Guaninbasen. Diese 3`Poly-G-Extension führt sowohl bei methylierten PD-CpG-ODN, als auch bei PD-non-CpG-ODN zur TLR-9-vermittelten IFN- γ -Produktion (HAAS et al., 2008).

Verändert man das Rückgrat der ODN von PS zu PD führt dies von der TLR-9-Inhibition zur Stimulation (HAAS et al., 2008). Dies zeigt die Bedeutung des Zuckerrückgrates auf die DNA-TLR-9-Interaktion. PS-modifizierte 2`Desoxyribose bindet mit 100-fach stärkerer Affinität an TLR-9 und TLR-7 als PD-2`Desoxyribose, hemmt aber gleichzeitig kompetitiv die ligandeninduzierte Stimulation von TLR-9 und TLR-7 (HAAS et al., 2008). Enthaltene CpG-Motive kehren diesen negativen Effekt auf TLR-9 um und führen zusammen mit der hohen Rezeptoraffinität der PS-ODN zu einer starken TLR-9-Stimulation (HAAS et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, PS-modifizierte ODN wirken als TLR-9-Antagonisten (kompetitive Hemmung), besitzen aber gleichzeitig eine sehr hohe Rezeptoraffinität (HAAS et al., 2008). CpG-Sequenzen wirken TLR-9-stimulatorisch und heben den inhibitorischen Effekt des Zuckerrückgrates nicht nur auf, sondern kehren ihn aufgrund der Rezeptoraffinität sogar ins stark positive um (HAAS et al., 2008). Nach HAAS und Mitarbeitern (2008) zeigen diese Ergebnisse, dass die TLR-9-Aktivierung strikt von einem 2`Desoxyriboserückgrat abhängig ist.

3.6 Molekularer Mechanismus der CpG-Signaltransduktion

CpG-ODN werden sequenzunabhängig durch spezielle Proteine an der Zelloberfläche verschiedenster Zellen mittels Endozytose aufgenommen und dort über säurehaltige Vesikel in endosomale Kompartimente der Zelle transportiert (FONSECA und KLINE, 2009; VOLLMER und KRIEG, 2009) (Abb. 4). Medikamente, welche mit der endosomalen Ansäuerung interferieren (z.B. Quinacrine), hemmen die Wirkung von CpG-ODN (MACFARLANE und MANZEL, 1998; HÄCKER, 2002). Die intrazelluläre Signaltransduktion der CpG-ODN verläuft über eine Dimerisierung der Rezeptormoleküle (VOLLMER und KRIEG, 2009). Dies führt zu einer allosterischen Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne des Toll/Interleukin-1-Rezeptors, was zu einer Rekrutierung von Signaladaptormolekülen (MyD88) und Signaltransduktionsmolekülen wie die „IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase“ (IRAK) und die „mitogenaktivierte Kinase“ (MAPK), sowie „IFN regulatory factors“ führt (VOLLMER und KRIEG 2009).

Diese Signalkaskade führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor- κ B“ (NF- κ B) mit nachfolgender Zytokinproduktion und Expression kostimulatorischer Moleküle in den Zielzellen (VOLLMER und KRIEG, 2009) (Abb. 4). Über einen zweiten MyD88-abhängigen-Weg kommt es zur Komplexierung mit IRAK-1, IRAK-4, „TNF receptor-associated factor 6“ (TRAF 6) und „interferon-regulatory factor 7“ (IRF-7) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Einer der zentralen Transkriptionsfaktoren der CpG-Wirkung ist T-bet (Th1-specific T-box transcription factor) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Dieser vermittelt eine Hemmung der Th2-assoziierten Antikörperisotypen und eine Verstärkung der Th1-assoziierten Antikörperisotypen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Es existieren spezielle Kontrollmechanismen, welche die TLR-9-vermittelte Immunantwort überwachen. Dazu zählen die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die „NO Synthase 2“ (NOS 2), die Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostaglandin E2 (PGE 2) und das regulatorische Zytokin IL-10, welche durch die CpG-Aktivität hochreguliert werden und über eine negative Rückkoppelung ihrerseits zu einer Herunterregulation der CpG-Effekte führen (VOLLMER und KRIEG,

2009). Eine Reihe negativer TLR-9-Regulatoren fördern T-regulatorische Zellen (Treg) und unterdrücken die T-Zell-Expansion, sowie die zytotoxische T-Zell-Aktivität und könnten damit möglicherweise die Induktion von Autoimmunerkrankungen verhindern (VOLLMER und KRIEG, 2009).

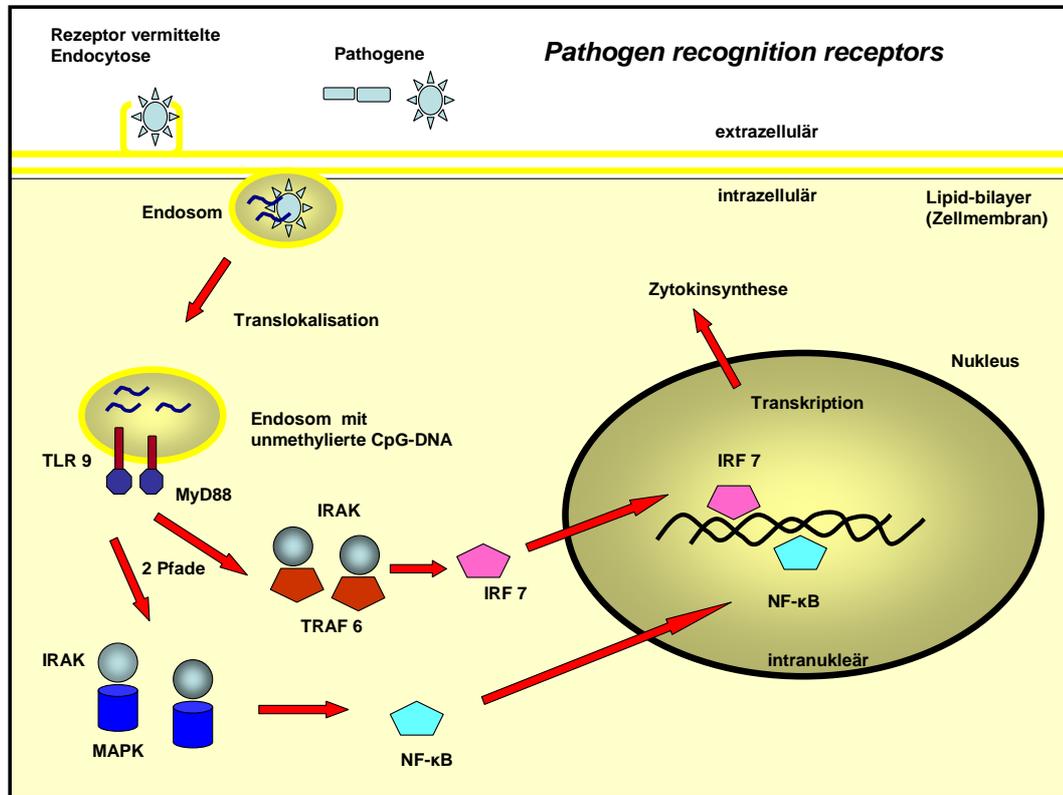


Abb. 4: Schemazeichnung zur TLR-9-vermittelten Signaltransduktion. Intrazelluläre Aufnahme der Pathogene über rezeptorvermittelte Endozytose und Translokalisierung in Endosomen. Erkennung durch *Pathogen recognition receptor* TLR-9 und Auslösung einer Signalkaskade über MyD88, IRAK, TRAF 6 und MAPK mit der Folge der Aktivierung von Transkriptionsfaktor NF-κB und IRF 7. Induktion der Transkription von für spezifische Zytokine kodierenden Genen und nachfolgender Proteinbiosynthese der Zytokine.

Diese Vielzahl an Kontrollmechanismen der CpG-ODN-vermittelten Immunaktivierung ermöglichen eine äußerst feine Regulation und das Ineinandergreifen aktivierender und hemmender Faktoren, welche erst in ihrem Zusammenspiel als endogenes Orchester vollständig verstanden werden können.

3.7 *In vitro*-Einsatz von CpG-ODN

Die meisten *in vitro*-Versuche mit CpG-ODN wurden bis dato an peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) durchgeführt (RANKIN et al., 2001; LIU et al., 2008, 2009). Hierbei wurden die verschiedenen CpG-Motive auf ihre sequenzabhängigen speziesspezifischen Unterschiede im Hinblick auf die Hochregulation von Th1-Zytokinen verglichen. Beim Pferd wurden bereits CpG B 2142, B 2135 und C 2395 sowie ODN 2041 in *in vitro*-Studien mit equinen PBMCs getestet (LIU et al., 2008, 2009). Abhängig vom untersuchten Zytokin unterschieden sich die Klassen in ihrer Effektivität. Auch mit PBMCs von Hunden wurden bereits erfolgreich *in vitro*-Versuche mit CpG-ODN durchgeführt (KURATA et al., 2004). KURATA und Mitarbeiter (2004) verglichen elf verschiedene A-Klassen im Hinblick auf ihre sequenzabhängige Speziesspezifität auf kanine Zellen und ihre Fähigkeit, IFN- γ hoch zu regulieren. ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) untersuchten die CpG-Wirkung sowohl auf murine myeloide dendritische Zellen als auch auf humane plasmazytoide DCs und B-Zellen, beide gewonnen aus PBMCs. Dabei wurden CpG-ODN A 2216, B 2006, B 1826, C M362 und M383 auf ihre Wirkung verglichen. RANKIN und Mitarbeiter (2001) verglichen 30 verschiedene CpG-ODN-Motive bei zehn unterschiedlichen Tierarten und entdeckten dabei ein zentrales Motiv (5'- GTCGTT- 3') als hochkonserviert innerhalb der meisten untersuchten Spezies.

3.8 *In vivo*-Einsatz von CpG-ODN

3.8.1 Vakzinestudien mit CpG-ODN

In den meisten kommerziellen Impfstoffen werden heute Aluminiumhydroxide (Alum) als Adjuvans verwendet, welche allerdings die Aktivierung von CD 8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten blockieren (WEINER, 2000). Die meisten Adjuvanzen verstärken nur die Th2-Antwort, ohne auch die zelluläre Immunantwort anzuregen (WEINER, 2000). Eine Ausnahme bildet das *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)-Adjuvans, welches auch die Th1-Schiene aktiviert (WEINER, 2000).

CpG-ODN aktivieren sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort (FLAMINIO et al., 2007). Im Gegensatz zu anderen Wirkverstärkern in Impfstoffen, wie beispielsweise dem Freund'schen Adjuvans, zeigen CpG-ODN unabhängig vom Verabreichungsweg keinerlei Bildung von sterilen Abszessen (WEINER, 2000).

Bei fast allen Vakzinestudien mit CpG-ODN wurden bisher, aufgrund ihrer stimulatorischen Wirkung speziell auf B-Lymphozyten, B-Klassen als Adjuvans eingesetzt (VOLLMER und KRIEG, 2009). Allerdings zeigten auch C-Klassen Vakzineaktivität. Unter einer Adjuvansaktivität versteht man nach VOLLMER und KRIEG (2009) eine Aktivierung der humoralen Immunantwort durch synergistische Effekte zwischen TLR-9 und B-Zellrezeptoren. Dies führt zur Stimulierung von antigenspezifischen B-Zellen, hemmt die B-Zellapoptose, verstärkt die Überlebensrate und den IgG-Klassenswitch (VOLLMER und KRIEG, 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass kein anderes Vakzineadjuvans eine so starke Th1-Immunantwort bewirkt wie CpG-ODN (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Eine Verabreichung über die Schleimhaut aktiviert nach VOLLMER und KRIEG (2009) sowohl die lokale als auch die systemische humorale und zelluläre Immunantwort und vermittelt damit einen erhöhten Schutz gegen Infektionen. In Vakzinestudien konnte gezeigt werden, dass der Mangel an protektiven Antikörperkonzentrationen nach Impfungen bei HIV-Infektionen durch Kombination mit CpG-B (CpG 7909) stark vermindert werden konnte (VOLLMER und KRIEG, 2009). Bei Impfungen gegen Hepatitis B in Kombination mit CpG-ODN B stiegen die seroprotektiven Antikörperlevel nach zwölf Monaten um 63 % bei der Kontrollgruppe ohne CpG-ODN und um 100 % bei der kombinierten CpG-ODN B Anwendung an (VOLLMER und KRIEG, 2009). In dieser Studie behielten 85 % der Patienten den Antikörperlevel für mehr als dreieinhalb Jahre; in der Kontrollgruppe waren es dagegen nur 20 % (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Die protektiven Antikörperlevel wurden mit CpG-ODN auch deutlich früher erreicht. Bei einer Anthrax-Impfstudie erreichte die Kontrollgruppe ohne CpG-ODN Adjuvans das Toxinneutralisationslevel nach 46 Tagen, die kombinierte Vakzine mit CpG-ODN B-Anwendung erzeugte bereits nach 22 Tagen diese

Antikörperlevel (einschließlich eines achtfach erhöhten Antikörpertiters) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Bei Mäusen konnten Vakzinedosen bei Kombination mit einem CpG-ODN Adjuvans um bis zu 99 % reduziert werden (VOLLMER und KRIEG, 2009). Da gerade bei Influenzavakzinen eine Reduktion der Impfdosis entscheidend ist, um adäquate Mengen des Impfstoffes herstellen zu können, erweisen sich CpG-ODN Adjuvanzen hierbei als äußerst hilfreich (VOLLMER und KRIEG, 2009). So reicht beispielsweise ein Zehntel der normalen Influenzaimpf-dosis aus, um in Kombination mit CpG-ODN ein gleiches antigenspezifisches IFN- γ -Level zu erhalten (VOLLMER und KRIEG, 2009).

Eine prophylaktische Anwendung von TLR-9-Liganden (CpG-ODN) bei Mäusen führte zu einem transienten Schutz gegenüber einem weiten Feld von viralen, bakteriellen und einigen parasitären Erregern (z.B. *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Ebola*, *Vakziniavirus*) (VOLLMER und KRIEG, 2009). Je nach Art der Verabreichung (oral, inhalativ, oder *per injectionem*) reichte dieser Schutz bei einmaliger CpG-ODN Verabreichung von einem Tag bis zu zwei Wochen (VOLLMER und KRIEG, 2009).

3.8.2 Allergenspezifische Immuntherapie mit CpG-ODN

Auch in die Humanmedizin fanden CpG-ODN bereits erfolgreich Einzug (SENTI et al., 2009). Durch eine direkte Kombination der CpG-ODN mit bestimmten Allergenen kommt es zu einer antigenspezifischen Th1-Immunantwort und gleichzeitig zu einer Unterdrückung eines Th2-vermittelten allergischen Asthmas (SENTI et al., 2009). Die Kombination mit Allergenen wird als spezifische Immuntherapie (SIT) bezeichnet (BOHLE, 2002). Diesen Mechanismus macht man sich bei einem der stärksten humanen Allergene, der beifussblättrigen Ambrosie, zu Nutze (RICHTER, 2006). Eine Konjugation der CpG-ODN an spezifische Antigene verstärkt nach VOLLMER und KRIEG (2009) die Antigenaufnahme und reduziert die nötige Antigenmenge. Erste erfolgversprechende Phase I und IIa Studien beim Menschen mit CpG-ODN A wurden bereits durchgeführt (SENTI et al., 2009). Es wurde eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik erzielt (VOLLMER und KRIEG, 2009).

4. Bedeutung der Th1/Th2-Balance

Die Th1/Th2-Balance im Körper ist von entscheidender Bedeutung in der Homöostase der Immunantworten (KLINE, 2007). Kommt es zur einer Verschiebung in Richtung überschießender Th2-Antwort, können allergische Erkrankungen die Folge sein (UMETSU und DEKRUYFF, 2006; KLINE, 2007). Physiologischerweise spielen Th2-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung extrazellulärer Parasiten wie beispielsweise den intestinalen Helminthen (LUNN und HOROHOV, 2010). Dieser Pfad wird bevorzugt an der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts und des Respirationstraktes eingeschlagen, da hier ein Kontakt zur Außenwelt besteht (LUNN und HOROHOV, 2010). Diese Oberflächen sind prädisponiert für Parasiteninvasionen, deren Bekämpfung die eigentliche Aufgabe von IgE darstellt (LUNN und HOROHOV, 2010). Antigenpräsentierende Zellen (APCs) an diesen Barrieren zur Außenwelt sind auf die Th2-Antwort programmiert (LUNN und HOROHOV, 2010). Unter diesen Gesichtspunkten ist die Th1/Th2-Balance von entscheidender Bedeutung für das immunologische Gleichgewicht.

Natürliche Infektionen durch Bakterien und Viren wirken auf das Immunsystem in Richtung einer zellvermittelten, proinflammatorischen Th1-Immunantwort (KLINE, 2007). Im Gegensatz dazu herrscht im neonatalen Immunsystem eine allergiebegünstigende, humorale Th2-Antwort vor (KLINE, 2007). Es wird vermutet, dass der Rückgang von Infektionskrankheiten in der frühen Entwicklungsphase des Immunsystems eine Ursache für das vermehrte Auftreten von Allergien ist (BRAUN-FAHRLÄNDER, 2003; WASER et al., 2005; KLINE, 2007; BRAUN-FAHRLÄNDER, 2009). Der Kontakt zu mikrobiellen Erregern in dieser Phase der Entwicklung scheint einen entscheidenden Effekt auf die Prägung des Immunsystems auszuüben (BRAUN-FAHRLÄNDER, 2003, 2009). So zeigte sich, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind und regelmäßig Kontakt zu Tieren hatten, später weniger Allergien entwickelten, als Kinder in Städten (BRAUN-FAHRLÄNDER, 2003, 2009).

5. Gelatinenartikel (GNP)

5.1 Nanopartikeläre Trägersysteme

Mit Hilfe verschiedener Transportsysteme („delivery systems“) ist es möglich, CpG-ODN erfolgreich in Zielzellen zu transferieren (ZWIOREK et al., 2008; WILSON et al., 2009). Der Vorteil solcher Transportsysteme besteht darin, dass sie zu einer verbesserten zellulären Aufnahme der CpG-Moleküle führen und sie aufgrund von sterischen Abschirmungen vor frühzeitigem Abbau durch körpereigene Nukleasen schützen (ZWIOREK et al., 2008). Im Zusammenhang damit verstärken sie die immunstimulatorische Wirkung der CpG-ODN nachhaltig (ZWIOREK et al., 2008).

Freie CpG-ODN zeigen jedoch Probleme bei der zellulären Aufnahme, der Stabilität und der Spezifität für Zielzellen (ZWIOREK et al., 2008). Zur Lösung dieser Probleme wurde eine Kopplung der Oligodeoxynukleotide an verschiedene Transportsysteme versucht (ZWIOREK et al., 2008; WILSON et al., 2009). Werden CpG-ODN in nanopartikeläre Trägersysteme verpackt, führt dies zu einer Aufnahme in lokale Lymphknoten ohne systemische Ausbreitung (STORNI et al., 2004; BOURQUIN et al., 2008; ZWIOREK et al., 2008). Durch das nanopartikeläre Trägersystem wird die lokale Phagozytoserate erhöht, wodurch CpG-ODN direkt in die Endosomen zu TLR-9 gelangen (STORNI et al., 2004).

Das Thioesterrückgrat der B- und C-Klasse schützt vor frühzeitigem Abbau und erhöht dadurch die Halbwertszeit im Gewebe auf zwei Tage (MUTWIRI et al., 2004). Die A-Klasse hingegen wird durch ubiquitäre DNAsen *in vivo* schnell zerstört, kann aber beispielsweise durch sterische Abschirmung auf Gelatinenartikel oder verpackt in „virus-like particles“ (VLP) davor bewahrt werden (WILSON et al., 2009).

MANOLOVA und Mitarbeiter (2008) konnten nachweisen, dass eine Verpackung der A-Klasse in Nanopartikel (30 nm) eine bessere Aufnahme in den Lymphknoten und damit verbunden auch eine verstärkte Phagozytose ermöglicht. Dadurch gelangt nach STORNI und Mitarbeiter (2004) das CpG-ODN direkt in seinen Bestimmungsort, dem Endosom, zu den intrazellulär gelegenen TLR-9-Molekülen. Unverpackte CpG-ODN hingegen verteilen sich im Organismus und

können unter Umständen zu einer Splenomegalie und in einigen Fällen auch zu toxischen Schockreaktionen führen, wie SPARWASSER und Mitarbeiter (1997) und VON BEUST und Mitarbeiter (2005) zeigten. Die CpG-ODN Anwendung über den Lymphknoten von Mäusen bedarf nach VON BEUST und Mitarbeitern (2005) viel geringerer Mengen ($< 0,1$ nmol) als eine subkutane Verabreichung. Bei 1-10 nmol traten unabhängig vom Verabreichungsweg systemische Nebenwirkungen auf (VON BEUST et al., 2005). Die gleiche Gruppe konnte in Versuchen an Mäusen nachweisen, dass eine intralymphatische Anwendung von CpG-ODN sicher und effektiv ist.

Lipidnanopartikel konnten als effektives Transportsystem für CpG-ODN nachgewiesen werden (WILSON et al., 2009). Durch die Verpackung der CpG-ODN in die Nanopartikel kommt es zu einer verstärkten Wirkung, einer verlängerten Lebensspanne, einer passiven Akkumulation am Ort des Krankheitsgeschehens und einem Reservoirereffekt der CpG-ODN mit verzögerter Freisetzung (WILSON et al., 2009).

5.2 Gelatinenpartikel

In einer umfangreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studie etablierten ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) ein neues Transportsystem. Es handelt sich dabei um Gelatinenpartikel (GNP), hergestellt aus Gelatine Typ A, extrahiert aus Schweinehaut (175 Bloom) (ZWIOREK et al., 2008) (Abb. 5). Die Beladung der kationisierten GNP mit negativ geladenen CpG-ODN erfolgt über elektrostatische Anziehung. Durch die Verknüpfung mit Cholamin kann eine pH-unabhängige kationische Oberfläche auf den GNP mittels einer quaternären Aminogruppe erzeugt werden (ZWIOREK et al., 2008).

Als optimale Beladung der GNP wurde ein Verhältnis von 1:20 (5 %) ermittelt, da bei höherer Beladung die GNP nicht mehr stabil blieben und Tendenz zur Aggregation zeigten (ZWIOREK et al., 2008). Dies kommt höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer nunmehr neutralen Oberfläche zu Stande, welche die Aneinanderlagerung aufgrund von fehlenden elektrostatischen Wechselwirkungen begünstigt (ZWIOREK et al., 2008).

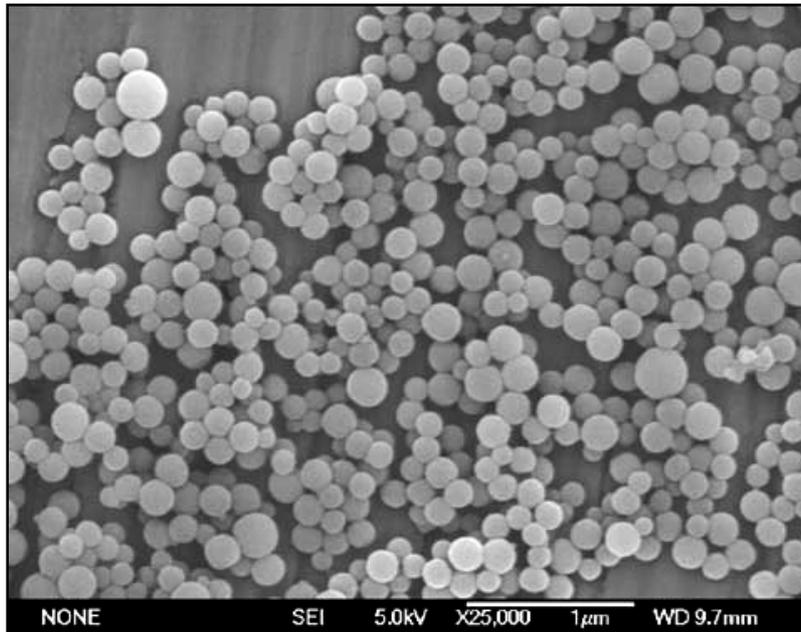


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Gelatinenanopartikeln.
(Abb. mit freundlicher Genehmigung von Dipl. pharm. S. Fuchs)

Ein entscheidender Vorteil der Gelatinenanopartikel ist, dass sie selbst immunologisch inert sind (ZWIOREK et al., 2008). Dies ist die Voraussetzung für eine wiederholte Anwendung im Organismus und eine Konjugation mit immunmodulatorischen Substanzen wie den CpG-ODN.

Eine Reihe von Untersuchungen zeigten, dass GNP Polymere eine exzellente biologische Abbaubarkeit und eine sehr gute biologische Verträglichkeit aufweisen (BOURQUIN et al., 2008; TSENG et al., 2008, 2009; ZWIOREK et al., 2008). Die biologische Abbaurrate der Partikel kann über das Ausmaß der Quervernetzungen reguliert werden (TSENG et al., 2008). Die funktionellen Gruppen auf den Nanopartikeln sind in der Lage, Konjugationen mit Liganden einzugehen, wodurch sie sich als Transportsystem für pharmakologische Substanzen eignen (ZWIOREK et al., 2008).

5.3 Vernebelung von GNP

Die aerodynamische Stabilität von GNP nach Vernebelung wurde bereits nachgewiesen (TSENG et al., 2008, 2009). Je höher dabei die Viskosität der zu vernebelnden Dispersion und je geringer die Oberflächenspannung der Partikel ist, desto kleiner werden die vernebelten Partikel. Dies ist im Hinblick auf die Alveolargängigkeit (1-5 μm Partikelgröße) von großer Bedeutung.

5.4 *In vitro*-Einsatz von CpG-ODN/GNP

Bei Gentherapieexperimenten konnten ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) nachweisen, dass die höchste Transfektionsrate der Nanopartikel in die Zielzellen bei einem elektrischen Potential von ca. + 3 mV stattfand. Aufgrund dessen wurden 30 μg CpG-ODN pro 600 μg GNP (5 %) als ideale Beladung angesehen (ZWIOREK et al., 2008). ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) konnten nachweisen, dass CpG-ODN rasch an GNP-gebunden werden und nach zwölf Stunden Inkubation mit murinen myeloiden dendritischen Zellen (mDC) 68 % der Zellen CpG-ODN beladene GNP aufgenommen hatten, wobei der Einfluss der Partikelgröße auf die zelluläre Aufnahme und die folgende Immunstimulation von Bedeutung waren. Die Phagozytose wurde als Hauptaufnahmemechanismus in die Zielzellen identifiziert (ZWIOREK et al., 2008).

Kolloidale partikuläre Formulierungen bewegen sich innerhalb der gleichen Größenverhältnisse wie Mikroorganismen und werden deshalb bevorzugt durch entsprechende Abwehrzellen phagozytiert (ZWIOREK et al., 2008). ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) konnten zeigen, dass positiv geladene Partikel im Vergleich zu neutralen und negativ geladenen Formulierungen bevorzugt durch DC und Makrophagen phagozytiert werden.

Verschiedene Th1-Zytokine (IL-12 p70, IL-6 und TNF- α) wurden nach 24 Stunden Inkubation von mDC mit CpG-ODN B 1826 mittels quantitativen ELISA bestimmt (ZWIOREK et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN an GNP gebunden eine zwei- bis dreifach stärkere Zytokinantwort auslösten als ungebundene CpG-ODN der gleichen Klasse (ZWIOREK et al., 2008). TNF- α stieg im Vergleich zu ungebundenen CpG-ODN nach kombinierter CpG-

ODN/GNP-Anwendung sieben- bis neunmal stärker an (ZWIOREK et al., 2008). CpG/GNP führen zu einer Hochregulation der Expression von MHC-II und CD86 Oberflächenmolekülen (ZWIOREK et al., 2008). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CpG/GNP die Immunogenität von zusätzlich transportierten Antigenen steigert und die Aktivierung und Prägung von T-Zellen durch DC verstärkt (ZWIOREK et al., 2008). Dies ist von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf eine kombinierte Anwendung mit potentiellen Allergenen bei der spezifischen Immuntherapie (SIT). Die Phagozytose größerer Partikel (> 200 nm) resultiert in einer längeren Retention in endosomalen Vesikeln, was wiederum essentiell für die Induktion der Zytokinsynthese ist (ZWIOREK et al., 2008). Hierbei zeigt sich der Einfluss der Größe der aufgenommenen Partikel auf die Expression der Zytokine.

5.5 *In vivo*-Anwendung von CpG-ODN/GNP

ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) zeigten, dass dieser Ansatz auch im *in vivo*-Versuch erfolgreich ist und zu einer Steigerung der immunstimulatorischen Kapazität der CpG-ODN durch deren Konjugation an GNP führt. Es wurden zwei GNP mit unterschiedlicher Größe mit einer CpG-ODN B-Klasse beladen und Mäusen intravenös verabreicht. Unbeladene GNP zeigten keine Induktion der Zytokinexpression, waren also immunologisch inert (ZWIOREK et al., 2008). Partikel von größerem Durchmesser (300 nm) waren den kleineren (150 nm) in Bezug auf die Zytokininduktion überlegen (dreifach höhere IL-12-Produktion) (ZWIOREK et al., 2008).

Es konnten zu keiner Zeit toxische Effekte, weder *in vitro* noch *in vivo*, beobachtet werden (ZWIOREK et al., 2008). Keine der mit CpG-ODN/GNP behandelten Mäuse zeigte detektierbare Antikörperlevel gegen GNP nach drei Wochen. ZWIOREK und Mitarbeiter (2008) folgerten daraus, dass keine direkte Immunantwort gegen die Proteinmatrix des Trägersystems erfolgt. Im Gegensatz dazu führte die Verabreichung von GNP mit Freund'schem Adjuvans zur Bildung messbarer IgG-Level (ZWIOREK et al., 2008).

III **Material und Methoden**

1. **Studiendesign und Ziele**

Ziel dieser Studie war es im *in vitro*-Teil, aufgrund bestehender sequenzabhängiger Spezifität, ein geeignetes CpG-Motiv bei equinen bronchoalveolären Zellen (BAL-Zellen) zu identifizieren.

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit ein spezifisch immunmodulatorischer Effekt auf equine BAL-Zellen durch die eingesetzten CpG-ODN nachzuweisen ist. Gelatinenanopartikel (GNP) sollten dabei auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, als effektives molekulares Transportsystem für CpG-ODN bei equinen BAL-Zellen zu dienen.

Im *in vivo*-Teil der Studie sollte die zuvor identifizierte CpG-ODN-Sequenz gesunden und an COB erkrankten Pferden inhalativ verabreicht und dabei auf ihre lokale und systemische Verträglichkeit und ihre therapeutische Wirkung untersucht werden.

2. **Patientengut**

Insgesamt wurden fünfzehn Pferde in die klinische Studie aufgenommen (Tab. 4, S. 66). Davon stammten zwölf gesunde und an COB erkrankte Pferde aus dem Besitz der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München und drei an COB erkrankte Pferde aus dem Patientengut der Klinik für Pferde der tierärztlichen Fakultät der LMU München. Das mittlere Alter aller Pferde betrug 11,6 Jahre, das mittlere Gewicht 453,5 kg.

Alle Pferde, die in diese Studie aufgenommen wurden, erhielten zwei Monate vor Beginn des Versuchs keine Medikamente und wurden während des Versuchs unter gleichen Bedingungen gehalten. Die *in vivo*-Studie wurde als Tierversuch von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 55.2-1-54-2531-31-10).

3. Signalement und Anamnese

Bei allen Patienten wurde ein ausführlicher Vorbericht im Hinblick auf mögliche Vorerkrankungen, den Lungenstatus und die COB-Vorgeschichte erhoben. Die Allgemeinuntersuchung erfolgte entsprechend einem standardisierten Untersuchungsbogen zur Dokumentation von Signalement, Anamnese und Allgemeinuntersuchung der Patienten (vgl. COB-Lungenscoring, Anhang).

4. Allgemeinuntersuchung

Im Hinblick auf mögliche Lungenerkrankungen stand besonders die Kontrolle des Atmungsapparates im Vordergrund der Untersuchung. Im Rahmen der klinischen Allgemeinuntersuchung wurden alle Pferde (Tab. 4, S. 66) auf Haltung, Verhalten, Habitus, sowie Ernährungs- und Pflegezustand hin beurteilt. Außerdem wurde eine Beurteilung von Atemfrequenz und -typ, rektal gemessener Körpertemperatur, Pulsfrequenz, Farbe der Schleimhäute und der kapillären Füllungszeit durchgeführt (vgl. COB-Lungenscoring, Anhang). Des Weiteren wurden die Pferde auf Nasenausfluss und die Auslösbarkeit von Husten kontrolliert und die *Lnn. mandibulares* palpiert. Im Folgenden wurde eine spezielle Untersuchung des Atmungstraktes angeschlossen.

5. Spezielle Untersuchung

5.1 Spezielle Untersuchung des Atmungstraktes

Die spezielle Untersuchung des Atmungstraktes beinhaltete neben der Auskultation eine Lungenperkussion, eine arterielle Blutgasanalyse, eine endoskopische Exploration der Atemwege mit zytologischer Untersuchung des Tracheobronchialsekrets (TBS) und eine röntgenologische Untersuchung der Lunge.

5.2 Auskultation

Die Übersichtsausultation der Lunge erfolgte seitenvergleichend im Bereich der *Bifurcatio tracheae*, im kaudodorsalen sowie im kranioventralen Bereich des Thorax. Hierbei wurde insbesondere auf abnorme und verschärfte Atemgeräusche, eine verstärkt inspiratorische oder expiratorische Atemtätigkeit und das Auftreten einer biphasischen Expiration geachtet. Darüberhinaus erfolgte eine Auskultation der Trachea im Bereich des Kehlkopfes, sowie vor der *Apertura thoracis* am Brusteingang. Dies ermöglichte die Beurteilung des Luftstroms in den oberen Anteilen der Luftröhre, sowie die Detektion möglicher Sekretansammlungen in der Trachea.

5.3 Lungenperkussion

Im Rahmen der speziellen Untersuchung des Atmungstraktes erfolgte bei allen Pferden eine Perkussion der Lunge zur Bestimmung der Lungengrenzen, um ein bereits bestehendes Emphysem, wie es bei der COB häufig vorkommt, diagnostizieren zu können (vergrößerte Lungengrenzen) (Abb. 6).



Abb. 6: Vergrößertes Lungenfeld durch Perkussion bestimmt. Grenzen eines stark vergrößerten Lungenfeldes (gestrichelte Linie) bei einem mittelgradig an COB erkrankten Pferd (Nr. 2) mit Kreide angezeichnet.

5.4 Arterielle Blutgasbestimmung

Zur Bestimmung der arteriellen Blutgase, als wichtiger diagnostischer Parameter der COB, wurde die *Arteria carotis communis* oberhalb der *Apertura thoracis cranialis* auf der rechten Halsseite punktiert und arterielles Blut gewonnen. Anhand des laborchemisch bestimmten Sauerstoffpartialdruckes (P_{aO_2}), des Kohlendioxidpartialdruckes (P_{aCO_2}) und des aktuellen Barometerdruckes konnte zusätzlich die arterioalveoläre Sauerstoffdifferenz ($AaDO_2$) errechnet werden, welche zur Abschätzung des Schweregrades der COB Verwendung findet.

$$AaDO_2 = P_{AO_2} - PaO_2$$

$$P_{AO_2} = (P_B - 47 \text{ Torr}) \times 0,2095 - PaCO_2$$

$$P_B = \text{aktueller Barometerdruck in Torr (1 Torr} \approx 1 \text{ mmHg; 1 Torr} \approx 133,3 \text{ Pa)}$$

Einteilung der COB: $AaDO_2 < 10 \text{ mmHg (latent) (5,4} \pm 5 \text{ mmHg)}$

$10\text{-}15 \text{ mmHg (geringgradig)}$

$15\text{-}25 \text{ mmHg (mittelgradig)}$

$> 25 \text{ mmHg (hochgradig) (GRABNER, 2005b)}$

Als physiologische Werte für den Sauerstoffpartialdruck werden 100 mmHg (± 5 mmHg) zu Grunde gelegt (GRABNER, 2005b). Bei Werten < 95 mmHg ist von einer Partialinsuffizienz im Gasaustausch der Lunge auszugehen. Die physiologischen $PaCO_2$ -Werte liegen bei 40 mmHg (± 5 mmHg) (GRABNER, 2005b). Die Werte wurden mithilfe des Blutgasanalysegerätes Radiometer Copenhagen NPT 7 series (Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland), sowie der Blutgaskartuschen BG Cartridge D7100 dri-tek (Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland) bestimmt.

5.5 Endoskopische Untersuchung

Ein typisches klinisches Zeichen der COB stellt eine verstärkte Mukusbildung in den Atemwegen als Folge der Dys- und Hyperkrinie dar (ROBINSON, 2001) (Abb. 8). Mit Hilfe der endoskopischen Exploration der Trachea wurde die Menge, die Verteilung und die Viskosität des Tracheobronchialsekrets (TBS) anhand eines speziellen Scoringsystems bestimmt (GERBER et al., 2004)

(Abb. 7). Das TBS-Scoring (Grad 0 bis 5) erfolgte entsprechend der Einteilung nach GERBER und Mitarbeitern (2004): 0 = none, clean, singular TBS; 1 = little, multiple small blobs; 2 = moderate large blobs; 3 = marked, confluent/stream-forming; 4 = large, pool-forming; 5 = extreme, profuse amounts. Gesunde Pferde wiesen Atemwege ohne sichtbare Mukusablagerung auf (TBS-Scoring: 0).

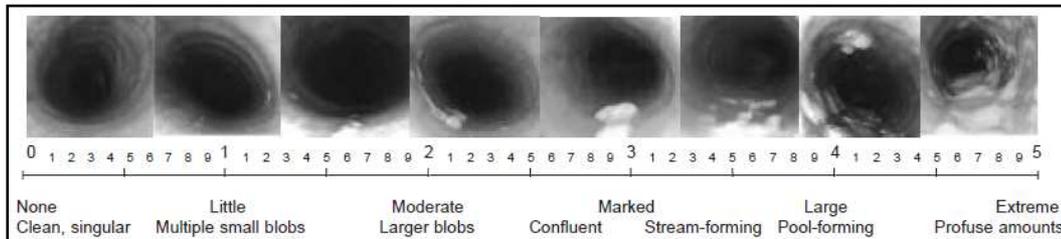


Abb. 7: TBS-Scoring (GERBER et al., 2004). Einteilung Grad 0 bis 5 anhand der endoskopisch in der Trachea vorgefundenen Mukusakkumulation.

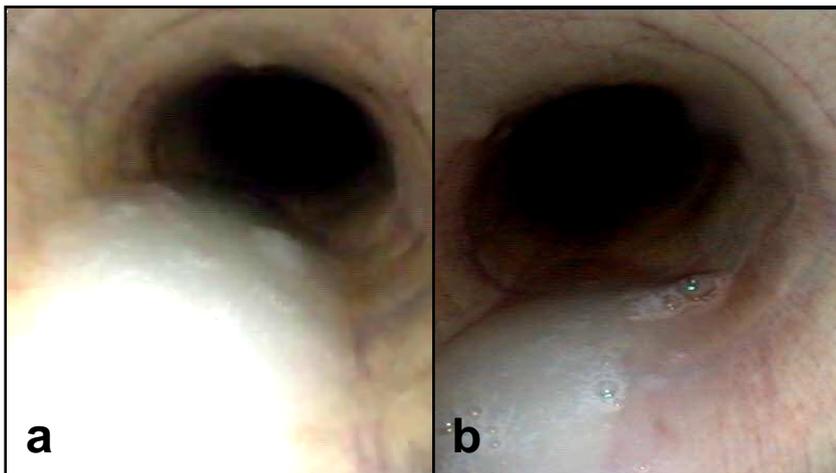


Abb. 8: TBS-Befunde in der Trachea von COB-Pferden. Darstellung zweier TBS-Befunde bei der Bronchoskopie: (a) durchgehende Sekretstraße, zäher, visköser Schleim, Grad vier bis fünf (Pferd Nr. 1); (b) einzelner See, lokal begrenzt, deutlich flüssigeres Sekret, Grad zwei bis drei (Pferd Nr. 2) (TBS-Scoring nach GERBER et al., 2004).

5.6 Zytologie des TBS

Die gewonnenen TBS-Proben wurden auf Objektträgern ausgestrichen, mittels Diff-Quick[®] staining set (Medion diagnostics, Düdingen, Schweiz) gefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Anhand der zytologischen Färbung konnte der

prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im TBS bestimmt werden. Dazu wurden 200 Zellen bei 500-facher Vergrößerung mit Ölimmersion ausgezählt und neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in ein prozentuales Verhältnis zueinander gesetzt (GERBER et al., 2008b; MAY und GEHLEN, 2009).

Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS korreliert direkt mit dem Schweregrad der COB und wird als einer der maßgeblichen Parameter in der Diagnostik der COB betrachtet (LAVOIE et al., 2001; COUËTIL et al., 2007). Charakteristisch für eine COB wird ein prozentualer Anteil von $> 25\%$ neutrophiler Granulozyten im TBS angesehen (ROBINSON, 2001) (Abb. 9). Auch weitere zytologische Befunde wie Curschmann-Spiralen, Charcot-Leyden-Kristalle (Kristallisationsprodukte eosinophiler Granulozyten) und schaumige Alveolarmakrophagen geben Hinweise auf eine bestehende COB (MAY und GEHLEN, 2009) (Abb. 10).

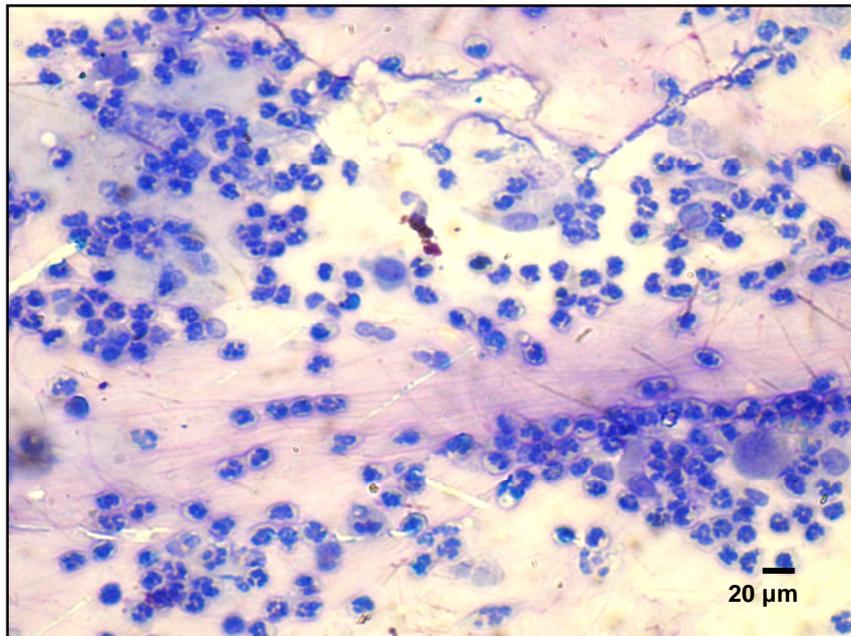


Abb. 9: Zytologisches Bild von neutrophilen Granulozyten. Darstellung einer Diff-quick gefärbten TBS-Probepreparat eines mittelgradig an COB erkrankten Pferdes (Nr. 15) mit überwiegend polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Bei den rosafarbenen Schlieren handelt es sich um Mukus.

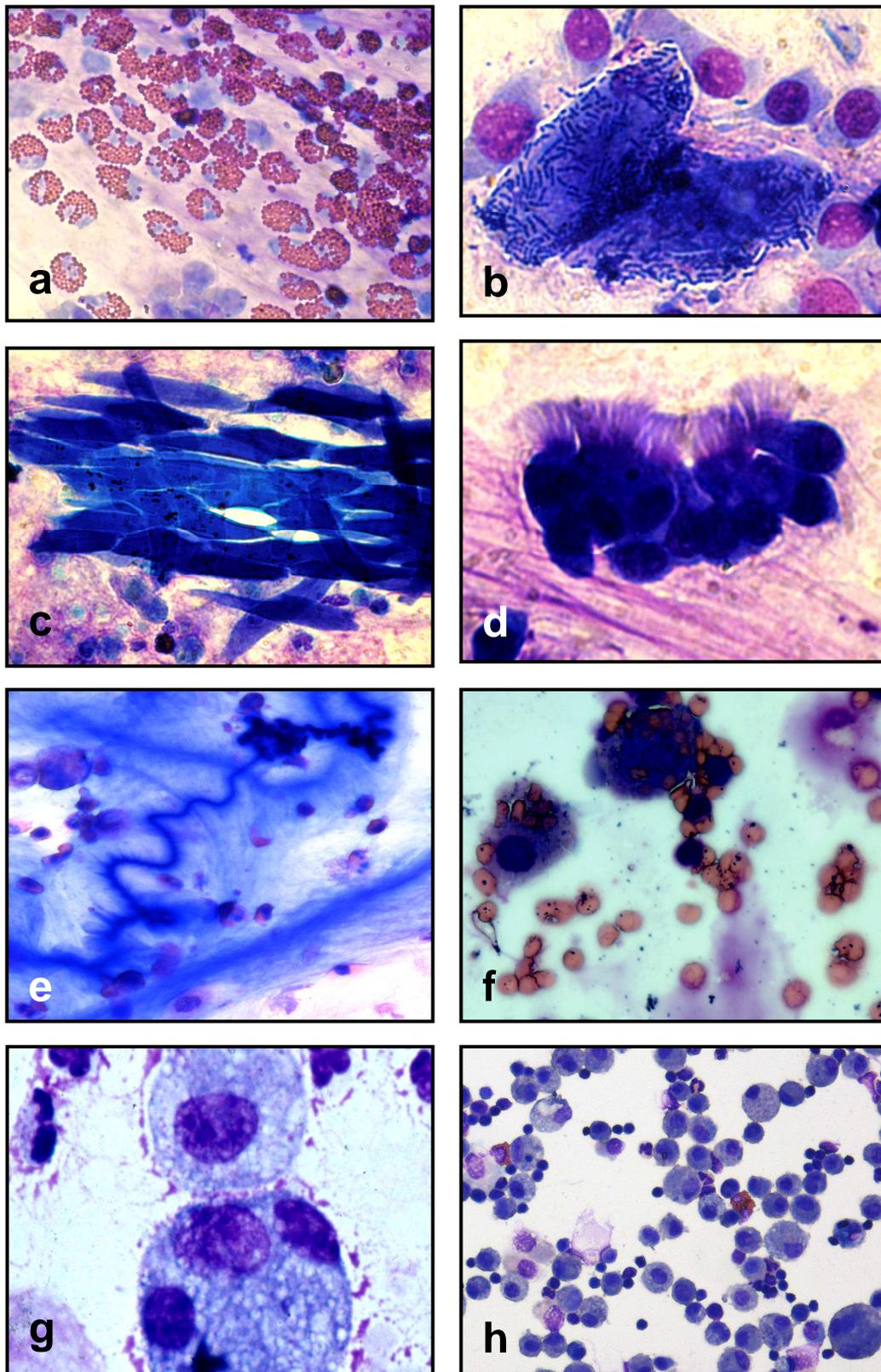


Abb. 10: Verschiedene zytologische Befunde (1000 x Vergrößerung). (a) Massive Ansammlung von eosinophilen Granulozyten im TBS bei einer allergischen Bronchitis oder differentialdiagnostisch auch bei Lungenwürmern (selten). (b) Intrazelluläre Streptokokken als Hinweis einer bakteriellen Atemwegsinfektion. (c) Charcot-Leyden-

Kristalle als typisches Zerfallsprodukt im TBS bei einer COB. **(d)** Abgelöster Flimmerepithelzellverband (Creolakörperchen) im TBS, entnahmebedingt. **(e)** Curschmannspirale im TBS, Sekretaussüsse der Bronchioli, typischer Befund einer COB. **(f)** Erythrozyten in der BAL, entnahmebedingt aufgrund eines Epitheltraumas oder differentialdiagnostisch bei belastungsbedingtem Lungenbluten (exercise-induced pulmonary hemorrhage, EIPH). **(g)** Schaumiger Alveolarmakrophage (vergrößert), typischer Befund einer COB. **(h)** Übersichtsbild eines Zytospots einer BAL-Probe mit überwiegend Makrophagen und Lymphozyten (Abb. **e-h** mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. May).

5.7 Röntgenologische Lungenuntersuchung

Zur Vervollständigung der speziellen Lungenuntersuchung erfolgte zusätzlich eine röntgenologische Untersuchung der Lunge mit einer digitalen Röntgenanlage (Multipuls-Röntgengenerator: Polydoros 80, Siemens; Detektorsystem: XDR1-M, Veterinärmedizinisches Dienstleistungszentrum GmbH). Es wurden zwei latero-laterale Aufnahmen des Thorax durchgeführt, wobei sowohl der kranioventrale (auf Höhe der Herzbasis) als auch der kaudodorsale Anteil der Lunge getrennt dargestellt wurden. Dazu wurde eine Geräteeinstellung von 125 kV und 14 mAs sowie ein Film-Fokus Abstand von ca. 1,5 Metern gewählt. Die Röntgenbilder wurden hinsichtlich interstitieller Verschattungen und COB-typischen Bronchienwandverdickungen beurteilt (GEHLEN et al., 2009) (Abb. 11; Lungenscoring, Anhang).

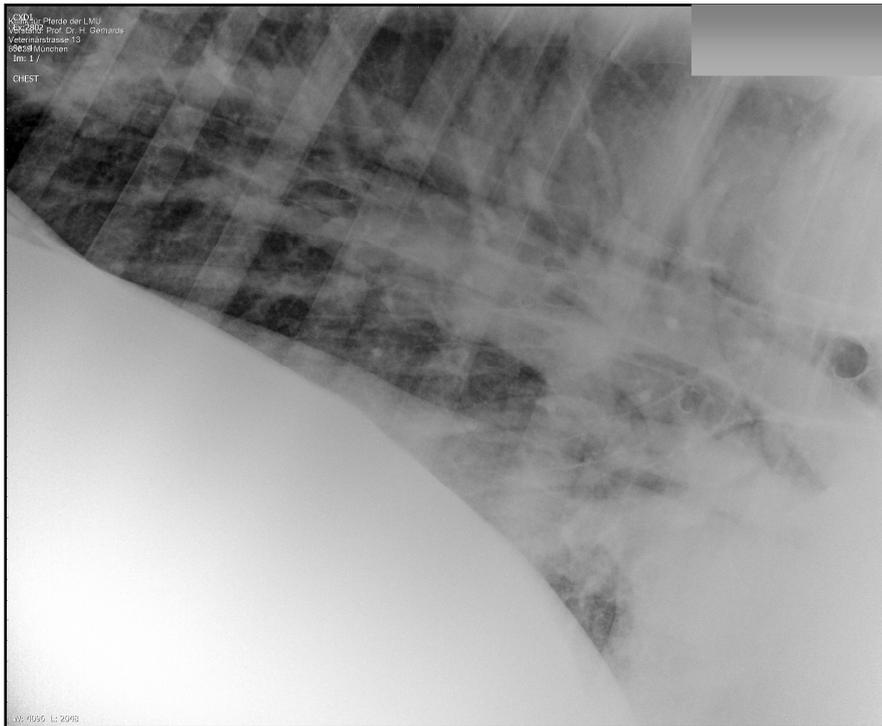


Abb. 11: Röntgenbefund. Röntgenologischer Befund eines mittelgradig an COB erkrankten Pferdes (Nr. 14). Mittelgradige interstitielle Verschattung und Bronchienwandverdickung.

6. Scoringsystem

Anhand eines Lungenscoringsystems (COB-Lungenscoring, Anhang), welches die Ergebnisse der allgemeinen und speziellen Lungenuntersuchung (Nasenausfluss, Atemfrequenz und -typ, Lungenauskultation), arterielle Blutgase, sowie eine endoskopische Untersuchung der Atemwege mit zytologischer Untersuchung des Tracheobronchialsekrets (TBS) berücksichtigte, war es möglich, die Pferde, entsprechend dem Schweregrad der Lungenerkrankung (gesund, geringgradig, mittelgradig oder hochgradig an COB erkrankte Pferde) einzuteilen. In der vorliegenden Studie kamen neben lungengesunden Pferden Pferde mit mittelgradiger COB zum Einsatz (Tab. 4, S. 66).

7. *In vitro*-Studie

7.1 Studiendesign und Ziel

Für die *in vitro*-Studie wurden BAL-Proben von sieben mittelgradig an COB erkrankten Pferden (Pferd Nr. 1, 2, 6, 7, 10, 14 und 15; mittleres Alter: 14,7 Jahre) und vier gesunden Pferden (Pferd Nr. 8, 9, 11 und 12; mittleres Alter: 12,3 Jahre) gewonnen (Tab. 4, S. 66). Die Einteilung der Pferde wurde anhand der vorhergehenden allgemeinen und speziellen Lungenuntersuchung und der entsprechenden Einteilung im Lungenscoringsystem durchgeführt (vgl. Lungenscoring, Anhang).

Die gewonnenen BAL-Zellen wurden im Labor mit verschiedenen CpG-ODN-Sequenzen inkubiert und daraufhin deren Zytokinexpression nach 24 Stunden bestimmt. Ziel der *in vitro*-Studie war es eine geeignete CpG-ODN-Sequenz zur Immunstimulation von BAL-Zellen zu identifizieren.

Gelatinenanoartikel (GNP) sollten dabei ihre Fähigkeit als molekulares Transportsystem für CpG-ODN bei equinen BAL-Zellen unter Beweis stellen.

7.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Zur Gewinnung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden die Patienten mittels einer intravenösen (i.v.) Injektion von Detomidin (0,01 mg/kg) (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) in die *Vena jugularis externa* sediert. Das flexible Videoendoskop Olympus Evis CF Typ 230 L (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde über den ventralen Nasengang in die Trachea bis vor die Aufzweigung der Hauptbronchien vorgeschoben. Dort erfolgte eine lokale Anästhesie mit Mepivacain 2 % (5 ml) (Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland) über den Arbeitskanal des Endoskops.

Die BAL wurde über einen separaten flexiblen BAL-Katheter (Bivona Inc., Gary, USA), welcher über die Nüster des Pferdes bis in die großen Hauptbronchien der Lunge geschoben und dort mittels eines aufblasbaren Ballons (Cuff) fixiert wurde, durchgeführt. Dort platziert, wurden 50 ml/100 kg sterile, körperwarmer Kochsalzlösung fraktioniert eingegeben und sofort durch Aspiration mit Hilfe

einer sterilen 100 ml-Spritze zurück gewonnen. In der Regel wurde auf diese Weise 70 % der eingegebenen Flüssigkeit, vermischt mit suspendierten Zellen der Bronchialschleimhaut, zurückgewonnen. Diese Spülprobe der Lunge wurde im Labor auf ihre Zellzahl und den Gehalt an immunologischen Botenstoffen (Zytokinen) mit Hilfe der ELISA-Technik untersucht.

Die endoskopische Untersuchung der Pferde dauerte durchschnittlich ca. 20 Minuten, wobei die BAL-Entnahme zehn Minuten davon ausmachte. Die Patienten wurden danach für ca. 1,5 Stunden nüchtern gehalten, bis die Wirkung der Sedierung vollständig abgeklungen war.

7.3 Zellkultur der BAL-Zellen

Das heterogene Zellgemisch der BAL, überwiegend bestehend aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, wurde bei 1200 g für sechs Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand zeitnah bei -80 °C eingefroren, um den aktuellen Zytokinstatus zu asservieren. Die Gesamtzellzahl wurde durch manuelle Auszählung mittels einer Neubauerzählkammer (Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) und Trypanblau-Färbung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), einer Lebend-Tot-Färbung, ermittelt (Abb. 12).

Danach wurden jeweils 2×10^5 Zellen pro well in einer 96-well plate (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) mit je 230 µl RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1624 Zellkulturmedium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) pro well für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % (V/V) CO₂-Atmosphäre in einem Hera cell 150 Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert (Abb. 13, 14). Das RPMI Zellkulturmedium wurde zusätzlich mit 67,8 µg/ml Penicillin und 113 µg/ml Streptomycin sowie 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt.

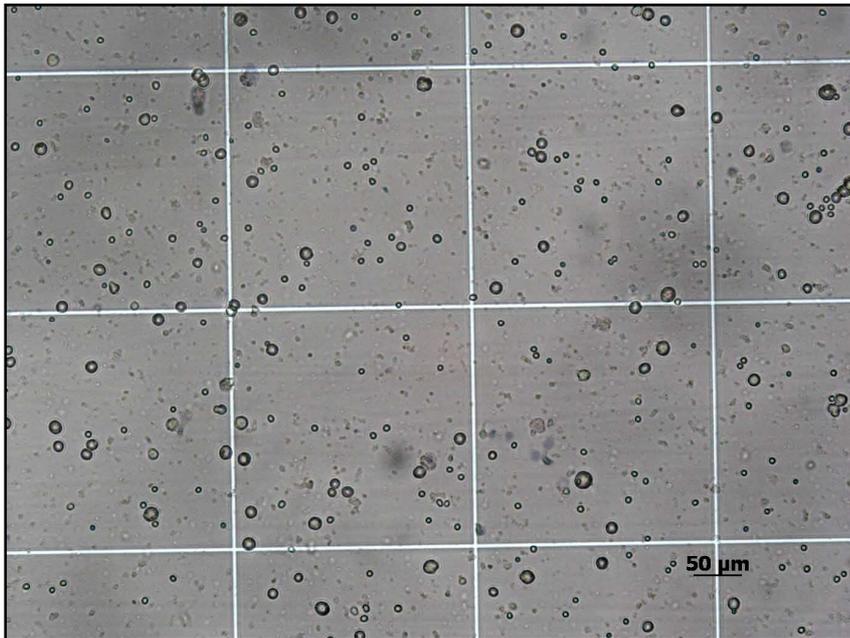


Abb. 12: Neubauer Zählkammer. Heterogenes Gemisch von BAL-Zellen mit Trypanblau-Färbung (Lebend-Tot-Färbung) in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

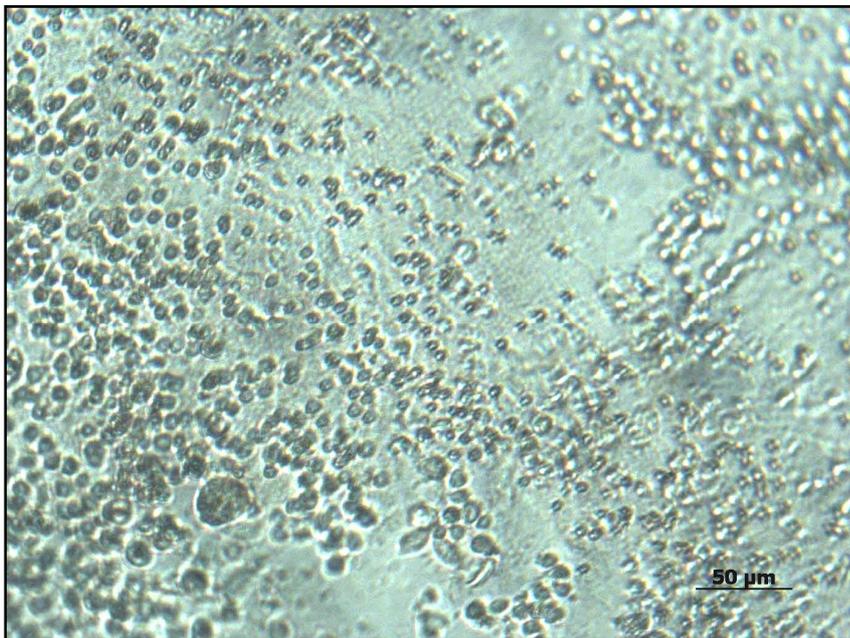


Abb. 13: BAL-Zellen in Zellkultur. Heterogenes Gemisch aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten aus der BAL eines COB-Pferdes (Nr. 2) nach 24 Stunden Inkubation in RPMI Medium.

Die Konzentration der CpG-ODN betrug 44 $\mu\text{g/ml}$ (0,014 mg/well). Dabei wurden zwei Ansätze, einmal CpG-ODN ohne GNP und einmal an GNP gebunden, miteinander verglichen. Die Konzentration der GNP betrug hierbei 0,278 mg/well.

Um den Einfluss der CpG-ODN auf die equinen BAL-Zellen bestimmen zu können wurden nach 24 Stunden Inkubation die Zellkulturüberstände gewonnen und mittels „Equinen Sandwich-ELISA-Sets“ (R&D Systems, Minneapolis, USA) untersucht. Im Hinblick auf den immunologischen Hintergrund wurden drei Schlüsselzytokine (IL-4, IL-10 und IFN- γ) analysiert. Die Durchführung des ELISA erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

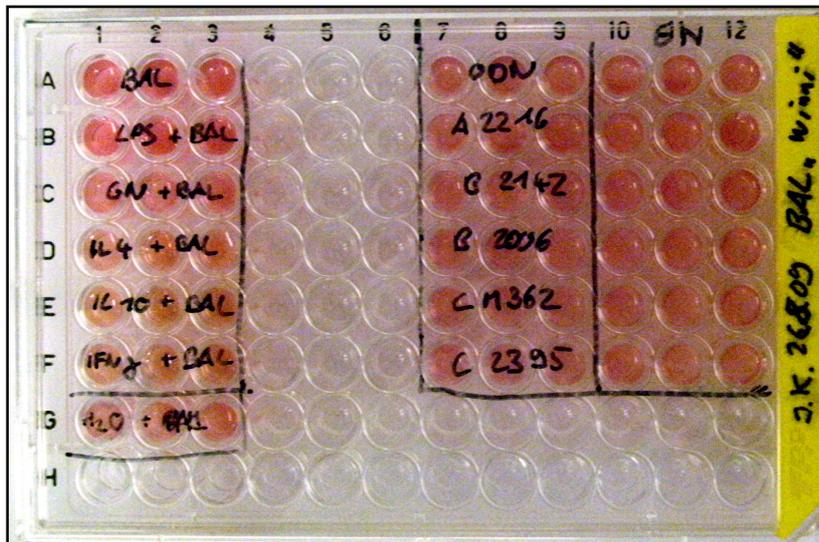


Abb. 14: Zellkulturplatte. Darstellung der Auftragung der verschiedenen CpG-ODN, sowie der Positiv- und Negativkontrollen in der 96-well Platte zusammen mit BAL-Zellen und Zellkulturmedium.

7.4 CpG-ODN-Sequenzen

Folgende CpG-ODN-Sequenzen wurden im *in vitro*-Versuch eingesetzt. Sie sind nach Klassenzugehörigkeit, Zuckerrückgrat und Basensequenz in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Darstellung der im *in vitro*-Versuch zum Einsatz gekommenen CpG-ODN-Sequenzen. Aufgeteilt in Zugehörigkeit zur Klasse, Zuckerrückgrat und Sequenz.

Klasse	Zucker-rückgrat	Sequenz
CpG-ODN A 2216	ss, PS*/PD	5'-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G- 3' (20 Basen)
CpG-ODN B 2142	ss, PS	5'-TCG CGT GCG TTT TGT CGT TTT GAC GTT- 3' (27 Basen)
CpG-ODN B 2006	ss, PS	5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT- 3' (24 Basen)
CpG-ODN C M362	ss, PS	5'-TCG TCG TCG TTC GAA CGA CGT TGA T- 3' (25 Basen)
CpG-ODN C 2395	ss, PS	5'-TCG TCG TTT TCG GCG CGC GCC G- 3' (22 Basen)
ODN 2041 (ohne CpG Motive)	ss, PS	5'-CTG GTC TTT CTG GTT TTT TTC TGG- 3' (24 Basen)

ss = single stranded (einzelsträngig)
 PS = Phosphothioesterzuckerrückgrat
 PD = Phosphodiesterzuckerrückgrat
 PS/PD = Rückgratchimäre, bestehend aus einem gemischten Phosphothioester-
 und Phosphodiesterzuckerrückgrat

7.5 Beladung der GNP mit CpG-ODN

Die Herstellung der GNP erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll von COESTER und Mitarbeitern (2000) und wurde von Herrn Dipl. pharm. Sebastian Fuchs durchgeführt. Die GNP werden aus Gelatine Typ A, extrahiert aus Schweinehaut (175 Bloom) und unter Verwendung von Glutaraldehyd (25 %), Aceton und EDC Katalysator (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) gewonnen (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die GNP-Dispersion (2 mg/ml)

wurde zur Kationisierung mit 60 mg Cholamin und 72 mg des Katalysators EDC auf einen pH von 4,7 eingestellt. Die Dispersion wurde daraufhin bei konstantem Schütteln mit 500 /min für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Partikel zweimal bei 18000 g zentrifugiert und unter aseptischen Bedingungen gefiltert (1,2 µm). Die Konzentration wurde gravimetrisch bestimmt. Als Verdünnungsmedium diente „highly purified water“ (HPW).

Die Partikelgröße und Oberflächenladung (Zetapotential) wurde vor und nach Beladung mit CpG-ODN mit Hilfe des Zetasizer ZS Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) in HPW in 10 mM NaCl bestimmt. Um die kolloidale Stabilität der Dispersion aufrecht zu erhalten, hat sich eine Beladung von 5 % als vorteilhaft erwiesen. Die Konzentration der GNP betrug 3 mg/ml. Dies ergab ein Volumen von 90 µl GNP pro well bei einem Gesamtvolumen von 320 µl/well.

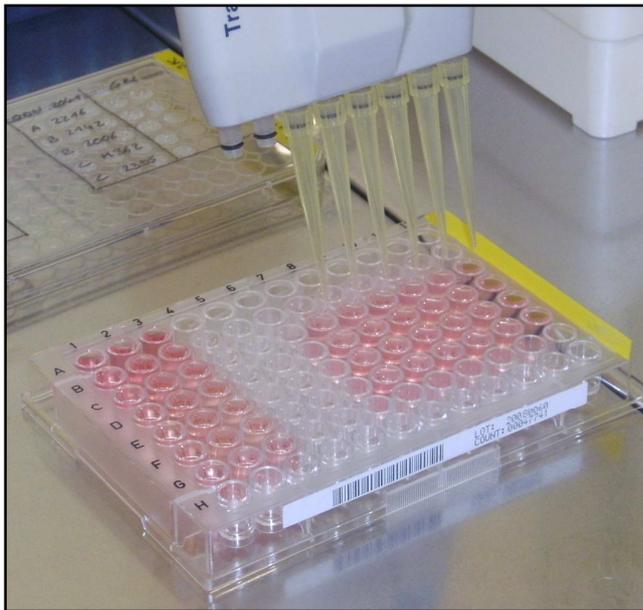


Abb. 15: Zugabe der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung zu den BAL-Zellen in Zellkultur. Zugabe der CpG-ODN- und der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung zu den inkubierten BAL-Zellen in Zellkulturmedium unter der sterilen Werkbank.

Die Oligodeoxynukleotide lagen als Lyophilisat vor und wurden mit HPW zu einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml verdünnt und bei -80 °C eingefroren. 76,5 µl der Arbeitskonzentration der GNP-Dispersion wurden zu 230 µl HPW gegeben und 43,74 µl der jeweiligen CpG-Stammlösung ergänzten den Ansatz

(Abb. 15). Dies ergab eine Konzentration von 3 mg/ml GNP und 0,15 mg/ml CpG, was einer 5 % Beladung entspricht. Als Referenz wurden 0,15 mg/ml CpG-Lösung von jeder Klasse (306,5 ml HPW, 43,75 µl CpG-ODN-Stammlösung) und 3 mg/ml GNP-Dispersion (274 µl HPW, 76,51 µl GNP-Stammlösung) verwendet. Alle Proben wurden 90 Minuten bei 22 °C und 300 /min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert

7.6 Sandwich-ELISA

Zur Verwendung in dieser Studie kam ein sogenannter Sandwich-ELISA der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA). Das gesuchte natürliche oder rekombinante Antigen (im vorliegenden Fall IL-4, IL-10 und IFN- γ) wird zwischen zwei spezifischen Antikörpern gebunden wie zwischen den Brotscheiben eines Sandwichs (Abb. 16). Die verwendeten „DuoSets“ sind speziell zur Analyse von Zellkulturüberständen hergestellt worden. Jedes „DuoSet“ enthält Material um ca. fünfzehn 96-well Platten analysieren zu können.

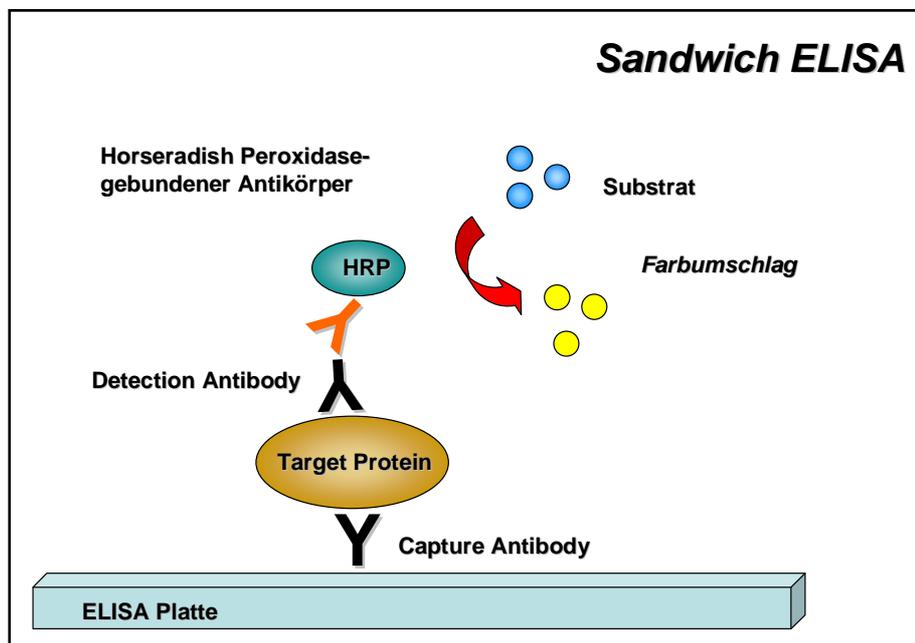


Abb. 16: Schemazeichnung eines Sandwich-ELISA. Das zu detektierende Protein (Target Protein) befindet sich zwischen den beiden Antikörpern (Capture Antibody, Detection Antibody), vergleichbar wie die Wurst zwischen den Brotscheiben eines Sandwichs, daher die Bezeichnung.

Der erste Antikörper („capture antibody“) wurde zu einer spezifischen Arbeitskonzentration („working concentration“) mit PBS („phosphate buffered salt solution“: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2 - 7,4; 0,2 µm filtriert) verdünnt und in einer Menge von 100 µl/well auf die dafür vorgesehenen ELISA-Platte (Thermo Fisher Scientific, Rokshilde Site, Dänemark) pipettiert und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Er bildete damit den Boden des „Sandwichs“.

Am darauffolgenden Tag wurden die nicht an den Boden der ELISA-Platte gebundenen Antikörper zur Vermeidung von Interferenzen durch dreimalige Spülung und nachfolgende Aspiration mittels 400 µl/well Waschpuffer (0,05 % Tween in 20 PBS, pH 7,2 - 7,4) und des automatischen Immuno Wash Modell 1575 (Bio-rad laboratories, München, Deutschland) entfernt. Am Ende des Waschvorgangs wurde eventuell verbliebene Restflüssigkeit durch kräftiges Klopfen der umgedrehten Platte auf Zellstoff entfernt.

Im nächsten Schritt wurden die frei gebliebenen Bereiche zwischen dem gebundenen „capture antibody“ mit 300 µl/well Blockpuffer (reagent diluent: 1 % bovin serum albumin in PBS, pH 7,2 - 7,4, 0,2 µm filtriert) geblockt. Damit wurden unspezifische Bindungen an den Boden der ELISA-Platte verhindert. Dieser Vorgang benötigte mindestens eine Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Darauf folgend wurde der restliche Blockpuffer durch dreimaliges Waschen und Aspirieren der Flüssigkeit mit Waschpuffer erneut entfernt.

Nach dieser Vorbereitung der ELISA-Platte folgte der eigentliche Ansatz. Dazu wurden pro well 100 µl Probenmaterial bzw. Standard aufgetragen und die Platte mit einer adhäsiven Folie bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Auftragen der Zellkulturüberstände erfolgte unter einer sterilen Werkbank („laminar flow“) (Hera safe Sicherheitswerkbank, Heraeus, Hanau, Deutschland), um Kontaminationen der lebenden BAL-Zellen zu vermeiden (Abb. 17). Die Proben wurden nach einem festen Schema aufgetragen (Tab. 3). Anschließend wurde der dreimalige Waschvorgang wiederholt, um ungebundenes Probenmaterial zu entfernen. Im Anschluss wurden 100 µl/well des in der entsprechenden Arbeitskonzentration mit „reagent diluent“ verdünnten „detection antibody“ hinzugegeben und die Platten erneut für zwei Stunden inkubiert.



Abb. 17: Arbeit unter der sterilen Werkbank. Übertragen der Zellkulturüberstände auf die drei ELISA-Zytokinplatten mittels 12-Kanal-Multipipette.

Nach Ablauf der Zeit wiederholte sich der dreimalige Waschvorgang. Es folgte die Zugabe des an Streptavidin gebundenen Enzyms der „horseradishperoxidase“ (HRP) (Abb.16). Auch dieses Reagenz wurde zuvor in der entsprechenden Arbeitskonzentration mit „reagent diluent“ hergestellt. 100 µl/well der Streptavidin-HRP wurden zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert.

Ein dreimaliger Waschgang entfernte wiederum ungebundenes Reagenz. Zur Sichtbarmachung der Reaktion wurde nun 100 µl/well eines Substrats zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert. Diese „substrate solution“ bestand aus einer 1:1 Mischung von „color reagent A“ (H₂O₂) und „color reagent B“ (Tetramethylbezidin). Es zeigte sich eine blaue Verfärbung, wenn die Proben positiv für das entsprechende Zytokin waren.

Um die Reaktion zu stoppen wurden 50 µl/well einer „stop solution“ (2 N H₂SO₄) zugegeben und die Platte sanft geklopft, um eine einwandfreie Vermischung zu garantieren. Es zeigte sich ein Farbumschlag nach gelb (Abb. 18), welcher nun photometrisch mittels des Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer, Fremont, USA) quantitativ photometrisch bei 450 nm bestimmt werden konnte.

Tab. 3: Aufteilung der Proben auf der ELISA-Platte. Hier beispielhaft für IL-10 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 20000 pg/ml	Standard 20000 pg/ml	Neg. kon- trolle RPMI	Neg. kon- trolle RPMI	Neg. kon- trolle RPMI		ODN 2041	ODN 2041	ODN 2041	ODN 2041 + GNP	ODN 2041 + GNP	ODN 2041 + GNP
B	Standard 10000 pg/ml	Standard 10000 pg/ml	Neg. kon- trolle PBS	Neg. kon- trolle PBS	Neg. kon- trolle PBS		CpG A ODN 2216	CpG A ODN 2216	CpG A ODN 2216	CpG A ODN 2216 + GNP	CpG A ODN 2216 + GNP	CpG A ODN 2216 + GNP
C	Standard 5000 pg/ml	Standard 5000 pg/ml	Neg. kon- trolle Reag. diluent	Neg. kon- trolle Reag. diluent	Neg. kon- trolle Reag. diluent		CpG B ODN 2142	CpG B ODN 2142	CpG B ODN 2142	CpG B ODN 2142 + GNP	CpG B ODN 2142 + GNP	CpG B ODN 2142 + GNP
D	Standard 2500 pg/ml	Standard 2500 pg/ml	BAL Zellen	BAL Zellen	BAL Zellen		CpG B ODN 2006	CpG B ODN 2006	CpG B ODN 2006	CpG B ODN 2006 + GNP	CpG B ODN 2006 + GNP	CpG B ODN 2006 + GNP
E	Standard 1250 pg/ml	Standard 1250 pg/ml	Pos. kon- trolle BAL + LPS	Pos. kon- trolle BAL + LPS	Pos. kon- trolle BAL + LPS		CpG C ODN M362	CpG C ODN M362	CpG C ODN M362	CpG C ODN M362 + GNP	CpG C ODN M362 + GNP	CpG C ODN M362 + GNP
F	Standard 625 pg/ml	Standard 625 pg/ml	BAL- Zellen + GNP	BAL- Zellen + GNP	BAL- Zellen + GNP		CpG C ODN 2395	CpG C ODN 2395	CpG C ODN 2395	CpG C ODN 2395 + GNP	CpG C ODN 2395 + GNP	CpG C ODN 2395 + GNP
G	Standard 312,5 pg/ml	Standard 312,5 pg/ml	BAL- Zellen + HPW	BAL- Zellen + HPW	BAL- Zellen + HPW		Pos. kon- trolle INF- γ	Pos. kon- trolle INF- γ	Pos. kon- trolle INF- γ	Pos. kon- trolle IL-4	Pos. kon- trolle IL-4	Pos. kon- trolle IL-4
H	Standard 156,25 pg/ml	Standard 156,25 pg/ml	Über- stand BAL- Zellen	Über- stand BAL- Zellen	Über- stand BAL- Zellen		Pos. kon- trolle IL-10	Pos. kon- troll IL-10	Pos. kon- trolle IL-10			

Die Nachweisgrenzen der verwendeten ELISA-Sets lagen bei 15,6 – 2000 pg/ml (IL-4), 156,2 – 20000 pg/ml (IL-10) und 31,2 – 4000 pg/ml (IFN- γ). Die aus den Absorptionen berechneten Werte wurden durch Subtraktion der Werte von unbehandelten BAL-Zellen korrigiert, welche als Negativkontrollen dienten.

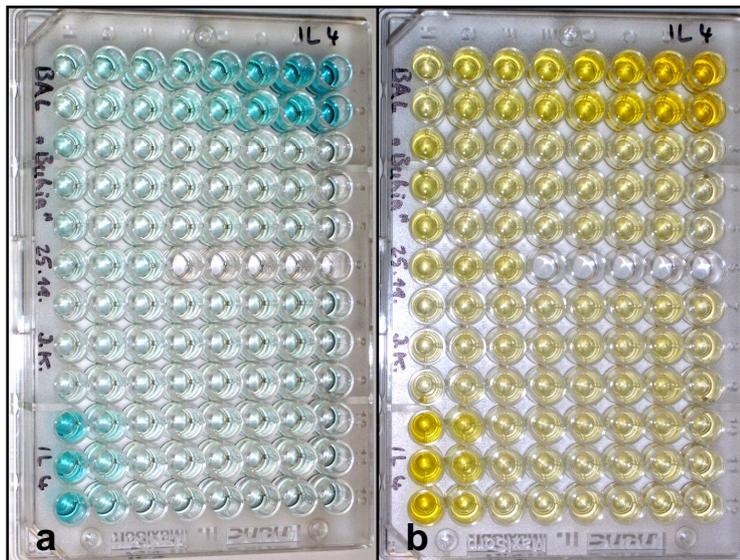


Abb. 18: ELISA-Farbreaktion. Nach Zugabe des Substrats kommt es durch den Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper zu einer blauen Farbbildung (a). Diese Reaktion wird nach 20 Minuten durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag nach gelb kommt, welcher photometrisch bestimmt wird (b).

7.7 Zellvitalitäts-Test (MTT-Test)

Zur Überprüfung der Überlebensrate der BAL-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit CpG-ODN und GNP wurde jeweils ein so genannter MTT-Test durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen Zytotoxizitäts-Test. Die Zellen wurden dazu *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit und den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen.

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan (Abb. 19) (BERRIDGE und TAN, 1993). Die Reduktion des MTTs ist dabei hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH, welche sich im endoplasmatischen Retikulum der Zelle befinden, und nur teilweise von Succinat abhängig (BERRIDGE und TAN, 1993). Die Menge des umgesetzten und gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen.

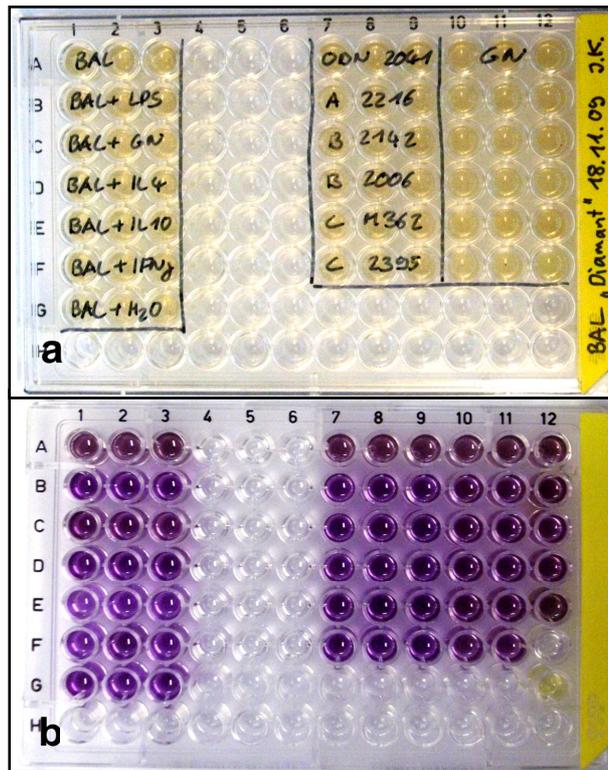


Abb. 19: Zellvitalitäts-Test (MTT-Test). Bildung des unlöslichen Formazan (lila) nach Zugabe von MTT-Reagenz als Maß für die Glykolyserate der Zellen.

Nach der Gewinnung des Überstandes zur ELISA-Untersuchung wurden die verbliebenen Zellpellets mit je 150 μ l MTT Arbeitslösung, bestehend aus 82 % PBS (7,2 ml), 9 % FCS (800 μ l) und 9 % einer 5 mg/ml MTT Stammlösung (800 μ l), resuspendiert. Jeweils 150 μ l MTT Reagens wurde pro well dazu gegeben. Danach wurde dieser Ansatz für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO $_2$ Atmosphäre inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellkulturplatte bei 1200 g für sechs Minuten. Der Überstand wurde verworfen und jeweils 200 μ l/well Dimethylsulfoxid (DMSO) (Biotech GmbH & Co. KG, Emmerich, Deutschland) zu dem gebildeten Formazan hinzu gegeben. Alle Proben wurden darauf bei 530 nm photometrisch bestimmt.

8. *In vivo*-Studie

8.1 Studiendesign und Ziel

Die zuvor im *in vitro*-Versuch am effektivsten in Bezug auf eine Hochregulation von IL-10 und IFN- γ bei equinen BAL-Zellen identifizierte CpG-ODN-Sequenz (CpG-ODN A 2216), wurde daraufhin im *in vivo*-Versuch gesunden und an COB erkrankten Pferden inhalativ verabreicht. Hierbei wurden insbesondere die lokale und systemische Verträglichkeit und die therapeutische Wirkung untersucht. Die *in vivo*-Studie wurde als Tierversuch von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 55.2-1-54-2531-31-10).

Folgende drei Gruppen wurden für die *in vivo*-Studie etabliert. Die erste Placebo-kontrollierte Gruppe (n = 4) beinhaltete gesunde Individuen (Pferd Nr. 3, 4, 5 und 8; mittleres Alter = 7,3 Jahre), die zweite Gruppe (n = 4) ebenfalls bestehend aus gesunden Pferden (Pferd Nr. 9, 11, 12 und 13; mittleres Alter = 10,5 Jahre) zur Verträglichkeitsstudie und schließlich die dritte Gruppe (n = 4) mit mittelgradig erkrankten COB-Pferden (Pferd Nr. 1, 2, 6 und 7; mittleres Alter 18,3 Jahre) als Wirksamkeitsstudie.

Im Rahmen der Verträglichkeitsprüfung der Formulierung wurden gesunde Pferde mit der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung inhaliert. Zum Nachweis, das GNP auch beim Pferd immunologisch inert sind, wurden gesunde Pferde nur mit Wasser und GNP inhaliert. Zur Überprüfung eines therapeutischen Effekts der CpG-ODN *in vivo* wurden COB-Pferde mit der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung inhaliert.

Die Pferde wurden vor und nach den Inhalationen klinisch, endoskopisch, laborchemisch und zytologisch untersucht. Aus der jeweils frisch gewonnenen BAL wurde der aktuelle Zytokinstatus der Lunge erhoben.

8.2 Verträglichkeit

Bei allen inhalierten Pferden wurden vor und nach Inhalation Blutproben genommen, um mögliche systemische Reaktionen zu detektieren. Im Speziellen standen Fibrinogen als unspezifischer Entzündungsmarker, sowie ein Differentialblutbild im Vordergrund der laborchemischen Untersuchung. Desweiteren erfolgte eine ausführliche klinische Untersuchung der Pferde im Hinblick auf lokale oder systemische Reaktionen.

8.3 BAL-Gewinnung

Die Gewinnung der BAL für den *in vivo*-Versuch erfolgte entsprechend wie beim *in vitro*-Versuch (S. 47f) bereits beschrieben. Auch beim *in vivo*-Versuch wurde die BAL direkt nach Entnahme bei 1200 g für sechs Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren. Der so asservierte Überstand diente als Marker für den aktuellen Zytokinstatus in der Lunge der untersuchten Patienten.

8.4 Zytokinbestimmung aus BAL

Der eingefrorene Überstand wurde mit Hilfe eines „Equinen Sandwich-ELISA-Sets“ (R&D Systems, Minneapolis, USA) analysiert. Im Hinblick auf den immunologischen Hintergrund des zu erwartenden Th2/Th1-Shifts wurden die Schlüsselzytokine IL-4, IFN- γ und IL-10 bestimmt. Der ELISA wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

8.5 CpG-ODN und GNP

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des *in vitro*-Versuchs kam im *in vivo*-Versuch die einzelsträngige A Klasse 2216 CpG-ODN 5`-G*G*G GGA CGA TCG TCG* G*G*G *G*G-3` (* = Phosphothioesterrückgrat; die anderen Basen besitzen ein Phosphodiesterückgrat), bestehend aus 20 Basen, zum Einsatz. Sie wurde von der Firma Biomers GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen.

Die Herstellung der GNP erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll nach COESTER und Mitarbeiter (2000) und wurde von Dipl. pharm. Sebastian Fuchs durchgeführt. Die Vorbereitung der GNP und ihre Beladung mit CpG-ODN erfolgten analog der Beschreibung im *in vitro*-Versuch. Die Konzentration der eingesetzten A Klasse betrug 187,5 µg pro Inhalation, gebunden an 3,75 mg GNP und gelöst in 2,5 ml HPW. Dies entspricht 1,5 mg/ml GNP und 0,075 mg/ml CpG-ODN.

8.6 Inhalationsprotokoll

Die Inhalation der GNP-gebundenen CpG-ODN erfolgte mittels eines geeigneten Inhalationssystems. Dieses bestand aus dem „Equine Haler“ (Equine HealthCare Aps, Hoersholm, Dänemark), welcher über ein 90° Glasrohr mit dem „AeroNeb Go Mash Vibrator“ (Aerogen, Galway, Irland) verbunden wurde (Abb. 20).



Abb. 20: Patentierte Inhalationsvorrichtung. Im Rahmen der Studie wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. pharm. S. Fuchs eine patentierte Kombination aus „AeroNeb Go Mash Vibrator“ und „Equine Haler“ für die *in vivo*-Inhalationsstudien am Pferd entwickelt (Patentnummer: EP10002266).

Die Inhalationszeit betrug ca. zehn Minuten pro Inhalation und wurde mit einem Abstand von zwei Tagen zur vorhergehenden Inhalation durchgeführt. Im Rahmen der Verträglichkeitsprüfung der Formulierung wurden gesunde Pferde (n = 4) dreimalig mit der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung inhaliert.

Zum Nachweis, dass GNP auch beim Pferd immunologisch inert sind, wurden gesunde Pferde ($n = 4$) dreimalig nur mit Wasser und GNP (Placebo) inhaliert. Zur Überprüfung eines therapeutischen Effekts der CpG-ODN *in vivo* wurden COB-Pferde ($n = 4$) fünfmalig mit der GNP-gebundenen CpG-ODN-Formulierung (CpG-GNP) inhaliert. Die Inhalationen erforderten keinerlei Ruhigstellung, Fixierung oder sonstige Zwangsmaßnahmen am Patienten (Abb. 21). Die Dosierung der eingesetzten CpG-ODN Dispersion betrug 0,18 mg pro Inhalation pro Pferd und 3,75 mg GNP pro Inhalation pro Pferd.

Nach drei Inhalationen erfolgte bei allen Pferden eine endoskopische Kontrolluntersuchung mit Blutentnahme, TBS-Proben- und BAL-Probenentnahme. Daraufhin wurden bei den COB-Pferden zwei weitere Inhalationen angeschlossen, so dass insgesamt fünf Inhalationen pro COB-Pferd durchgeführt wurden. Im Anschluss daran wurde die dritte und letzte endoskopische Kontrolle der Lunge vorgenommen. Sie entspricht in der Durchführung den beiden vorangegangenen. Die gesunden Pferde erhielten nur drei Inhalationen und entsprechend auch nur zwei Untersuchungen, da kein weiterer Effekt zu erwarten war.



Abb. 21: Inhalation. Darstellung der *in vivo*-Anwendung des kombinierten Einsatzes von „Equine Haler“ und „AeroNeb Go Mash Vibrator“ am Pferd.

9. Statistische Analysen

Die Daten zur Zytokinquantifizierung aus den ELISA-Ergebnissen und MTT-Tests wurden mit Hilfe der Prism 5 Software (Graphpad software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein ungepaarter Student *t*-test angewandt, um Unterschiede zwischen unabhängigen Gruppen wie beispielsweise der Stimulation von Zellen bei an COB erkrankten Pferden gegenüber Zellen von gesunden Pferden zu bestimmen. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgesetzt. Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte \pm S, D, ausgedrückt.

IV Ergebnisse

1. Ergebnisse der klinischen Lungenuntersuchung

1.1 Allgemeinuntersuchung

Das Allgemeinbefinden aller in dieser Studie aufgenommenen fünfzehn Pferde war ungestört. Vorberichtlich war bei vier Pferden (Nr. 1, 2, 14 und 15) eine chronische Lungenerkrankung bekannt. Über die Dauer der Vorerkrankung konnte hingegen keine genaue Angabe gemacht werden. Im Rahmen der klinischen Allgemeinuntersuchung konnte bei sieben Pferden (Nr. 1, 2, 6, 7, 10, 14 und 15) eine erhöhte Ruheatemfrequenz (durchschnittlich 20 Atemzüge pro Minute), ein abdominal verstärkter Atemtyp und seromuköser Nasenausfluss beobachtet werden. Acht Pferde (Nr. 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12 und 13) waren vorberichtlich lungengesund. Bei diesen Pferden zeigten sich bei der klinischen Allgemeinuntersuchung keine von der Norm abweichenden Parameter.

1.2 Spezielle Lungenuntersuchung

Bei drei Pferden (Nr. 6, 7 und 10) wurde die chronische Lungenerkrankung erst im Rahmen der speziellen Lungenuntersuchung diagnostiziert. Die vorberichtlich bestehende chronische Lungenerkrankung der Pferde Nr. 1, 2, 14 und 15 konnte zusammen mit den Ergebnissen der klinischen Allgemeinuntersuchung und der speziellen Lungenuntersuchung bestätigt werden. Bei den chronischen Lungenerkrankungen handelte es sich in allen Fällen um eine chronische obstruktive Bronchitis. Der Schweregrad der diagnostizierten COB wurde bei den für diese Studie verwendeten sieben Pferden (Nr. 1, 2, 6, 7, 10, 14 und 15) als mittelgradig eingestuft (vgl. Lungenscoring, Anhang). Die vorberichtlich acht gesunden Pferde (Nr. 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12 und 13) erwiesen sich auch nach der speziellen Lungenuntersuchung als lungengesund. Die für die *in vitro*- und *in vivo*-Studie verwendeten Pferde sind in Tab. 4 nach Alter, Geschlecht, Rasse, Gewicht, Nutzung und Lungenstatus aufgelistet.

Tab. 4: Patientengut der *in vitro*- und *in vivo*-Studie. Die Pferde sind jeweils nach Alter, Geschlecht, Rasse, Gewicht, Nutzung und Lungenstatus aufgelistet

Nr:	Alter [Jahre]	Geschlecht	Rasse	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Nutzung	Status
1	20	2	5	162	475	2	1
2	22	2	1	157	516	1	1
3	3	2	6	142	430	1	2
4	6	3	2	86	165	2	2
5	6	1	2	83	152	2	2
6	20	1	1	156	563	1	1
7	11	1	1	163	510	1	1
8	14	1	4	152	470	1	2
9	11	1	1	161	553	1	2
10	12	1	1	149	473	1	1
11	12	1	1	158	490	1	2
12	12	1	1	158	530	1	2
13	7	1	1	152	465	1	2
14	6	1	3	175	530	3	1
15	12	3	7	165	480	2	1

Geschlecht: 1 = Stute
2 = Hengst
3 = Wallach

Rasse: 1 = Traber
2 = Pony
3 = Warmblut
4 = Vollblut
5 = Pura Raza Espanol (PRE)
6 = Haflinger
7 = Knabstrupper

Nutzung: 1 = Zucht
2 = Freizeit
3 = Sport

Lungenstatus: 1 = COB
2 = gesund

2. *In vitro*-Ergebnisse

2.1 Zytokinfreisetzung in Zellkultur nach CpG/CpG-GNP-Stimulation

2.1.1 IL-10-Freisetzung

Um den Einfluss von GNP-gebundenen CpG-ODN (CpG-GNP) im Vergleich zu löslichen CpG-ODN (CpG) auf die Zytokinfreisetzung aus BAL-Zellen zu identifizieren wurden sechs verschiedene Sequenzen miteinander verglichen. Unter den drei bestimmten Zytokinen (IL-10, IL-4 und IFN- γ) zeigte IL-10 die

höchsten Freisetzungswerte. Als durchgehende Beobachtung zeigte sich, dass Zellen von gesunden Pferden signifikant ($p = 0,0047$) höhere IL-10 Konzentrationen freisetzen als Zellen von COB-Pferden. In Abb. 22 ist dies für die Stimulation durch lösliche CpG dargestellt.

Im Vergleich zu allen untersuchten Sequenzen zeigte die A-Klasse 2216 die höchsten IL-10 Konzentrationen sowohl bei BAL-Zellen von gesunden Pferden (400 pg/ml) als auch bei Zellen von COB-Pferden (220 pg/ml). Dagegen zeigten die B-Klassen (CpG-ODN 2142 und CpG-ODN 2006) und C-Klassen (CpG-ODN M362 und CpG-ODN 2395) beinahe identische IL-10-Freisetzungverhalten innerhalb ihrer Klasse. Die Werte der Freisetzung waren dabei relativ niedrig (125 pg/ml) bezogen auf BAL-Zellen von COB-Pferden. Die C-Klassen setzten in Zellkultur von gesunden Pferden höhere Konzentrationen von IL-10 frei (350 pg/ml) als die untersuchten B-Klassen (200 pg/ml).

In Abb. 23 ist die IL-10-Freisetzung durch GNP-gebundene CpG-ODN (CpG-GNP) dargestellt. Am auffälligsten hierbei ist die signifikant ($p = 0,0051$) höhere Freisetzung von IL-10 bei Zellen von gesunden Pferden. Des Weiteren induzierte CpG-GNP A 2216 die höchsten IL-10 Konzentrationen (540 pg/ml) und übertraf damit sogar die Konzentrationen durch die löslichen CpG (Abb. 23). Im Gegensatz dazu fallen die IL-10 Konzentrationen durch CpG-GNP Stimulation alle niedriger aus als bei löslichen CpG. Außerdem sind die Werte innerhalb der B- und C-Klasse nicht homolog, was in diesem Fall eine deutliche Unterscheidung der beiden Klassen unter diesen Umständen ermöglicht.

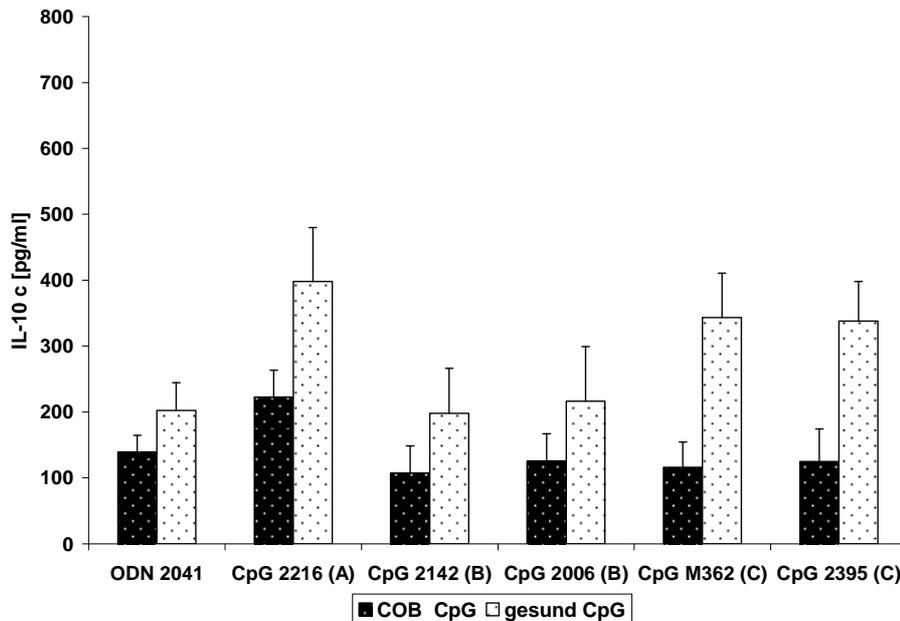


Abb. 22: IL-10-Freisetzung mit löslicher CpG-Formulierung. IL-10-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen löslichen CpG-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert.

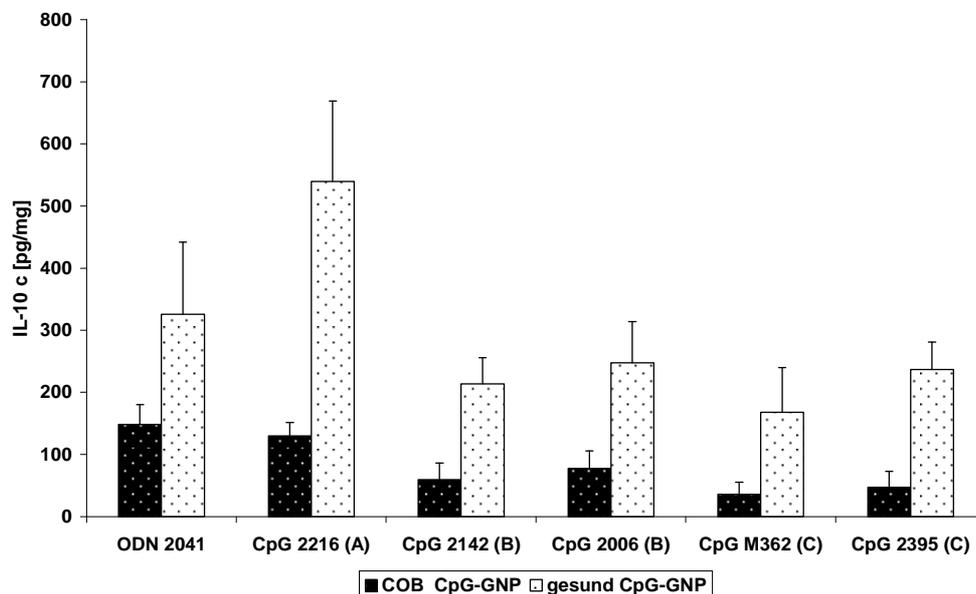


Abb. 23: IL-10-Freisetzung mit CpG-GNP-Formulierung. IL-10-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen CpG-GNP-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert.

2.1.2 IL-4-Freisetzung

Im Gegensatz zur IL-10-Freisetzung zeigten sich bei der IL-4-Freisetzung nach Stimulation mit den sechs verschiedenen ODN keinerlei signifikante Unterschiede ($p = 0,6140$) zwischen den Zellen von gesunden und COB-kranken Pferden (Abb. 24). Beide Gruppen (Zellkulturen von gesunden und COB-Pferden) zeigten insgesamt niedrige absolute Werte und große Schwankungen zwischen- und untereinander. Jedoch, wie in Abb. 25 aufgezeigt, wurde ein hoch signifikanter Unterschied für die IL-4-Freisetzung bei GNP-gebundenen CpG-ODN (CpG-GNP) zwischen Zellkulturen von gesunden und kranken Pferden festgestellt ($p = 0,0010$). Diese Werte (Abb. 25) sind im Gegensatz zu denen der Zellen von COB-Pferden negativ. Die Werte der GNP-gebundenen CpG-ODN-stimulierten Zellkultur von COB-Pferden sind vergleichbar mit denen für lösliche CpG-ODN ($p = 0,9469$). Des Weiteren reduzierten GNP-gebundene CpG-ODN die IL-4-Freisetzung bei Zellen von gesunden Pferden signifikant mehr ($p = 0,0018$) als die löslichen CpG-ODN (Abb.25).

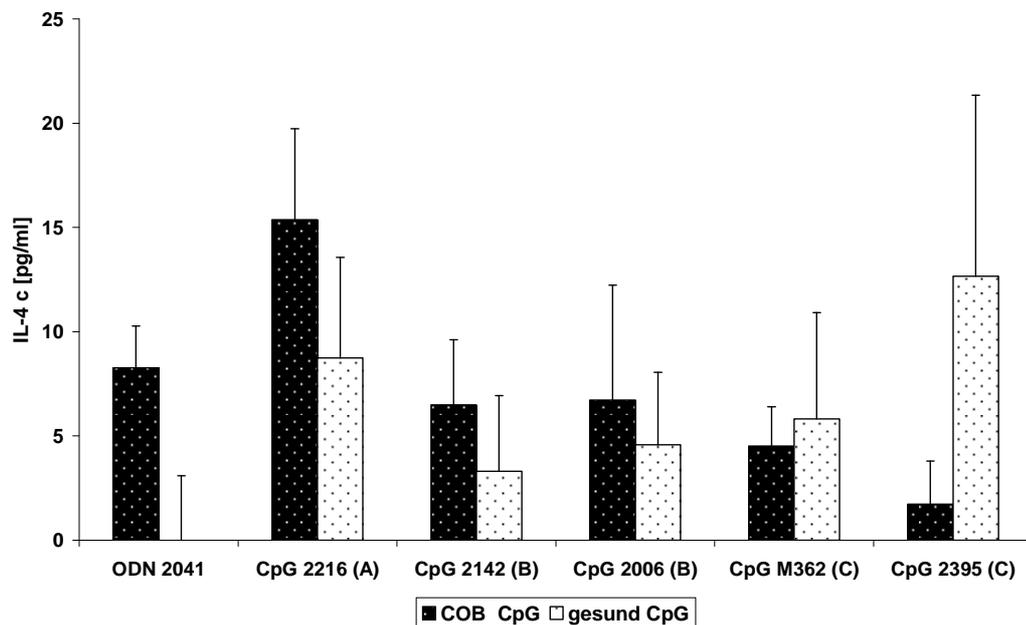


Abb. 24: IL-4-Freisetzung mit löslicher CpG-Formulierung. IL-4-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen löslichen CpG-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert.

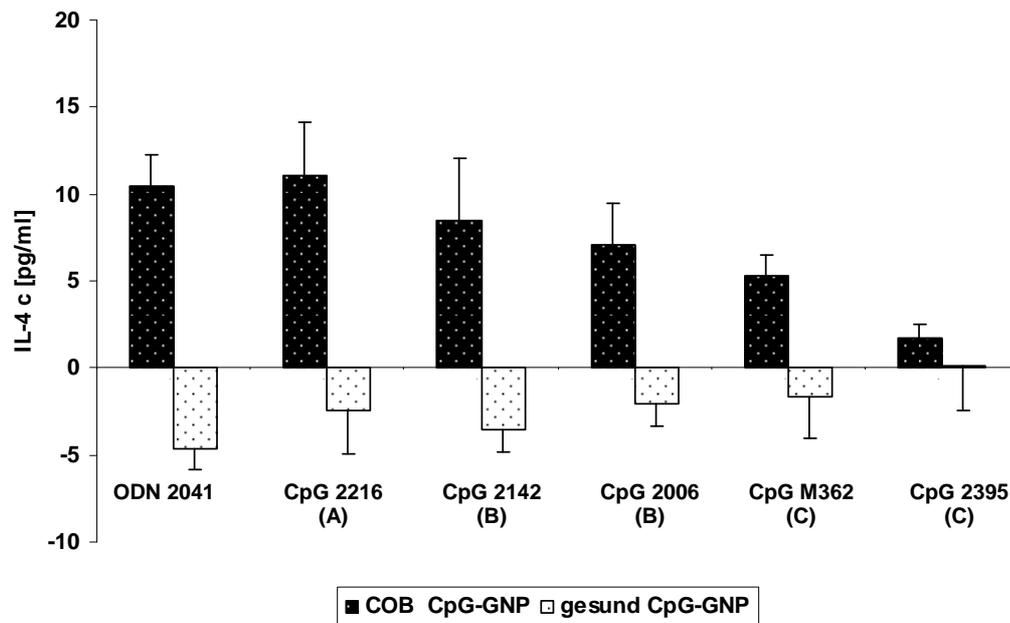


Abb. 25: IL-4-Freisetzung mit CpG-GNP-Formulierung. IL-4-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen CpG-GNP-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert. Negative Werte ergeben sich daher, dass Zellen von gesunden Pferden im Vergleich zu unbehandelten BAL-Zellen (nativ) weniger IL-4 freisetzen. Die nativen BAL-Zellen wurden als Nullwert festgesetzt. Es handelt sich also nicht um negative ELISA-Werte.

2.1.3 IFN- γ -Freisetzung

In Abb. 26 ist die Freisetzung von IFN- γ aus Zellkulturen von an COB erkrankten und gesunden Pferden nach Stimulation mit löslichen CpG aufgezeigt. Insgesamt zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,3514$). Jedoch wiesen die sechs untersuchten ODN unterschiedlich Effekte auf. Wie bereits bei IL-10 auffällig, setzte die A-Klasse CpG-ODN 2216 auch hier am meisten IFN- γ frei. Bei Zellen von COB-Pferden betrug der Wert 94 ± 10 pg/ml und bei Zellkulturen von gesunden Pferden 135 ± 19 pg/ml. Alle anderen untersuchten ODN zeigten deutlich niedrigere Konzentrationen zwischen 15 und 50 pg/ml (Abb. 26). Eine Tendenz zu höheren Konzentrationen bei Zellkulturen von gesunden Pferden konnte beobachtet werden, war aber statistisch

nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten GNP-gebundene ODN (CpG-GNP) einen deutlichen Unterschied in der IFN- γ -Freisetzung zwischen Zellkulturen von gesunden und kranken Pferden ($p = 0,0080$) (Abb. 27). Dabei führte wiederum die A-Klasse 2216 zu der höchsten IFN- γ -Freisetzung, in Zellkulturen von gesunden Pferden im Mittel zu 76 ± 14 pg/ml und bei Zellen von COB-Pferden zu 25 ± 10 pg/ml. Es konnte somit ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,0530$). Im Gegensatz dazu konnte keine oder nur eine marginale Freisetzung von IFN- γ aus Zellkulturen von COB-Pferden festgestellt werden, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied bei Zellkulturen von gesunden Pferden nach Stimulation mit CpG oder CpG-GNP festzustellen war ($p = 0,4530$).

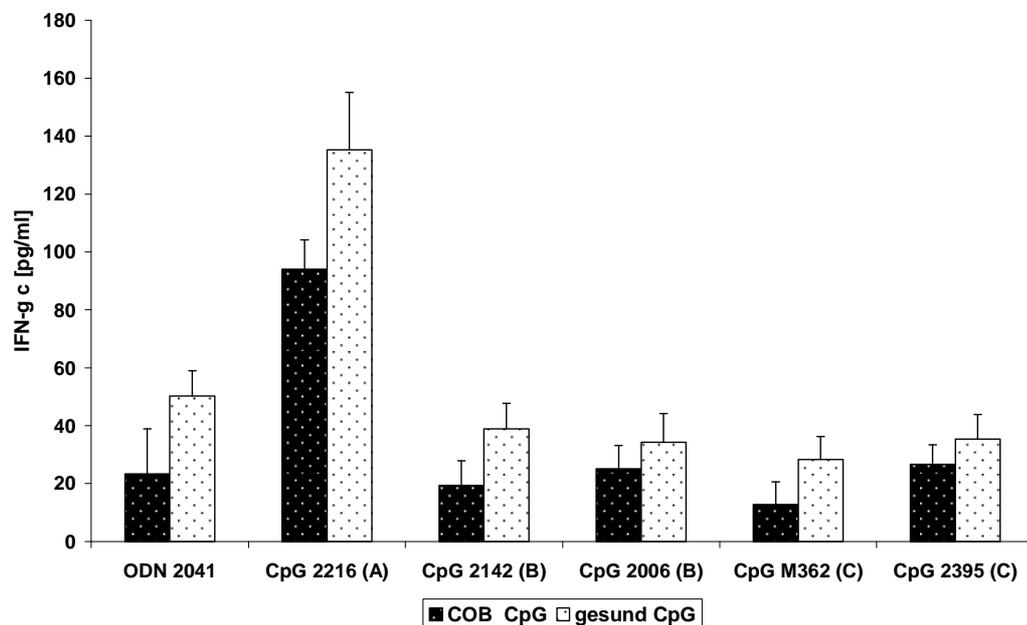


Abb. 26: IFN- γ -Freisetzung mit löslicher CpG-Formulierung. IFN- γ -Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen löslichen CpG-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert.

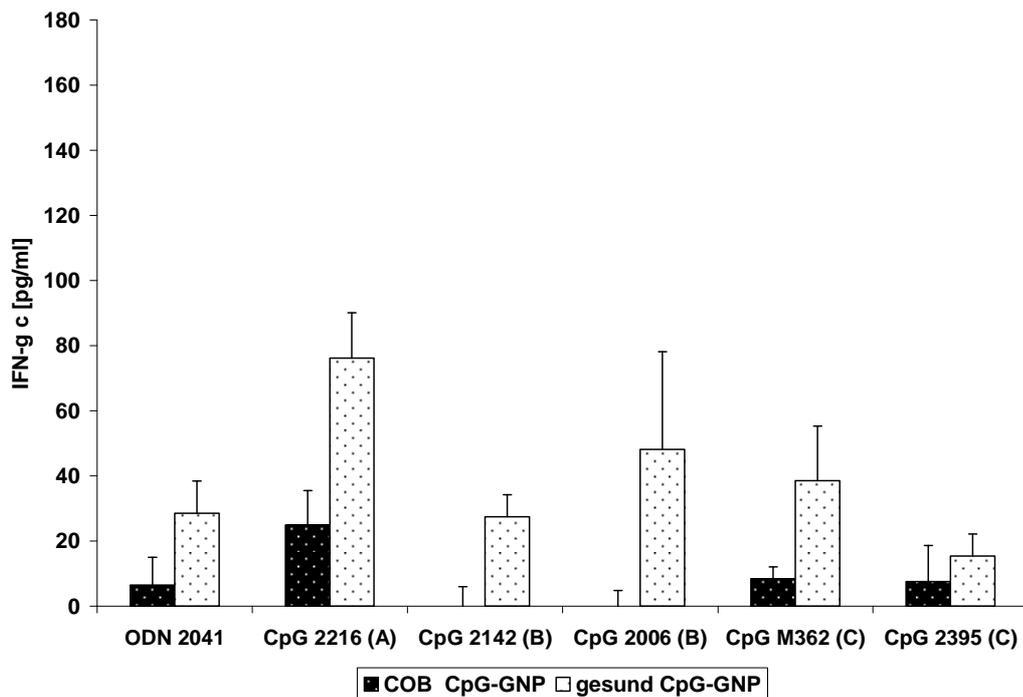


Abb. 27: IFN- γ -Freisetzung mit CpG-GNP-Formulierung. IFN- γ -Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellkulturen von an COB erkrankten (schwarze Balken mit n = 7 Pferde) und gesunden Pferden (weiße Balken mit n = 4 Pferde) nach Inkubation mit verschiedenen CpG-GNP-Formulierungen. Native BAL-Werte wurden als Negativkontrolle bereits abgezogen. Dargestellte Werte sind somit bereits korrigiert.

2.2 MTT-Test

Um den Einfluss der ODN und GNP-gebundenen ODN nach 24 Stunden Inkubation auf die Überlebensrate und Zellvitalität der BAL-Zellen zu prüfen, wurden von allen Zellkulturen (sowohl von COB-Pferden als auch von gesunden Pferden) MTT-Tests durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte (Zellen von COB-Pferden auf der einen Seite mit CpG oder CpG-GNP und Zellen von gesunden Pferden auf der anderen Seite ebenfalls mit CpG oder CpG-GNP inkubiert) aus den individuellen Überlebensraten der Zellen gebildet (Abb. 28). Als 100 %-Werte dienten unbehandelte BAL-Zellen nach 24 Stunden Inkubation.

In der gesunden Gruppe konnte dabei kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der Zellen zwischen löslichen CpG oder CpG-GNP festgestellt werden. Außerdem zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied innerhalb der

sechs untersuchten ODN im Hinblick auf die Zellvitalität. Die niedrigsten Überlebensraten ergaben sich bei Zellen von COB-Pferden, welche mit löslichen ODN inkubiert wurden ($69,7 \% \pm 6,6 \%$). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen von COB-Pferden, die mit CpG-GNP inkubiert wurden, die signifikant höchste Überlebensrate (im Mittel $104,3 \% \pm 6,4 \%$) ($p < 0,0001$).

So waren beispielsweise signifikante Unterschiede zwischen Zellen inkubiert mit CpG-ODN 2216 A-Klasse und Zellen mit GNP-gebundenen CpG-ODN 2216 A-Klasse vorhanden ($p = 0,0405$). Jedoch betrug die mittlere Überlebensrate der Zellen von gesunden Pferden, welche löslichen CpG ausgesetzt waren $94,2 \% \pm 4,0 \%$ und mit CpG-GNP Anwendung $91,7 \% \pm 8,0 \%$. Hierbei zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede ($p = 0,5120$). Auch bei der Anwendung von CpG-ODN 2216 A-Klasse war kein signifikanter Unterschied vorhanden ($p = 0,5319$). Darüber hinaus differierten die Zellen von COB und gesunden Pferden nicht in ihrer Vitalität nach Inkubation mit GNP-gebundener CpG-ODN 2216 A-Klasse ($p = 0,8080$).

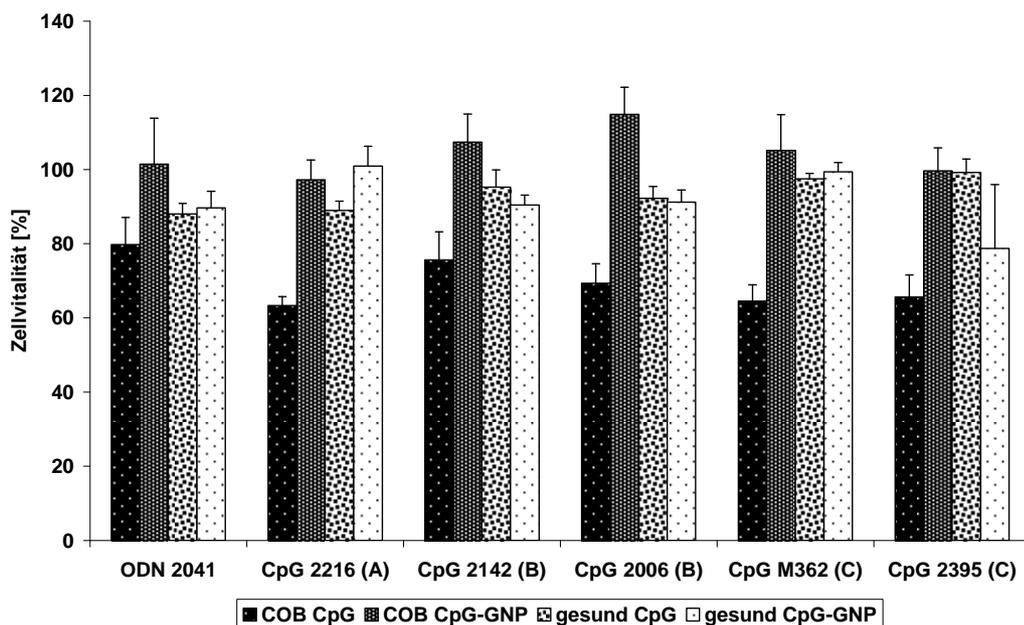


Abb. 28: Zellvitalität im MTT-Test. Vergleich der Zellvitalität [%] von BAL-Zellen von gesunden ($n = 4$) und an COB erkrankten Pferden ($n = 7$) jeweils mit löslichen CpG- oder CpG-GNP-Formulierungen. Als 100 %-Werte dienten unbehandelte BAL-Zellen nach 24 Stunden Inkubation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BAL-Zellen von COB-Pferden signifikant höhere Überlebensraten im MTT-Test zeigten, wenn sie mit CpG-GNP inkubiert wurden, im Vergleich zu löslichen ODN. Dieser Unterschied konnte bei BAL-Zellen von gesunden Pferden nicht beobachtet werden.

3. *In vivo*-Ergebnisse

3.1 Einfluss der Inhalation auf *in vitro* Zellkultur

3.1.1 IL-10-Freisetzung *in vitro*

Um die Effizienz der angewandten Inhalationstherapie zu beurteilen, wurden BAL-Zellen vor und nach fünf Inhalationen bei COB-Pferden, sowie bei gesunden Pferden gewonnen. Dabei dienten die Werte der gesunden Pferde vor Inhalation als physiologische Referenzparameter. Die gewonnenen Zellen wurden *in vitro* mit je sechs verschiedenen ODN in Zellkultur stimuliert und daraufhin die Zytokinexpression bestimmt. Anhand der vorliegenden *in vitro*-Daten konnte insbesondere im Hinblick auf die IL-10-Freisetzung ein deutlicher Anstieg bei COB-Pferden nach Inhalation beobachtet werden (Abb. 29).

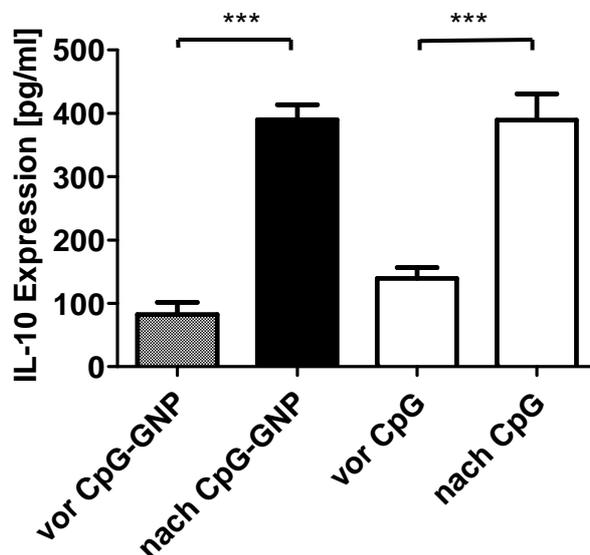


Abb. 29: *In vitro* IL-10-Freisetzung aus BAL-Zellen von COB-Pferden vor und nach fünf Inhalationen. Die IL-10-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellen von COB-Pferden stieg *in vitro* sowohl bei Inkubation mit CpG-GNP-Formulierung (graue Balken) als auch mit löslichen CpG (weiße Balken) nach fünf Inhalationen der COB-Pferde signifikant an.

Abb. 30 zeigt die *in vitro* IL-10-Freisetzung im Klassenvergleich nach CpG-GNP Stimulation in Zellkultur aus BAL-Zellen vor und nach Inhalation der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Die grauen Balken stehen für BAL-Zellen in Zellkultur, gewonnen nach fünfmaliger Inhalation der COB-Pferde. Die Inhalation stimulierte die Zellen *in vivo*, was zu einer erhöhten IL-10-Freisetzung in Zellkultur (Vergleich schwarze Balken und graue Balken) führte. Die physiologischen IL-10-Werte der gesunden Pferde (weiße Balken) wurden nach der Inhalation zum Teil noch übertroffen (graue Balken). Ähnliches ist auch bei den löslichen CpG-ODN ohne GNP-Formulierung in Zellkultur zu beobachten gewesen (Abb. 31).

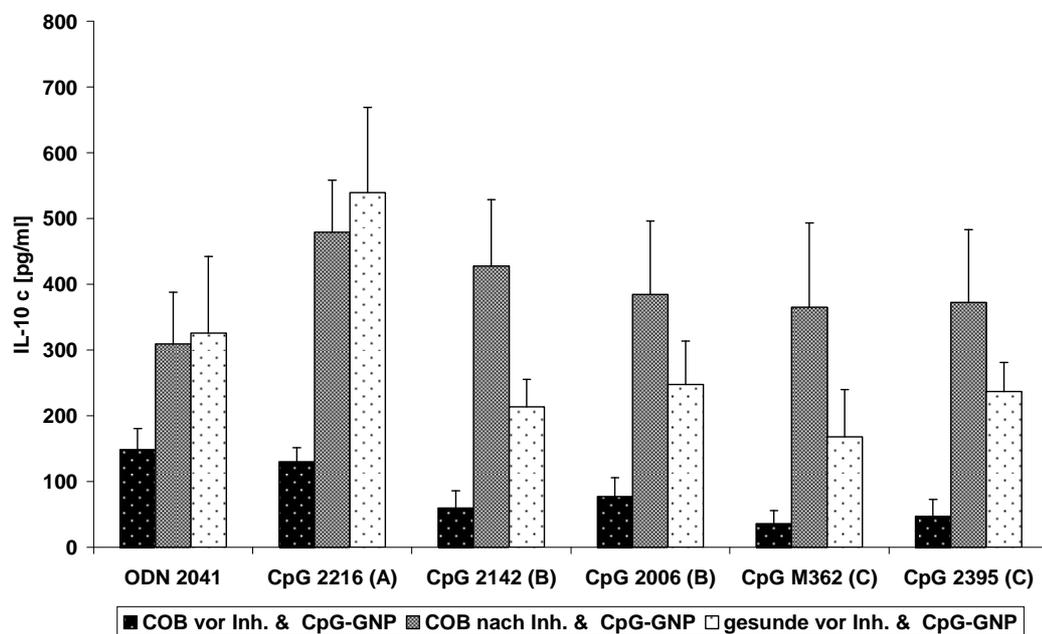


Abb. 30: *In vitro*-Klassenvergleich der IL-10-Freisetzung in Zellkultur vor und nach Inhalation der COB-Pferde. Die grauen Balken zeigen BAL-Zellen in Zellkultur, gewonnen nach fünfmaliger Inhalation der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216, inkubiert mit verschiedenen CpG-GNP-Formulierungen *in vitro*. Die Inhalation stimulierte die Zellen *in vivo*, was zu einer erhöhten IL-10-Freisetzung [pg/ml] in Zellkultur (Vergleich schwarze Balken und graue Balken) führte. Dies spricht für eine Aktivierung der Zellen *in vivo* durch die Inhalation. Die physiologischen IL-10-Werte der gesunden Pferde (weiße Balken) wurden nach der Inhalation zum Teil noch übertroffen (graue Balken).

Nach Bildung des arithmetischen Mittels aus allen in Zellkultur untersuchten ODN konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) bei der IL-10-Freisetzung aus BAL-Zellen vor (83 pg/ml) und nach Inhalation (390 pg/ml) gezeigt werden (Abb. 29). Die gleiche Beobachtung wurde bei der IL-10-Freisetzung nach Stimulation (389 pg/ml) der Zellen mit löslichen ODN im Vergleich zu den Werten vor Beginn der Inhalationen (139 pg/ml) gemacht. Dies entspricht einem hochsignifikanten Unterschied ($p = 0,0002$) der IL-10-Freisetzung in Zellkultur vor und nach fünf Inhalationen.

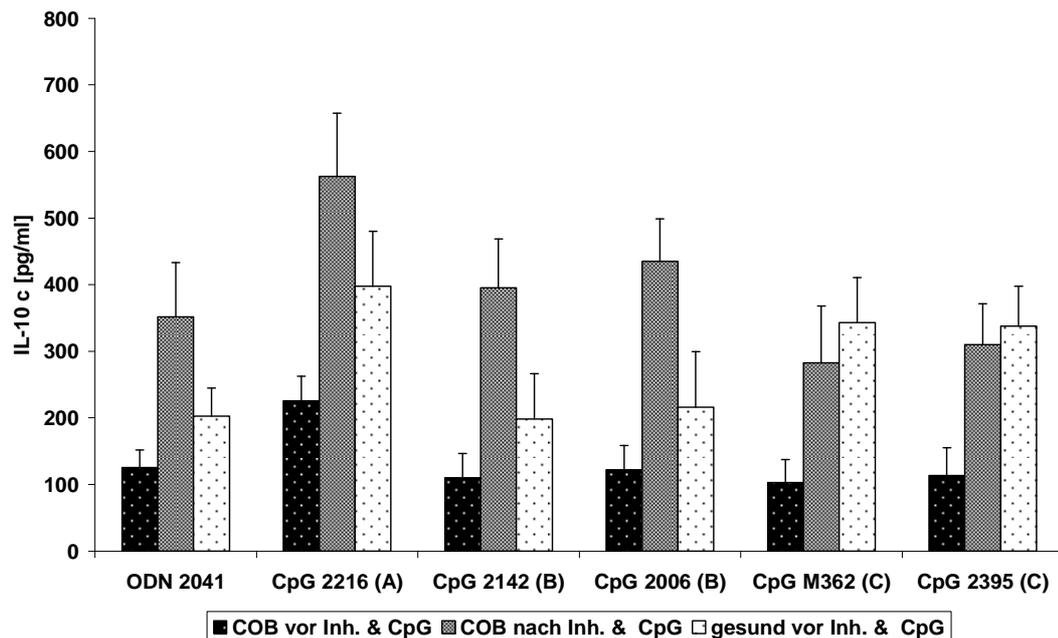


Abb. 31: *In vitro*-Klassenvergleich der IL-10-Freisetzung in Zellkultur vor und nach Inhalation der COB-Pferde. Die grauen Balken zeigen BAL-Zellen gewonnen nach fünfmaliger Inhalation der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216, inkubiert mit verschiedenen löslichen CpG-Formulierungen *in vitro*. Die Inhalation stimulierte die Zellen *in vivo*, was zu einer erhöhten IL-10-Freisetzung [pg/ml] in Zellkultur (Vergleich schwarze Balken mit $n = 7$ Pferde und graue Balken mit $n = 4$ Pferde) führte. Dies spricht für eine Aktivierung der Zellen *in vivo* durch die Inhalation. Die physiologischen IL-10-Werte der gesunden Pferde (weiße Balken mit $n = 4$ Pferde) wurden nach der Inhalation zum Teil noch übertroffen (graue Balken).

3.1.2 IL-4-Freisetzung *in vitro*

Die IL-4-Freisetzung war, obwohl die absoluten Werte vergleichsweise niedrig waren, sowohl bei löslichen ($p = 0,0298$) als auch bei GNP-gebundenen ODN ($p = 0,0282$) nach Inhalation deutlich erniedrigt (Abb. 32). Abb. 33 zeigt die *in vitro* IL-4-Freisetzung im Klassenvergleich nach CpG-GNP-Stimulation in Zellkultur aus BAL-Zellen vor und nach Inhalation der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Die Inhalation führte zu einer Stimulation der Zellen *in vivo*, was zu einer verringerten IL-4-Freisetzung in Zellkultur (Vergleich schwarze Balken und graue Balken) nach Inhalation führte (Th2/Th1-Shift). Die physiologisch niedrigen IL-4-Werte der gesunden Pferde (weiße Balken) wurden nach der Inhalation allerdings noch nicht erreicht (graue Balken) (Abb. 33).

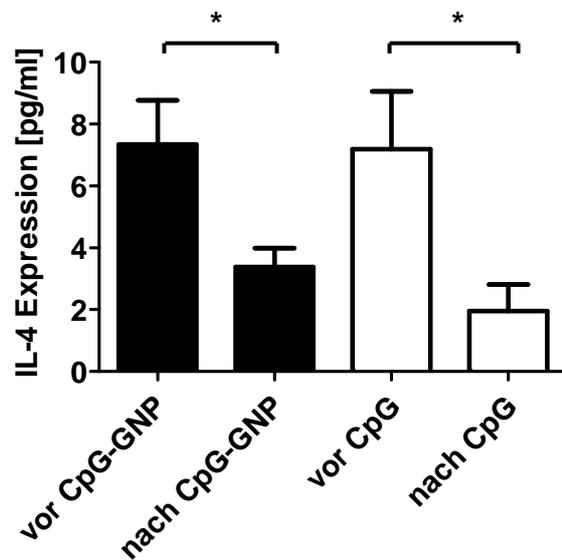


Abb. 32: *In vitro* IL-4-Freisetzung aus BAL-Zellen von COB-Pferden vor und nach fünf Inhalationen. Die IL-4-Freisetzung [pg/ml] aus BAL-Zellen von COB-Pferden fällt *in vitro* sowohl bei Inkubation mit verschiedenen CpG-GNP- (graue Balken) als auch mit löslichen CpG-Formulierungen (weiße Balken) signifikant nach fünf Inhalationen der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216.

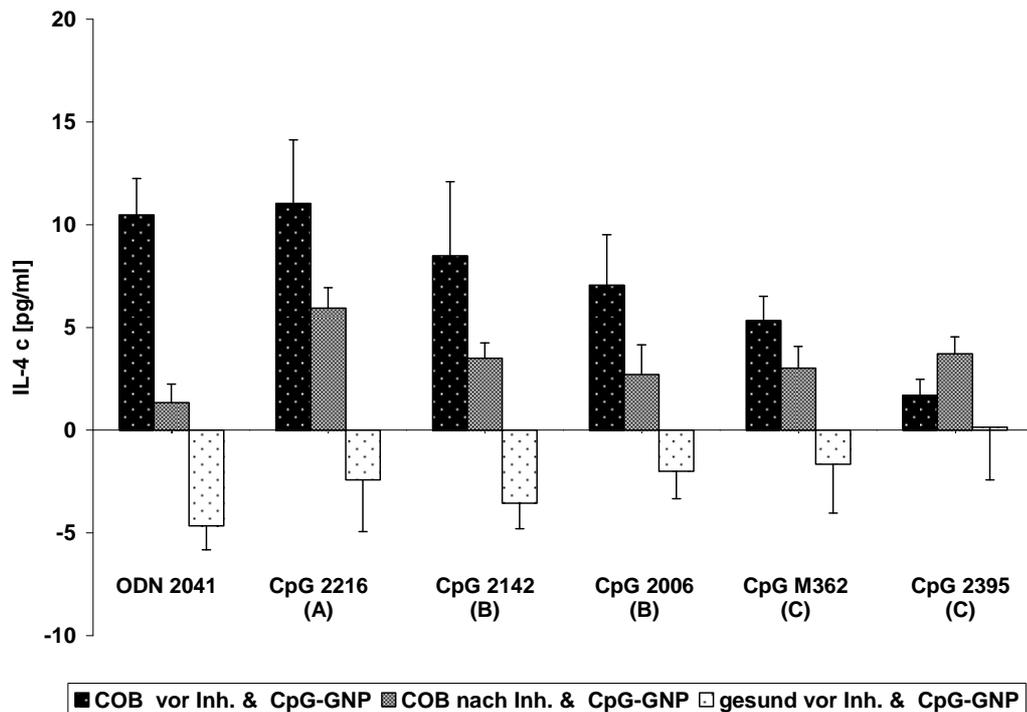


Abb. 33: *In vitro*-Klassenvergleich der IL-4-Freisetzung in Zellkultur vor und nach Inhalation der COB-Pferde. Die grauen Balken zeigen BAL-Zellen in Zellkultur, gewonnen nach fünfmaliger Inhalation der COB-Pferde mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Die Inhalation stimulierte die Zellen *in vivo*, was zu einer verringerten IL-4-Freisetzung in Zellkultur (Vergleich schwarze Balken und graue Balken) führte (Th2/Th1-Shift). Dies spricht für eine Aktivierung der Zellen *in vivo* durch die Inhalation. Die physiologisch niedrigen IL-4-Werte der gesunden Pferde (weiße Balken) wurden nach der Inhalation allerdings noch nicht erreicht (graue Balken).

3.1.3 IFN- γ -Freisetzung *in vitro*

Die IFN- γ -Freisetzung in Zellkultur nach Inhalation war überwiegend niedrig und zeigte keinen Trend in Richtung eines Anstieges oder Abfalls nach Stimulation mit GNP-gebundenen ODN ($p = 0,1414$) oder löslichen ODN ($p = 0,4870$) im Vergleich zu den Werten in Zellkultur vor der Inhalation. Jedoch zeigte die A-Klasse sowohl vor Inhalation als auch danach im Vergleich zu allen anderen ODN höhere IFN- γ -Werte in Kultur.

3.2 Einfluss der Inhalation auf die *in vivo*-Zytokinfreisetzung

3.2.1 IL-10-Freisetzung *in vivo*

Während der Inhalationen kam es zu einem deutlichen Anstieg von IL-10 im Überstand der BAL der COB-Pferde (Abb. 34). Nach drei Inhalationen war ein signifikanter 3,8-facher Anstieg ($p = 0,0473$) der IL-10-Expression, nach fünf Inhalationen sogar ein 6,9-facher Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten.

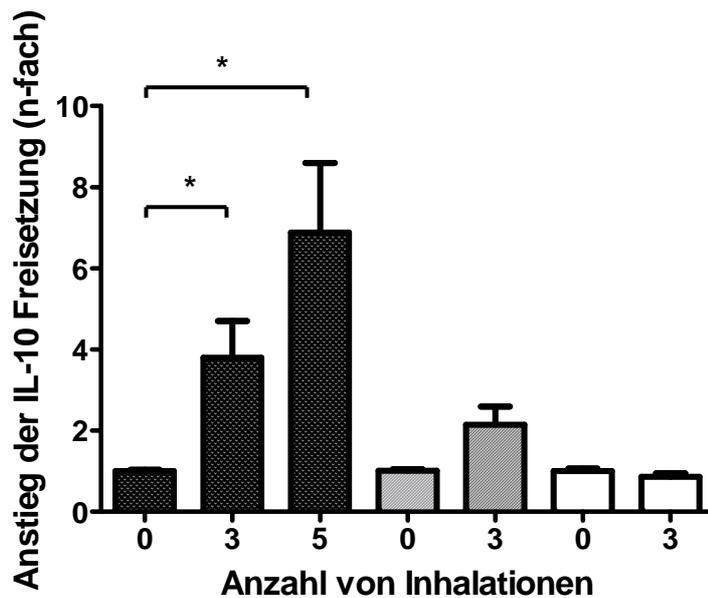


Abb. 34: *In vivo*-Freisetzung von IL-10 zu Beginn, nach drei und nach fünf Inhalationen bei COB-Pferden und gesunden Pferden. IL-10-Freisetzung als relativer (n-fach) Anstieg dargestellt, Ausgangswerte wurden gleich eins gesetzt. Schwarze Balken zeigen IL-10-Werte in frisch gewonnener BAL von COB-Pferden ($n = 4$) nach null, drei und fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Graue Balken zeigen Werte für gesunde Pferde ($n = 4$) nach null und drei Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 und weiße Balken zeigen gesunde Pferde ($n = 4$), welche nur mit „highly purified water“ (HPW) und GNP (Placebogruppe) inhaliert wurden.

Diese Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0340$) vor und nach Beendigung der fünf Inhalationen bei COB-Pferden. Bei gesunden Pferden war ein 2,1-facher Anstieg der IL-10-Freisetzung nach drei Inhalationen zu verzeichnen. Jedoch war der Unterschied der Zytokinexpression vor und nach

Inhalation nur marginal statistisch signifikant ($p = 0,0890$). Im Gegensatz dazu zeigten gesunde Pferde vor und nach Inhalation keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2890$) in der IL-10-Freisetzung bei Verwendung von „highly purified water“ (HPW) mit GNP (Placebo) (Abb. 34).

3.2.2 IL-4-Freisetzung *in vivo*

IL-4 und IFN- γ wurden entsprechend dem IL-10 aus dem Überstand der vor und nach der Inhalationsbehandlung gewonnenen BAL bestimmt. Allerdings konnten für IL-4 keine einheitlichen Ergebnisse im *in vivo*-Versuch nachgewiesen werden. Die Werte variierten stark und ließen keinen entsprechenden Verlauf erkennen.

3.2.3 IFN- γ -Freisetzung *in vivo*

IFN- γ hingegen zeigte nach Anwendung von GNP-gebundenen CpG-ODN A 2216 einen signifikanten Anstieg. Abb. 35 zeigt einen signifikanten Anstieg von IFN- γ bei COB-Pferden sowohl nach drei ($p = 0,0034$) als auch nach fünf ($p = 0,0740$) Inhalationen bezogen auf den Ausgangswert. Im Gegensatz dazu führte die Inhalation von GNP und „highly purified water“ (Placebo) bei gesunden Pferden zu keinem signifikanten Anstieg ($p = 0,8322$) von IFN- γ (Abb. 35). Bei gesunden Pferden war darüber hinaus kein IFN- γ im Überstand nach Inhalation nachzuweisen.

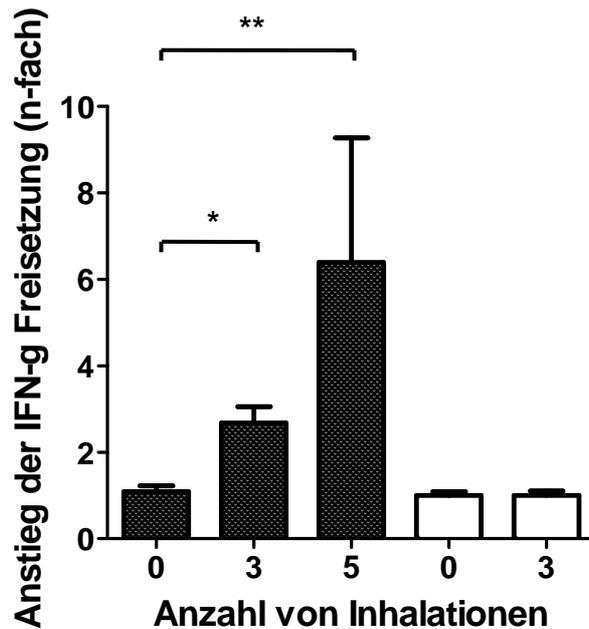


Abb. 35: *In vivo*-Freisetzung von IFN- γ zu Beginn, nach drei und nach fünf Inhalationen bei COB-Pferden und gesunden Pferden. IFN- γ -Freisetzung als relativer (n-fach) Anstieg dargestellt, ausgehend von den Anfangswerten, welche gleich eins gesetzt wurden. Schwarze Balken zeigen IFN- γ -Werte in frisch gewonnener BAL von COB-Pferden (n = 4) nach null, drei und fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Weiße Balken zeigen Werte für gesunde Pferde (n = 4) nach null und drei Inhalationen mit GNP und „highly purified water“ (Placebo).

3.3 Klinische Parameter

3.3.1 Verträglichkeit

Bei allen inhalierten Pferden wurden vor und nach Beendigung der Inhalationen Blutproben genommen, um mögliche systemische Reaktionen aufzudecken. Es konnten bei keinem Pferd Veränderungen im Sinne einer Entzündungsreaktion oder Immunsuppression nachgewiesen werden. Auch wurden bei der klinischen, endoskopischen und zytologischen Untersuchung keinerlei lokale Entzündungsreaktionen wie Rötung, Schwellung, Hyperkrinie oder Neutrophilie im Bereich der Atemwege festgestellt.

3.3.2 Ruheatemfrequenz

COB-Pferde zeigten eine Ruheatemfrequenz von durchschnittlich $19,6 (\pm 1,47)$ Atemzügen pro Minute vor der Inhalationsbehandlung (Abb. 36), welche signifikant höher war ($p = 0,0094$) als die Frequenz der gesunden Pferde ($13,6 (\pm 0,98)$ Zügen pro Minute). Nach fünf Inhalationen von GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,5447$) in der Atemfrequenz zwischen COB-erkrankten und gesunden Pferden mehr festgestellt werden (Abb. 36). Die Ruheatemfrequenz war bei den COB-Pferden auf durchschnittlich $12,8 (\pm 0,80)$ Züge pro Minute gesunken und wich damit nicht mehr von den physiologischen Werten (acht bis 16 Züge pro Minute) ab.

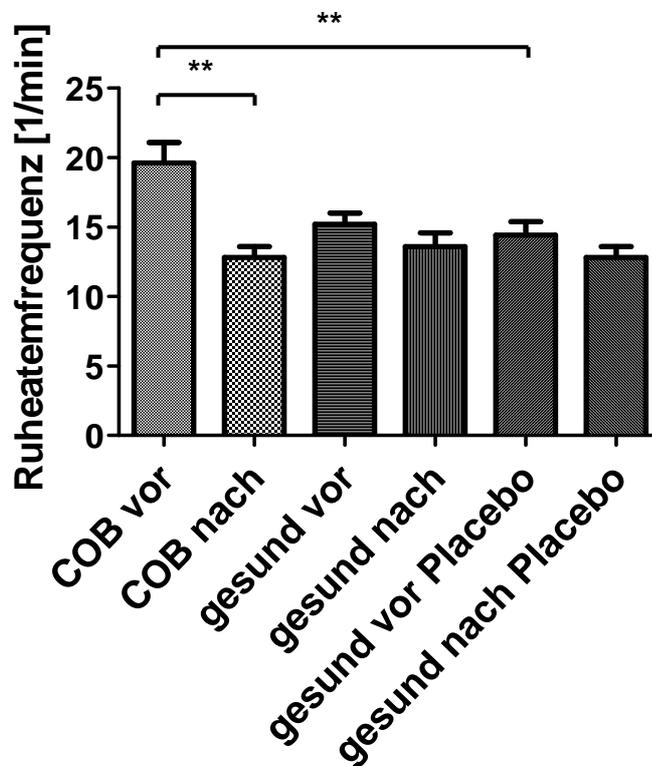


Abb. 36: Ruheatemfrequenz vor und nach Inhalationstherapie. Signifikanter Abfall der Ruheatemfrequenz [1/min] bei COB-Pferden ($n = 4$) von durchschnittlich ca. 20 Atemzügen pro Minute auf 13 Atemzüge (physiologischer Bereich) nach fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Gesunde Pferde ($n = 4$) erhielten drei Inhalationen von GNP-gebundener CpG-ODN A 2216. Die Placebogruppe, bestehend aus gesunden Pferden ($n = 4$), erhielt dreimal „highly purified water“ mit GNP.

3.3.3 Sauerstoffpartialdruck

Die untersuchten gesunden Pferde wiesen in dieser Studie im Mittel einen Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) von 94 mmHg ($\pm 2,07$) auf (Abb. 37). Im Gegensatz dazu zeigten COB-Pferde vor Inhalation einen PaO_2 von 86,75 mmHg ($\pm 2,29$) (Abb. 37). Dieser Mittelwert wurde nach fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 signifikant ($p = 0,0150$) auf 95,6 mmHg ($\pm 1,69$) verbessert (Abb. 37). Bei den gesunden Pferden zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung ($p = 0,5384$). Obwohl nicht statistisch signifikant konnte doch ein tendenzieller Unterschied vor und nach Inhalation mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 bei den gesunden Pferden beobachtet werden.

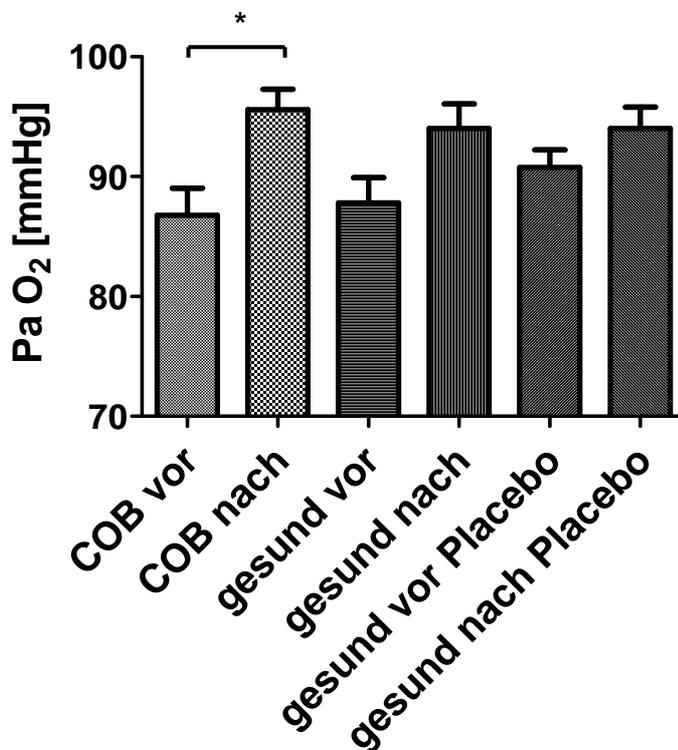


Abb. 37: Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut vor und nach Inhalationsbehandlung von COB-Pferden und gesunden Pferden. Signifikanter Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks [mmHg] der COB-Pferde ($n = 4$) nach fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 von ca. 87 mmHg (Partialinsuffizienz) auf ca. 96 mmHg (physiologischer Bereich). Gesunde Pferde ($n = 4$) und Placebogruppe ($n = 4$) wurden jeweils nur dreimal inhaliert.

3.3.4 TBS-Scoring

Die Menge des TBS-Sekrets (Material und Methoden, S. 41f, TBS-Scoring nach GERBER et al., 2004) wurde durch die fünfmalige Inhalation GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 ebenfalls positiv beeinflusst (Abb. 38), mit einem marginal statistischen Abfall ($p = 0,1078$) im TBS-Scoring von $2,7 (\pm 0,43)$ auf $1,7 (\pm 0,34)$ Punkte (Abb. 38). Jedoch sanken die TBS-Werte der COB-Pferde nicht auf die Werte der gesunden Pferde, welche im Durchschnitt bei $0,3 (\pm 0,20)$ lagen, sondern wiesen nach Abschluss der fünfmaligen Inhalation nach wie vor einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,0019$) zu den Werten der gesunden Pferde auf (Abb. 38).

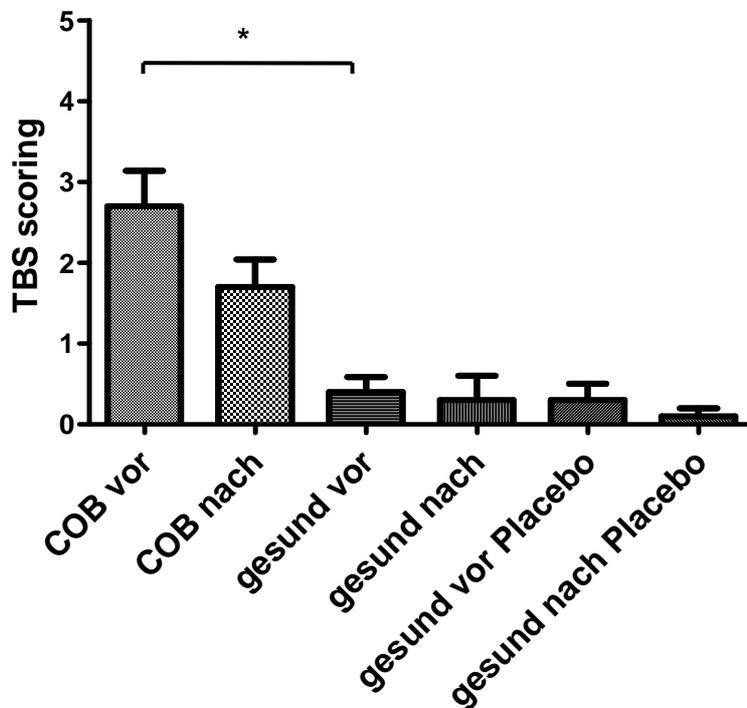


Abb. 38: TBS-Scoring vor und nach Inhalation von COB-Pferden und gesunden Pferden. Reduktion der TBS-Menge in der Trachea (Scoringssystem nach Gerber et al., 2004) bei COB-Pferden nach fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 von Grad 2,7 auf 1,7. Es wurden jedoch noch keine physiologischen Werte erreicht (Grad 0 - 0,5).

3.3.5 Neutrophile Granulozyten

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS der COB-Pferde zu Beginn des vorliegenden Versuchs betrug im Durchschnitt 70 % ($\pm 0,50$) (Abb. 10). Damit bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0004$) zu den Werten der gesunden Pferde, welche im Durchschnitt bei 26 % ($\pm 6,00$) lagen (Abb. 39). Die Inhalationsbehandlung mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 führte bei den COB-Pferden zu einem signifikanten ($p < 0,0001$) Abfall der neutrophilen Granulozyten auf 50 % ($\pm 2,04$) nach drei Inhalationen und 40 % ($\pm 6,52$) nach fünf Inhalationen ($p = 0,0048$) (Abb. 39).

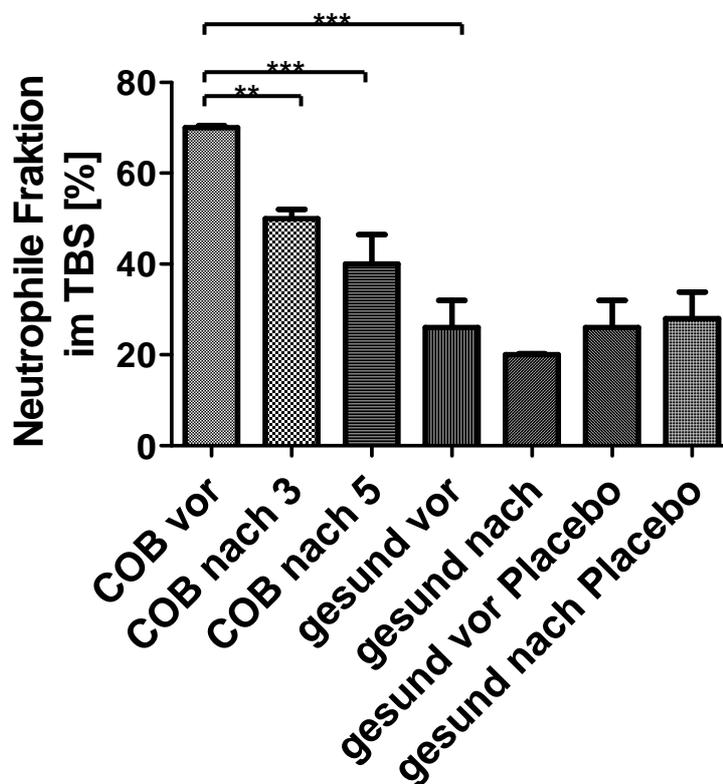


Abb. 39: Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS vor und nach Inhalation von COB-Pferden und gesunden Pferden. Der durchschnittliche prozentuale Anteil [%] der neutrophilen Granulozyten im TBS der COB-Pferde lag vor Inhalationsbeginn mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216 bei 70 %. Nach drei Inhalationen war ein Abfall auf 50 % und nach fünf Inhalationen ein Abfall auf 40 % feststellbar. Dies ergibt insgesamt eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten im TBS um 30 % nach fünf Inhalationen mit GNP-gebundener CpG-ODN A 2216.

Nach fünf Inhalationen war kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,1950$) mehr im prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten zwischen COB-Pferden und gesunden Pferden vorhanden. Abb. 39 zeigt außerdem, dass weder GNP-gebundene CpG-ODN A 2216- ($p = 0,3472$) noch Placebo-Anwendung ($p = 0,8171$) bei gesunden Pferden zu einem signifikanten Unterschied der neutrophilen Granulozyten führte.

3.3.6 Röntgenologische Untersuchung

Bei allen mit einer COB diagnostizierten Pferden waren sowohl interstitielle Verschattungen als auch COB-typische Bronchienwandverdickungen röntgenologisch nachweisbar (Abb. 11). Auch bei einigen gesunden Pferden konnten geringgradige Veränderungen im röntgenologischen Bild der Lunge beobachtet werden.

V Diskussion

1. Ziele der Studie

Das Hauptziel dieser Studie war es, einen neuen Therapieansatz zur Behandlung der COB des Pferdes durch Immunstimulation von BAL-Zellen mittels inhalativ verabreichten CpG-ODN zu etablieren.

Dabei sollte im *in vitro*-Teil der Studie, aufgrund der bestehenden sequenzabhängigen Speziesspezifität, ein geeignetes CpG-Motiv bei equinen bronchoalveolären Zellen (BAL-Zellen) identifiziert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit ein spezifisch immunmodulatorischer Effekt auf equine BAL-Zellen durch die eingesetzten CpG-ODN nachzuweisen ist. Gelatinenanopartikel (GNP) sollten dabei auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, als effektives molekulares Transportsystem für CpG-ODN bei equinen BAL-Zellen zu dienen.

Im *in vivo*-Teil der Studie sollte die zuvor identifizierte CpG-ODN-Sequenz gesunden und an COB erkrankten Pferden inhalativ verabreicht werden und dabei auf ihre lokale und systemische Verträglichkeit und ihre therapeutische Wirkung evaluiert werden.

2. Studiendesign

Die Wahl der drei Zytokine (IL-10, IL-4 und IFN- γ) in der vorliegenden Studie ergab sich zum Einen aus der Fragestellung des Versuchs, eine spezifische Immunstimulation (Th2/Th1-Shift) bei equinen BAL-Zellen durch die eingesetzten CpG-ODN nachzuweisen, zum anderen aus dem Angebot an kommerziell zur Verfügung stehenden equinen ELISA-Sets.

Zur Identifizierung einer optimalen CpG-ODN-Sequenz im Hinblick auf eine Hochregulation von IL-10 und IFN- γ wurden die immunologischen Effekte aller drei existierenden CpG-ODN-Klassen (A-, B- und C-Klasse) *in vitro* bei equinen BAL-Zellen verglichen. Darüber hinaus wurden jeweils zwei verschiedene Sequenzen pro Klasse, mit Ausnahme der A-Klasse, wo nur eine Sequenz zur

Verfügung stand, untersucht. Dies ermöglichte einen besseren Einblick in die sequenzabhängige Spezifität der Immunstimulation von equinen BAL-Zellen durch verschiedene CpG-ODN.

Diese *in vitro*-Studien wurden trotz bereits existierender Ergebnisse zur Spezifität verschiedener CpG-ODN-Sequenzen beim Pferd durchgeführt, da in früheren Studien überwiegend PBMCs verwendet wurden (RANKIN et al., 2001; ÓLAFSDÓTTIR et al., 2004; LIU et al., 2008). Aufgrund unterschiedlicher Zellpopulationen zwischen PBMCs und BAL-Zellen konnte nicht mit vergleichbaren immunologischen Reaktionen und Ergebnissen auf die dabei zum Einsatz gekommenen CpG-ODN-Sequenzen gerechnet werden.

3. Bedeutung der Zellzusammensetzung der BAL

Die Zellzusammensetzung der BAL ist abhängig vom Schweregrad der COB und dem Zeitpunkt der Probennahme im Verlauf des Krankheitsgeschehens (GRABNER, 2005a; MAY und GEHLEN, 2009). So sind während der Exazerbation deutlich mehr neutrophile Granulozyten in der BAL nachweisbar als in Phasen der Remission (GRABNER, 2005a; GERBER et al., 2008b). Dieses heterogene Gemisch an BAL-Zellen setzt sich überwiegend aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zusammen (GRABNER, 2005a; MAY und GEHLEN, 2009). Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass es zu unterschiedlichen Zytokinexpressionen in Abhängigkeit von den vorhandenen Zellsubpopulationen kommen kann.

Um die gebildeten Zytokine eindeutig einer Population zuordnen zu können, wäre eine Zellseparierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) nötig. Durch magnetische Separation der einzelnen Subklassen könnte ihr genauer quantitativer Anteil in der BAL bestimmt werden. Allerdings existieren für equine Zellen noch keine kommerziell erhältlichen Antikörper zur Differenzierung der Zellpopulationen in CD4⁺-T-Lymphozyten, oder zur weiteren Auftrennung in CD4⁺-CD25⁺-Treg-Zellen. Dies wäre besonders von Interesse, um die Quelle der IL-10-Produktion zu identifizieren und eine mögliche Aktivierung und Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen nachzuweisen.

Aufgrund der Tatsache, dass kommerzielle Kits zur Zellseparation von equinen BAL-Zellen nicht zur Verfügung stehen, war es in dieser Studie nicht möglich, die gemessenen Zytokine eindeutig bestimmten Zellsubtypen aus der heterogen zusammengesetzten BAL zuzuordnen. Obwohl die genaue Kenntnis der beteiligten Zellsubtypen und ihr individueller Beitrag zur Zytokinexpression, Überlebensrate und Pathogenese der COB von großem Interesse wären, ist dies nicht zwingend eine Voraussetzung für erfolgreiche *in vivo*-Versuche.

Da es sich bei *in vivo*-Versuchen ebenfalls um eine heterogenen Komposition von verschiedenen Zellen handelt, sind die vorgenommenen *in vitro*-Versuche möglicherweise näher an den realen Bedingungen, als wenn man sie an isolierten Zellsubtypen durchgeführt hätte. Bei Versuchen mit isolierten Zellsubtypen wird den unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Immunzellen nur wenig Raum gegeben. Aufgrund dessen konnten im vorliegenden Versuch die interzellulären Aktionen womöglich besser wiedergegeben und damit auch eine Vorhersage zu möglichen therapeutischen Effekten *in vivo* getroffen werden.

Die zytologische Untersuchung der TBS-Proben lieferte einen Anhaltspunkt zur quantitativen Verteilung der wichtigsten Zelltypen (GRABNER, 2005a). Jedoch erlaubte sie keine Differenzierung der einzelnen Subklassen wie beispielsweise der Lymphozyten in Th1, Th2 oder Treg. Dies wäre allerdings interessant im Hinblick auf die eingesetzten CpG-ODN und den erwarteten Th2/Th1-Shift, sowie eine mögliche Beteiligung von Treg am immunologischen Geschehen (MOSEMAN et al., 2004; FONSECA und KLINE, 2009).

Da IL-10 von verschiedensten immunologischen Zellen gebildet werden kann (HAWRYLOWICZ, 2009), wäre im vorliegenden Versuch die genaue Quelle der beobachteten Expression, gerade im Hinblick auf ein mögliches therapeutisches Potential von großem Interesse. Die deutlich höheren IL-10-Freisetzungen aus Zellkulturen von gesunden Pferden im Vergleich zu Zellen von COB-Pferden sprechen für eine unterschiedliche quantitative Zusammensetzung der Zellsubpopulationen bedingt durch die Lungenerkrankung (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) (GRABNER, 2005a; MAY und GEHLEN, 2009). Der hohe IL-10-Wert in den Zellkulturen von gesunden Pferden im vorliegenden Versuch könnte als physiologischer regulatorischer Mechanismus in gesunden Lungen im Sinne einer Th1/Th2-Balance beurteilt

werden, welcher im Rahmen der Pathophysiologie der COB bei gestörter Lungenhomöostase zu Gunsten einer überschießenden Th2-Antwort verschoben wird (UMETSU und DEKRUYFF, 2006; HAWRYLOWICZ, 2009; RYANNA et al., 2009).

4. Speziesspezifische CpG-ODN-Sequenzen

Eines der Ziele dieser Studie war es eine optimal stimulatorische CpG-ODN-Sequenz im Hinblick auf einen Th2/Th1-Shift bei equinen BAL-Zellen zu identifizieren. Gemäß der in der Literatur beschriebenen speziesspezifischen Determinierung der CpG-Motive erschien es sinnvoll, zuerst im *in vitro*-Versuch nach geeigneten Sequenzen beim Pferd zu suchen. Frühere Studien verwendeten dazu meist PBMCs, weshalb ein direkter Vergleich, aufgrund unterschiedlicher Zellpopulationen, schwierig erscheint. Der Vorteil der PBMCs liegt in ihren besseren Zellkultureigenschaften gegenüber BAL-Zellen, was sie für *in vitro*-Versuche zu einem etablierten Zellmodell gemacht hat (LIU et al., 2008, 2009).

Da die Pathomechanismen der COB allerdings in den tiefen Atemwegen lokalisiert sind, erschien es sinnvoller, Zellen direkt von dort zu gewinnen, um relevante Effekte auf diese spezialisierten Zellen der Lunge zu erforschen. Zudem wurde eine Vielzahl von Zellen in der equinen Lunge als TLR-9-positiv identifiziert (SCHNEBERGER et al., 2009). Diese Zellen erschienen damit besonders geeignet zur direkten CpG-ODN-Interaktion. Damit kann die lokale Applikation der CpG-ODN in die equine Lunge als durchaus sinnvoll angesehen werden.

ÓLAFSDÓTTIR und Mitarbeiter (2004) erklärten, das die optimal stimulatorische Sequenz beim Pferd 5`-CTCGTT-3` sei. Dies wurde allerdings von keiner anderen Gruppe bestätigt. RANKIN und Mitarbeiter (2001) identifizierten das Motiv 5`-GTCGTT-3` als das effektivste bei einer ganzen Reihe von Säugetieren einschließlich Mensch, Pferd, Rind, Schaf, Hund und Katze. Dieses Motiv findet sich wiederholt (dreimal) in CpG-ODN B 2006 und einmal in CpG-ODN B 2142. Diese beiden Sequenzen erwiesen sich allerdings im vorliegenden Versuch mit equinen BAL-Zellen nicht als die effektivsten ODN im Hinblick auf eine optimale

TLR-9-Aktivierung mit Th2/Th1-Shift und IL-10-Stimulation. Gemäß den vorliegenden Ergebnissen in BAL-Zellen, verhält sich CpG-ODN A 2216 diesbezüglich deutlich effizienter. Diese Abweichungen sind sicherlich auf unterschiedliche Zellpopulationen zwischen PBMCs und BAL-Zellkulturen zurückzuführen. Entsprechend der durchgeführten *in vitro*-Versuche konnte die A Klasse 2216 als die effektivste der fünf verglichenen CpG-ODN-Sequenzen identifiziert werden.

Die spezielle Struktur des CpG-ODN A 2216 mit seiner zentralen palindromischen Sequenz und terminalen Poly-G-Motiven am 5`- und 3`-Ende ist auf der einen Seite für ihre besondere immunstimulatorische Wirkung verantwortlich, kann aber auch zur Bildung von sogenannten inter- und intramolekularen G-Tetraden führen (ZWIOREK et al. 2008). Dabei kommt es zur spontanen Bildung stabiler nanopartikulärer Strukturen mit bis zu 30 Basen Länge und einer Aggregatgröße von bis zu 100 nm (ZWIOREK et al., 2008). Dies kann zu einer verminderten immunologischen Wirksamkeit führen (ZWIOREK et al., 2008). Bei Auftreten von Aggregationen während der Beladung der GNP mit CpG-ODN A gilt es, dies zu beachten.

5. *In vitro*-Studie

5.1 Bedeutung der IL-10-Freisetzung

Für alle sechs untersuchten ODN zeigten BAL-Zellen von gesunden Pferden nach Inkubation in Zellkultur höhere Konzentrationen an IL-10 und IFN- γ im Vergleich zu Zellen von COB-Pferden. Dies war unabhängig von der verwendeten Formulierung (lösliche ODN oder GNP-gebunden). Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen ist ein Unterschied in der Zusammensetzung der Zellpopulation zwischen gesunden und kranken Pferden. COB-Pferde werden mit überschießenden Th2- und geringen Th1-Immunantworten in Verbindung gebracht (CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2005, 2009). Anhand des nahezu identischen *in vitro*-IL-10-Freisetzungsverhaltens innerhalb der B- und C-Klassen, kann gefolgert werden, dass weniger die individuelle Sequenz als vielmehr die CpG-Klasse in diesem Fall

den Ausschlag zur IL-10-Freisetzung gab. Dies ist von Interesse im Hinblick auf eine möglicherweise geringere sequenzabhängige Spezifität der CpG-ODN bei equinen BAL-Zellen. Allerdings setzte sich diese Beobachtung bei der IL-4- und IFN- γ -Freisetzung nicht fort, sondern war nur auf IL-10 begrenzt.

Der signifikante IL-10-Anstieg *in vivo* nach drei (3,8-fach) und nach fünf Inhalationen (6,9-fach) der COB-Pferde, sowie der 2,1-fache Anstieg der IL-10-Freisetzung bei gesunden Pferden, bestätigt zusätzlich den Mechanismus der Immunmodulation der BAL-Zellen durch die eingesetzte Formulierung. Alle drei in Zellkultur von gesunden Pferden untersuchten Zytokinprofile (IL-10, IL-4 und IFN- γ) können als physiologische Parameter von nicht „allergiebetreffenen“ Lungen unter homöostatischen immunologischen Bedingungen und ohne überschießende Th2-Antwort betrachtet werden. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen können deshalb als physiologische Zielwerte für eine CpG-ODN-basierende Immunotherapie angesehen werden.

Die große Bedeutung des IL-10 liegt in dessen inhibitorischer Wirkung gegenüber dem proallergischen IL-4 und IL-5, sowie dem proinflammatorischen IFN- γ (VAN SCOTT et al., 2000; TAYLOR et al., 2006; MILOVANOVIC et al., 2009). CpG-ODN aktivieren auch B-Lymphozyten IL-10 freizusetzen, welches als regulatorischer Schalter zur Begrenzung von CpG-vermittelten proinflammatorischen Entzündungsreaktionen fungiert (KLINE und KRIEG, 2001). Aufgrund dessen könnte diesem regulatorischen Zytokin eine zentrale Rolle im proallergischen und proinflammatorischen Geschehen der COB zukommen.

Es konnte gezeigt werden, dass humane plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) ein enges Netzwerk in Epithelien der luftleitenden Wege der oberen und unteren Atemwege der menschlichen Lunge bilden (GARNIER und NICOD, 2009). In der Annahme von vergleichbaren Verhältnissen in equinen Lungen könnten auch dort pDCs als „first line defence“ und Vermittler zwischen der Außenwelt und dem angeborenen Immunsystem fungieren.

MOSEMAN und Mitarbeiter (2004) konnten nachweisen, dass CpG-ODN A 2216 via TLR-9-Pfad humane pDCs induzierte CD4⁺-CD25⁻-Zellen in Richtung IL-10-produzierenden CD4⁺-CD25⁺-Zellen (Treg-Zellen) durch direkten Zell-Zell-

Kontakt zu aktivieren. Dies könnte auf ähnlichem Weg auch im Pferd vonstatten gehen und würde für eine CpG A 2216-induzierte Treg-Aktivierung mit IL-10-Bildung sprechen. Man könnte dann davon ausgehen, dass die beobachtete Hochregulation von IL-10 durch eine Aktivierung der Treg erfolgte. Dies wäre von großer Bedeutung im Hinblick auf den therapeutischen Nutzen der A-Klasse im Krankheitsgeschehen der COB.

Bei an Asthma erkrankten Kindern wurden in der BAL weniger Tregs nachgewiesen als bei gesunden (HARTL et al., 2007). Auch der Anteil der Tregs innerhalb der T-Helferzellen ist in der humanen BAL deutlich höher als im Blut. Tregs in PBMCs machen 5 % der enthaltenen T-Helferzellen aus, in der BAL sind es 25 % der T-Helferzellen (HARTL et al., 2007). Wenn diese Ergebnisse vom Menschen sich ähnlich beim Pferd darstellen, würden diese die erhöhten IL-10-Werte bei gesunden Tieren nach CpG-ODN-Einsatz via TLR-9-Aktivierung erklären.

5.2 Bedeutung der IL-4-Freisetzung

Die absoluten Werte der IL-4-Konzentrationen in den stimulierten Zellkulturen waren in der vorliegenden Studie vergleichsweise niedrig. Meist lagen sie sogar unterhalb der Nachweisgrenze von 15,6 pg/ml bezogen auf die Standardkurve des kommerziellen ELISA. Die nativen unstimulierten BAL-Zellen wurden als Nullwert festgesetzt und ihre IL-4-Freisetzung als Negativkontrolle von den stimulierten BAL-Zellen abgezogen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich somit um korrigierte Werte und nicht um negative ELISA-Ergebnisse. Die negativen Werte ergaben sich daher, dass Zellen von gesunden Pferden im Vergleich zu unbehandelten BAL-Zellen weniger IL-4 freisetzten.

Die Beobachtung, dass Zellen von gesunden Pferden weniger IL-4 nach Stimulation freisetzen als Zellen von COB-Pferden, erwiesen sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Studien, welche bei Pferden mit COB eine überschießende Th2-Immunantwort (hohe IL-4- und IL-5-Werte) in der BAL nachweisen konnten (LAVOIE et al., 2001; CORDEAU et al., 2004; HOROHOV et al., 2005). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen nun auch bei equinen BAL-Zellen die Annahme, dass CpG-ODN zu einer Herunterregulation

der Th2-Zytokine führen (BOHLE, 2002; KRIEG, 2006; KLINE, 2007; FONSECA und KLINE, 2009; VOLLMER und KRIEG, 2009).

5.3 Bedeutung der IFN- γ -Freisetzung

Es ist bekannt, dass reine Th1-Immunantworten mit einhergehender IFN- γ -Freisetzung zur Exazerbation allergischer Erkrankungen beitragen können (UMETSU und DEKRUYFF, 2006). IFN- γ als proinflammatorisches Zytokin wird auch in Lungen von Asthmapatienten vermehrt freigesetzt und scheint zum Schweregrad der allergischen Erkrankung beizutragen (UMETSU und DEKRUYFF, 2006). Th1-Zellen für sich alleine sind wahrscheinlich auch kein ausreichendes Gegengewicht, überschießende Th2-Immunantworten zu regulieren, sondern können sogar entzündliche Reaktionen in Lungen im *in vivo*-Modell verstärken (UMETSU und DEKRUYFF, 2006). Im Gegensatz dazu wurde diskutiert, dass IFN- γ zu den inhibitorischen Effekten bei Asthma und Allergien in Kombination mit dem suppressiv wirkenden IL-10 von Tregs beitragen könnte (STOCK et al., 2004).

GIGUERE und Mitarbeiter (2002) und AINSWORTH und Mitarbeiter (2003) konnten bei COB-Pferden erhöhte IFN- γ -Werte in der BAL nachweisen, was aufgrund des chronisch entzündlichen Geschehens in der Lunge verständlich ist. Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen die Induktion von Tregs und die vermehrte Produktion von IL-10 als therapeutische Interaktion von großer Bedeutung, um den Pathomechanismus der chronischen Entzündung zu unterbrechen (HAWRYLOWICZ, 2005; ROBINSON, 2009b; RYANNA et al., 2009).

5.4 Zellvitalität

Anhand des MTT-Tests war es möglich, nachzuweisen, dass die unterschiedlichen Formulierungen (lösliche CpG und GNP-gebunden) differierende Einflüsse auf die Überlebensrate der BAL-Zellen von COB-Pferden ausübten. Der auffälligste Punkt war dabei der signifikante Unterschied zwischen löslichen CpG und CpG-

GNP bei Zellen von COB-Pferden. Die GNP-formulierten CpG waren im Mittel weniger zytotoxisch für die Zellpopulationen der BAL von COB-Pferden. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus früheren Studien mit anderen Zelltypen (BOURQUIN et al., 2008).

Es konnten dagegen keine Unterschiede in der Vitalität von BAL-Zellen von gesunden Pferden bei Inkubation mit CpG oder CpG-GNP festgestellt werden. Aufgrund dessen können die Absorptionsunterschiede bei Zellen von COB-Pferden im MTT-Test nicht auf eine GNP-bedingte Absorptionsstörung zurückgeführt werden, insbesondere da GNP ihr Absorptionsmaximum bei einer anderen Wellenlänge haben (375 nm) (COESTER et al., 2000).

6. *In vivo*-Inhalationsstudie

6.1 Studiendesign

Da die Dauer der Vorerkrankung der COB-Pferde weder durch die ausführliche Anamnese, noch durch die spezielle Lungenuntersuchung einwandfrei bestimmt werden konnte, stellt dieser Faktor eine Variable dar. Differierende lokale Zytokinmilieus und Zellsubpopulationen in den Lungenkompartimenten, im Sinne einer verschobenen Th1/Th2-Balance, sowie unterschiedliche Phasen innerhalb der Chronizität des Krankheitsgeschehens führen wahrscheinlich zu variierenden immunologischen Reaktionsmustern (HOROHOV et al., 2005). Dies gilt es bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Auf der anderen Seite wurde versucht, diesen Aspekt durch eine möglichst einheitliche Pferdepopulation (Haltungsbedingungen, Alter, Rasse und Nutzung der Pferde) und einen definierten Untersuchungs- und Therapiezeitraum auszugleichen. Zwölf der fünfzehn Pferde dieser Studie stammten aus dem gleichen Stall mit gleichen Haltungsbedingungen (Boxenhaltung mit Stroheinstreu und Heufütterung, sowie täglichem Paddockaufenthalt), gleicher Nutzung (Zucht), sowie überwiegend gleicher Rasse (acht der fünfzehn Pferde waren Traber). Auch der Untersuchungs- und Therapiezeitraum erstreckte sich bei allen Pferden einheitlich auf die Monate November bis Januar, womit mögliche andere allergische Erkrankungen wie „summer pasture-associated obstructive

pulmonary disease“ (SPAOPD) oder Sommerkeczem keinen direkten Einfluss auf die lokalen immunologischen Reaktionen nehmen konnten. Die Durchführung des gesamten Versuchs im Winter stellte sicher, dass die Patienten überwiegend in Stallhaltung mit vergleichbarer Exposition gegenüber potentiellen Allergenen gehalten wurden. Somit konnten andere Einflussfaktoren wie regelmäßiger Weideaufenthalt und eine damit in Verbindung stehende asymptomatische Remissionsphase ausgeschlossen werden (ROBINSON, 2001; AINSWORTH et al., 2003).

Eine einheitliche Haltung auf Stroh und Fütterung des gleichen Heus lässt eine ähnliche Allergenbelastung der Patienten annehmen (AINSWORTH et al., 2003; DEBRUE et al., 2005; MILLERICK-MAY, 2009). Zudem herrscht bei kalten Temperaturen und in überwiegend geschlossenen Ställen nachgewiesenermaßen eine deutlich höhere Konzentration an Schadgasen im Mikroklima der Ställe, welche einen entscheidenden Anteil an der Pathogenese der COB darstellen (MILLERICK-MAY, 2009). Diese „natürliche“ Exposition gegenüber potentiellen Auslösern einer COB gewährleistet weitgehend vergleichbare extrinsische Einflussfaktoren (AINSWORTH et al., 2003, 2009; MILLERICK-MAY, 2009).

Ein weiterer Parameter zur Diagnostik der COB stellt die Belastungsuntersuchung dar (COUËTIL et al., 2007; GERBER et al., 2008b). Da ein Großteil der Pferde im vorliegenden Versuch klinikeigene Pferde waren, die keiner regelmäßigen reiterlichen oder sonstigen Belastung ausgesetzt sind, konnten keine vergleichbaren standardisierten Belastungsuntersuchungen durchgeführt werden. Ein objektiver Vergleich zwischen den Erholungswerten von COB-Pferden und gesunden Pferden war damit in der vorliegenden Studie nicht durchführbar.

6.2 Inhalationsregime

Die im Vergleich zu anderen Inhalationsprotokollen kurzen Inhalationszeiten von zehn Minuten pro Inhalation jeden zweiten Tag machen dieses System äußerst benutzerfreundlich. Auch die kombinierte Anwendung aus „AeroNeb Go Mash Vibrator“ und „Equine Haler“ erwiesen sich als benutzer- und pferdefreundlich.

Schließlich sind auch die geringeren Kosten für den „Equine Haler“ und „AeroNeb Go Mash Vibrator“ im Vergleich zu anderen Systemen wie den Ultraschallvernebler zu berücksichtigen (NIEDERMAIER und GEHLEN, 2009).

Die topische Anwendung erscheint im vorliegenden Studiendesign ein vielversprechender Ansatz zu sein. Ist ein Analogieschluss zur Inhalation mit Kortikosteroiden zulässig, dann gewährleistet die lokale Anwendung von CpG-ODN *per inhalationem* ein Minimum an systemischer Wirkung. Eine Verabreichung über die Schleimhaut aktiviert nach VOLLMER und KRIEG (2009) sowohl die lokale als auch die systemische humorale und zelluläre Immunantwort und vermittelt damit einen erhöhten Schutz gegen Infektionen.

Daneben wären aber auch andere Anwendungswege denkbar. Eine lokale Injektion in die *Lymphonodi mandibulares*, welche mit dem Lymphsystem der Lunge in direkter Verbindung stehen, oder die direkte endoskopische Instillation in die Hauptbronchien, wären ebenfalls denkbar. Jedoch muss bei diesen deutlich invasiveren Methoden vermutlich mit einer stärkeren systemischen Reaktion des Immunsystems gerechnet werden.

Die unterschiedliche Anzahl der Inhalationen zwischen COB-Pferden (fünf Inhalationen) und gesunden Pferden (drei Inhalationen) ergab sich daraus, dass es bei den gesunden Pferden zu keiner messbaren Verbesserung der klinischen Parameter kommen konnte, da diese bereits im physiologischen Bereich lagen. Eine entsprechende Verbesserung nach drei Inhalationen wie bei den COB-Pferden war also nicht möglich, weshalb zusätzliche Inhalationen für die Fragestellung des Versuchs als nicht notwendig erachtet wurden.

Trotz der für herkömmliche Inhalationstherapien vergleichsweise kurzen Zeitspanne und geringen Anzahl der Inhalationen, ließ sich eine deutliche Verbesserung in der Zytologie, der Menge und Viskosität des TBS, der arteriellen Blutgase und der AaDO₂, sowie der Atemfrequenz der COB-erkrankten Pferde nachweisen.

Um eine eindeutige quantifizierende Zuordnung der beobachteten positiven Effekte treffen zu können, bedarf es weitergehender Studien mit größeren Patientenzahlen und mehreren Kontrollgruppen. Damit ließe sich auch der Effekt der Inhalation mit physiologischer Kochsalzlösung, im Vergleich zur

Kombination mit GNP oder CpG-ODN an kranken Pferden besser evaluieren. Das sich Inhalationen per se positiv auf die Atemwegserkrankung auswirken, steht außer Frage. Welchen Anteil sie an der Verbesserung der klinischen, laborchemischen und zytologischen Parameter im vorliegenden Versuch hatten, muss noch weiterführend untersucht werden.

6.3 Verträglichkeit der CpG-GNP-Inhalation

Nebenwirkungen auf die Inhalation der CpG-GNP-Formulierung wurden in der vorliegenden Studie nicht beobachtet. Im Rahmen der Inhalationen kann es zu einer Verflüssigung des Trachealsekrets und damit zu leichtem Nasenausfluss kommen, was aber für einen therapeutischen Effekt spricht. Lokale Entzündungsreaktionen aufgrund der Inhalation wurden nicht beobachtet. Systemische Wechselwirkungen wurden aufgrund der lokal begrenzten Anwendung als äußerst gering eingestuft und konnten im Rahmen der untersuchten Blutparameter nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen der diagnostischen Untersuchung bei der Gewinnung der BAL verbleibt eine Restmenge an steriler Kochsalzlösung in der Lunge, welche in der Regel innerhalb von ein bis zwei Tagen über das respiratorische Epithel resorbiert wird. In seltenen Fällen kann dies zu leichtem Fieber und lokalen Entzündungsreaktionen in der Lunge führen. Diese Nebenwirkungen sind jedoch selbstlimitierend und konnten im vorliegenden Versuch nicht beobachtet werden.

Bei allen inhalierten Pferden wurden vor und nach Inhalation Blutproben genommen, um mögliche systemische Reaktionen zu detektieren. Im Speziellen standen Fibrinogen als unspezifischer Entzündungsmarker, sowie ein Differentialblutbild im Vordergrund der laborchemischen Untersuchungen. Es wurden jedoch keine Veränderungen im Sinne einer Entzündungsreaktion oder Immunsuppression nachgewiesen. Auch wurde bei der klinischen, endoskopischen und zytologischen Untersuchung keinerlei lokale Entzündungsreaktionen wie Rötung, Schwellung, Hyperkrinie oder Neutrophilie der Atemwege festgestellt. Dies spricht für eine gute Verträglichkeit der angewandten Dosis und des verwendeten Inhalationsprotokolls.

6.4 IL-10-Freisetzung

Entsprechend dem beobachteten signifikanten Anstieg der IL-10-Freisetzung nach fünfmaliger Inhalation der COB-Pferde, ist davon auszugehen, dass es im vorliegenden *in vivo*-Versuch aufgrund der Inhalation zu einer Aktivierung spezifischer Zellsubpopulationen mit resultierender Bildung von antiallergisch wirkendem IL-10 kam.

Nach Placeboinhalation (GNP und „highly purified water“) konnte dagegen kein Anstieg von IL-10 festgestellt werden. Dies bestätigt, das GNP ohne CpG-ODN nicht zu einer Zytokininduktion von IL-10 führen und damit, wie bereits in Versuchen mit anderen Tierarten gezeigt (ZWIOREK et al., 2008), auch bei equinen BAL-Zellen immunologisch inert sind.

IL-10, als Schlüsselzytokin in der Vermittlung von Toleranz bei überschießenden Immunreaktionen, war im Hinblick auf seine *in vivo*-Expression nach CpG-GNP-Anwendung von besonderem Interesse. Entsprechend der *in vitro*-Ergebnisse (Klassenvergleich der CpG-ODN im Hinblick auf die effektivste Zytokinstimulation) hatte sich die A-Klasse 2216 als besonders effizient erwiesen. Dies bildete die Grundlage für ihren *in vivo*-Einsatz.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-10 zu einer Herunterregulation von IL-4, IL-5 und IFN- γ führt (VAN SCOTT et al., 2000; TAYLOR et al., 2006). Aufgrund dessen wurde hypothetisiert, dass der *in vivo*-Einsatz von CpG-ODN 2216 zu einer IL-10-vermittelten Herunterregulation des chronisch entzündlich/allergischen Geschehens der COB führen könnte und damit möglicherweise auch vor Gewebeschädigung durch Degranulation von neutrophilen Granulozyten schützen könnte. Dies konnte anhand der klinischen, endoskopischen und zytologischen Befunde bestätigt werden.

Beim Menschen konnte nach antiallergischer Therapie (z.B. Einsatz von Glukokortikoiden oder allergenspezifischer Immuntherapie) ein Anstieg von IL-10 auf eine Aktivierung von Tregs zurückgeführt werden (RYANNA et al., 2009). Asthmapatienten weisen deutlich niedrigere Zahlen an Tregs in der BAL der betroffenen Atemwege auf als vergleichbare gesunde Menschen, was mit einem Verlust der peripheren Allergentoleranz bei Asthmapatienten korreliert (HARTL et al., 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse aus der Asthmaforschung der

Humanmedizin könnte geschlossen werden, dass der beobachtete IL-10-Anstieg im vorliegenden Versuch ebenfalls auf eine Aktivierung und Vermehrung der Tregs durch CpG-ODN in der Pferdelunge zurückzuführen ist.

Darüber hinaus ist bekannt, dass CpG-ODN plasmazytoide dendritische Zellen beim Menschen aktivieren (MOSEMAN et al., 2004), welche in den tiefen Atemwegen lokalisiert sind (GARNIER und NICOD, 2009). JARNICKI und Mitarbeiter (2008) zeigten, dass der Einsatz von CpG-ODN eine Freisetzung von IL-12 und IL-10 aus dendritischen Zellen bewirkt, was zu einer IL-12-vermittelten Th1- und einer IL-10-vermittelten Treg-Induktion führt. Demzufolge könnte daraus für die vorliegende Studie geschlossen werden, dass CpG-ODN eine IL-10-Freisetzung via Tregs bewirkten und somit möglicherweise zu einer peripheren Toleranz geführt haben, was eine innovative alternative Behandlungsart allergischer Erkrankungen der Pferde darstellen würde (MOSMAN et al., 2004; UMETSU und DEKRUYFF, 2006; FONSECA und KLINE, 2009; RYANNA et al., 2009).

6.5 IL-4-Freisetzung

Die vergleichsweise niedrigen IL-4-Werte in Zellkultur nach Inhalation stehen im Einklang mit dem beabsichtigten Ziel, Th2-medierte proallergische Immunantworten durch den Einsatz von CpG-ODN zu reduzieren. Dies lässt einen signifikanten *in vivo*-Effekt durch die Inhalationstherapie annehmen, höchstwahrscheinlich bedingt durch eine Veränderung der beteiligten Zellsubpopulationen in den Atemwegen. Vergleicht man die hohen IL-10-Werte *in vitro*, insbesondere nach Inhalationsbehandlungen, mit den vergleichsweise niedrigen Werten an IFN- γ und IL-4, kann dies möglicherweise auf einen negativen Feedbackmechanismus durch IL-10 zurückgeführt werden (VAN SCOTT et al., 2000; TAYLOR et al., 2006).

6.6 IFN- γ -Freisetzung

In der vorliegenden *in vivo*-Studie konnte ein konstanter Anstieg von IFN- γ bei COB-Pferden nach drei und nach fünf Inhalationen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine CpG-ODN-induzierte Th1-Stimulation. Dies konnte im vorliegenden Versuch erstmalig beim Pferd nach Inhalation von GNP-gebundenen CpG-ODN *in vivo* nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite könnten niedrige proinflammatorische IFN- γ -Werte auch als positiv bei chronisch entzündlichen Prozessen bewertet werden (UMETSU und DEKRUYFF, 2006). Da bei gesunden Pferden im BAL-Überstand kein IFN- γ nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass es erst in Folge der chronischen Entzündungsreaktionen der COB zu einem Anstieg kommt und IFN- γ physiologischerweise nur in geringen Konzentrationen im Atmungstrakt gesunder Pferde vorkommt (AINSWORTH et al., 2003; AINSWORTH und CHEETHAM, 2010). Auch konnte weder nach Inhalation von Placebo noch nach CpG-GNP-Inhalation bei gesunden Pferden ein eindeutiger IFN- γ -Anstieg nachgewiesen werden. Möglicherweise hängt dies mit unterschiedlichen vorherrschenden Zellsubpopulationen und differierenden Aktivierungspfaden bei COB-Pferden im Vergleich zu gesunden Pferden zusammen (HOROHOV et al., 2009).

In Studien beim Menschen konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg von IFN- γ in Verbindung mit IL-10 effektiv in der Hemmung von asthmatischen und allergischen Erkrankungen ist (STOCK, 2004). Dieses Erkenntnis unterstützt den erwähnten Th2/Th1-Shift weg vom proallergischen Th2-Pfad (JURK und VOLLMER, 2007).

Dieser Spagat zwischen einer gewünschten Hochregulation von Th1, um die gestörte Th1/Th2-Balance wieder herzustellen auf der einen Seite, und auf der anderen Seite eine zusätzliche proinflammatorische Stimulation im chronischen Entzündungsgeschehen der COB zu vermeiden, erfordert weitere immunologisch-klinische Studien.

6.7 Klinische Ergebnisse

6.7.1 Ruheatemfrequenz

Die Ruheatemfrequenz war bei den COB-Pferden nach fünf Inhalationen von CpG-GNP in den physiologischen Bereich abgesunken und unterschied sich damit nicht mehr von den Werten der gesunden Pferde. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass das Therapieregime zu einer Normalisierung der Atemfrequenz bei an COB erkrankten Pferden beigetragen hat.

6.7.2 Röntgenologische Befunde

Die röntgenologischen Befunde wurden im Rahmen der speziellen Untersuchung des Atmungstraktes erhoben und dienten im Lungenscoring der Einteilung in den Schweregrad der COB. Da sich radiologisch sichtbare Veränderungen der interstitiellen und bronchialen Verschattungen der Lunge im Rahmen der Pathogenese der COB erst nach frühestens drei Monaten darstellen lassen (GEHLEN et al., 2009), erfolgte keine röntgenologische Kontrolluntersuchung nach Ende des Versuchs. Da auch die gesunden Pferde zum Teil geringgradige Veränderungen auf den Lungenröntgenaufnahmen aufwiesen, wurde dieser Parameter weniger schwer im Scoring gewichtet.

6.7.3 Sauerstoffpartialdruck

Die COB-Pferde erreichten nach fünf Inhalationen mit CpG-GNP-Formulierung physiologische PaO₂-Werte im arteriellen Blut. Auch bei den gesunden Pferden konnte eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Verbesserung des Sauerstoffpartialdrucks beobachtet werden. Innerhalb der Placebogruppe war dies nicht zu beobachten. Dies spricht für einen positiven Effekt der Formulierung auf die Fähigkeit zum uneingeschränkten Gasaustausch in den Alveolen. Möglicherweise kam es in Folge der CpG-GNP-Anwendung zu einer Reduktion des Bronchospasmus und der entzündlichen Schleimhautschwellung, sowie der das Lumen verlegenden TBS-Menge, wodurch eine verbesserte Ventilation der tiefen Atemwege und ein verbesserter Gasaustausch in den Alveolen erfolgten.

6.7.4 Endoskopische Untersuchung

Nach fünf Inhalationen konnte bei den COB-Pferden ein Abfall im TBS-Score nachgewiesen werden, physiologische Werte wurden allerdings nicht erreicht. Dies spricht für einen positiven Effekt der CpG-GNP-Formulierung auf die Dys- und Hyperkrinie der COB. In weiterführenden Studien muss geklärt werden, ob durch häufigere oder längere Inhalationen eine weitere Verbesserung der TBS-Werte bis hin zu physiologischen Bedingungen erreicht werden kann.

Die Dicke des Septums der *Bifurcatio tracheae* wurde nicht als Anhaltspunkt für den Schweregrad der COB verwendet, da nachgewiesen wurde, dass keine Korrelation zwischen beiden Parametern besteht (KOCH et al., 2007).

6.7.5 Neutrophile Granulozyten

Da der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS direkt mit dem Schweregrad der COB korreliert (LAVOIE et al., 2001; COUËTIL et al., 2007) kann anhand dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass der Schweregrad der jeweils vorliegenden COB nach fünf Inhalationen mit CpG-GNP signifikant reduziert worden ist. Die Placebo-Anwendung bei gesunden Pferden konnte dagegen keinen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten vor und nach Inhalation induzieren. Dies spricht für einen antientzündlichen Effekt der CpG-GNP-Formulierung.

Schwere und chronische Asthmafälle zeigen häufig erhöhte Zahlen an neutrophilen Granulozyten (HOROHOV et al., 2009). Die Dominanz von eosinophilen Granulozyten bei Asthma ist weniger häufig als allgemein angenommen. Weniger als 50 % der Asthmafälle sind auf eosinophile Entzündungsreaktionen zurückzuführen (HOROHOV et al., 2009). Anhand dieser Erkenntnisse erscheint die COB des Pferdes der nicht-eosinophilen Form des humanen Asthmas sehr ähnlich (HOROHOV et al., 2009). Möglicherweise ist der verantwortliche immunologische Mechanismus der COB der Pferde sowohl allergischen Ursprungs als auch durch das angeborene Immunsystem vermittelt (HOROHOV et al., 2009).

In früheren Studien beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen Treg-Aktivierung und der Reduktion neutrophiler Granulozyten durch eine verstärkte Apoptoserate beobachtet werden (LEWKOWICZ et al., 2006). Humane neutrophile Granulozyten exprimieren alle bekannten TLRs außer TLR-3 (LEWKOWICZ et al., 2006). Es wurde nachgewiesen, dass TLRs einen entscheidenden Einfluss auf die Stimulation und Funktion der Treg ausüben (CARMALHO et al., 2003; LEWKOWICZ et al., 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TLRs einen wesentlichen Bestandteil in der Organisierung der angeborenen Immunantwort und indirekt auch in der Kontrolle der adaptativen Immunantwort durch Aktivierung antigenpräsentierender Zellen darstellen (PASARE und MEDZHITOV, 2004).

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Studie ist die Erkenntnis, dass Tregs neutrophile Granulozyten durch direkten Zell-Zell-Kontakt und insbesondere über IL-10 hemmen (MONTAGNOLI et al., 2006). Diesem Einfluss der Treg kommt höchstwahrscheinlich große Bedeutung in der Behandlung und Therapie allergischer Erkrankungen zu (UMETSU und DEKRUYFF, 2006; RYANNA et al., 2009).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass der deutliche *in vivo*-IL-10-Anstieg nach CpG-GNP-Inhalation bei COB-Pferden direkt mit dem Abfall der neutrophilen Granulozyten im TBS in Verbindung steht. Dies unterstützt die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die inhalative Anwendung von GNP-gebundenen CpG-ODN zur klinischen Verbesserung einer COB führt.

7. Schlussfolgerung und Ausblick

Es handelt sich bei der vorliegenden Studie um die erste *in vivo*-Anwendung von nanopartikulär gebundener immunstimulatorischer DNA mittels Inhalation beim Pferd. Es konnte hierbei die sichere Verwendung eines biologisch abbaubaren und nicht toxischen nanopartikulären Trägersystems (Gelatinenanoartikel) für Nukleinsäuren und pharmakologisch wirksame Substanzen erstmalig beim lebensmittelliefernden Tier nachgewiesen werden.

Was in weiteren Studien zu klären bleibt, ist die Frage, wie lange die beobachteten positiven klinischen, endoskopischen, zytologischen und laborchemischen Ergebnisse bei den behandelten COB-Patienten anhalten. Des Weiteren sind die Effekte an größeren Patientenzahlen, unter Placebokontrolle der COB-Pferde und in Dosis-Wirkungsstudien zu überprüfen.

Eine weitere vielversprechende Option stellt die kombinierte Anwendung von CpG-GNP mit der spezifische Immuntherapie (SIT) dar (BOHLE, 2002; SENTI et al., 2009). Die Kombination mit potentiellen Allergenen könnte, wie bereits bei Mensch und Hund beschrieben, auch beim Pferd erfolgversprechend sein. Gerade auf dem breiten Gebiet der allergischen Erkrankungen eröffnen diese Methoden vielversprechende neue Therapiekonzepte der COB des Pferdes.

VI Zusammenfassung

Ein Hauptziel dieser Studie war es, eine optimal stimulatorische Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodeoxynukleotid (CpG-ODN)-Sequenz im Hinblick auf den zu erwartenden Th2/Th1-Shift über toll-like receptor-9 (TLR-9)-Aktivierung bei equinen bronchoalveolären Lavage-Zellen (BAL-Zellen) zu identifizieren. Damit sollte ein neuer, immunologischer Therapieansatz für die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) des Pferdes eruiert werden.

Im *in vitro*-Teil der Studie wurden BAL-Proben von vier lungengesunden und sieben mittelgradig an COB erkrankten Pferden gewonnen und in Zellkultur mit fünf CpG-ODN-Sequenzen (der Klassen A, B und C) und einer ODN-Sequenz ohne CpG-Motiv inkubiert und nach 24 Stunden aus dem Zellkulturüberstand die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Für alle sechs untersuchten ODN zeigten BAL-Zellen von gesunden Pferden höhere Konzentrationen an IL-10 und IFN- γ im Vergleich zu Zellen von COB-Pferden. Dies war unabhängig von der verwendeten Formulierung (lösliche ODN oder GNP-gebunden). BAL-Zellen von gesunden Pferden setzten darüber hinaus weniger IL-4 nach Stimulation frei als Zellen von COB-Pferden. Im Klassenvergleich zeigte die A-Klasse 2216 der verwendeten ODN-Sequenzen die höchste Freisetzungsrates des antientzündlichen und antiallergischen Zytokins IL-10 und des Th1-Zytokins IFN- γ . Aufgrund dessen wurde diese Sequenz für die *in vivo*-Studie ausgewählt.

Um eine bessere *in vivo*-Stabilität der CpG-ODN zu gewährleisten wurden sie an Gelatinenano-partikel (GNP) gebunden. Die GNP-gebundene A-Klasse 2216 wurde sowohl vier lungengesunden als auch vier COB-Pferden inhaliert. Eine dritte Gruppe, bestehend aus vier lungengesunden Pferden, erhielt nur GNP mit Wasser. Damit sollte nachgewiesen werden, dass GNP immunologisch inert sind. Es wurden weder lokale noch systemische Unverträglichkeiten infolge der Inhalation festgestellt. Dies spricht für eine gute Verträglichkeit der angewandten Dosis und des verwendeten Inhalationsprotokolls.

Jeweils nach drei und nach fünf Inhalationen wurden bei COB-Pferden BAL-Proben genommen und auf ihren Zytokinstatus untersucht. Nach drei Inhalationen war ein 3,8-facher Anstieg der IL-10-Expression, nach fünf Inhalationen ein 6,9-

facher Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten. Die Hochregulation von IL-10 als antientzündliches und antiallergisches Zytokin ist von großer Bedeutung im chronisch-entzündlichen Geschehen der COB des Pferdes und war neben der Hochregulation von IFN- γ ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie. Bei gesunden Pferden war dagegen nur ein 2,1-facher Anstieg der IL-10-Freisetzung nach drei Inhalationen zu verzeichnen. Gesunde Pferde zeigten vor und nach Inhalation mit Placebo (GNP mit Wasser) keinen signifikanten Unterschied in der IL-10-Freisetzung. Darüberhinaus konnte ein konstanter Anstieg des Th1-Zytokins IFN- γ bei COB-Pferden nach drei und nach fünf Inhalationen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine CpG-ODN-induzierte Th1-Stimulation, was im vorliegenden Versuch zum ersten Mal beim Pferd *in vivo* nach Inhalation von CpG-GNP nachgewiesen werden konnte.

Die klinischen Parameter zur Beurteilung des Schweregrades der COB zeigten nach fünf Inhalationen eine signifikante Verbesserung. Die Ruheatemfrequenz war von durchschnittlich 20 Atemzüge/min auf 13/min abgesunken und unterschied sich damit nicht mehr von den Werten der gesunden Pferde. Der Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) der COB-Pferde (im Durchschnitt 87 mmHg), als Maß für den uneingeschränkten Gasaustausch in der Lunge, erreichte nach fünf Inhalationen mit CpG-GNP physiologische Werte (96 mmHg). Des Weiteren konnte bei den COB-Pferden ein Abfall im Tracheobronchialsekret (TBS)-Score nachgewiesen werden. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten im TBS der COB-Pferde lag vor Inhalationsbeginn bei 70 %. Nach drei Inhalationen erfolgte ein Abfall auf 50 % und nach fünf Inhalationen ein Abfall auf 40 %. Aufgrund der Korrelation der Anzahl der neutrophilen Granulozyten mit dem Schweregrad der COB, kann anhand dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass der Schweregrad der jeweils vorliegenden COB nach fünf Inhalationen mit CpG-GNP signifikant reduziert worden ist.

In weiterführenden Studien müssen diese positiven Ergebnisse an höheren Patientenzahlen, unter Placebokontrolle der COB-Pferde, sowie in Dosis-Wirkungsstudien überprüft werden um das volle Potential dieser inhalativen nanopartikulären Immuntherapie beim Pferd zu überprüfen.

VII Summary

One major aim of the present investigation was to identify optimal stimulating Cytosin-Phosphate-Guanin-Oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) sequences in equine bronchoalveolar lavage-cells (BAL cells) resulting into Th2/Th1-shift via toll-like receptor 9 (TLR-9) activation in order to evaluate a novel immunologic therapy of equine recurrent airway obstruction (RAO).

In the *in vitro* part of the study BAL samples of four healthy and seven RAO-affected horses were taken and incubated in cell culture with five CpG-ODN sequences (consisting of A, B and C class) and one ODN sequence without a CpG motif. After 24 hours cytokine levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ were determined by ELISA technique. BAL cells from healthy horses exhibited higher concentrations of IL-10 and IFN- γ for all the six ODNs in comparison to BAL cells from RAO-affected horses. This effect was independent from the types of the formulations (soluble ODN or GNP-bound). Cells from healthy horses exhibited lower IL-4 concentrations following stimulation as compared to the cells from RAO-affected horses. According to the *in vitro* results of upregulation of IL-10 and IFN- γ the A-class 2216 was chosen for *in vivo* inhalation studies.

For a better *in vivo* stability CpG-ODN was bound to gelatin nanoparticles (GNP). Four healthy horses and four RAO horses were inhaled with GNP-bound A class 2216. A third group consisting of four healthy horses gained GNP with water to verify whether GNP are immunologic inert.

No local or systemic adverse effects after inhalation of GNP-bound CpG-ODN (CpG-GNP) were observed indicating the good biocompatibility of applied doses and regime. This is the first time an *in vivo* application of nanoparticle-bound immunostimulating DNA via inhalation in horses is reported.

BAL samples were taken after three and after five inhalations (RAO-affected horses) to evaluate actual cytokine levels. After three inhalations of CpG-GNP, RAO-affected horses showed a 3.8 fold increase of IL-10 expression in BAL, after five inhalations a 6.9 fold increase could be observed. The upregulation of anti-inflammatory and anti-allergic cytokine IL-10 is of great value in the chronic inflammatory response of RAO. IL-10 stimulation by CpG-ODN was one major

aim of this study. Healthy horses exhibited a 2.1 fold increase after three inhalations. In contrast inhalation of placebo (GNP with water) showed no significant increase in IL-10 expression in BAL. After three and five inhalations of CpG-GNP, a constant increase in IFN- γ (Th-1 cytokine) concentration in BAL of RAO-affected horses was measurable. This could be due to CpG-ODN-dependent Th1 stimulation. In the present study, this effect was demonstrated in an *in vivo* clinical trial using CpG-GNP formulation through inhalation route.

Clinical parameters to evaluate severity of RAO showed significant improvement after five inhalations with CpG-GNP formulation. The breathing rate of RAO-affected horses (mean breathing rate 20/min) showed a significant decrease after five inhalations of CpG-GNP to the physiologic range (< 16/min). Oxygen partial pressure (PaO₂) of arterial blood gas is a parameter to evaluate gas exchange in the lungs. PaO₂ of RAO-affected horses (mean 87 mmHg) increased significantly to the physiological range (95 \pm 5 mmHg) following same treatment. Moreover, a decrease in tracheal bronchial secretion score (TBS score) was detected in RAO-affected horses although physiological levels were not achieved. The mean percentage fraction of neutrophil granulocytes in the TBS of RAO-affected horses was about 70 % before inhalation with CpG-GNP. After three inhalations, a mean decrease to 50 % was detectable and after five inhalations a mean decrease to 40 % was found. As the percentage of neutrophils in TBS correlates directly to the severity of RAO, it can be assumed that severity of the present RAO disease was reduced significantly after five inhalations with CpG-GNP.

In further studies these positive results have to be verified with higher numbers of patients, placebo control of RAO-affected horses and dose escalation studies to clarify the full potential of this novel inhalation immunotherapy using nanoparticles.

VIII Literaturverzeichnis

Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR (2002): Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet J*, 34: 587-593.

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

Ainsworth DM (2009): Just how important is IL-17 in horses with RAO? In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 100-102.

Ainsworth DM, Cheetham J (2010): Recurrent airway obstruction. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (Herausgeber): *Equine internal medicine* (dritte Auflage). St. Louis: Saunders Elsevier, 340-344.

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

Anderson KV (2000): Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12: 13-19.

Art T, Bureau F, Robinson NE (2008): Guest Editorial: Hunting for a key to the enigma of heaves in the black box of the white cells. *Vet J*, 177: 307-308.

Barnes PJ (2000): Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest*, 117: 10-14.

Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001): Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9237-9242.

Berridge MV, Tan AS (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303: 474-482.

Bird AP (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321: 209-213.

Bird AP (1987): CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet*, 3: 342-347.

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

Bourquin C, Anz D, Zwioerek K, Lanz A-L, Fuchs S, Weigel S, Wurzenberger C, von der Borch P, Golic M, Moder S, Winter G, Coester C, Endres S (2008): Targeting CpG oligodeoxynucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol*, 181: 2990-2998.

Braun-Fahrländer C (2003): Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April 2002. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3: 325-329.

Braun-Fahrlander C (2009): Role of environment in asthma, endotoxin and other factors. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 44-46.

Carmalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler T, Zelenay S, Haury M, Demengeot J (2003): Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 197: 403-411.

Coester C, von Briesen H, Langer K, Kreuter J (2000): Gelatin nanoparticles by two step desolvation - a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul*, 17: 187-193.

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

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

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

Ewart SL (2009): Complexities of gene x environment interactions. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 30-33.

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

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

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

Flaminio MJ, Borges AS, Nydam DV, Horohov DW, Hecker R, Matychak MB (2007): The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. *J Immune Based Ther Vaccines*, 25: 1-17.

Fonseca D, Kline J (2009): Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 256-262.

Funch-Nielssen H, Roberts CA, Weeks JS, Deaton CM, Marlin DJ (2001): Evaluation of a new spacer device for delivery of drugs into the equine respiratory tract. Company record.

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

Gehlen H, May A (2011): COB-Chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes. *Continuing Veterinary Education*, Veterinär Verlag, 1: 1-28.

Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, Imhof A, Tahon L, Robinson NE (2004): Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine vet J*, 36: 576-582.

Gerber V, Nussbaumer P (2008): Asthma beim Pferd – Krankheitsgene und parasitäre Würmer. UniPress, 138: 15-16.

Gerber V, Swinburne JE, Blott SC, Nussbaumer P, Ramseyer A, Klukowska-Rotzler J, Dolf G, Marti E, Burger D, Leeb T (2008a): Genetics of recurrent airway obstruction (RAO). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 115, 271-275.

Gerber V, Gerber H, Straub R (2008b): Untersuchungsmethoden beim Pferd (erste Auflage). Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 65-77.

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

Giguere S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M (2002): Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol*, 85: 147-158.

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

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

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

Häcker H (2002): Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 247: 77-92.

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

Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S (2007): Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 119: 1258-1266.

Hartmann G, Krieg AM (2000): Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, 164: 944-953.

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S (2003): Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 33: 1633-1641.

Hawrylowicz CM (2005): Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med*, 202:1459-1463.

Hawrylowicz CM (2009): Regulatory T cells in allergy and asthma: the role of the vitamin D pathway. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 91-92.

Hoffman A (1999): Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. *Equine Vet Educ*, 11: 330-336.

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

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

Iwakura Y, Ishigame H (2006): The IL-23/IL-17 axis in inflammation *J Clin Invest*, 116: 1218-1222.

Jarnicki AG, Conroy H, Brereton C, Donnelly G, Toomey D, Walsh K, Sweeney C, Leavy O, Fletcher J, Lavelle EC, Dunne P, Mills KH (2008): Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signalling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol*, 180: 256-262.

Jurk M, Vollmer J (2007): Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *Biodrugs*, 21: 387-401.

Kline JN, Krieg AM (2001): Oligodeoxynucleotides. In: Hansel TT, Barnes PJ (Herausgeber): *New Drugs for Asthma, Allergy and COPD*. Basel: Karger, 31: 229-232.

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

Klinman D, Shirota H, Tross D, Sato T, Klaschik S (2008): Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol*, 84: 958-964.

Koch C, Straub R, Ramseyer A, Widmer A, Robinson NE, Gerber V (2007): Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance for the evaluation of lower airway health in horses. *Equine vet J*, 39: 107-112.

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

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

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

Kurata K, Iwata A, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H (2004): Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences that induce IFN- γ production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 102: 441-450.

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5: 190-198.

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

Leibold W (2009): Klinische und immunologische Untersuchungen zur Diagnosestellung des Sommerkzems und ihre forensische Bedeutung. In: Berufsverband der praktizierenden Tierärzte (bpt) - Kongress 1.- 4. Oktober 2009 (Herausgeber): Vortragsband Pferd, Kleintier, Praxisführung. Nürnberg: bpt Akademie GmbH, 70-71.

Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchórzewski H (2006): Lipopolysaccharide-activated CD4⁺ CD25⁺ Tregulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*, 177: 7155-7163.

Liu T, Nerren J, Murrell J, Juillard V, El Garch H, Martens R, Cohen N (2008): CpG-induced stimulation of cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells of foals and their dams. *J Jevs*, 28: 419-426.

Liu T, Nerren J, Liu M, Martens R, Cohen N (2009): Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vaccine*, 27: 674-683.

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

Macdowell AL, Peters SP (2007): Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 7: 464-468.

Macfarlane DE, Manzel L (1998): Antagonism of immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides by Quinacrine, Chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol*, 160: 1122-1131.

Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Martin F, Bachmann MF (2008): Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol*, 38: 1404-1413.

Marti E (2009): Role of IgE and perspectives on clinical allergy testing. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 109-111.

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

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

Millerick-May M (2009): Quantification and control of environmental contaminants in stables. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 192-194.

Milovanovic M, Heine G, Zuberbier T, Worm M (2009): Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy*, 39: 671-678.

Montagnoli C, Fallarino F, Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, Zelante T, Kurup WP, Pitzurra L, Puccetti P, Romani L (2006): Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J Immunol*, 176: 1712-1723.

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

Mutwiri G, Pontarollo R, Babiuk S, Gabriel P, van Drunen Little-van den Hurk S, Mena A, Tsang C, Alcon V, Nichani A, Ioannou X, Gomis S, Townsend H, Hecker R, Potter A, Babiuk LA (2003): Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol*, 91: 89-103.

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

Neuhaus S, Bruendler P, Frey CF, Gottstein B, Doherr MG, Gerber V (2010): Increased Parasite Resistance and Recurrent Airway Obstruction in Horses of a High-Prevalence Family. *J Vet Intern Med*, 24: 407-413.

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

Ohnesorge B (2009): RAO/COB/COPD: Definition und Erstuntersuchung, auch unter forensischen Gesichtspunkten. In: Berufsverband der praktizierenden Tierärzte (bpt) - Kongress 1.- 4. Oktober 2009 (Herausgeber): Vortragsband Pferd, Kleintier, Praxisführung. Nürnberg: bpt Akademie GmbH, 72-75.

Ólafsdóttir G, Svansson V, Torsteinsdóttir S (2004): In vitro Stimulation of Horse Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) with Adjuvant Peptides and CpG Motifs on a Vector. In: Icelandic Veterinary Association (Herausgeber): International Symposium on Diseases of the Icelandic Horse, 2004, Selfoss, Iceland. Ithaca NY: International Veterinary Information Service. [http://www.ivis.org/proceedings/Iceland/2004/Poster4/chapter_frm.asp]

Pasare C, Medzhitov R (2004): Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*, 16: 23-26.

Pauwels R (2001): Global initiative for chronic obstructive lung diseases (GOLD): time to act. *Eur Respir J*, 18: 901-902.

Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Little-van den Hurk S (2001): CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11: 333-340.

Richter C (2006): Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A- und CpG-C-Oligodesoxynukleotiden als Grundlage für die Entwicklung immunstimulatorischer Nanopartikel (Dissertation). München: Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

Robinson NE (2001): Recurrent airway obstruction (Heaves). In: Lekeux P (Herausgeber): *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service. [http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/robinson/chapter_frm.asp?LA=1]

Robinson NE (2006): COPD, RAO, Heaves, IAD: Sorting out the Phenotypes of Chronic Airway Disease in the Horse. In: Proceedings of the annual meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society of Veterinary Pathology, Tucson, Arizona: International Veterinary Information Service. [<http://www.ivis.org/proceedings/acvp/2006/RobinsonNE.pdf?LA=1>]

Robinson NE (2009a): The challenge of defining the phenotype in equine airway disease. In: Tessier C, Gerber V (Herausgeber): 4th world equine airways symposium (WEAS). Bern: Pabst Science Publishers, 27-29.

Robinson DS (2009b): Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*, 39: 1314-1323.

Ryanna K, Stratigou V, Safinia N, Hawrylowicz C (2009): Regulatory T cells in bronchial asthma. *Allergy*, 64: 335-347.

Schaeper W (1939): Untersuchungen über die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd. *Tierärztliche Rundschau*, 31: 595-601.

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

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

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

Sparwasser T, Hültner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H (1997): Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol*, 162: 2368-2374.

Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman G, DeKruyff RH, Umetsu DT (2004): Induction of TH1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyperreactivity. *Nat Immunol*, 5: 1149-1156.

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

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

Traub PM (2005): Klinische und immunologische Untersuchungen zur Ausprägung der Chronisch Obstruktiven Bronchitis des Pferdes: Gibt es Hinweise auf eine hyperreagible und eine dyskrinische Form? (Dissertation). Hannover: Klinik für Pferde und Arbeitsgruppe für Immunologie, Tierärztlichen Hochschule Hannover.

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

Tseng C-L, Su W-Y, Yen K-C, Yang K-C, Lin F-H (2009): The use of biotinylated-EGF-modified gelatine nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. *Biomaterials*, 30: 3476-3485.

Umetsu DT, DeKruyff RH (2006): The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev*, 212: 238-255.

Van Scott MR, Justice JP, Bradfield JF, Enright E, Sigounas A, Sur S (2000): IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278: 667-674.

Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM (2004): Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*, 34: 251-262.

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

Von Beust BR, Johansen P, Smith KA, Bot A, Storni T, Kündig TM (2005): Improving the therapeutic index of CpG oligodeoxynucleotides by intralymphatic administration. *Eur J Immunol*, 35: 1869-1876.

Von Garnier C, Nicod LP (2009): Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss med wkly*, 139: 186-192.

Waser M, von Mutius E, Riedler J, Nowak D, Maisch S, Carr D, Eder W, Tebow G, Schierl R, Schreuer M, Braun-Fahrländer C (2005): ALEX Study team. Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy*, 60: 177-184.

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

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

Yasuda K, Rutz M, Schlatter B, Metzger J, Lupp PB, Schmitz F, Haas T, Heit A, Bauer S, Wagner H (2006): CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol*, 36: 431-436.

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

IX Anhang

1. COB Lungenscoring

Untersuchungsbogen zur Dokumentation von Signalement, Anamnese und Allgemeinuntersuchung der Patienten mit Punkteschlüssel zur Bewertung der klinischen, laborchemischen, endoskopischen, zytologischen und radiologischen Befunde im Hinblick auf den Schweregrad der COB-Erkrankung.

COB-Lungenscoring**Signalement/Anamnese:**

Alter : _____ Patientenname: _____

Geschlecht: _____ Besitzer: _____

Rasse: _____

Gewicht: gewogen/geschätzt _____ kg

Größe: Stockmaß/Bandmaß _____ cm

Nutzung: _____

Haltung: _____

Vorbehandlung: _____

sonstige Erkrankungen: _____

Allgemeinuntersuchung:

Haltung _____

Verhalten _____

Habitus _____

Ernährungszustand _____

Pflegezustand _____

Atemfrequenz/-typ _____

Temperatur _____

Pulsfrequenz _____

Schleimhäute/KFZ _____

Nasenausfluss _____

Lymphknoten _____

Husten auslösbar _____

Auskultation Lunge _____

Auskultation Herz _____

Allgemeinbefinden _____

<u>Spezielle Untersuchung:</u>		Punkte:	
Husten auslösbar:	ja nein	1 0	
Husten:	belastungsinduziert belastungsunabhängig	2 3	
Nasenausfluss:	ggr. serös mittelgr. sero-mukös hochgr. mukös	1 2 3	
Nasenausfluss:	belastungsinduziert belastungsunabhängig	1 2	
Atemfrequenz in Ruhe:	< 16 16-20 > 20	0 1 2	
Atemtyp:	costoabdominal geringgr. abdominal verstärkt deutlich abdominal verstärkt Nüsternblähen in Ruhe	0 2 3 4	
Dampfrinne:	nein ja	0 3	
Atemgeräusch:	inspiratorisch/ expiratorisch	geringgr. mittelgr. hochgradig	1 2 3
Lungenfeld:	physiologisch geringgr. vergrößert deutlich vergrößert	0 1 2	
<u>Belastungsuntersuchung</u>			
Beruhigungswerte nach standardisierter Belastung (5 min Schritt, 10 min Trab)	Ruheatemfrequenz erreicht nach	< 20 min 20-30 min > 30 min	0 2 3
2			

Blutchemie

Tag und Uhrzeit der Bestimmung		_____ 2009 _____		Uhr
Arterielle Blutgase:	vor Belastung	pO ₂	100 +/- 5mmHg	0
			90 +/- 5mmHg	1
			80 +/- 5mmHg	2
	(Partialinsuffizienz)			
	nach Belastung	pCO ₂	40 +/- 5mmHg	0
			50 +/- 5mmHg	3
(Globalinsuffizienz)				
nach Belastung	pO ₂	100 +/- 5mmHg	0	
		90 +/- 5mmHg	1	
		80 +/- 5mmHg	2	
(Partialinsuffizienz)				
nach Belastung	pCO ₂	40 +/- 5mmHg	0	
		50 +/- 5mmHg	3	
		(Globalinsuffizienz)		
Arterioalveoläre				
Sauerstoffdifferenz: (modifiziert nach Grabner, 2005)	< 10	mmHg (latent)		0
	10-15	mmHg (geringgr.)		1
	15-25	mmHg (mittelgr.)		2
	> 25	mmHg (hochgr.)		3

Endoskopische Untersuchung

Bifurcatio tracheae:	scharf begrenzt	0
	geringgr. verdickt	1
	deutlich verdickt	2
Trachealsekretmenge:	keine	0
	geringgr.	1
	mittelgr.	2
	hochgr.	3
Trachealsekretviskosität:	flüssig	1
	viskös	2
	zäh (mit „Spikes“)	3

Zytologische Untersuchung

BAL Zytologie: BAL Flüssigkeitsmenge _____ ml
 Leukozytenzahl (BAL) _____

Gesamtzellzahl		
Entnahme- und Weiterverarbeitungszeitspanne		
(Kühlagerung)		
Neutrophile Granulozyten	geringgr. (< 10%)	0
(Anzahl geringer in BAL	mittelgr. (10-20%)	2
als in TBS)	hochgr. (> 30%)	3
schaumige Makrophagen (Typ C)	keine	0
	wenige	1
	viele	2
<u>Tracheobronchialsekret</u>		
Farbe, Konsistenz und Menge		
Neutrophile Granulozyten	geringgr. (< 30%)	0
	mittelgr. (30-50%)	3
	hochgr. (> 50%)	4
schaumige Makrophagen (Typ C) (reaktive Entzündungszellen)	keine	0
	wenige	1
	viele	2
mehrkernige Riesenzellen	keine	-----
	wenige	-----
	viele	-----
Charcot-Leyden Kristalle	keine	0
	wenige	1
	viele	2
Creola-Körperchen (Entnahmebedingt)	keine	-----
	wenige	-----
	viele	-----
Eosinophile Granulozyten (allergische Bronchitis, Lungenwürmer)	keine	-----
	wenige	-----
	viele	-----
Bakterien (Infektion)	keine	-----
	wenige	-----
	viele	-----
	intrazellulär	-----
	extrazellulär	-----
4		

Epithelzellen	keine	----
	wenige	----
	viele	----
Epithelzellen mit Einschlüssen	keine	----
	wenige	----
	viele	----
Curshmannspiralen	keine	0
	wenige	3
	viele	4
Hyphen und Konidien	keine	----
	wenige	----
	viele	----
Mastzellen	keine	----
	wenige	----
	viele	----

Röntgenologische Untersuchung

Kaudaler Bereich	nicht verdichtet	0
	geringgr. verdichtet	1
	mittelgr. verdichtet	2
	hochgr. verdichtet	3
Interstitium	nicht verdichtet	0
	geringgr. verdichtet	1
	mittelgr. verdichtet	2
	hochgr. verdichtet	3
Bronchienwände	nicht verdickt	0
	geringgr. verdickt	2
	mittelgr. verdickt	3
	hochgr. verdickt	4
postkardiales Dreieck	scharf begrenzt	0
	geringgr. verdichtet	1
	mittelgr. verdichtet	2
	hochgr. verdichtet	3

Einteilung nach Punktesystem in 4 Schweregrade:

ohne Röntgen:

gesund	0-5 Punkte
geringgr. COB	6-20 Punkte
mittelgr. COB	21-42 Punkte
hochgr. COB	43-64 Punkte

mit Röntgen:

0-5 Punkte
6-23 Punkte
24-51 Punkte
52-77 Punkte

2. Aufzeichnungsplan

Aufzeichnungsplan Inhalation

(modifiziert nach einer Vorlage von Tierärztin Frau Barbara Wärther)

Die Beurteilung des Allgemeinbefindens der Tiere erfolgt nach folgendem Plan:

Do

Allgemein-US Gewicht (Maßband), Alter, Rasse _____
Herkunft _____

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

Blutabnahme (Differentialblutbild)

Arterielle Blutgase

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Mepivacain-Hydrochlorid 2% 5 ml intratracheal

Do-D1

Während der Inhalationen (dreimalig) erfolgt eine kontinuierliche Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Körpertemperatur

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

D1

Allgemein-US Gewicht _____

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

Blutabnahme (Differentialblutbild)

Arterielle Blutgase

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Mepivacain-Hydrochlorid 2% 5 ml intratracheal

D1-D2

Während der Inhalationen (zweimalig) erfolgt eine kontinuierliche Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Körpertemperatur

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

D2

Allgemein-US

Gewicht _____

Haltung		Augenausfluss	
Verhalten		Schleimhäute	
Habitus		KFZ	
Atemfrequenz/-typ		Ernährungszustand	
Nasenausfluss		Pflegezustand	
Husten auslösbar		Temperatur	
Lymphknoten		Allgemeinbefinden	

Blutbild

Arterielle Blutgase

Endoskopie

BAL-Gewinnung: Sedation/Analgesie: Detomidin 0,01 mg/kg Butorphanol 0,01 mg/kg

Lokalanästhesie: Mepivacain-Hydrochlorid 2% 5 ml intratracheal

Folgende Parameter der Speziellen Untersuchung werden zur Beurteilung der Verträglichkeit herangezogen:

Modifiziert nach

Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0"

Reaktionen ab der Stufe 1 werden als Unverträglichkeit gewertet und führen zum Abbruch des Versuchs.

Allergische /immunologische Reaktionen

	1	2	3	4	5
Allergie/ Hypersensitivität	Urtikaria, vorübergehend	Hautauschlag , Urtikaria, Dyspnoe	Systemischer Bludruckabfall +/- Urticaria, parenterale Medikation notwendig, Ödembildung	Ana- phylaxie mit notwendige r par- enteraler Medikation	Tod
Autoimmunreak- tion	Asympto- matische, serologische oder andere Hinweise auf Autoimmun- reaktion, normale Organfunktion ohne Indikation f. Behandlung	Nachweis einer Auto- immun- reaktion die ein nichtessentiel- les Organ oder eine nichtessentiel- le Funktion betrifft (Bsp. Hypo- thyreose)	Reversible Reaktion mit Beeinträchtigung eines essentiellen Organs oder andere Nebenwirkungen	Lebensbedr- ohliche Autoimmun- reaktionen	Tod
Vasculitis (nicht bei perivaskuläre Injektion)	Mild, keine Indikation f. Behandlung	Symptomatis- che Therapie mit nicht- steroidalen Medikamente n	Behandlung mit steroidalen Medikamenten indiziert	Ischämische Reaktionen, Amputation oder chir. débridemen- t indiziert	Tod
Andere	Mild	moderat	erheblich	lebensbedr- ohlich	Tod

Dermatologie:

	1	2	3	4	5
Hämatome (ohne Vorhandensein von Thrombo- zytopenie)	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert		--	-
Alopezie	Ggr. Ausdünnung des Haarkleids (Injektions- stelle)	Ggr. generalisierte Ausdünnung des Haarkleids	Generalisierter Haarverlust	-	-

Erythem	Auf bestimmte Region beschränkt	Generalisiert, aber erst bei genauer Untersuchung sichtbar	Generalisiert, leicht sichtbar bei Untersuchung	-	-
Hyperpigmentation	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert			
Hypopigmentation	Ggr. oder lokalisiert	Ausgeprägt oder generalisiert			
Reaktionen an der Injektionsstelle	Schmerz/ Juckreiz/ Erythem	Schmerz oder Schwellung mit Entzündung oder Phlebitis	Ulzeration oder Nekrose, die chirurgische Intervention erfordert	Ulzeration/ Nekrose, die chirurgische Intervention erfordert und die täglichen Lebensfunktionen einschränkt	-
Photosensitivität	Schmerzloses Erythem	Schmerzhaftes Erythem	Erythem mit Schuppenbildung	Lebensbedrohlich	Tod
Juckreiz	Mild oder lokalisiert	Intensiv oder großflächig auftretend	Intensiv, großflächig auftretend mit Einschränkung der tägl. Lebensfunktionen	-	-
Ausschlag: Schuppenbildung	Papeln/Pusteln oder Erythem ohne weitere Symptome	Papeln/Pusteln oder Erythem mit Juckreiz oder weiteren Symptomen, lokalisierte Schuppenbildung oder weitere Läsionen, < 50% der Körperoberfläche betreffend	Erhebliche, generalisierte Hautrötungen oder Papeln/Pusteln oder vesikuläre Veränderungen; Schuppenbildung, > 50% der Körperoberfläche betreffend	Generalisiert exfoliative, ulzerative oder bullöse Dermatitis	Tod

Ausschlag: Akne	Keine Behandlung angezeigt	Behandlung angezeigt	Begleitet von Schmerz, Ulzeration oder Schuppenbildung		
Ausschlag: Erythema multiforme	-	Stellenweise, nicht generalisierte Erhöhungen	Erheblich, generalisierter Ausschlag o. schmerzhafte Stomatitis, i.v. Substitution, Zusatzfütterung angezeigt	Lebensbedr ohlich	Tod
Urtikaria	-	Vorüber- gehend	Behandlung für < 24 h angezeigt	Behandlung für > 24 h angezeigt	
Hautablösung	Dezente Hautablösung, nur bei genauer Untersuchung bemerkbar	Hautablösung leicht bemerkbar, aber keine klumpige Exfoliation ggr. Krusten- bildung	Hautablösung leicht bemerkbar, mit Exfoliation bei der Untersuchung	-	-
Weitere	mild	moderat	erheblich	lebensbedro hlich	Tod

Konstitutionelle Auswirkungen

	1	2	3	4	5
Lethargie	Milde Lethargie	Gering ausgeprägte Lethargie mit leichter Einschränkung der täglichen Aktivitäten	Ausübung der täglichen Aktivitäten ernsthaft eingeschränkt	Hilfe zur Ausübung der täglichen Aktivitäten nötig, Zwangsfütterung	Tod
Fieber (wenn keine Neutropenie; physiologisch Pferd: 37,0-38,0)	Erhöhung der Normal- temperatur < 5°C	Erhöhung der Normaltempe- ratur > 5-8 °C	Erhöhung der Normaltemperat- ur > 8-10 °C	Erhöhung der Normaltem- peratur > 10 °C	Tod
Hypothermie	--	36,0- 33 ° C	33-30 ° C	< 30 ° C oder lebensbedr ohliche Konsequenz en	Tod

Gewichtsverlust	5-10% des Ausgangsgewichts, keine Intervention angezeigt	10-20% des Ausgangsgewichts, Zusatzfütterung angezeigt	>20 % des Ausgangsgewichtes	-	Tod
Andere	mild	moderat	erheblich	lebensbedrohlich	Tod

Auswirkungen auf Muskeln / Weichteilgewebe

	1	2	3	4	5
Arthritis (nicht-septisch)	Ggr. Schmerz mit Entzündung oder Gelenkschwellung, ohne Funktionsbeeinträchtigung	Moderate Schmerzen, mit Entzündung oder Gelenkschwellung, mit funktionsbeeinträchtigung, aber ohne Beeinträchtigung der täglichen Lebensfunktionen	Erhebliche Schmerzen mit Entzündung oder Gelenkschwellung, Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Lebensbedrohliche Einschränkungen	-
Extremitäten (Lahmheit)	Lahmheit nur dem erfahrenen Beobachter auffallend	Bewegungseinschränkung d. Gliedmaße, kann sich aber über weitere Strecken fortbewegen	Erhebliche Lahmheit (4/5)	Lahmheit (5/5)	-
Muskelschwäche (generalisiert-lokalisiert)	asymptomatisch, Schwäche bei klin. US auffallend	Symptomatische Muskelschwäche, ohne Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Symptomatische Muskelschwäche, Beeinträchtigung der tägl. Lebensfunktionen	Lebensbedrohliche Einschränkungen	Tod
Myositis	Ggr. Schmerz, ohne Funktionsbeeinträchtigung	Funktionsbeeinträchtigende Schmerzen, keine Beeinträchtigung	Schmerzen mit Beeinträchtigung der täglichen Lebensfunktionen		Tod

		ung er täglichen Lebensfunkti onen			
Weichteil- nekrose	-	Lokale Wundbehandl ung medizinische Intervention angezeigt	Operatives Débridement oder weitere invasive Intervention indiziert	Lebensbe- drolich, notfall- mäßige, invasive Intervention indiziert	Tod
Weitere	mild	moderat	erheblich	lebensbedro hlich	Tod

3. Geräte, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind beim *in vitro*- und *in vivo*-Versuch zum Einsatz gekommen. Sie sind in Tab. 5, 6 und 7 aufgeführt.

Tab. 5: Zum Einsatz gekommene Geräte

Gerät	Firma
Accu-jet Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, Deutschland
BALF Katheter	Bivona Inc., Gary, USA
Endoskopieturm	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Hera cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hera freeze, Gefrierschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hera safe, Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ImmunoWash Model 1575	Bio-rad laboratories, München, D.
inoLab, pH-Sonde	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Magnetrührer IKA RET	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Megafuge 2.0R, Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multipuls-Röntgengenerator: Polydoros [®] 80	Siemens AG, München, Deutschland
Olympus CLV-U40, Evis CV-230 Endoskopieturm	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus Evis CF Typ 230 L Videoendoskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipetman P20, P200, P1000	Gilson International B.V., Limburg-Offheim, Deutschland
Radiometer Copenhagen NPT 7 series	Radiometer GmbH, Willich- Schiefbahn, Deutschland
Röntgendetektorsystem: XDR1-M [®]	Veterinärmedizinisches Dienstleistungszentrum GmbH, Hannover, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpette-12	Brand, Wertheim, Deutschland
Wallac Victor ² 1420 Multilabel counter	Perkin Elmer, Fremont, CA, USA

Tab. 6: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Firma
Albumin from bovine serum (min. 96%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BD OptEIA TMB Substrat Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Diff-Quick staining set	Medion diagnostics, Düdingen, Schweiz
Domidine 10 mg/ml Injektionslösung Detomidinhydrochlorid, für Pferde und Rinder	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO) 99.5% plant cell culture tested	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ELISA duo set kits (IFN- γ , IL-4, IL-10)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Fetal Calf Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fluka, Sulfuric acid (95-97%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Meaverin 2% Mepivacainhydrochlorid Injektionslösung	Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Septoderm Haut	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, Deutschland
Torbugesic (Butorphanol) 1% für Pferde	Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Deutschland
Trypan blue solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
BG Cartridge D 7100 dri-tek Blutgaskartuschen	Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland
coming costar, Reagent Reservoir	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Falcon serological pipet (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
nunc cryo Tube vials (1,8ml)	Thermo Fisher Scientific, Roskilde Site, Dänemark
nunc-immuno plate	Thermo Fisher Scientific, Roskilde Site, Dänemark
Objekträger 50 Elka	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Trypan Blau 0,4%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zellkultur Testplatte 96U	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

4. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Ermöglichung dieser, mir sehr ans Herz gewachsene Arbeit, danken. Auch die Bereitstellung aller benötigten Mittel habe ich ihr zu verdanken.

Die vorliegende Studie wurde durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg finanziell ermöglicht.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich meiner Betreuerin Frau Dr. Anna May für ihre immer unkomplizierte Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei jeglichen auftretenden Problemen.

Ganz herzlich danke ich auch meinen Kollegen aus der Pferdeklinik, ohne deren Hilfe manche praktischen oder organisatorischen Schwierigkeiten kaum zu lösen gewesen wären. Insbesondere seien hier stellvertretend die Tierärztinnen Frau Caroline Oel, Frau Susanne Neukirch und Frau Barbara Wärther genannt.

Von besonderer Dankbarkeit erfüllt bin ich gegenüber meinem Kollegen aus der pharmazeutischen Technologie Herrn Dipl. pharm. Sebastian Fuchs, durch dessen stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen so manche Schwierigkeit überwunden werden konnte. Außerdem danke ich ihm für seine große Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Schließlich möchte ich auch Frau Dipl. Ing. (FH) Mehrije Ferizi, Frau Dipl. Biol. Veronika Benda, Herrn Pallab Parabh, PhD und Frau Dr. Ulrike Schillinger für die Einarbeitung im Labor und die immer hilfsbereite Unterstützung bei technischen Fragen ganz herzlich danken.