

**Studie zur wiederkehrenden Atemwegobstruktion des Pferdes (RAO):**

**Potentieller pathophysiologischer Stellenwert von vaskulärem  
endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-  
 $\alpha$ ) und vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP)**

von Antonella Victoria Block

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

**Studie zur wiederkehrenden Atemwegobstruktion des Pferdes (RAO):  
Potentieller pathophysiologischer Stellenwert von vaskulärem  
endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-  
 $\alpha$ ) und vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP)**

von Antonella Victoria Block  
aus New Haven / USA

München 2015

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

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes  
sowie für gerichtliche Tiermedizin  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Hartmut Gerhards,

Angefertigt 2015 im  
Department für Biomedizin und Pneumologie  
Universitätsspital Basel  
4031 Basel, Schweiz, Petersgraben 4  
Mentor: Prof. Dr. Michael Roth

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. J. Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. H. Gerhards

**Korreferent:** Priv. – Doz. Dr. Gerhard Wess  
Priv. – Doz. Dr. Ivica Medugorac

**Tag der Promotion: 18. Juli 2015**

Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung .....	1
II.	Bisherige Studien zur Pathogenese der RAO .....	3
	2.1. Ätiologie und Pathophysiologie der RAO.....	3
	2.2. Was führt bei einem empfindlichen Pferd zu klinischen Symptomen?.....	3
	2.3. Mitbeteiligung immunologischer Faktoren .....	5
	2.4. Mitbeteiligung inflammatorischer Faktoren .....	6
	2.4.1 IL-4.....	6
	2.4.2 IL-6.....	7
	2.4.3 IL-8.....	9
	2.4.4 TNF- $\alpha$ .....	10
	2.4.5 VEGF .....	11
	2.5. VIP .....	12
III.	Methoden .....	16
	3.1 Pferde .....	16
	3.2 Analytische Methoden .....	17
	3.2.1 Blutabnahme .....	17
	3.2.2 Analyse der Zytokine.....	17
	3.2.3 ELISA Prozedur für IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ und VEGF165 .....	17
	3.2.4 VIP ELISA .....	18
	3.2.5 Berechnung der Zytokinkonzentration.....	18
	3.2.6 Statistik.....	19
IV.	Ergebnisse .....	20
V.	Diskussion.....	50
VI.	Zusammenfassung .....	56
VII.	Summary.....	57
VIII.	Literatur.....	58
IX.	Abkürzungsverzeichnis .....	65
X.	Danksagung.....	66

## I. EINLEITUNG

Die obstruktive Ventilationsstörung RAO (recurrent airway obstruction) tritt in etwa 10 – 20 % erwachsener Pferde gehäuft in der nördlichen Hemisphäre auf (1). Pathophysiologische Beschreibungen der Erkrankung wurden zum Beispiel durch Bouley bereits 1863 (2) als erschwerte Atmung ohne relevante makroskopisch fassbare pathologische Veränderungen der Lungen gedeutet. Der erste wissenschaftliche Report über RAO geht auf Lowell zurück, der 1964 die Erkrankung mit dem menschlichen Asthma verglich (3).

Unter RAO versteht man eine Erkrankung des Respirationstrakts des Pferdes, die eine rezidivierende allergische Bronchitis involviert und symptomatisch mit Dyspnoe von unterschiedlichem Schweregrad, zum Teil mit Husten, verbunden ist. Dem menschlichen Asthma ähnlich wird mit RAO ein chronisches Geschehen in den Bronchialwegen beschrieben, das mit bronchialer Hyperreagibilität und allergischen Reaktionen einhergeht. Als Ursachen kommen hierfür typischerweise Staub und Schimmelpilze sowie bakterielle Endotoxine in Frage, die häufig Stroh und Heu kontaminieren (4, 1, 5). Die Hyperreagibilität der Bronchialwege kann experimentell durch Stäube, Reizgase und kalte Luft ausgelöst werden. Im Unterschied zum Asthma des Menschen, dessen Pathologie durch Lymphozyten dominiert ist, zeigen die Atemwege des Pferdes eine Inflammation mit neutrophilen Granulozyten. Für die allergische Komponente der RAO ist die IgE vermittelte Histaminfreisetzung aus Mastzellen offensichtlich weniger bedeutend als für den Menschen (6).

Symptomatisch fällt die Dyspnoe insbesondere nach Belastung auf, sodass eine Akutsituation entsteht, die für den Veterinärmediziner einen Notfall darstellt. Der die Dyspnoe begleitende Husten kann produktiv sein mit Auswurf von viskösem Sekret. Die Obstruktion der Atemwege ist auskultatorisch leicht erfassbar. Eine zu diagnostischen Zwecken durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist in der Regel durch eine hohe Anzahl neutrophiler Granulozyten von zum Teil 50 - 70 % gekennzeichnet (7, 8). Obwohl zahlreiche Studien zur RAO vorliegen, ist die exakte Pathophysiologie der Erkrankung ungeklärt.

Das Ziel der Dissertation besteht in der Charakterisierung immunologischer und entzündungsfördernder Parameter bei RAO im Vergleich zu dem bei Pferden noch kaum untersuchten potenten, autologen anti-inflammatorischen Mediator, vasoaktives intestinales Peptid (VIP), aus dem Vollblut und dem Serum akut symptomatischer Pferde. Unter der Voraussetzung, dass sich eine Korrelation zwischen den pro-inflammatorischen Parametern und VIP nachweisen lässt, erscheint es sinnvoll, das neue anti-inflammatorische Prinzip auf seinen möglichen therapeutischen Nutzen zu evaluieren und später eventuell in der klinischen Praxis anzuwenden. Erstmals werden hierbei eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit erfasst.

## II. BISHERIGE STUDIEN ZUR PATHOGENESE DER RAO

### 2.1. Ätiologie und Pathophysiologie der RAO

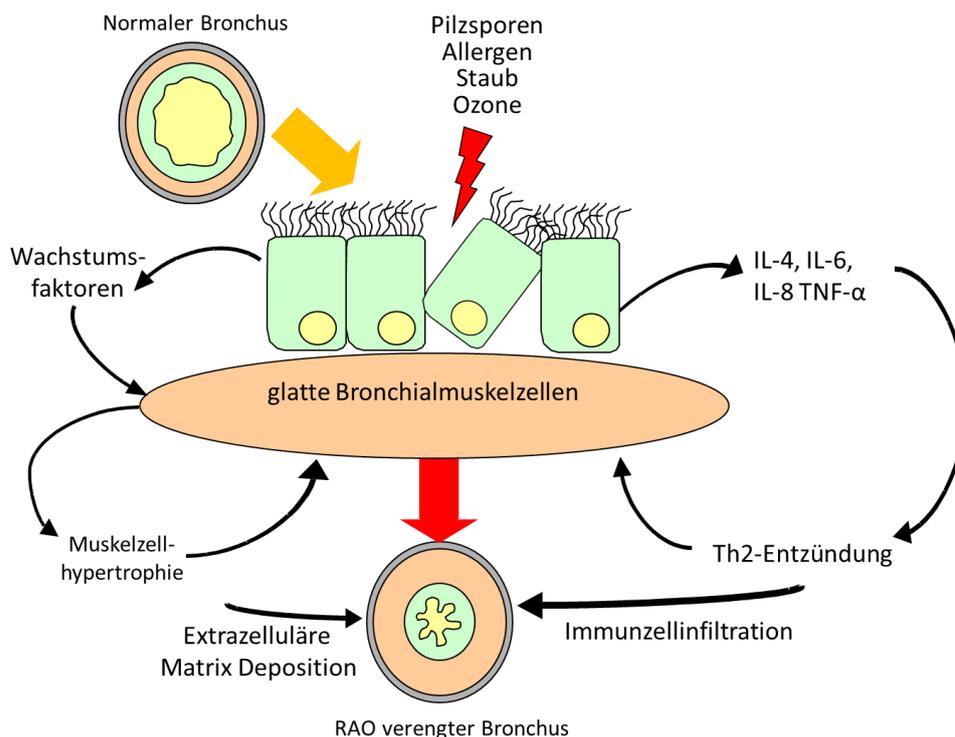
Unter den verschiedenen Ursachen der RAO beobachtet man einen genetischen Hintergrund, sodass die Prävalenz der Nachkommen zweier betroffener Elternteile zwischen 38 – 48 % liegt. Ist nur ein Elternteil betroffen, liegt die Prävalenz bei 6 - 17 % (9). Bisher wurde kein Hinweis auf eine genetische Prädisposition bei der Züchtung von Pferden beobachtet (9). In Analogie zum Menschen wurde ein Polymorphismus (10), auf dem *IL4RA* Locus des Pferdechromosoms 13 (ECA13q13) identifiziert. Interessanterweise zeigten kürzlich durchgeführte Studien eine Assoziation zwischen RAO und einer erhöhten Resistenz gegen parasitäre Infektionen (11), eine Beobachtung, die ebenfalls mit humanem Asthma korrespondiert (12). Hierfür verantwortlich scheint eine Th2-gewichtete Immunreaktion zu sein, die direkt in die Wirtsabwehr gegenüber Pathogenen involviert ist (12).

### 2.2. Was führt bei einem empfindlichen Pferd zu klinischen Symptomen?

Die Exazerbation von RAO hängt eindeutig mit der lokalen Exposition gegenüber Staub zusammen. Man geht davon aus, dass RAO die Folge einer allergischen Überempfindlichkeit gegenüber organischen Partikeln in den Ställen ist. Jedoch sind die spezifischen Antigene, die die Krankheit bei empfindlichen Pferden auslösen, bisher unbekannt. Stallstaub beinhaltet mehr als 50 Arten von Sporen, Milben und bakteriellen Endotoxinen (13). Weitere Partikel im direkten Umfeld des Pferdes können ebenso zur Bronchokonstriktion beitragen und zwar entweder weil die Atemwege intrinsisch hyperreagibel sind oder weil die Hyperreagibilität durch eine Entzündung ausgelöst wird. Weitere Ursachen, die ein empfindliches Pferd für RAO disponieren, werden in bestimmten Umweltschadstoffen gesehen, die bei der Pferdehaltung auftreten.

Unter den spezifischen Antigenen, die eine bronchiale Hyperreagibilität verursachen können, wurden *Aspergillus fumigatus* und *Faenia rectivirgula* gefunden, die experimentell eine Neutrophilie der Atemwege und eine

Obstruktion in RAO-empfindlichen Pferden auslösten, jedoch nicht in gesunden Tieren (14). Im Unterschied zum humanen Asthma, bestehen beim Pferd keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der bronchialen Hyperreagibilität und der Immunreaktion vom Soforttyp. Dies ist unter anderem dadurch belegt, dass die Lungenfunktion und Hauttests mit spezifischen Antigenen nicht mit den Serumbefunden von IgE und IgG Antikörpern korrelieren. Generell wird nach einer Staubinhalation eine verzögerte, von Neutrophilen dominierte Inflammation der Atemwege beobachtet, die an eine Typ 3 Allergie erinnert. Jedoch fehlen Hinweise auf eine alveoläre Entzündung und Granulombildung kombiniert mit Fieber (15). Darüber hinaus fehlt beim Pferd bei RAO der Hinweis von Präzipitinen (16). In Analogie zum menschlichen Asthma sind die grundlegenden Veränderungen der Bronchien bei der RAO des Pferdes in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst.



**Abb 1:** Die Struktur des normalen Bronchus ist oben links dargestellt. Es wird angenommen, dass die Hauptschädigung durch inhalierte Allergene und Stäube am Epithel ausgelöst wird, die sich auf die darunterliegenden Zellschichten, besonders den glatten Muskelzellen auswirkt. Die Ausschüttung von Entzündungsfaktoren wie von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt zu einer lokalen Entzündung, die unter bestimmten Voraussetzungen chronisch wird.

### 2.3. Mitbeteiligung immunologischer Faktoren

Sowohl bei der Pathophysiologie der RAO als auch bei dem humanen Asthma wird der Mitbeteiligung bestimmter Zytokine eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben.

Allgemein geht man von einer Th2-Gewichtung, d. h. erhöhte Expression von zum Beispiel Interleukin-4 (IL-4) und IL-5 aus, begleitet von einer geringeren Expression Th1-typischer Zytokine wie zum Beispiel Interferon-gamma, was unter anderem in der BAL betroffener Pferde beobachtet wurde (17, 18).

Während beim Menschen diese Konstellation zu einer Erhöhung der Eosinophilenzahl sowohl im Serum als auch in der BAL führt, ist dies bei Pferden mit einer Erhöhung neutrophiler Granulozyten verbunden. IL-8 ist ein potenter chemotaktischer Faktor und Aktivator der Funktion neutrophiler Granulozyten; so zeigen neuere Beobachtungen, dass die Neutrophilen-Inflammation typisch für akute asthmatische Episoden ist und von einer signifikanten Freisetzung von IL-8 begleitet wird (19).

In Analogie hierzu wurden in der BAL erhöhte Konzentrationen von IL-6 bestimmt, wobei dieses Zytokin bei zahlreichen immunologischen Prozessen exprimiert wird (19). Neben den erwähnten Zytokinen ist die lokale Freisetzung weiterer entzündlicher Faktoren für die Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel mikrobielle Faktoren wie Viren und Allergene den Verlauf einer akuten Obstruktion maßgeblich aggravierern können (20). Obwohl die exakten molekularen Mechanismen eines Bronchospasmus beim Pferd derzeit noch unklar sind, ist es konklusiv, dass die lokale Bildung spezifischer Antikörper und die Reaktion betroffener Pferde auf die Inhalation mit spezifischen Allergenen und resultierender Zunahme von Lymphozyten im Bronchialsystem ein Ausdruck einer adaptiven, das heißt erworbenen Immunität ist.

Im Unterschied hierzu führt der Kontakt mit unspezifischen Faktoren wie zum Beispiel inhaliertes Endotoxin in Pferdeställen, das sich oft im Heu oder Stroh befindet, zu Exazerbationen. Verstärkt wird dieser Umstand durch schlechte

Belüftung der Ställe (21, 22). Wie mehrere Beobachtungen zeigen, ist die Häufigkeit von RAO-typischen Symptomen bei entsprechend disponierten Pferden circa 8-15 Mal höher, wenn die Ställe stark Staub belastet und schlecht ventiliert sind, als wenn sich die Pferde in entweder gut belüfteten Ställen oder auf der Weide befinden. Der Einfluss dieser individuellen lokalen Rahmenbedingungen weist auf eine Mitbeteiligung der angeborenen Immunität (innate immunity) hin. Bronchoprovokationsuntersuchungen mit Milben, Schimmelpilzsporen und Kältereiz unterstützen die potentielle Mitbeteiligung des angeborenen Immunsystems bei RAO (23,24).

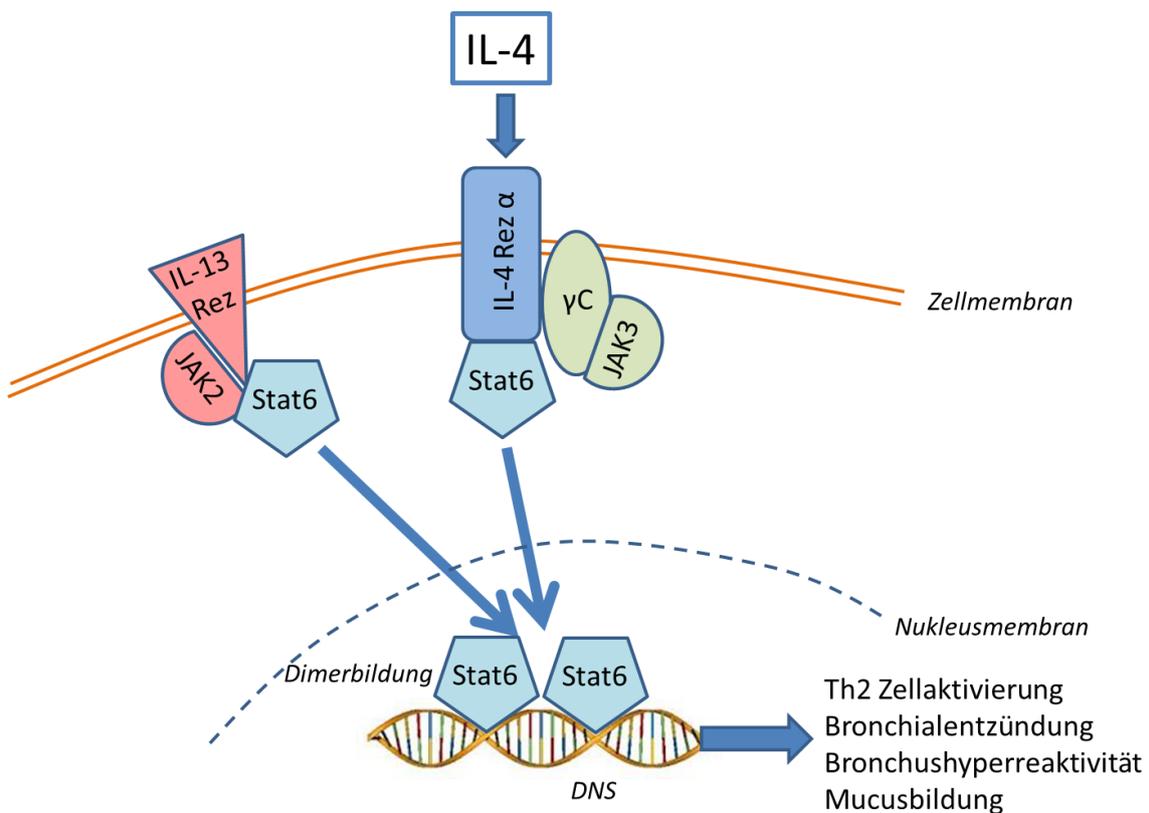
#### **2.4. Mitbeteiligung inflammatorischer Faktoren**

Die Mitbeteiligung inflammatorischer Faktoren ist anhand der Differentialdiagnose der Granulozytenpopulationen in der BAL am besten belegt. Weder im Bronchialsekret noch im induzierbarem Sekret lassen sich verlässlich Veränderungen der Granulozyten bei Exazerbationen der RAO messen. Der bei Pferden beobachtbare Anstieg neutrophiler Granulozyten in der BAL geht mit der Synthese und Freisetzung entzündlicher Faktoren einher, wie zum Beispiel Elastase, Metaboliten des oxidativen Metabolismus und Leukotrien B<sub>4</sub> (25, 26, 27) mit entsprechenden resultierenden zellbiologischen Veränderungen der Bronchialwege. So zeigten molekularbiologische Untersuchungen eine gesteigerte Transkription verschiedener Zytokine wie zum Beispiel Interleukin (IL-1 $\beta$ , Tumornekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ), IL-8 und IL-17 bei RAO (28, 29, 30, 31, 32). Darüber hinaus bestehen Hinweise auf eine Heraufregulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der zahlreiche pro-inflammatorische Gene in den Bronchialwegen induziert (33).

##### **2.4.1. Interleukin-4 (IL-4)**

Untersuchungen über die Bedeutung von IL-4 belegen, dass dieses Zytokin einen spezifischen aktivierten Phänotyp neutrophiler Granulozyten von Pferden induziert (erhöhte Expression von IL-4 Receptor  $\alpha$ , CD23/Fc $\epsilon$  receptor-II, IL-8 und TNF- $\alpha$ ). Die gesteigerten pro-inflammatorischen Mechanismen bei der RAO in den Atemwegen von Pferden bewirken aber nicht nur eine vermehrte Freisetzung von Mediatoren sondern auch substantielle zellbiologische

Veränderungen wie das sogenannte „Remodeling“ (d.h. bindegewebiger Umbau), was die Inflammation verfestigt, beziehungsweise perpetuiert, sodass im weiteren Verlauf inflammatorische Veränderungen nicht nur in der Lunge sondern zum Teil auch systemisch nachweisbar sind (34). Die heute bekannten Signalübertragungsmechanismen des IL-4 und deren Bedeutung für den Entzündungsvorgang bei Asthma und RAO sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

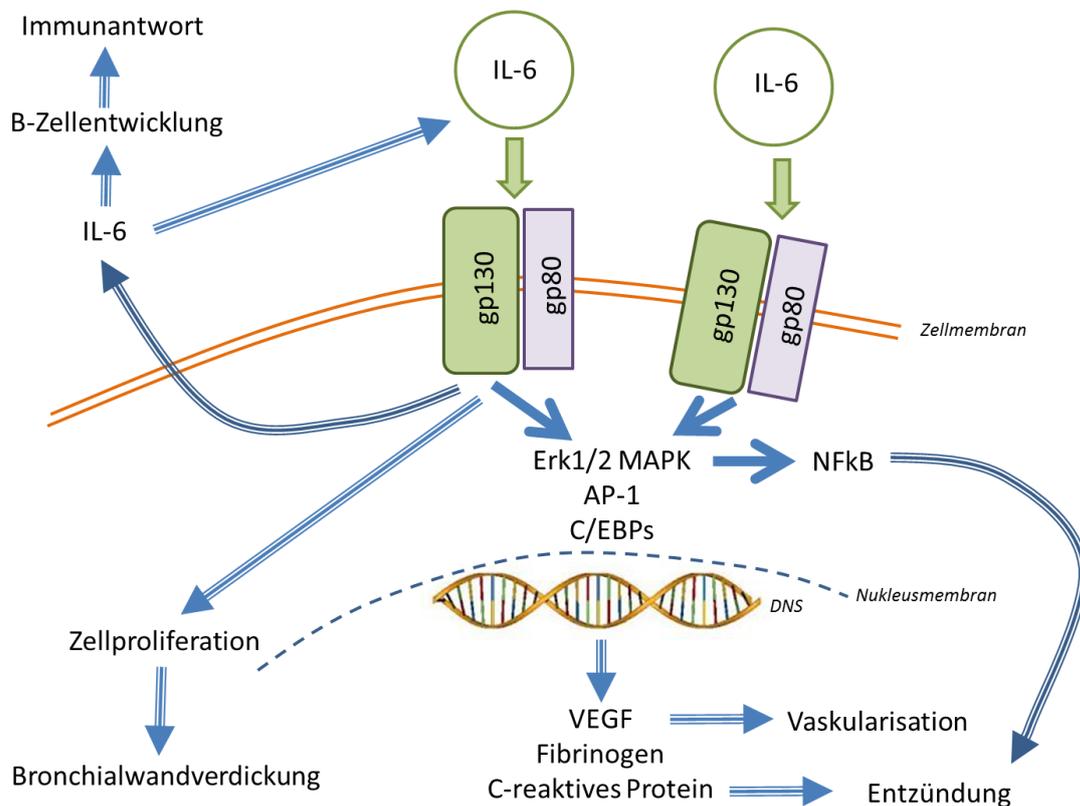


**Abb 2:** Zusammenfassung der Signalübertragung des IL-4 in Kooperation mit anderen zellmembranständigen Rezeptoren. Entscheidend ist hierbei die Dimerbildung zweier Stat6-Signalproteine, die infolge in den Nucleus wandern und dort die Aktivität einer Vielzahl von Genen regulieren, was nach zelltypspezifischer Reaktion zur Differenzierung von Th-2 Zellen, der Kontraktilität der glatten Bronchialmuskelzellen, Zytokinfreisetzung und zur Mucusbildung führt. Rec = Rezeptor, DNS = Desoxyribonukleinsäure, JAKs = Janus Kinase, Stat = signal transducer and activator of transcription.

#### 2.4.2. Interleukin-6 (IL-6)

Die Rolle des IL-6 im Rahmen entzündlicher Erkrankungen ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch immer nicht geklärt. Zum einen spielt IL-6 eine Hauptrolle bei der Differenzierung der antikörperproduzierenden B-Zellen und nimmt damit

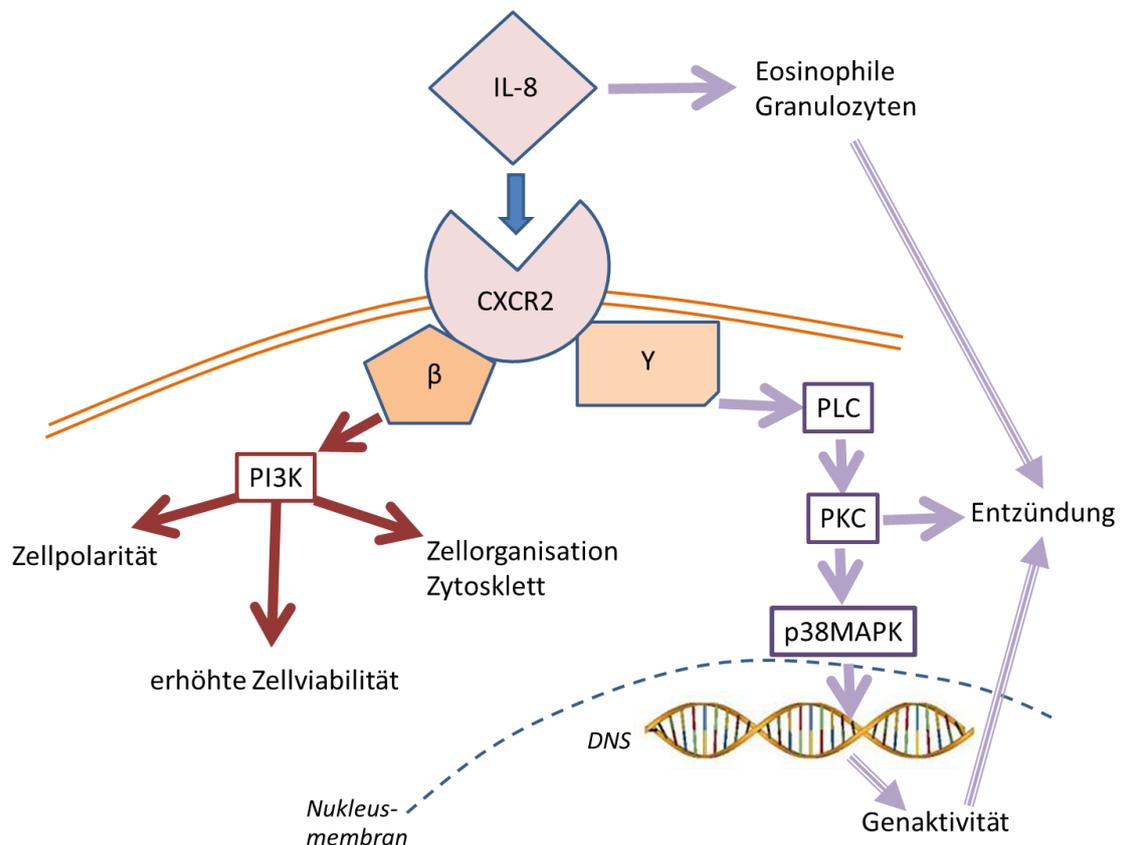
direkten Einfluss auf die Immunantwort auf Allergene; zum anderen reguliert IL-6 die Fibrinogenbildung und fördert damit die Wundheilung. IL-6 kann die Synthese von VEGF induzieren und trägt über die Induktion der Zellteilung und der extrazellulären Matrixneubildung zur Verdickung der Bronchialwände beim menschlichen Asthma bei (17). Ob diese Funktionen auch bei RAO eine Rolle spielen, ist unklar. Erhöhte IL-6 Konzentrationen wurden bei RAO Pferden in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit nachgewiesen (19). Virale und bakterielle Infektionen der Lunge führen zu einem Anstieg der IL-6 Ausschüttung durch Immun- und Gewebszellen (17, 20). Eine Zusammenfassung der bekannten Wirkungen von IL-6 bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen wird in Abbildung 3 gegeben.



**Abb 3:** Zusammenfassung der bekannten Wirkungen des IL-6 bei menschlichem Asthma, die gegebenenfalls auf die Pathologie des RAO beim Pferd übertragen werden können. Die IL-6 Rezeptoren bestehen aus zwei Untereinheiten, gp80 und gp 130, die ein Quadrimer bilden müssen, um das Signalsystem zu aktivieren. Die Hauptübermittlungsproteine sind Erk1/2 mitogen activated kinase (MAPK), Activator Protein-1 (AP-1), der Nuclear factor kappaB (NFκB), und die CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP), welche als Transkriptionsfaktoren fungieren.

### 2.4.3. Interleukin-8 (IL-8)

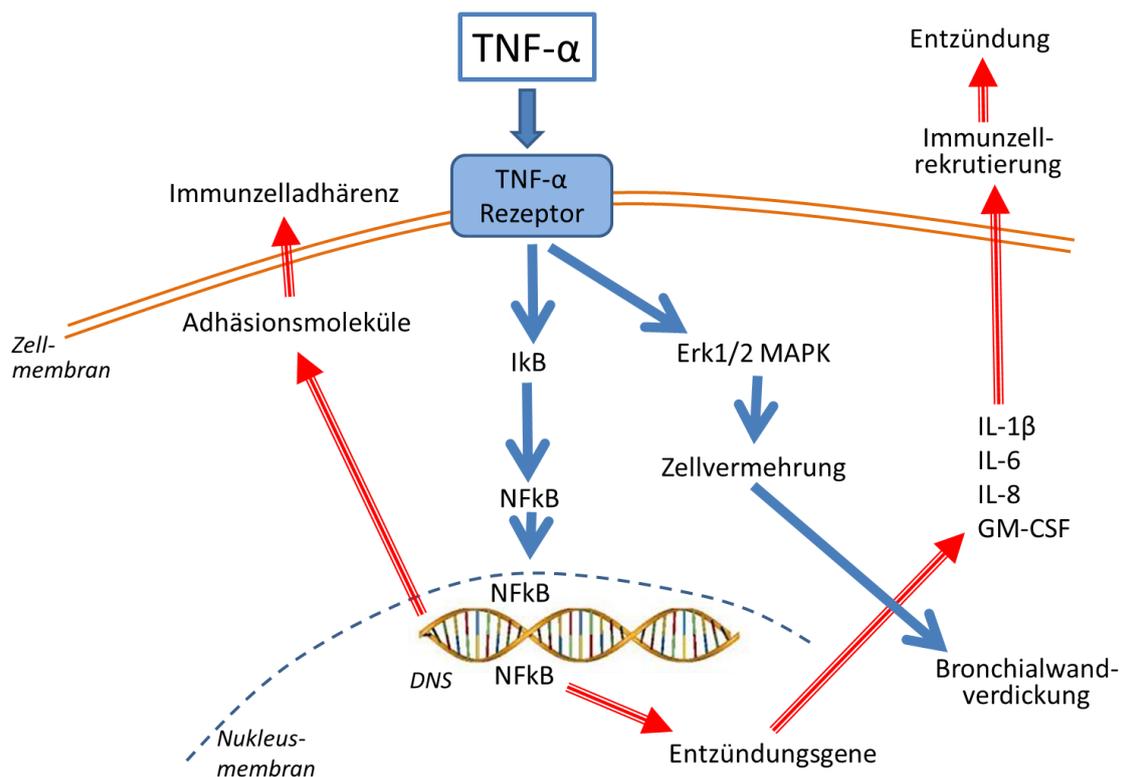
Bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen des Menschen ist das IL-8 ein potenter chemotaktischer Faktor und Aktivator eosinophiler Zellen. Beim Pferd mit RAO kann die Bildung des IL-8 durch IL-4 oder TNF- $\alpha$  die Freisetzung von Immun- und Gewebszellen angeregt werden. Dies führt zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten (19). Erhöhte IL-8 Spiegel bei Pferden mit RAO scheinen für die Neutrophilen-Inflammation pathophysiologisch relevant zu sein, was die akuten asthmatischen Episoden erklären könnte (19). So wurden erhöhte IL-8 Konzentrationen und gesteigerte Neutrophilen-Aktivität in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit bei Pferden mit RAO beobachtet (28, 30, 31). Ein besonders grosser Anstieg des IL-8 wurde bei symptomatischen Pferden nach Heuexposition berichtet (32). In Analogie zur chronischen Inflammation beim Menschen ist in Abbildung 4 die Wirkung von IL-8 auf Immun- und Lungenzellen bei Pferden mit RAO dargestellt.



**Abb 4:** Bekannte Wirkungen des IL-8 bei RAO und Signalübertragungsmechanismen mittels zweier Untereinheiten ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) des IL-8 Rezeptors CXCR2. Mitogen activated protein kinase (MAPK), Phosphoinositol 3 kinase (PI3K), Protein kinase C (PKC), Phospholipase C (PLC).

#### 2.4.4. Tumornekrosisfaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Die potentielle Bedeutung von TNF- $\alpha$  bei der RAO gründet sich auf Untersuchungen des allergischen Asthmas beim Menschen. Im Vordergrund steht hierbei die Beobachtung, dass TNF- $\alpha$  nach allergischer Stimulation aus Mastzellen und Makrophagen durch einen IgE-abhängigen Mechanismus freigesetzt wird. Zudem weisen Patienten mit allergischem Asthma eine erhöhte TNF- $\alpha$  Expression in den Bronchialwegen auf (35). TNF- $\alpha$  stimuliert die Freisetzung zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und seiner selbst (35). Erst kürzlich wurde die potentielle Bedeutung von TNF- $\alpha$ -Antagonisten im Asthma klinisch getestet (36). Die Rolle des TNF- $\alpha$  beim menschlichen Asthma und seine mögliche Rolle beim RAO sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb 5:** Zusammenfassung der TNF- $\alpha$  Wirkung bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen. Mitogen activated protein kinase (MAPK), Granulozyten Makrophagen Colony stimulating factor (GM-CSF). Inhibitor of nuclear factor kappaB (I $\kappa$ B), Nuklear factor kappaB (NF $\kappa$ B).

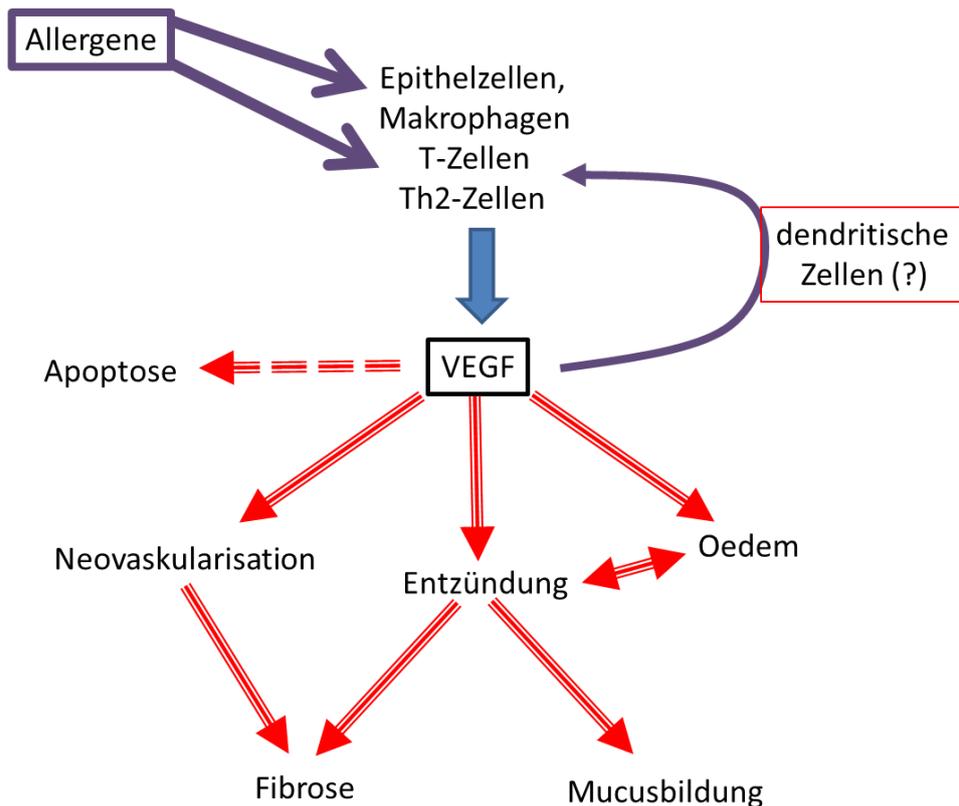
#### 2.4.5. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der VEGF wurde bisher in der veterinärmedizinischen Literatur über RAO nur einmal untersucht (41). Das Protein wird unter hypoxischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei einer Exazerbation einer RAO, in den Bronchialwegen freigesetzt, was unter anderem in der BAL symptomatischer Pferde nachgewiesen werden kann (41).

Beim Menschen wie auch beim RAO Pferd wird die Neusynthese des VEGF fast ausschließlich über den sogenannten Hypoxia inducible Factor (HIF) gesteuert (41). In anderen Spezies wurde gezeigt, dass VEGF nur auf Endothelzellen wirkt und somit die Neovaskularisierung von hypoxischem Gewebe einleitet. Dies führte dazu, dass VEGF zuerst als Tumorstadiumsfaktor eingestuft wurde. Erst heute wird klar, dass dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung des Gewebes hat und seine Inhibierung zu Schäden der Blutgefäßstruktur führen kann. Die molekulare Wirkung von VEGF wird durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Endothelzellen übertragen und steuert unter anderem die normale Angiogenese sowie lokale Wundheilungsprozesse in verschiedenen Geweben.

Als Wachstumsfaktor stimuliert VEGF unter pathologischen Bedingungen die Vermehrung inflammatorisch aktiver Zellen und perpetuiert somit zum Beispiel einen durch ein Allergen oder einen Infekt eingeleiteten entzündlichen Prozess, der klinisch mit einer Exazerbation endet. In der oben erwähnten Studie (42) führte eine Exazerbation neben der Freisetzung von VEGF auch zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Aktivität zahlreicher in inflammatorische Prozesse involvierter Gene steuert. Um einen potenziellen wirksamen pharmakologischen Ansatz zur Therapie einer Exazerbation bei der RAO zu entwickeln, erscheint es daher sinnvoll, einen gegenregulierenden Faktor zur Kontrolle des inflammatorisch geschädigten Bronchialgewebes zu evaluieren.

Die bekannten Funktionen des VEGF sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb 6:** Zusammenfassung der möglichen Funktionen des VEGF zur Pathologie des RAO.

## 2.5. Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

Trotz gewisser Unterschiede bei der Pathogenese des Asthmas beim Menschen gegenüber der RAO beim Pferd, zeigt die Therapie mit Kortikosteroiden und Bronchodilatoren, wie zum Beispiel  $\beta$ -2-adrenerge Substanzen, dass die pharmakologischen Wirkungen, obwohl nur symptomatisch, sehr wohl vergleichbar sind (42, 43). Um die Wirksamkeit dieser und anderer Therapien zu steigern, erscheint es sinnvoll, neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Entzündungstherapie zu berücksichtigen.

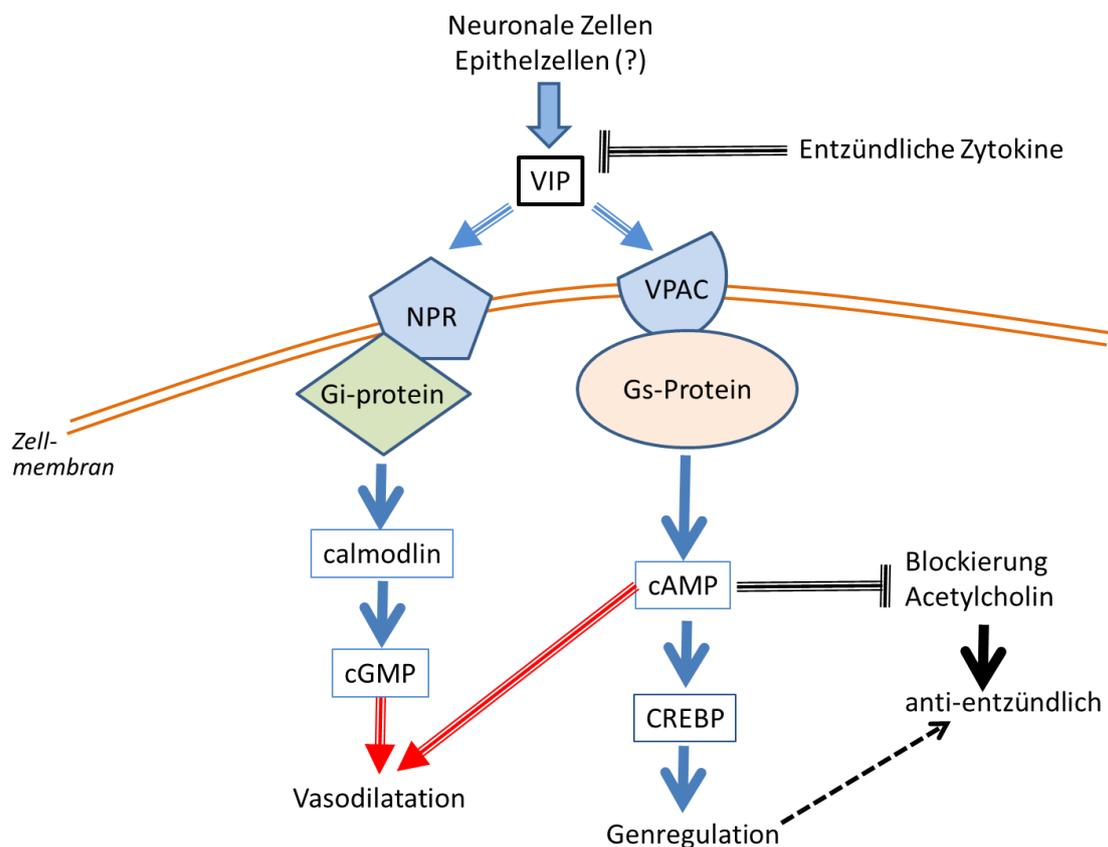
Zur Pathophysiologie obstruktiver Ventilationsstörungen, hat die experimentielle Forschung ein Netzwerk von Zytokinen charakterisiert. Nach heutigem Verständnis geht man davon aus, dass sich unter Normalbedingungen die zum Teil gegenregulierenden Zytokine bezüglich Gewebekonzentration und Wirkung in einer biologischen Balance befinden. Entzündungsfördernde Signale werden in der Regel mit der hochregulierten Expression entsprechender spezifischer

Zytokine erklärt, dies bei gleichzeitiger Herunterregulierung der Expression negativ regulierender Zytokine. Durch dieses Ungleichgewicht kommt es zur Perpetuierung lokaler inflammatorischer Schädigungen. Es ist daher von besonderem Interesse, die gegensinnigen Wirkungen beteiligter Zytokine für die RAO am Beispiel spezifischer Proteine zu analysieren.

Als ein geeigneter Faktor, der bereits eingetretenen inflammatorischen Schädigungen wie bei RAO und/oder IAD (Inflammatory Airway Disease) möglicherweise gegenregulieren kann, könnte VIP zur Anwendung kommen. Bei VIP handelt es sich um ein 28 Aminosäuren großes Neuropeptid (44), das seine molekulare Wirkung ebenfalls über spezifische Rezeptoren entfaltet. VIP spezifische Bindungsstellen findet man auf der Oberfläche von Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie mesenchymalen Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (45). Obwohl das Molekül und seine biologische Bedeutung beim Pferd kaum untersucht sind, handelt es sich um einen systemisch nachweisbaren, potenten anti-inflammatorischen Faktor (45). Beim Menschen ist dieses Neuropeptid sowohl im kardiovaskulären System als auch in den Bronchialwegen nachweisbar (46). Seine Wirkung besteht unter anderem in einem positiv chronotropen und inotropen Effekt, d. h. es bewirkt eine koronare Vasodilatation sowie eine Bronchodilatation und verfügt zudem über eine breite anti-inflammatorische Wirkung (47, 48). Die bronchodilatatorische Wirkung von VIP an isolierten humanen Bronchialstrecken ist ca. 100 Mal effektiver als die Dilatation durch adrenerge Substanzen wie Isoproterenol. Damit ist VIP der potenteste endogene Bronchodilatator, der bisher beschrieben wurde (49). Das Spektrum seiner Effekte ist am Menschen sowohl im Rahmen der COPD als auch beim Asthma belegt (50, 51). Neben vielem anderen wird über eine therapeutische Wirkung bei der Autoimmunpathologie bei rheumatoider Arthritis berichtet (52).

Zahlreiche Untersuchungen der molekularen Pathologie des Asthmas demonstrierten eine inhibierende Wirkung des VIP auf pro-inflammatorische Signale verschiedener Zytokine sowie auf eine gesteigerte biologische Aktivität beteiligter Zellen wie eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen (53, 54). Zudem zeigten molekularbiologische

Untersuchungen blockierende Effekte von VIP auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B mit konsekutiver Herunterregulation der Aktivität spezifischer Gene, die in inflammatorische Prozesse involviert sind (55). Letzteres könnte eine bremsende Wirkung auf das Wachstum bzw. die Expansion der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen erklären. Die anti-inflammatorische Wirkung von VIP ist in mehreren Tiermodellen sowohl in-vivo als auch in-vitro belegt. Eine fehlende beziehungsweise mangelhafte Expression von VIP wurde bei Untersuchungen am Menschen mit dem Auftreten pulmonaler Erkrankungen assoziiert beschrieben. (56, 57). Die genannten möglicherweise gewebe-  
 protektiven Wirkungen des VIP bei RAO sind in Abbildung 7 zusammengefasst.



**Abb 7:** Zusammenfassung der möglicherweise protektiven Wirkungen des VIP bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen wie z.B. bei RAO. VIP signalisiert seine Wirkungen durch seinen spezifischen Rezeptor VPAC oder durch bisher wenig definierte Rezeptoren für neuronale Proteine (NRP).

Um einen möglichen Antagonismus zwischen spezifischen pro-inflammatorischen Faktoren und VIP hinsichtlich eines relevanten pathophysiologischen Stellenwerts im Rahmen der RAO des Pferdes zu

charakterisieren, erscheint es daher sinnvoll, diese Mediatoren im Serum symptomatischer Pferde zu messen. Die bisherigen oben erwähnten Resultate zu der RAO basieren zum Teil auf ambivalenten Befunden. So sind die immunologischen und inflammatorischen Parameter häufig *in vivo* in der BAL von Pferden mit und ohne spezifische Provokation erfasst. Dazu stammen Ergebnisse von Studien *in vitro*, wobei die Mediatoren in Zellkulturen nach antigener Stimulation in den Kulturüberständen mit spezifischen Antikörpern qualitativ und quantitativ gemessen wurden.

Hinzu kommen molekularbiologische Untersuchungen zur Analyse der Aktivität bestimmter Gene anhand deren Transkription. Allerdings fehlen systematische Studien über den Stellenwert anti-inflammatorischer Faktoren *in vivo* sowie über die potentielle Bedeutung von Alters- und Geschlechtsabhängigkeit bei der RAO. Die vorliegende Studie zeigt daher Befunde im Serum symptomatischer Pferde im akuten klinischen Zustand unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht.

### III. METHODEN

#### 3.1 **Pferde**

Alle Pferde stammten aus einem Praxisgebiet in der Region von Freiburg im Breisgau. Als Kontrolle dienten 16 gesunde Pferde, die anamnestisch keinen Hinweis auf eine obstruktive Ventilationsstörung bzw. Lungenerkrankung aufwiesen. Die Pferde wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Anamnestisch bestand kein Hinweis auf eine Erkrankung während der letzten 6 Monate. 15 symptomatische Pferde mit den klinischen Zeichen einer RAO, d. h. wiederkehrende Atemwegobstruktion verbunden mit Husten, vermehrter Schleimbildung und zumeist gesteigerter Atemfrequenz bzw. Dyspnoe, dienten als Studienkollektiv. Infektionskrankheiten wie equines Influenzavirus und/oder equines Herpesvirus wurden mittels Blutuntersuchungen ausgeschlossen. Mit der Tupferprobe des Nasensekrets wurden bakterielle Infekte exkludiert. Die Exazerbationen der RAO wurden, wie in Tabelle 1 dargestellt, antiobstruktiv therapiert, sodass die Pferde klinisch stabil waren. Vor einer Blutentnahme wurde ein Intervall von mindestens 3 Wochen abgewartet, um mögliche pharmakologische Interaktionen mit den immunologischen bzw. inflammatorischen Parametern zu vermeiden.

Zur Abklärung der klinischen Situation wurde in Absprache und mit Billigung der Tierbesitzer 20 ml venöses Blut entnommen. Hiervon wurden, neben der für die klinische Diagnostik notwendigen Vollblutmenge, auch die für die in der Studie zu erfassenden immunologischen bzw. inflammatorischen Parameter im Serum bestimmt. Hierzu wurden die Serumproben in das Department Biomedizin und Pulmologie des Universitätsspitals Basel, Schweiz, transferiert und dort in einem Speziallabor analysiert (Methoden siehe unten). Alle Pferde wurden in Boxen mit Zugang zur Frischluft, eingestallt auf Sägespänen, untergebracht. Als Raufutter dienten trockenes Heu sowie Stroh und als Kraftfutter Hafer, Pellets und diverse Müsli.

## 3.2 Analytische Methoden

### 3.2.1 Blutabnahme

Venöse Blutproben (jede 20 ml) wurden mittels Vakuümröhrchen (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) abgenommen; 9 ml Blut hiervon wurden zur Routinediagnostik verwendet und in sterile Röhrchen pipettiert. Sämtliche Proben lagerten bis zur Zytokinbestimmung bei -80°C. Um das Serum zu erhalten, wurden die Röhrchen in einer Laborzentrifuge bei 1.800 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Hiernach wurde das Serum mit einer Pasteur Pipette abgezogen, in frische Röhrchen pipettiert und bei -80°C bis zur Zytokinbestimmung gelagert. Die Serumproben wurden gleich, d. h. nach der Blutabnahme, für die Analysen gewonnen. Vor der Analyse wurden alle Proben mittels Nummerncode verblindet und hiernach in das Labor transferiert.

### 3.2.2 Analyse der Zytokine

Die qualitative und quantitative Analyse der Zytokine IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , VEGF<sub>165</sub> und VIP wurden alle mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) bestimmt. Die kommerziell verfügbaren ELISA-Kits wurden bei Genorise Scientific Inc., Paoli, PA, USA: IL-4 (Serum cat # 106025; Serum cat 106027), IL-6 (Serum cat # 106005, Serum cat # 106009, IL-8 (cat # GRC 106476), TNF- $\alpha$  (Serum cat # 106004; Serum Cat # 106012), VEGF<sub>165</sub> (cat # GRC 106475) bezogen. Der VIP ELISA stammt von MyBioSource, Inc., San Diego, CA, U.S.A. (cat \* MBS0233840).

### 3.2.3 ELISA Prozedur für IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ und VEGF<sub>165</sub>

Die Bestimmungen wurden anhand der Vorschriften der Hersteller durchgeführt. Um die Zytokinkonzentration exakt zu erfassen, wurden die Proben wie folgt doppelt bestimmt:

Von jeder Probe wurden je 100  $\mu$ l Serum in jeweils 2 Löcher einer 96-ELISA-Platte pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde die Platte entleert. Jeder Ansatz wurde drei Mal mit 300  $\mu$ l/Loch Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung, die ein vom Hersteller beigefügtes Blockierungsmittel enthielt, gewaschen und entleert. Hiernach wurden 100  $\mu$ l des Ansatzes für 30 Minuten mit dem Blockierungsmittel inkubiert und dann die Platte entleert. Es

folgte die Zugabe von 100 µl/Loch des zytokinspezifischen ersten Antikörpers, der mit Blockierungspuffer verdünnt war, die Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur und hiernach die Entleerung der Platte. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch erneutes Waschen mit dem Puffer (300 µl/Loch) entfernt. Danach wurden 100 µl des zweiten Peroxidase-markierten Antikörpers in jedes Loch pipettiert, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann entleert. Der Ansatz wurde hiernach drei Mal mit dem Blockierungspuffer (300 µl/Loch) gewaschen. Danach wurde die Platte entleert. Nach Zugabe von je 100 µl/Loch der Substratlösung, erfolgte die Inkubation für 20 Minuten. Die Farbreaktion wurde durch Hinzugabe von 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Loch gestoppt. Die ELISA-Platten wurden dann mittels eines ELISA READER (BioRAD) bei 450 nm Wellenlänge und einer korrigierenden Wellenlänge von 520 nm abgelesen.

#### 3.2.4 VIP ELISA

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden im Duplikat durchgeführt:

Von jeder Serumprobe wurden je 10 µl in ein Plattenloch gegeben und mit je 40 µl Probenverdünner (ist im Assay enthalten) gemischt. Ohne weitere Inkubation wurden je Loch 100 µl eines Horse-Radish Peroxidase markierten Antikörpers (im Assay enthalten) dazu gegeben und die 96-Lochplatte wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte durch Ausschütteln und Klopfen auf einem Papiertuch geleert. Darauf wurde die Platte 4 x mit jeweils 400 µl/Loch eines im Assay enthaltenen Waschpuffers gewaschen. Hiernach wurden pro Loch je 50 µl Chromogenlösung A und je 50 µl Chromogenlösung B hinzugefügt und auf einem Mixer bei 37°C. für 15 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl einer Säurelösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem ELISA Reader gemessen.

#### 3.2.5 Berechnung der Zytokinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels einer absteigenden Verdünnungsreihe (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, und 15.5 ng/ml) des zu bestimmenden Zytokins erstellt. Der Mittelwerte jedes Probeduplikates wurde

vom ELISA Reader in einen ng/ml bzw. pg/ml Wert umgerechnet. Die höchste Standardlösung ist jeweils in den ELISA enthalten, die Erstellung der jeweiligen Verdünnungsreihe erfolgte manuell. Jede ELISA Platte muss eine Reihe von Standardwerten und einen Nullwert enthalten. Der Nullwert wird von allen gemessenen Proben subtrahiert.

### 3.2.6 Statistik

Die Hypothese war, dass es keinen Unterschied hinsichtlich der Zytokinkonzentration zwischen gesunden und kranken Pferden mit RAO gab. Die Daten wurden im Vergleich untereinander durch den sogenannten Student's t-test (nicht gepaart, einseitig) gesichert. Ein Ergebnis wurde als signifikant angenommen, wenn der *P*-Wert < 0,05 war. Die Korrelationen wurden kalkuliert unter Verwendung der Software eines free online provider (<http://easycalculation.com/statistics/correlation.php>).

#### IV. ERGEBNISSE

Tabelle 1 illustriert das Studienkollektiv von 15 Pferden mit RAO nach Alter, Geschlecht und Rasse sowie die pulmologischen Symptome vor der jeweiligen Blutabnahme. Zudem sind die Therapien der akuten Exazerbation in Tabelle 2 beschrieben.

**Tabelle 1: Kollektiv der Pferde mit RAO**

RAOs	Name	Alter	Geschlecht	Rasse	klinische Symptome	Atemfrequenz	Verordnete Medikamente
H1	Twister	15	Wallach	Warmblut	Husten/verschleimt	erhöht	Clenbuterol, Penicillin, Streptomycin, Dembrexin
H2	Goody	20	Wallach	Vollblut	Husten/trocken	erhöht	Penicillin-Streptomycin, ACC
H3	Jayjay	15	Wallach	Warmblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Penicillin, Streptomycin, Dembrexin
H4	Jeanie	8	Stute	Warmblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin, ACC
H5	Nabuko	14	Wallach	Warmblut	Husten/trocken	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin, Sulfadimethoxin-Trimethoprim
H6	Latina	12	Stute	Vollblut	Husten/trocken	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin
H7	Raptus	12	Wallach	Warmblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin, Sulfadimethoxin-Trimethoprim
H8	Listi	10	Wallach	Pony	Husten/trocken	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin, Penicillin-Streptomycin
H9	Alano	15	Wallach	Warmblut	Husten/verschleimt	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin, Sulfadimethoxin-Trimethoprim
H10	Anglo	15	Wallach	Pony	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin
H11	Diana	20	Stute	Warmblut	Husten/verschleimt	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin, Penicillin-Streptomycin
H12	Sma	21	Stute	Vollblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin, Sulfadimethoxin-Trimethoprim
H13	Ramira	25	Stute	Vollblut	Husten/trocken	erhöht	Clenbuterol, Dembrexin
H14	Akira	16	Stute	Warmblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin
H15	Yara	19	Stute	Warmblut	Husten/trocken	normal	Clenbuterol, Dembrexin

**Tabelle 2: Therapien der akuten Exazerbation**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Präparatename</b>	<b>Dosierung</b>
Penicillin-Streptomycin	Albrecht	Veracin® compositum	5 ml/100 kg KGW i.m.
Acetylcystein	Cp-Pharma	Equmucin® 2 g	20 mg/kg KGW p.o.
Prednisolon	Cp-Pharma	Prednisolon® 50 mg	1 mg/100 kg KGW p.o. initial
Clenbuterol	Boehringer	Ventipulmin®	0,8 µg/kg KGW p.o.
Dembrexin	Boehringer	Sputolysin®	0,3 mg/kg KGW p.o. 2 x tgl.
Sulfadimethoxin-Trimethoprim 50%	Medistar	Sulfadimethoxin-Trimethoprim 50%	20 mg Gesamtwirkstoff/kg KGW p.o.

Sämtliche Medikamente wurden mindestens drei Wochen vor der Blutentnahme abgesetzt.

In Tabelle 3 sind die Pferde aufgeführt, die als Kontrollen dienten.

**Tabelle 3: Kollektiv normaler, unbehandelter Pferde**

Kontrollen	Name	Alter	Geschlecht	Rasse
<b>K1</b>	Lando	25	Wallach	Warmblut
<b>K2</b>	Rubino	7	Wallach	Warmblut
<b>K3</b>	Dondro	5	Wallach	Warmblut
<b>K4</b>	Höllenstein	15	Wallach	Warmblut
<b>K5</b>	Partout	5	Wallach	Pony
<b>K6</b>	Farandi	4	Wallach	Pony
<b>K7</b>	Lomur	18	Wallach	Pony
<b>K8</b>	Angelus	8	Wallach	Pony
<b>K9</b>	Lisa	6	Stute	Warmblut
<b>K10</b>	Corafino	5	Wallach	Warmblut
<b>K11</b>	Monti	12	Wallach	Warmblut
<b>K12</b>	Chakira	9	Stute	Warmblut
<b>K13</b>	Ciccolina	15	Stute	Warmblut
<b>K14</b>	Mima	24	Hengst	Warmblut
<b>K15</b>	Tequila	10	Wallach	Warmblut
<b>K16</b>	Pico	19	Wallach	Warmblut

Tabelle 4 zeigt die Befunde von Zytokinkonzentrationen, bestimmt im Serum gesunder Pferde.

**Tabelle 4: Zytokinkonzentrationen gesunder Pferde**

	<b>IL-4</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>VEGF</b>	<b>VIP</b>
	ng/ml	ug/ml	ug/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml
	12	25	0	0	135	756
	49	645	48	129	82	162
	8	0	13	37	138	1204
	24	0	18	0	127	685
	31	15	0	10	98	372
	27	38	12	7	121	317
	21	42	0	0	135	273
	18	31	10	0	142	197
	29	125	12	42	63	1048
	12	53	9	0	31	695
	25	12	0	43	23	746
	21	0	9	6	78	1283
	37	0	0	0	28	948
	18	16	0	0	33	574
	76	263	131	86	0	43
	84	382	117	71	0	194
Mittelwert	30.75	102.94	23.69	26.94	77.13	593.56
Standardabweichung	15.41	125.41	28.12	30.8	45.23	327.06

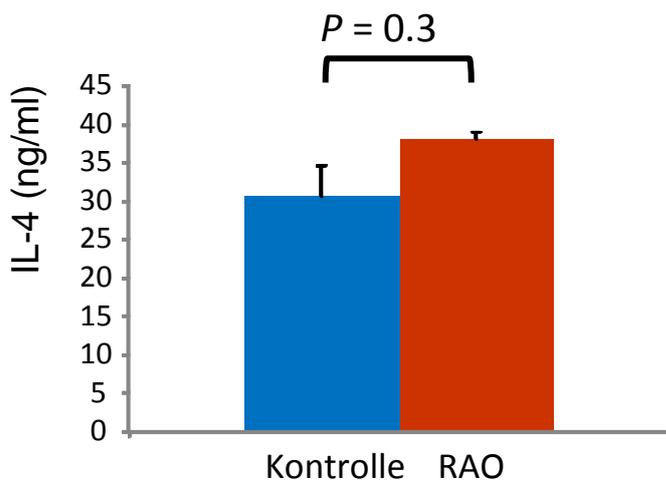
Tabelle 5 repräsentiert die Zytokinserumkonzentrationen der an RAO erkrankten Pferde.

**Tabelle 5: Zytokinkonzentrationen der Pferde mit RAO nach akuter Exazerbation**

	<b>IL-4</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>VEGF</b>	<b>VIP</b>
	ng/ml	ug/ml	ug/ml	ng/ml	ng/ml	pg/ml
	35	128	24	46	153	95
	46	758	116	635	65	17
	52	867	185	274	98	364
	64	274	98	21	185	27
	18	51	9	0	21	78
	26	186	32	39	86	18
	11	25	6	0	105	534
	25	286	53	76	124	16
	63	97	154	152	74	47
	25	41	12	0	153	695
	52	175	85	167	42	746
	39	205	92	163	228	162
	17	20	31	0	62	645
	48	328	37	51	36	68
	51	401	92	82	41	168
Mittelwert	38.13	256.13	68.4	113.73	98.2	245.33
Standardabweichung	14.66	183.63	45.76	109.64	47.84	234.31

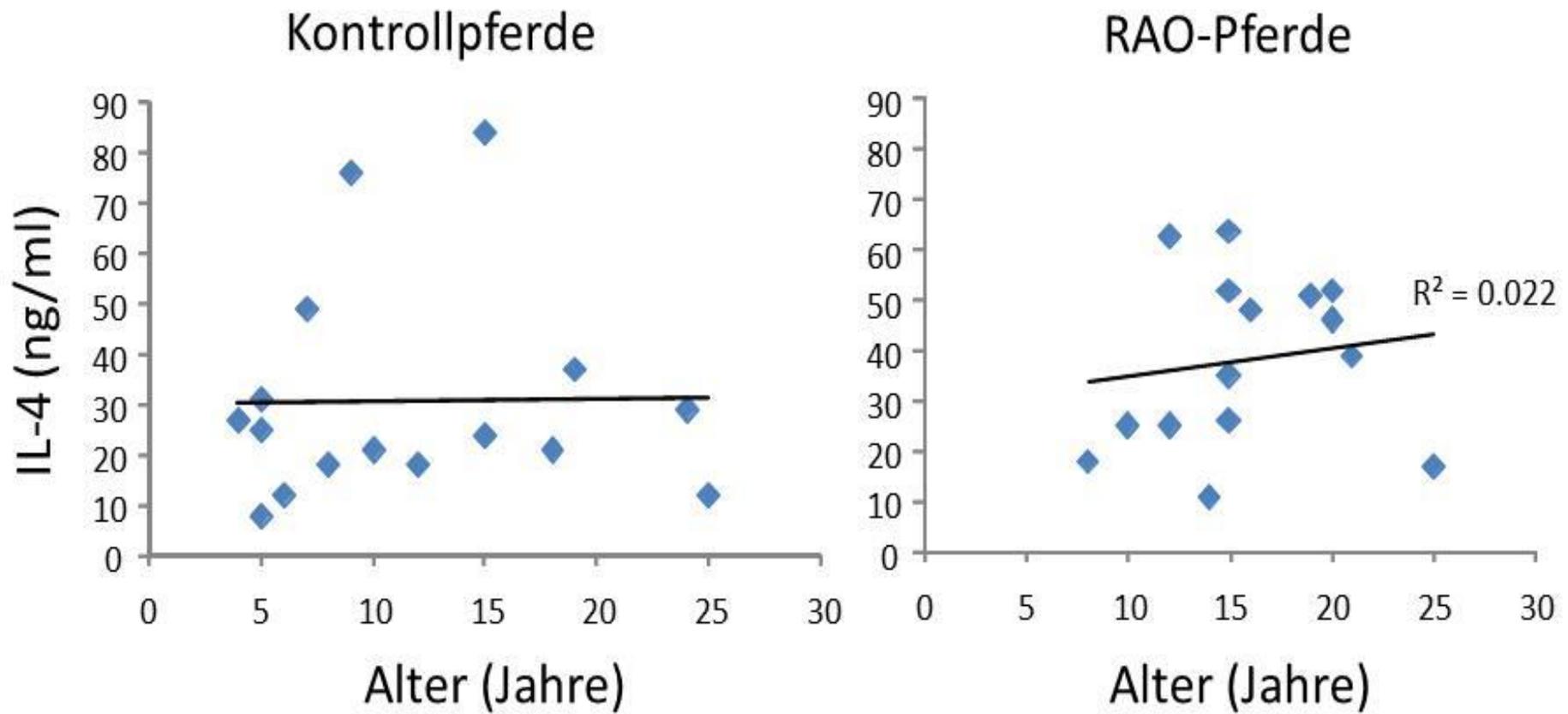
### IL-4 ist bei RAO leicht aber nicht signifikant erhöht

Die Serumkonzentration von IL-4 erkrankter Tiere ist in Abbildung 8 gegenüber den der Kontrollen, d. h. gesunder Tiere, dargestellt. Die Kontrollen wiesen eine durchschnittliche Serumkonzentration von  $30.75 \pm 15.4$  ng/ml auf, während die Pferde mit RAO einen nicht signifikanten jedoch leicht erhöhten IL-4 Wert von  $38.13 \pm 14.7$  ng/ml demonstrierten ( $P = 0.3$ ; Vergleich mittels Student's t-test, nicht gepaart, einseitig).



**Abb. 8:** Die IL-4 Konzentrationen im Serum von Kontrollen gegenüber Pferden mit RAO wurden mittels ELISA bestimmt. Balken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, fand sich bei den Kontrollen keine Korrelation zwischen dem Alter und den IL-4 Serumkonzentrationen. Dagegen ergab sich bei den Pferden mit RAO eine leichte Korrelation mit den IL-4 Serumkonzentrationen (rechte Graphik). Die Korrelation bei den Pferden mit RAO wird durch einen tiefen IL-4 Wert des ältesten Pferdes gemindert. Nimmt man dieses Pferd aus der Statistik, ergibt sich ein Bestimmtheitsmass der Regression ( $R^2$ ) von 0.194.



**Abb. 9:** Altersabhängigkeit der IL-4 Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd. Die Gerade und das Bestimmtheitsmass der Regression zwischen Alter und den IL-4 Messwerten bei beiden Kollektiven an.

Unterteilt man die Pferde nach dem Geschlecht (Wallache und Hengste zusammengefasst „männlich“), fand sich keine Korrelation mit den IL-4 Serumkonzentrationen. Die Daten sind in Tabelle 6 dargestellt und mittels Student's t-test (nicht gepaart, einseitig) verglichen.

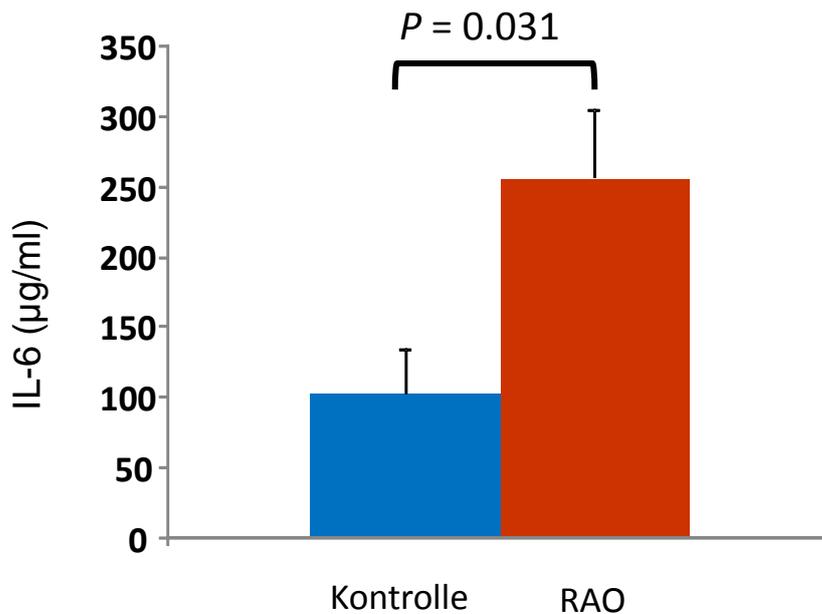
**Tabelle 6: Geschlechtsabhängigkeit der IL-4 Serumkonzentrationen und RAO**

	IL-4			
	Kontrollen		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	12	29	35	64
	49	21	46	26
	8	37	52	52
	24		18	39
	31		11	17
	27		25	48
	21		63	51
	18		25	
	12			
	25			
	18			
	76			
	84			
Mittelwert	31.15	29.00	34.38	42.43
SD	17.78	5.33	14.63	12.94
P-Wert M/W	0.80		0.38	

\*IL-4 Werte sind in ng/ml angegeben

## IL-6 ist bei RAO signifikant erhöht

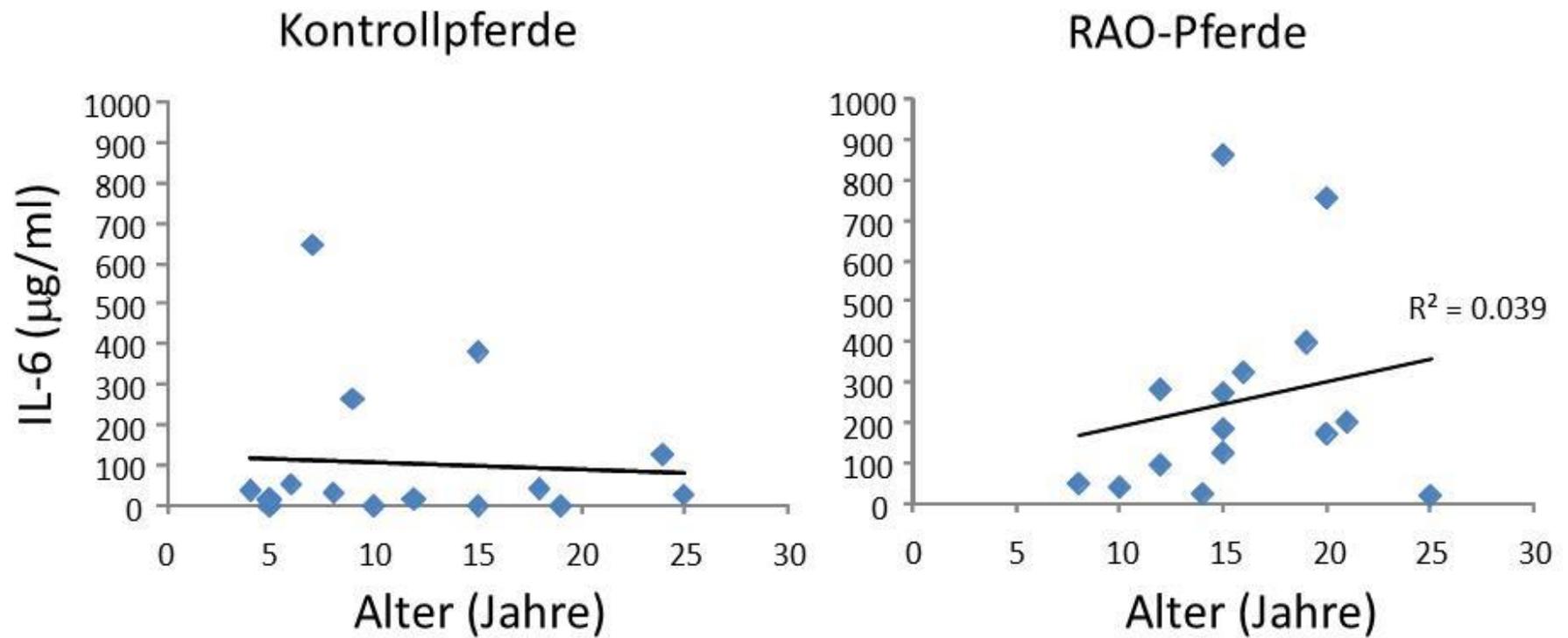
Die Analyse von IL-6 ergab bei gesunden Pferden eine Serumkonzentration von  $102.9 \pm 123.41 \mu\text{g/ml}$  und bei Pferden mit RAO einen signifikant erhöhten Wert von  $256.13 \pm 183.63 \mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.031$ ; Student's t-test, nicht gepaart, einseitig), siehe Abbildung 10.



**Abb. 10:** Der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler für IL-6 illustriert bei den Pferden mit RAO einen signifikant erhöhten Wert.

Die Konzentrationsbestimmung von IL-6 bei den Kontrollen demonstrierte keine Korrelation in Abhängigkeit vom Alter. Im Gegensatz hierzu, zeigte sich, wie beim IL-4, eine Korrelation bei den Pferden mit RAO, siehe Abbildung 11. Wie beim IL-4, verminderte das älteste Pferd mit RAO die Korrelation allerdings erheblich; schließt man dieses Tier aus, betrug das Bestimmtheitsmass  $R^2 = 0.143$  gegenüber  $R^2 = 0.039$ , vorausgesetzt man berücksichtigt alle Pferde mit RAO.

Bezogen auf das Geschlecht ergab sich kein signifikanter Zusammenhang, wobei die Werte der weiblichen immer niedriger waren als die der männlichen Pferde (Tabelle 7). Es bleibt offen, ob dieser Unterschied bei größeren Kohorten das Signifikanzniveau erreichen kann.



**Abb. 11:** Altersabhängigkeit der IL-6 Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd.

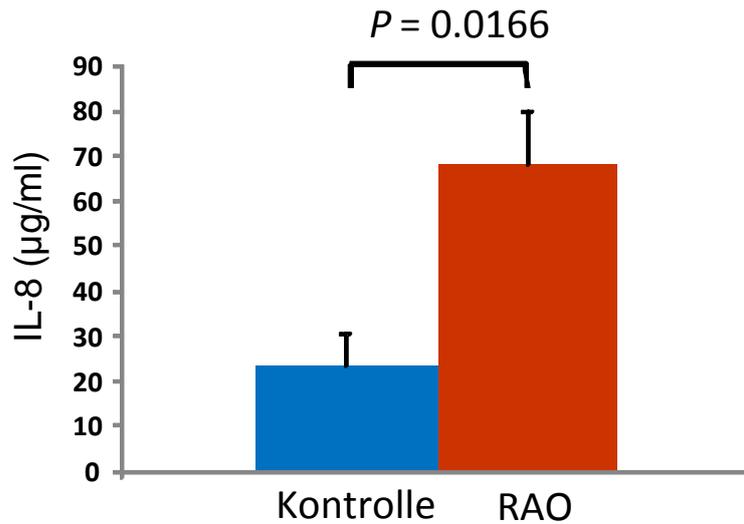
**Tabelle 7: Geschlechtsabhängigkeit der IL-6 Serumkonzentrationen und RAO**

	Kontrolle		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	25	125	128	274
	645	0	758	186
	0	0	867	175
	0		51	205
	15		25	20
	38		286	328
	42		97	401
	31		41	
	53			
	12			
	16			
	263			
	382			
Mittelwert	117.08	41.67	281.63	227.00
Standardabweichung	144.43	55.56	266.53	92.00
P-Wert M/W	0.30		0.68	

\*IL-6 Werte sind in µg/ml angegeben

### **IL-8 ist bei Pferden mit RAO stark erhöht.**

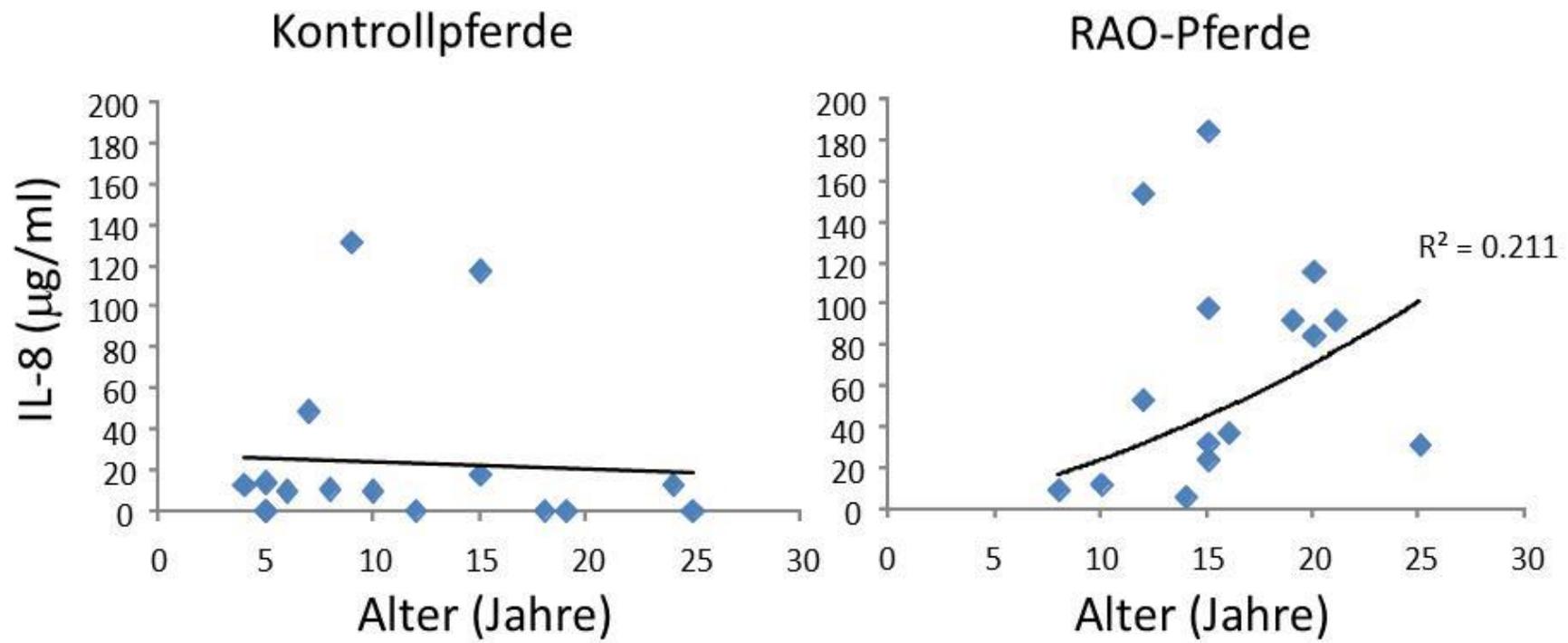
Die Messung von IL-8, dargestellt in Abbildung 12, widerspiegelt eine signifikante Zunahme der Zytokinkonzentration bei Pferden mit RAO ( $P < 0.01$ ; Student's t-test, nicht gepaart, einseitig). Während gesunde Tiere einen IL-8 Mittelwert von  $23.69 \pm 28.12$  µg/ml IL-8 aufwiesen, lag der IL-8 Mittelwert bei Pferden mit RAO bei  $68.4 \pm 45.76$  µg/ml.



**Abb. 12:** IL-8 Konzentrationen im Serum von Kontrollen gegenüber Pferden mit RAO wurden mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler für IL-8 ergab bei den RAO-Pferden einen signifikant erhöhten Wert.

Berücksichtigt man das Alter der Pferde, ergab sich für das IL-8 eine deutliche Korrelation bei Pferden mit RAO, wobei wiederum das älteste Pferd einen abweichenden tiefen Wert aufweist. Unter Einbezug aller Pferde mit RAO erreicht das Bestimmtheitsmass der Regression einen Wert von 0.211 (Abb. 13, rechte Graphik).

Die Unterteilung der beiden Studienkollektive nach Geschlecht ist in Tabelle 8 zusammengefasst; sie zeigt keinen Unterschied, wobei die Gruppengröße der weiblichen, gesunden Pferde deutlich zu klein ist, um eine gesicherte Aussage zu treffen. Dagegen ist die Anzahl Pferde mit RAO pro Geschlechtsgruppe mit 8 männlichen und 7 weiblichen Tieren statistisch aussagekräftig und somit vergleichbar.



**Abb. 13:** Die Altersabhängigkeit der IL-8 Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd.

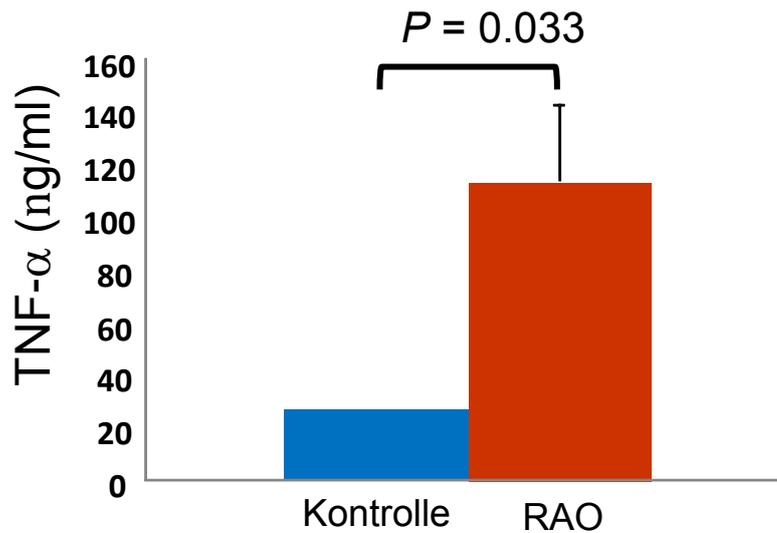
**Tabelle 8: Geschlechtsabhängigkeit der IL-8 Serumkonzentrationen und RAO**

	Kontrollen		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	0	12	24	98
	48	9	116	32
	13	0	185	85
	18		9	92
	0		6	31
	12		53	37
	0		154	92
	10		12	
	9			
	0			
	0			
	131			
	117			
Mittelwert	27.54	7.00	69.88	66.71
Standardabweichung	32.83	4.67	61.34	28.61
P-Wert M/W	0.14		0.91	

\*IL-8 Werte sind in µg/ml angegeben

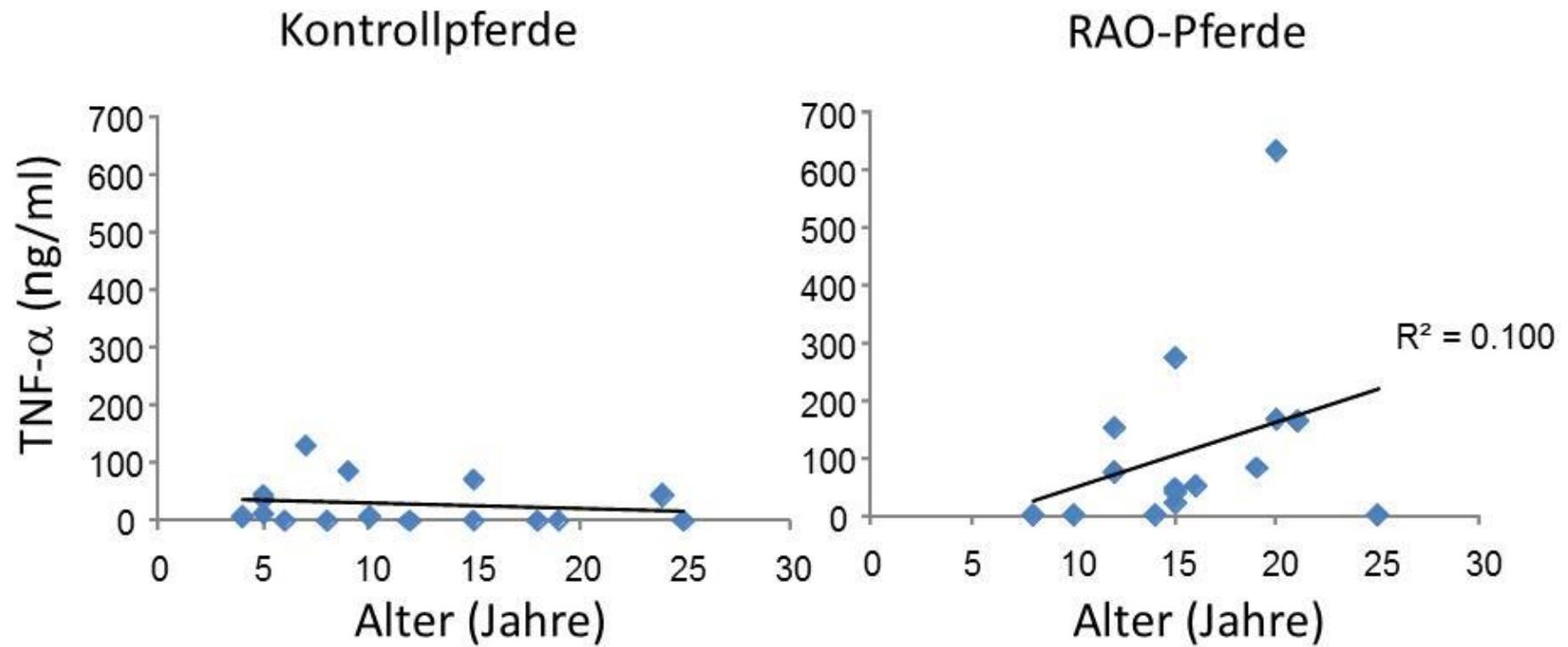
### **Bei Pferden mit RAO besteht eine signifikant erhöhte Serumkonzentration vom TNF-α**

Der Mittelwert für die Serumkonzentration des pro-inflammatorischen Faktors TNF-α ist bei Pferden mit RAO gegenüber Kontrollen signifikant erhöht. Wie in Abbildung 14 dargestellt, beträgt der im Serum gemessene Wert von TNF-α bei Kontrollen  $26.97 \pm 30.80$  ng/ml und der von Pferden mit RAO  $113.7 \pm 109.64$  ng/ml ( $P = 0.031$ ; Student's t-test, nicht gepaart, einseitig). Damit zeigt sich eine vierfache Zunahme des TNF-α bei Pferden mit RAO. Diese möglicherweise krankheitsspezifische Beobachtung korreliert zudem noch deutlich mit dem Alter der Pferde ( $R^2 = 0.1$ ), wobei, wie beim IL-6 und IL-8, das älteste der Pferde mit RAO eine Ausnahme macht (Abb. 15).



**Abb. 14:** *TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Serum von Kontrollen gegenüber Pferden mit RAO wurden mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert (Balken  $\pm$  Standardfehler) für TNF- $\alpha$  ergab bei den Pferden mit RAO einen signifikant erhöhten Wert.*

Getrennt nach Geschlechtern ergibt sich, wie in Tabelle 9 zusammengefasst, kein relevanter Unterschied innerhalb der beiden Gruppen, wobei die weiblichen Tiere jeweils einen geringeren TNF- $\alpha$  Mittelwert aufweisen als die männlichen Tiere. Im Gegensatz hierzu, ist die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  bei Tieren mit RAO bei beiden Geschlechtern signifikant erhöht.



**Abb. 15:** Altersabhängigkeit der TNF- $\alpha$  Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd.

**Tabelle 9: Geschlechtsabhängigkeit der TNF- $\alpha$  Serumkonzentrationen und RAO**

	Kontrolle		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	0	42	46	21
	129	6	635	39
	37	0	274	167
	0		0	163
	10		0	0
	7		76	51
	0		152	82
	0		0	
	0			
	43			
	0			
	86			
	71			
Mittelwert	29.46	16.00	147.88	74.71
Standardabweichung	33.64	17.33	154.34	53.67
P-Wert M/W	0.47		0.39	

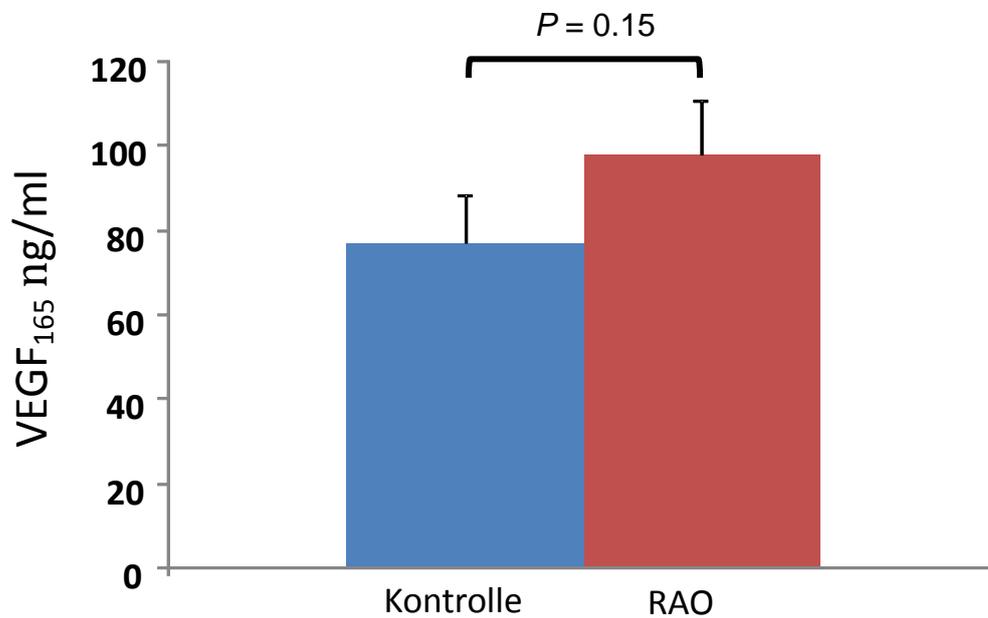
\* TNF- $\alpha$  Werte sind in ng/ml angegeben

### **VEGF<sub>165</sub> zeigt keinen RAO spezifischen Anstieg**

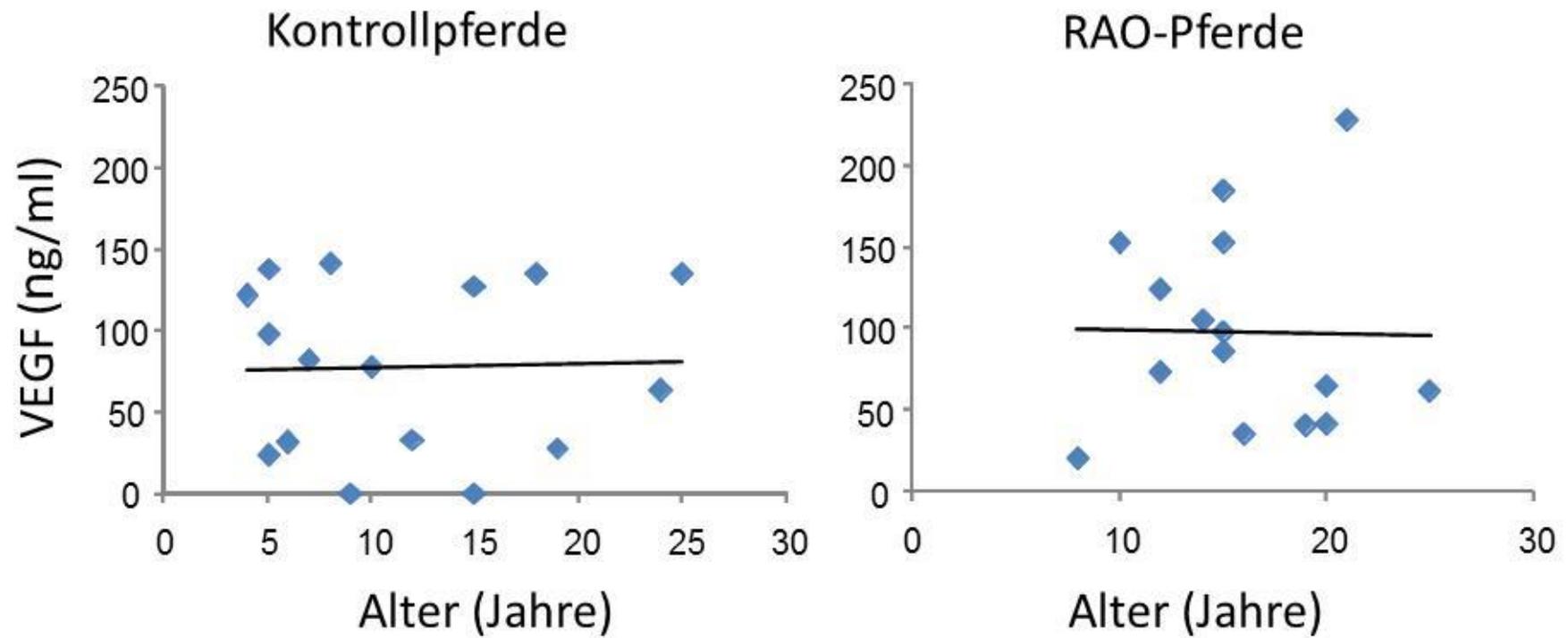
In Abbildung 16 kann ein leicht erhöhter Mittelwert des VEGF<sub>165</sub> bei den Pferden mit RAO festgestellt werden. Der Unterschied zwischen den Kontrollen ( $77.13 \pm 45.23$  ng/ml) und den erkrankten Pferden ( $98.2 \pm 47.84$  ng/ml) erreicht allerdings kein Signifikanzniveau ( $P = 0.15$ ; Student's t-test, nicht gepaart, einseitig).

Das VEGF<sub>165</sub> war eines der untersuchten Entzündungszytokine, bei dem keine Korrelation zwischen Alter und Serumkonzentration beobachtet wurde (Abb. 17). Die berechneten Korrelationsgeraden zeigen dies deutlich.

Auch die Unterteilung der beiden Studiengruppen nach Geschlecht demonstrierte keine Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von VEGF<sub>165</sub> mit diesem Parameter (Tabelle 10).



**Abb. 16:** Die VEGF Konzentrationen im Serum von Kontrollen gegenüber Pferden mit RAO wurden mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert (Balken  $\pm$  Standardfehler) für VEGF ergab bei den Pferden mit RAO einen signifikant erhöhten Wert.



**Abb. 17:** Die Altersabhängigkeit der VEGF Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd.

**Tabelle 10: Geschlechtsabhängigkeit der VEGF<sub>165</sub> Serumkonzentrationen und Erkrankung**

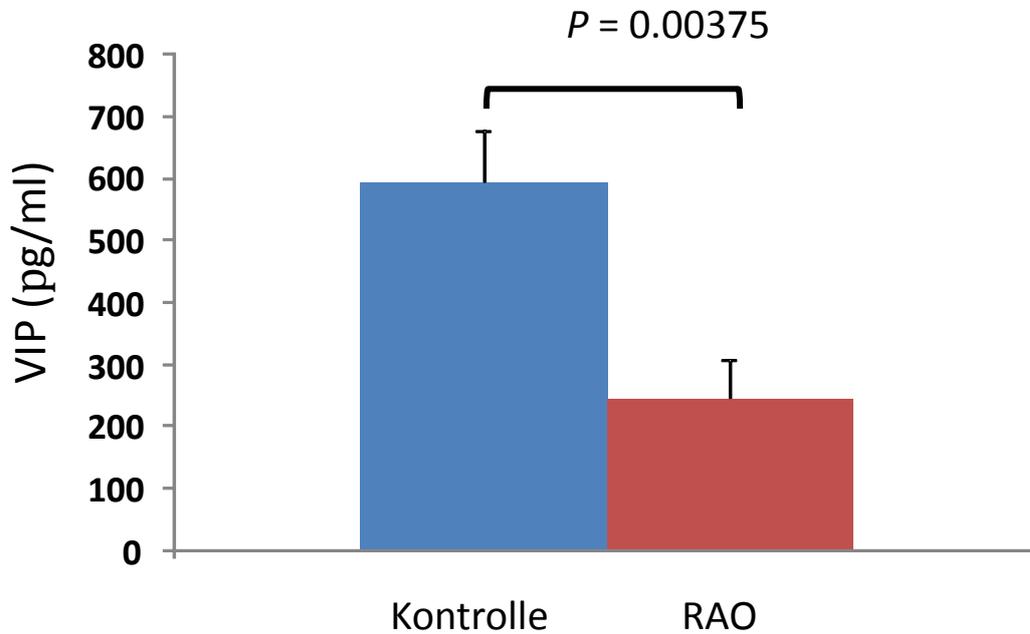
	Kontrollen		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	135	63	153	185
	82	78	65	86
	138	28	98	42
	127		21	228
	98		105	62
	121		124	36
	135		74	41
	142		153	
	31			
	23			
	33			
	0			
	0			
Mittelwert	81.92	56.33	99.13	97.14
Standardabweichung	49.63	18.89	34.63	62.49
P-Wert M/W	0.27		0.95	

\* VEGF<sub>165</sub> Werte sind in ng/ml angegeben

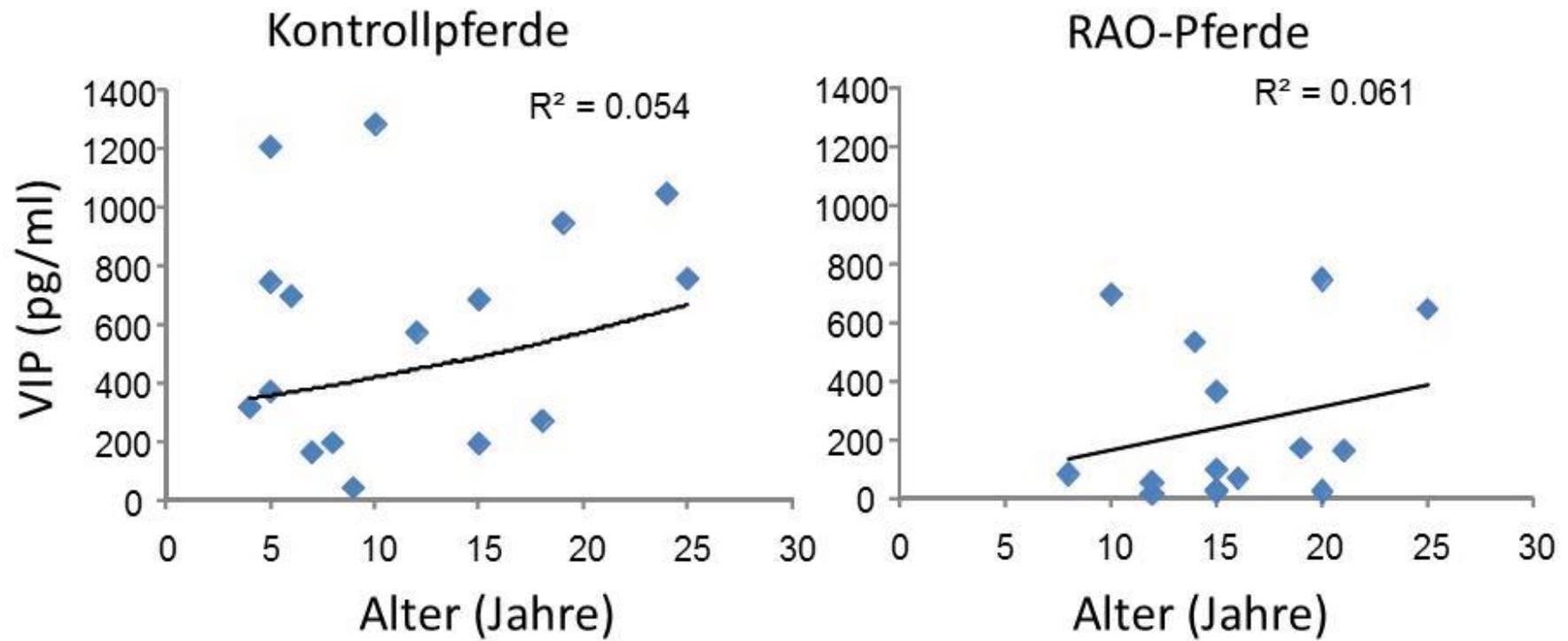
### VIP ist bei RAO signifikant erniedrigt

Von besonderem Interesse war die Bestimmung von VIP im Pferdeserum. Die VIP Konzentrationen sind generell viel geringer als die der meisten anderen Zytokine, sie bewegen sich im Bereich von pg/ml. Trotz dieser geringen Konzentrationen, weisen die Serumspiegel Pferde mit RAO, wie in Abbildung 18 gezeigt, eine deutlich geringere Konzentration als die von gesunden Pferden auf ( $P = 0.004$ ; Student's t-test, nicht gepaart, einseitig). Während für die Kontrollen ein Wert von  $593.6 \pm 327.06$  pg/ml gemessen wurde, beläuft sich der Wert von Pferden mit RAO auf  $245.1 \pm 234.31$  pg/ml.

Im Bezug auf das Alter ergibt sich für beide Pferdegruppen eine ähnlich positive, wenn auch geringe Korrelation mit den VIP Serumkonzentrationen (Abb. 19). Bei dieser Bestimmung zeigte das älteste Pferd mit RAO keine Abweichung von den anderen Tieren.



**Abb. 18:** Die VIP Konzentrationen im Serum von Kontrollen gegenüber Pferden mit RAO wurden mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert (Balken  $\pm$  Standardfehler) für VIP ergab bei den Pferden mit RAO einen signifikant erhöhten Wert.



**Abb. 19:** Die Altersabhängigkeit der VIP Serumkonzentrationen von Kontrollen (linke Graphik) und von Pferden mit RAO (rechte Graphik). Jeder Punkt repräsentiert ein Pferd.

Nach Geschlechtern getrennt wurde für die gesunden Tiere ein signifikanter Unterschied ( $P < 0.0037$ , Student's t-test, nicht gepaart, einseitig) zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet. Dieser Unterschied konnte bei den Pferden mit RAO nicht nachgewiesen werden (Tabelle 11). Zudem fällt auf, dass die VIP-Werte der weiblichen gesunden Pferde deutlich höher lagen. Inwieweit diese geschlechtsspezifischen Unterschiede bei gesunden Pferden tatsächlich existieren, kann aufgrund des kleinen Kollektivs weiblicher gesunder Tiere ( $n = 3$ ) nicht entschieden werden.

**Tabelle 11: Geschlechtsabhängigkeit der VIP Serumwerte und Erkrankung**

	Kontrolle		RAO	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	756*	1048	95	27
	162	1283	17	18
	1204	948	364	746
	685		78	162
	372		534	645
	317		16	68
	273		47	168
	197		695	
	695			
	746			
	574			
	43			
	194			
Mittelwert	478.31	1093.00	230.75	262.00
Standardabweichung	275.41	126.67	225.19	247.71
P-Wert M/W	0.004		0.836	

\* VIP Werte sind in pg/ml angegeben

## **RAO-spezifische Zytokinprofile unter besonderer Berücksichtigung des VIP**

In Tabelle 12 sind die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Zytokine für die Kontrollen aufgelistet. Es ergibt sich daraus eine starke positive Abhängigkeit zwischen den Serumkonzentrationen von IL-4 mit IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und VEGF<sub>165</sub> untereinander (Tabelle 12). Die IL-6 Werte korrelieren positiv mit IL-8 und TNF- $\alpha$  Serumspiegeln, und negativ mit VEGF<sub>165</sub> (Tabelle 12). Die Serumkonzentrationen für IL-8 steigen ebenfalls zusammen mit TNF- $\alpha$  an und weisen auf eine gemeinsame Regulation hin. Im Gegensatz hierzu besteht scheinbar ein negativer Regulationsmechanismus zwischen IL-8 und VEGF<sub>165</sub>. Die gemessenen TNF- $\alpha$  Serumspiegel korrelieren negativ mit VEGF<sub>165</sub>.

Die Korrelationen der entzündlichen Zytokine mit VIP waren grundlegend negativ und werden weiter unten dargestellt und separat besprochen.

***Tabelle 12: Beziehung der Serumspiegelregulation entzündlicher Zytokine bei gesunden Pferden untereinander***

	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	VEGF <sub>165</sub>
IL-4	0.70*	0.91	0.69	0.611
IL-6		0.67	0.90	-0.31
IL-8			0.70	-0.51
TNF- $\alpha$				-0.38

*\*Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte über Anwendung der entsprechenden Funktion mittels Excel-Tabellen.*

In Tabelle 13 sind die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Entzündungszytokine bei Pferden mit RAO aufgeführt. Wie bei den gesunden Pferden, zeigt sich auch hier ein positiver Zusammenhang zwischen einem erhöhten IL-4 Serumspiegel und IL-6, IL-8 sowie TNF- $\alpha$ . Im Gegensatz zu den Kontrollen war bei den Pferden mit RAO kein positiver Zusammenhang zwischen IL-4 und VEGF<sub>165</sub> Serumspiegelregulationen nachweisbar.

Wie bei den Kontrollen, steigt auch bei Pferden mit RAO der IL-6 Serumspiegel zusammen mit dem von IL-8 und TNF- $\alpha$  an, Hingegen ist der negative Zusammenhang zwischen IL-6 und VEGF<sub>165</sub>, der bei gesunden Pferden beobachtet wurde, bei RAO scheinbar aufgehoben.

Für IL-8 ergibt sich eine positive Korrelation der Serumspiegel mit denen des TNF- $\alpha$ , während die negative Korrelation mit VEGF<sub>165</sub> Serumspiegeln aufgehoben zu sein scheint.

Für die Korrelation des TNF- $\alpha$  und des VEGF<sub>165</sub> Serumspiegels ergab sich eine leichte negative Beziehung.

***Tabelle 13: Beziehung der Serumspiegelregulation entzündlicher Zytokine bei Pferden mit RAO***

	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	VEGF <sub>165</sub>
IL-4	0.48*	0.79	0.39	0.02
IL-6		0.69	0.77	-0.09
IL-8			0.61	0.04
TNF- $\alpha$				-0.11

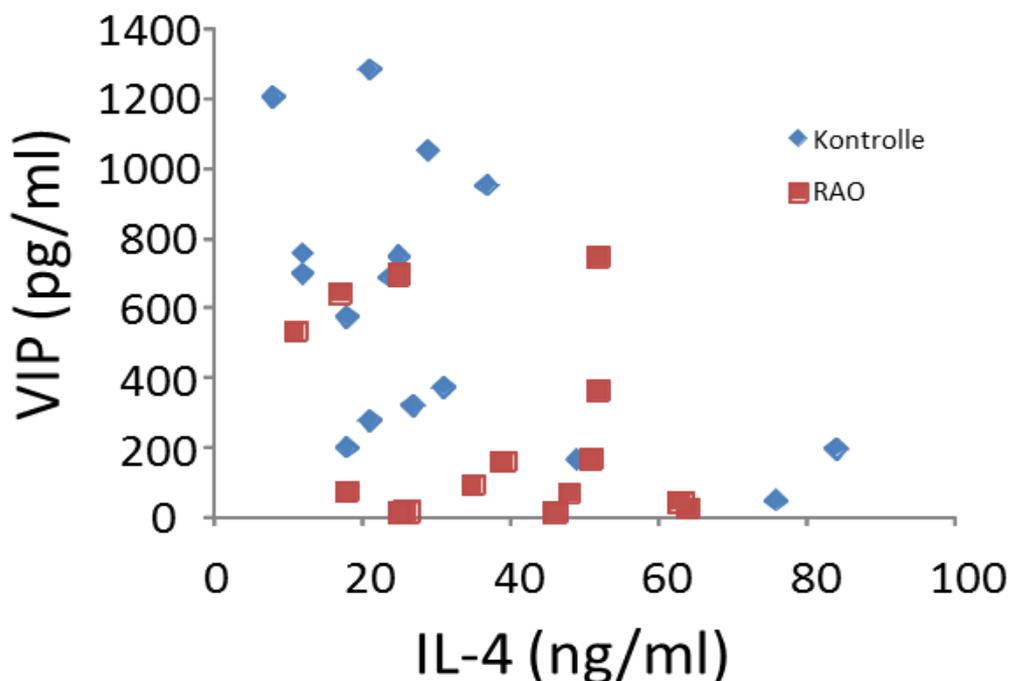
*\*Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte über Anwendung der entsprechenden Funktion mittels Excel-Tabellen.*

## VIP und die anderen entzündungsfördernden Zytokine

In Anbetracht der generellen anti-inflammatorischen Eigenschaften von VIP, könnte die Absenkung der VIP-Serumkonzentration bei RAO-Pferden durch die Freisetzung und Wirkung pro-inflammatorischer Faktoren, die mit RAO assoziiert sind, erklärt werden. Da die VIP-Konzentrationen mit dem Schweregrad der klinischen Symptome von RAO assoziiert zu sein scheint, wurde die VIP-Serumkonzentration mit allen anderen gemessenen entzündungsfördernden Zytokinen korreliert.

### VIP und IL-4

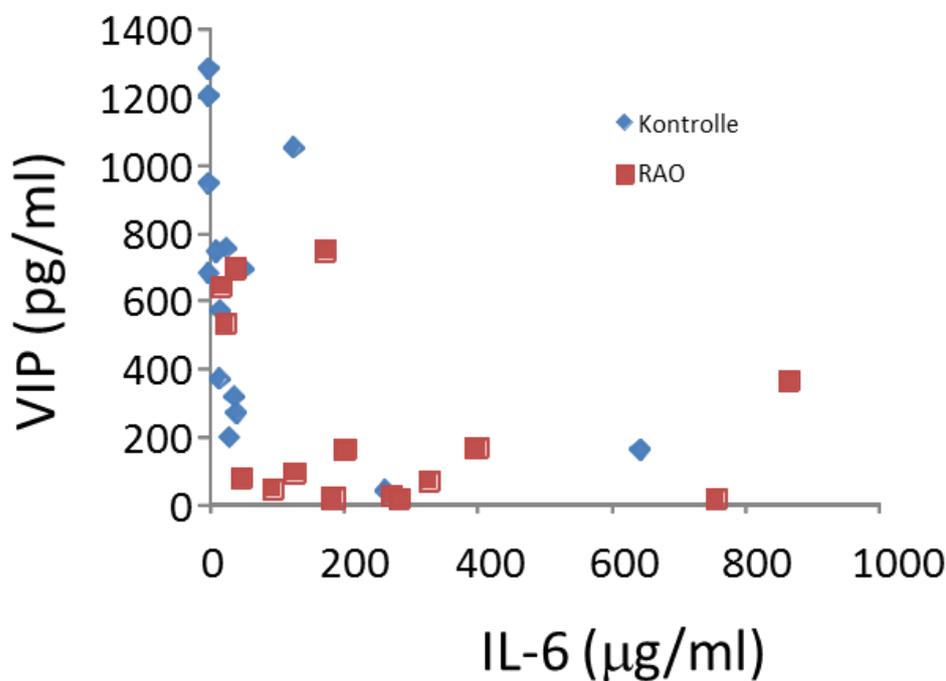
Abbildung 20 demonstriert keine klare Korrelation zwischen zirkulierendem IL-4 und VIP. Zwar ergab der IL-4/VIP Korrelationskoeffizient mit  $r^2 = -0.5525$  bei Kontrollen eine negative Korrelation für IL-4 und VIP, doch eine solche mögliche Korrelation konnte bei Pferden mit RAO nicht bestätigt werden ( $r^2 = -0.2930$ ) und schließt somit einen direkten Zusammenhang zwischen hochreguliertem IL-4 und erniedrigtem VIP Serumspiegel aus (Abb 20).



**Abb. 20:** Korrelation zwischen IL-4 und VIP Serumspiegeln bei gesunden Pferden (blaue Raute) und Pferden mit RAO (rotes Viereck). Jeder Graphikpunkt zeigt ein einzelnes Pferd an.

## VIP und IL-6

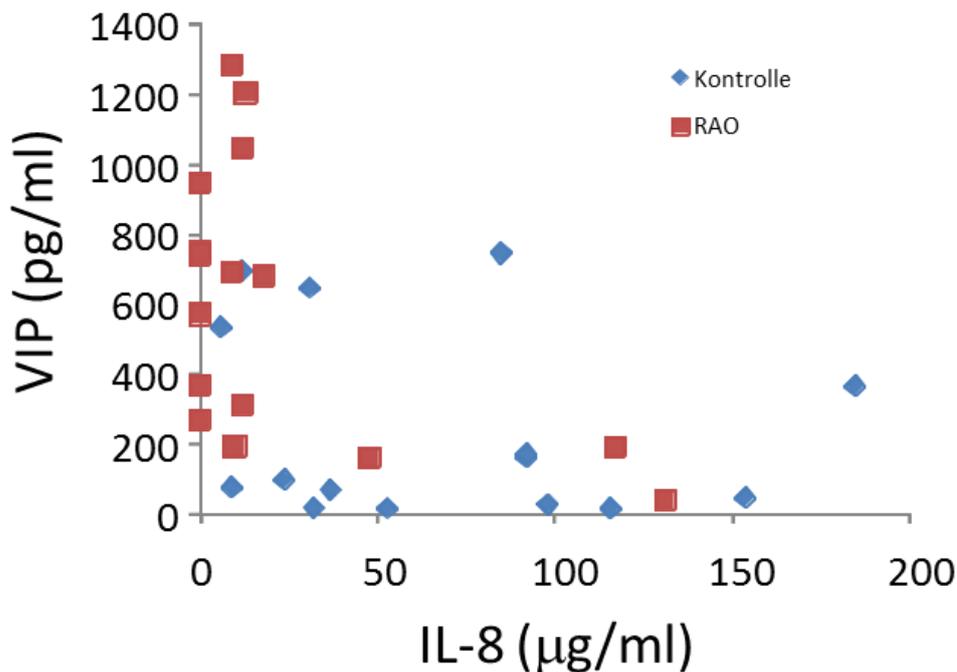
Wie in Abbildung 21 gezeigt, ergab sich bei gesunden Pferden keine Korrelation zwischen VIP und IL-6, da sich bei keinem dieser Tiere höhere Konzentrationen an zirkulierendem IL-6 nachweisen ließen ( $r^2 = -0.52$ ). Obwohl bei den Pferden mit RAO beide Zytokine im Serum demonstrierbar waren, zeigte sich auch hier keine Korrelation zwischen IL-6 und VIP ( $r^2 = -0.2770$ ). Dies ist unerwartet, da jedes Zytokin für sich allein betrachtet mit RAO korrelierte (siehe oben). Daher sprechen auch hier die Ergebnisse für eine relative Unabhängigkeit beider Zytokine voneinander bzw. von einer unabhängigen Regulation.



**Abb. 21:** Korrelation zwischen IL-6 und VIP Serumspiegeln bei Kontrollen (blaue Raute) und Pferden mit RAO (rotes Viereck). Jeder Graphikpunkt zeigt ein einzelnes Pferd.

## VIP und IL-8

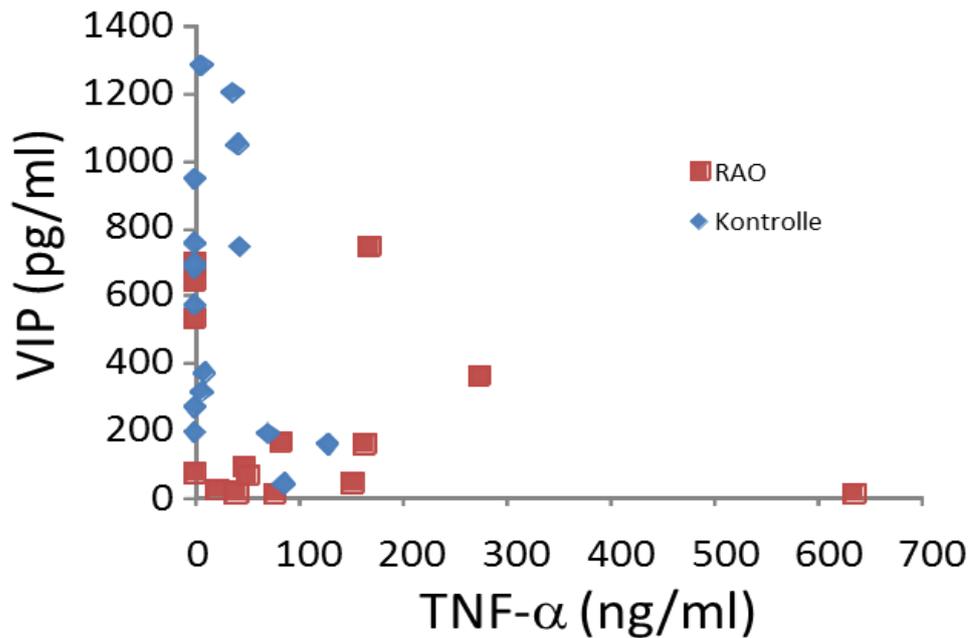
Wie oben beschrieben, wiesen die Pferde mit RAO gegenüber den Kontrollen deutlich erhöhte IL-8 Serumkonzentrationen auf. Die erhöhten IL-8 Werte der Pferde mit RAO korrelierten allerdings nicht mit der niedrigen des VIP-Konzentrationen (Abb 22). Damit zeigt sich auch hier ein unabhängiger Regulationsmechanismus für beide Zytokine. Die Analyse der Korrelationskoeffizienten ergab für gesunde Pferde einen  $r^2$ -Wert von -0.5197 und bei Pferden mit RAO einen  $r^2$ -Wert von -0.1920 (Abb 22). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass es eine inverse Abhängigkeit zwischen IL-8 und VIP in einem frühen Erkrankungsstadium geben könnte und diese bei der Serumanalyse bereits überschritten war. Um diesen Aspekt zu klären, müssten Analysen bei einer größeren Population von Versuchstieren über mehrere Tage erfolgen, was allerdings unter Praxisbedingungen leider nicht möglich ist.



**Abb. 22:** Korrelation zwischen IL-8 und VIP Serumkonzentration bei Kontrollen (blaue Raute) und Pferden mit RAO (rotes Viereck). Jeder Graphikpunkt zeigt ein einzelnes Pferd.

## VIP und TNF- $\alpha$

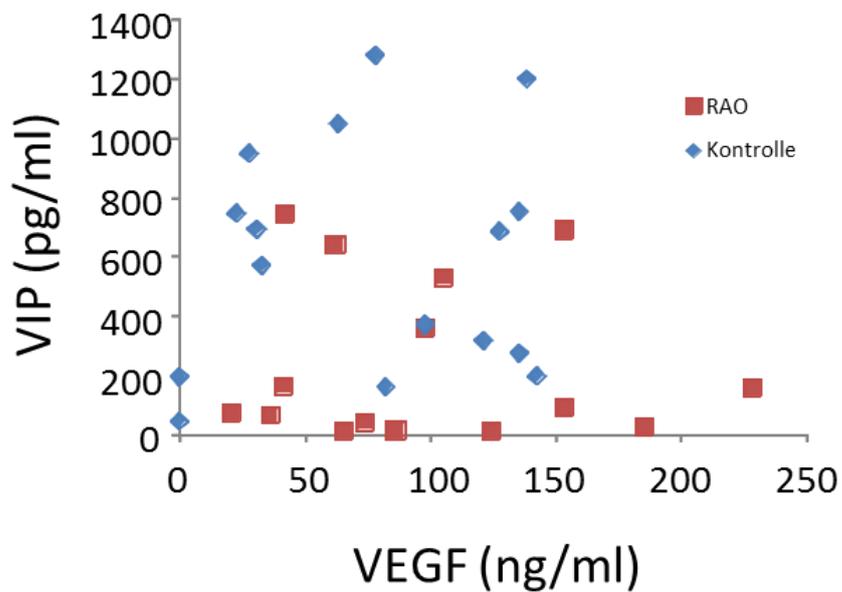
Auch der Vergleich der Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und VIP zeigte keine signifikante Korrelation ( $r^2 = -0.3695$ ) bei den Kontrollen (Abb 23). Bei den Pferden mit RAO besteht ebenfalls kein Hinweis auf eine Korrelation ( $r^2 = -0.1990$ ) der beiden Zytokine (Abb 23).



**Abb. 23:** Korrelation zwischen TNF- $\alpha$  und VIP Serumspiegel bei Kontrollen (blaue Raute) und Pferden mit RAO (rotes Viereck). Jeder Graphikpunkt zeigt ein einzelnes Pferd.

## VIP und VEGF<sub>165</sub>

Auch beim Vergleich zwischen VEGF und VIP Serumkonzentrationen ergab sich keine signifikante Korrelation, weder bei gesunden noch bei RAO Pferden. Der Korrelationskoeffizient für VIP und VEGF Serumwerten lag bei Pferden mit RAO bei  $r^2 = -0.0714$  und bei gesunden Pferde bei  $r^2 = 0.0849$  (Abb. 24).



**Abb. 24:** Korrelation zwischen VEGF und VIP Serumspiegel bei Kontrollen (blaue Raute) und Pferden mit RAO (rotes Viereck). Jeder Graphikpunkt zeigt ein einzelnes Pferd.

## V. DISKUSSION

Die Literaturbefunde zu RAO sind insofern ambivalent, als verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien sowie die Verwendung unterschiedlicher experimenteller Modelle zur Charakterisierung der Pathologie der Erkrankung zu unterschiedlichen Resultaten geführt haben (siehe Tabelle 14; 58).

**Tabelle 14: Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen RAO und experimentellem Asthma (58)**

Charakteristika	RAO	Asthmamodelle bei experimentellen Tieren
Ätiologie	Natürliche Entstehung Abhängig von genetischer Veranlagung und der Auseinandersetzung mit der Umwelt Natürliche Antigene und Wege der Sensibilisierung bzw. Provokation	Antigen-induziert Einige der verwendeten Antigene (z.B. Ovalbumin) und Wege der Sensibilisierung/Provokation (z. B. intra-peritoneal/tracheal) sind für das menschliche Asthma irrelevant Verzerrung durch genetische Inzucht Tierhaltung in pathogen-freiem Umfeld
Pathophysiologie unspezifische bronchiale Hyperreagibilität	vorhanden anhaltend	vorhanden von kurzer Dauer
Inflammation	dominiert von Neutrophilen und Th1/Th2/ Th17-Zytokinprofilen	Beruhet auf dem spezifischen Antigen und einem Adjuvans und dem genetischen Hintergrund der experimentellen Tiere (z. B. BALB/c Mäuse)
Bindegewebiger Umbau	anhaltend, betrifft meist periphere Atemwege	vorübergehend, betrifft zentrale und periphere Atemwege
Klinische Symptome	Atemwegsobstruktion, Husten, nasale Hypersekretion, Dyspnoe	meist nicht vorhanden
Forschungsansatz Genmanipulation Verfügbarkeit von Reagenzien	nicht geeignet begrenzt	Knock out-, transgene und chimäre Mäuse aktuell häufig verwendet

Um eine möglichst wirklichkeitsnahe Darstellung humoraler pathologischer Veränderungen zu ermöglichen, wurden Serumproben akut erkrankter Pferde

entnommen und erstmals etablierte immunologische und inflammatorische Faktoren mit dem Hormon VIP korreliert. Limitiert wird die Interpretation der Resultate durch die relativ kleinen Kollektive (n = 16 Pferde mit RAO und der Kontrollen n = 15) mit jeweils heterogenem Alter (4 – 25 Jahre) sowie der unterschiedlichen Geschlechts- und Rassenstruktur.

Die Studienergebnisse der analysierten Serumkonzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  zeigen eine Zunahme, während die von IL-4 und VEGF nicht signifikant verändert war. Die erhöhten Konzentrationen von IL-8 und TNF- $\alpha$  waren zudem abhängig vom Alter der Pferde mit RAO.

Obwohl beim Menschen IL-4 an der Th2-Reaktion des Asthmas wesentlich beteiligt ist, finden sich für das Zytokin bei Pferden mit RAO keine einheitlichen Befunde, die für eine krankheitsabhängige Erhöhung der Konzentration in biologischen Flüssigkeiten sprechen (59). Die meisten Befunde für IL-4 wurden in der BAL von Pferden erhoben. Es sei allerdings erwähnt, dass IL-4 den Phänotyp neutrophiler Granulozyten bei Pferden aktiviert (34), wobei die Funktion von IL-4 in zirkulierendem Serum bei RAO bisher kaum untersucht wurde. In dieser Studie konnten wir ebenfalls keine Korrelation der IL-4 Konzentration in Serum mit der RAO feststellen.

Die Bedeutung von VEGF bei der RAO ist in Anbetracht fehlender Studien unklar. VEGF ist ein potenter Stimulator der Angiogenese, der vaskulären Permeabilität und dem „Remodeling“ der Blutgefäße generell und in den Atemwegen im Besonderen bei der RAO oder Asthma (59). Diese Eigenschaften des VEGF legen nahe, dass dieses Zytokin eine wichtige Rolle im Ablauf von Wundheilung und Gewebeprotektion in der Lunge spielt (60). Die Regulation der vaskulären Permeabilität ist hierbei ein wesentlicher Aspekt für den Ablauf entzündlicher Prozesse in den Bronchialwegen (61).

Untersuchungen an Menschen unter Hypoxie bei einer exazerbierten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) weisen darauf hin, dass VEGF unter den chronisch hypoxischen Bedingungen im Serum der Patienten erhöht ist (62). Obwohl Pferde mit RAO im Vergleich zu gesunden Pferden einen leicht gesteigerten Wert für VEGF aufwiesen, konnte in dieser Studie kein

signifikanter Unterschied festgestellt werden. Um den pathophysiologischen Stellenwert von VEGF bei der RAO näher zu charakterisieren, bedarf es daher weiterer Studien.

Die beobachtete Erhöhung der Serumkonzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  werden durch mehrere Untersuchungen zur Pathogenese der RAO bestätigt (63).

IL-6 wird als pleiotroper Modulator von Entzündungsreaktionen bezeichnet. Es ist in der Abfolge der Entzündungskaskade in den Atemwegen dem TNF- $\alpha$  untergeordnet. IL-6 kommt durch die Art seiner komplexen Regulation und Funktion im Orchester der anderen Zytokine und Zellen u. a. eine Schlüsselstellung in dem Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität hin zu Mechanismen der erworbenen Immunität innerhalb des Entzündungsprozesses zu. IL-6 gehört zu einer Zytokinfamilie, die ihre Funktionen über den Glykoproteinrezeptor gp130 vermitteln. Wie oben beschrieben, weisen Pferde mit RAO einen signifikant erhöhten Wert für IL-6 im Serum auf. Dies könnte als Folge des ebenfalls erhöhten TNF- $\alpha$  Wertes angesehen werden, wobei entsprechende Untersuchungen im Rahmen dieser Studie nicht möglich waren.

Als ein potenter Stimulator der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten besitzt IL-8 eine zentrale Rolle bei der neutrophilen Inflammation der Bronchialwege. Das Zytokin begünstigt nicht nur die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sondern auch die Freisetzung pro-inflammatorischer Inhaltsstoffe aus anderen Blutzellen und fördert somit die Perpetuierung des Entzündungsgeschehens im Rahmen von der RAO (63). Die positive Korrelation erhöhter Zellkonzentrationen neutrophiler Granulozyten mit IL-8 ist unter anderem durch die Studie von Ordonez et al. beim menschlichen Asthma belegt (64). Somit unterstützt der in dieser Studie gefundene erhöhte IL-8 Wert bei Pferden mit RAO die Hypothese, dass IL-8 eine Rolle bei der RAO zukommt. Diese Annahme wird unter anderem dadurch gestützt, dass die Blutkonzentration von IL-8 sowohl beim Menschen als auch beim Pferd unter vergleichbaren klinischen Bedingungen

(d. h. obstruktive Ventilationsstörung bei COPD respektive bei RAO) signifikant erhöht ist.

TNF- $\alpha$  gilt als ein pro-inflammatorisches Zytokin, das offensichtlich bei verschiedenen Aspekten der Pathologie des Asthma eine Rolle spielt. Seine Bedeutung ist allerdings für die RAO noch weitgehend unbekannt. Die während der letzten Jahre zunehmende pharmazeutische Entwicklung von TNF- $\alpha$  Antagonisten als neues Therapeutikum bei verschiedenen klinischen Indikationen beim Menschen (z. B. Rheuma) unterstreicht die potentielle Bedeutung dieses Zytokins bei zahlreichen Pathologien (36). Beim Menschen wurde kürzlich eine Verbesserung der Lebensqualität unter Behandlung mit TNF- $\alpha$  Antagonisten bei Patienten mit therapierefraktärem Asthma beobachtet. Bei entsprechend behandelten Patienten war eine signifikante Abnahme der Häufigkeit von Exazerbationen zu beobachten (36). Dass TNF- $\alpha$  relevant für die Entstehung obstruktiver Ventilationsstörungen sein könnte, basiert unter anderem auf der Beobachtung, dass die Inhalation von rekombinantem TNF- $\alpha$  bei Normalpersonen zur Hyperreaktivität der Atemwege sowie zu einer Neutrophilie führte (37, 38). TNF- $\alpha$  stimuliert zudem die zytotoxischen Effekte eosinophiler Granulozyten auf Endothelzellen und ist somit in die Aktivierung von entzündungsfördernden T-Zellen involviert (39, 40). Bezogen auf die oben beschriebene signifikante Erhöhung des TNF- $\alpha$  bei Pferden mit RAO lässt sich schließen, dass dieses Zytokin eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen könnte, wobei hierfür allerdings weitere Untersuchungen notwendig sind.

Die vorliegende Studie zeigt, dass das anti-inflammatorisch wirksame Neurohormon VIP bei der RAO gegenüber Kontrollen signifikant erniedrigt ist. Da die gemessene Serumkonzentration von VIP mit dem Schweregrad der klinischen Symptome von Pferden mit RAO assoziiert zu sein scheint, wurden die anderen Zytokin-konzentrationen mit denen von VIP korreliert. Hierbei ergab sich eine eindeutige inverse Korrelation zwischen VIP und den pro-entzündlichen Zytokinen TNF- $\alpha$  und VEGF, wobei die Korrelation mit letzterem Zytokin enger erscheint (siehe Tabelle 12). Dieser Befund ist allerdings auf eine relativ geringe Anzahl von Probandenpferden gestützt, sodass weitere

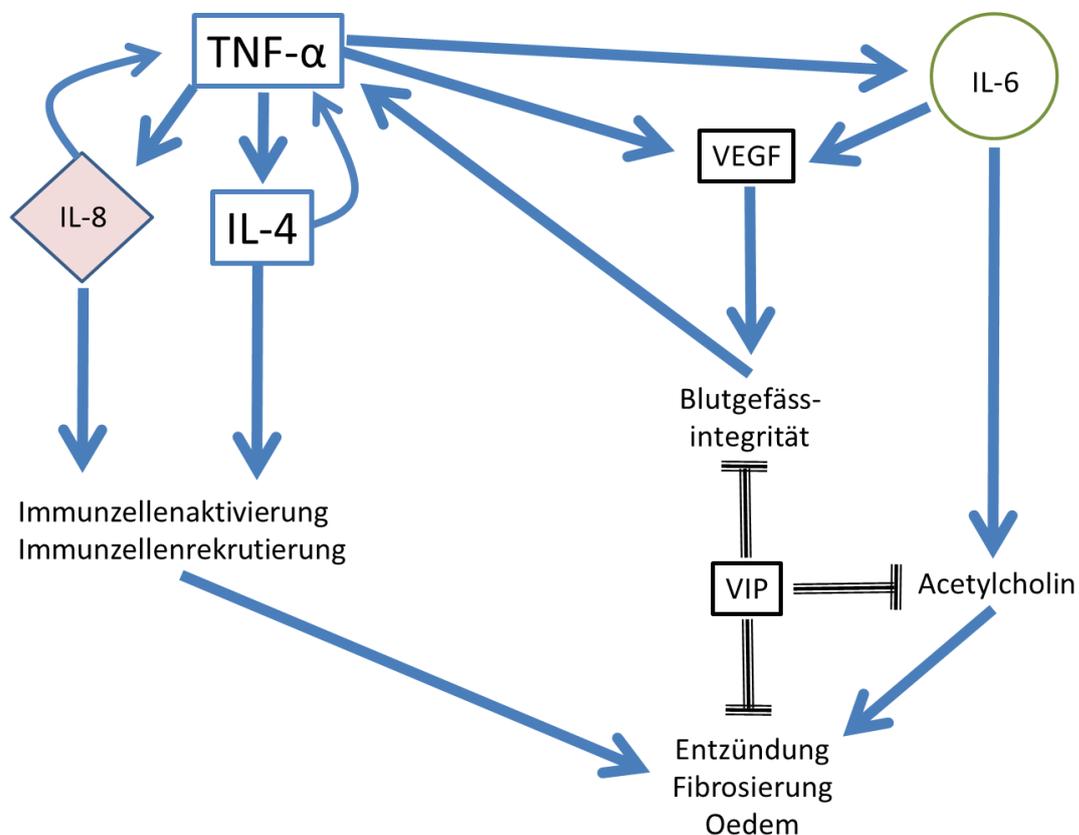
Untersuchungen in einem größeren Kollektiv möglicherweise zu überzeugenderen Resultaten führen könnten. Trotzdem könnte – vorbehaltlich einer Korrelation zwischen den pro-inflammatorischen Hormonen TNF-  $\alpha$ , VEGF und VIP -das Neurohormon eventuell als diagnostischer Indikator und als neues Therapeutikum zur Behandlung von der RAO Verwendung finden. Die Korrelation der Serumbefunde mit dem Alter und Geschlecht der Pferde war für IL-8 und TNF-  $\alpha$  sowie für VIP positiv. Aufgrund der gegensinnigen Expression der Zytokine ist eine gestörte Regulation für die Pathogenese der RAO von potentieller Bedeutung. Die beobachteten signifikanten Konzentrationsunterschiede von VIP bei den Kontrollen zwischen weiblichen und männlichen Tieren bedürfen weiterer Abklärung. Da diese bei Pferden mit RAO nicht differierten, scheinen sie für die Interpretation der Ergebnisse vermutlich nicht relevant zu sein.

Worauf gründet sich die Hypothese, die anti-inflammatorische Wirkung von VIP bei der RAO therapeutisch zu nutzen?

Alle Gene zur Steuerung der Inflammation, die beim menschlichen Asthma überexprimiert sind und die für pro-inflammatorische Zytokine kodieren, beinhalten eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-  $\kappa$ B innerhalb ihrer Promotoren (65). Bureau et al. (66) beobachtete, dass eine minimale NF-  $\kappa$ B Aktivität bei Kontrollen in den Bronchialzellen besteht, wo hingegen eine erhöhte Aktivität von NF-  $\kappa$ B bei RAO nachgewiesen wurde. Die gesteigerte Aktivität von NF-  $\kappa$ B konnte bis zu drei Wochen nach einer Exazerbation beobachtet werden, was eine gesteigerte Synthese und Freisetzung zahlreicher entzündungswirksamer Zytokine erklären könnte. In einer weiteren Studie desselben Autors korrelierte die erhöhte NF-  $\kappa$ B Aktivität mit der Anzahl von Granulozyten im Bronchialgewebe (67). Neben den oben erwähnten vielfältigen antientzündlichen Eigenschaften von VIP, dominiert seine Fähigkeit NF-  $\kappa$ B zu blockieren. Konsekutiv wird die Freisetzung von Zytokinen, die unter der Kontrolle von NF-  $\kappa$ B stehen, inhibiert. Die zusätzliche Eigenschaft von VIP, die erhöhten spezifischen Atemwegwiderstände bei einer Bronchokonstriktion zu antagonisieren, unterstützt seine potentielle Bedeutung als Therapeutikum.

Selbstverständlich sind die Implikationen für eine therapeutische Verwendung von VIP erst dann realistisch, wenn die vorliegende Studie mit einem wesentlich größeren Kollektiv wiederholt, und die präliminären Ergebnisse reproduziert worden sind. Die am Menschen gemachten Beobachtung einer guten Verträglichkeit von inhaliertem VIP (56), könnte eine Anwendung bei Pferden mit RAO begünstigen. Relevante Nebenwirkungen wurden bei klinischen Studien an Menschen bisher nicht beobachtet.

Die bekannten Interaktionen der in dieser Arbeit untersuchten RAO relevanten Faktoren sind in Abbildung 25 zusammengefasst.



**Abb. 25:** Darstellung der bekannten Interaktionen und der möglichen therapeutischen Wirkung des VIP beim Pferd mit RAO.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die wiederkehrende obstruktive Atemwegserkrankung der Pferde (RAO) stellt eine relativ häufige klinische Indikation in der Pferdemedizin dar, wobei die Pathogenese der Erkrankung nach wie vor ungeklärt ist. Neben zellulären dominieren humorale immunologische und pro-entzündliche Prozesse. Die vorliegende Studie dient der Darstellung der Interaktion spezifischer Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-8, respektive Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und einem bisher für die Pathologie der Erkrankung unbekanntem anti-inflammatorischen Faktor, dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP).

Methodisch wurden die Zytokine mittels ELISA im Serum gesunder ( $n = 16$ ; Kontrollen) und akut symptomatischer Pferde ( $n = 15$ ) qualitativ und quantitativ bestimmt. Nach dem Vergleich der Werte erkrankter Tiere gegenüber den Kontrollen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , während die von IL-4 und VEGF nicht statistisch relevant verändert war. Im Gegensatz hierzu, war die Konzentration von VIP signifikant geringer. Die erhöhten Konzentrationen von IL-8 und TNF- $\alpha$  und die erniedrigten von VIP waren zudem altersabhängig. Demnach scheint eine negative Korrelation zwischen den beiden entzündungsfördernden Zytokinen und dem anti-inflammatorischen VIP zu bestehen.

Diese Befunde unterstreichen einen möglicherweise relevanten pathophysiologischen Zusammenhang zwischen den genannten pro-inflammatorischen Faktoren sowie einen potentiellen Stellenwert des VIP für die Anwendung eines neuen anti-inflammatorischen Therapeutikums zur Behandlung der RAO.

## VII. SUMMARY

### **Study on the recurrent airway obstruction of the horses: Potential pathophysiologic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), and vasoactive intestinal peptide (VIP)**

The recurrent airway obstruction of the horse (RAO) represents a relatively common clinical disease entity in equine medicine. However, the pathogenesis of the disease still remains unclear. The underlying processes involve cellular, immunologic and inflammatory events. The present study serves to characterize the interaction between specific cytokines like interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) and the anti-inflammatory factor vasoactive intestinal peptide (VIP) and it's potential role in RAO.

The cytokines were examined in the serum of 16 healthy horses (controls) and in 15 horses with acute exacerbation using an ELISA. Comparison of the results of symptomatic horses against controls revealed a significantly increased serum concentration of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  and an almost unchanged one of IL-4 and VEGF. In contrast, the concentration of VIP was significantly lower. The increased concentration of IL-8 and TNF- $\alpha$  and the reduced levels of VIP were dependent on the age of the horses. Thus, there is an apparent negative correlation between the two pro-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory VIP.

To conclude: the data underline a potentially relevant antagonism between the two pro-inflammatory hormones and the anti-inflammatory peptide, which could serve for the development of a new anti-inflammatory therapy for the treatment of RAO.

## VIII. LITERATUR

1. Robinson NE. Recurrent Airway Ostruction (Heaves), *Equine Respiratory Diseases*, International Veterinary Information Service, New York, 2001.
2. Bouley H. In: Raige-Delorme MM, Daremberg C, Bouley H et al.(eds) *Nouveau dictionnaire lexicographique et descriptif des sciences médicales et vétérinaires*. Asselin, Paris, 1863; 1073–4.
3. Lowell FC. Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1964; 35: 322–30.
4. Jackson CA., Berney C., Jefcoat AM., Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves), *Equine Veterinary Journal*, 2000; 32 (5): 432-438.
5. Pirie RS., Dixon PM., McGorum BC. Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin Exp Allergy*, 2003; 33 (9): 1289-96.
6. Jefcoat AM., Hotchkis JA., Gerber V., Harkema JR., Basbaum CB., Robinson NE. Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001; 281: L704-L712.
7. Rose RJ., Hodgson DR., *Manual of Equine Practice*, 2002; Copyright WB Saunders
8. Sasse H. Clinician's perspective of equine airway disease (heaves) in "International Workshop on Equine Chronic Airway Disease", *Equine Veterinary Journal*, 2001; 33 (1): 5-19.
9. Marti E, Gerber H, Essich G et al. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet. J.* 1991; 23: 457–60.
10. Ramsayer A, Gaillard C, Burger D, et al. *Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses J. Vet. Intern. Med.* 2007;21:149-56

11. Neuhaus S, Bruendler P, Frey CF *et al.* Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a highprevalence family. *J. Vet. Intern. Med.* 2010;24:407-13
12. Barnes KC, Grant AV, Gao P, A review of the genetic epidemiology of resistance to parasitic disease and atopic asthma; common variants for common phenotypes? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005;5:379-85
13. Robinson NE. International workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet. J.* 2001; 33: 5–19.
14. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet. J.* 1993; 25: 261–7.
15. Dales RE, Munt PW. Farmer's lung disease. *Can. Fam. Physician* 1982; 28: 1817–20.
16. Lawson GH, McPherson EA, Murphy JR *et al.* The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet. J.* 1979; 11: 172–6.
17. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M *et al.* Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 1410–13.
18. Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O *et al.* IL-4, IL-5 and IFN $\gamma$  mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; **97**: 87–96.
19. Giguère S, Viel L, Lee E, MacKay R. J., Hernandez J, Frnachini M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; **85**: 147-158.
20. El Biaze M, Boniface S, Koscher V *et al.* T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; **58**: 844–53.
21. McGorum BC, Ellison J, Cullen RT. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet. J.* 1998; **30**: 430–4.

22. Berndt A, Derksen FJ, Edward Robinson N. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet. J.* 2010; **183**: 54–7.
23. Pirie RS, McLachlan G, McGorum BC. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: preparation and composition of HDS. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 332–6.
24. Lavoie J-P. Recurrent airway obstruction (Heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE *et al.* (eds) *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Saunders, Edinburgh, 2007; 565–89.
25. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC *et al.* Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 2005; **35**: 854–65.
26. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinus-Lymburner E *et al.* Effect of antigen exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; **45**: 181–7.
27. Lindberg A, Robinson NE, Nasman-Glaser B *et al.* Assessment of leukotriene B4 production in leukocytes from horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2004; **65**: 289–95.
28. Ainsworth DM, Grunig G, Matychak MB *et al.* Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003; **96**: 83–91.
29. Giguere S, Viel L, Lee E *et al.* Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; **85**: 147–58.
30. Debrue M, Hamilton E, Joubert P *et al.* Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **105**: 25–31.
31. Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M *et al.* Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2006; **67**: 669–77.

32. Franchini M, Gill U, von Fellenberg R *et al.* Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am. J. Vet. Res.* 2000; **61**: 1369–74.
33. Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G *et al.* Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.* 2000; **165**: 5822–30.
34. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD *et al.* Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet. J.* 2001; **33**: 311–18.
35. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R *et al.* Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, 10: 471-480
36. Brightling C, Berry M, Amrani Y: Targeting TNF- $\alpha$ : A novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 12 (1): 5-10
37. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ: Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152: 76-80
38. Thomas PS, Heywood G: Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 2002, 57: 774-778
39. Slungaard A, Vercelloti GM, Walker G, Nelson RD, Jacob HS: Tumor necrosis factor alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium. *J Exp Med* 1990, 171: 2025-2041
40. Scheurich P, Thoma B, Ucer U, Pfizenmaier K: Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987, 138: 1786-1790
41. Touissaint M, Fievez L, Desmet Cj *et al.* "Increased hypoxia-inducible factor 1alpha expression in lung cells of horses with recurrent airway obstruction "*BMC Veterinary Research* 2012, 8:64
42. T.T.J.M. Iaan, S. Bull, R.A.van Nieuwstadt and J.Fink-Gremmels (2006) "The Effect of Aerosolized and Intravenously Administered Clenbuterol

- and Aerosolized Fluticasone Propionate on Horses Challenged with Aspergillus fumigatus Antigen” *Veterinary Research Communications* Volume 30, Number 6 (pp.623-635)
43. Tamarinde TJM Laan (2001) “Serum Cortisol Concentrations in Response to Fluticasone Propionate Inhalation Therapy in Horses “*The 20<sup>th</sup> Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society*(2) (<http://www.thevcrs.org/2001-Edinburgh-Abstracts-1.pdf>)
  44. Said SI, Mutt V: Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 1970, 169:1217-8.
  45. Onoue S, Yamada S, Yajima T: Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD. *Peptides* 2007, 28:1640-50.
  46. Said SI: Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Invest* 1986, 9:191-200. Said SI, Mutt V, Yoshida T, Hara N: Vasoactive polypeptides from normal lung. *Chest* 1975, 67:44S.
  47. Ghatei MA, Sheppard MN, O’Shaughnessy DJ, Adrian TE, McGregor GP, Polak JM, Bloom SR: Regulatory peptides in the mammalian respiratory tract. *Endocrinology* 1982, 111:1248-54.
  48. Saga T, Said SI: Vasoactive intestinal peptide relaxes isolated strips of human bronchus, pulmonary artery, and lung parenchyma. *Trans Assoc Am Physicians* 1984;97:304-10
  49. Palmer JB, Cuss FM, Barnes PJ: VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J Appl Physiol* 1986, 61:1322-8. *Am Physicians* 1984, 97:304-10.
  50. Smalley SG, Barrow PA, Foster N: Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 2009, 157:225-34.
  51. Szema AM, Hamidi SA, Lyubsky S, Dickman KG, Mathew S, Abdel-Razek T, Chen JJ, Waschek JA, Said SI: Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291:L880-6.
  52. Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J and Gomariz, R.P. 2001. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by

- downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat. Med.* 7;563-569
53. Metwali A, Blum AM, Ferraris L, Klein JS, Fiocchi C, Weinstock JV: Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol* 1994, 52:69-78.
  54. O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Cataland S, Balcerzak SP: Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1980, 96:666-72.
  55. Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M: Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 921:92-102.
  56. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH: Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2003, 111:1339-46.
  57. Haberl I, Frei K, Ramsebner R, Doberer D, Petkov V, Albin S, Lang I, Lucas T, Mosgoeller W: Vasoactive intestinal peptide gene alterations in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur J Hum Genet* 2007, 15:18-22.
  58. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J-P: Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 2011, 16: 1027-1046
  59. Joubert P, Silversides DW, Lavoie J.-P.: Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon- $\gamma$ . *Equine vet. J.* 2001, 33 (7): 730-733
  60. Hatoum OA, Miura H, Binion DG: The vascular contribution in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285 (5): H1791-1796
  61. Gomulka K, Liebhart J: Vascular endothelial growth factor – structure, function and role in airways inflammation and the clinical course of asthma. *Pneumolol Allergol Pol* 2009, 77 (6): 549-553

62. Pavlisa G<sup>1</sup>, Pavlisa G<sup>2</sup>, Kusec V, Ostojic Kolonic S: Serum levels of VEGF and bFGF in hypoxic patients with exacerbated COPD. *Eur. Cytokine Netw.* 2010, 21 (2): 92-8
63. Giguère S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M: Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopath* 2002, 85: 147-158
64. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV: Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 1185-1190
65. Baeuerle PA, Baichwal VR: NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997, 65: 111-137
66. Bureau F, Bonizzi G, Kirschvink N, Delhalle S, Desmecht D, Merville MP, Bours V, Lekeux P: Correlation between nuclear factor- $\kappa$ B activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 1314-1321
67. Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G, Fievez L, Dogne S, Kirschvink N, Vanderplasschen A, Merville MP, Bours V, Lekeux P: Mechanisms of persistent NF- $\kappa$ B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol* 2000, 165: 5822-5830

## IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACC.....	Acetylcystein
BAL .....	bronchalveolare Lavage
COPD .....	chronic obstructive pulmonary disease
ELISA .....	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IAD .....	entzündliche Erkrankung der Bronchialwege
IgE .....	Immunglobulin-E
IgG .....	Immunglobulin-G
IL .....	Interleukin
mRNA.....	Messenger-RNA
NF- $\kappa$ B .....	nukleärer Transkriptionsfaktor
ng .....	Nanogramm
pg .....	Picogramm
RAO .....	wiederkehrende Atemwegsobstruktion des Pferdes
$r^2$ .....	Regressionskoeffizient
$R^2$ .....	Bestimmtheitsmass der Regression
TNF- $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGF .....	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIP .....	vasoaktives intestinales Peptid

## X. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Gerhards für die Überlassung des Themas sowie für konstruktive Anregungen beim Verfassen der Dissertation.

Herrn Prof. Roth danke ich für die professionelle Anleitung bei der Durchführung der Laboruntersuchungen.