

Pilotstudie zur passiven Sensibilisierung mit Ovalbumin an Precision-Cut-Lung-Slices (PCLS) des Pferdes

Ann Kristin Barton¹, Frank Niedorf², Jens Rohwer³ Manfred Kietzmann² und Bernhard Ohnesorge¹

Klinik für Pferde¹, Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie² und Institut für Veterinärimmunologie³ der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Die Hyperreagibilität der kleinen Atemwege ist ein Merkmal der equinen Recurrent Airway Obstruction (RAO). An Ratten, Mäusen und Menschen wurde gezeigt, dass diese Hyperreagibilität in vitro durch spezifische Antikörper enthaltene Serum von sensibilisierten auf nicht sensibilisierte Individuen übertragen werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, das Modell der passiven Sensibilisierung auf das equine PCLS-Modell zu übertragen und ein Versuchsprotokoll zu etablieren, durch das weitere Studien hinsichtlich therapeutischer Ansatzpunkte der RAO möglich werden. Precision cut lung slices (PCLS) von 7 Pferden wurden in 10%igem Serum von einem Pferd inkubiert, das zuvor gegen Ovalbumin aktiv immunisiert worden war. Von einem nicht gegen Ovalbumin sensibilisierten Kontrollpferd wurde Serum gewonnen, mit dem Kontrollschnitte inkubiert wurden. Nach der Seruminkubation wurde 1%iges Ovalbumin zu den PCLS gegeben, um eine Bronchokonstriktion auszulösen. Das Lumen der Bronchiolen wurde vor und zum Zeitpunkt 2 und 10 Minuten nach Zugabe von Ovalbumin vermessen. PCLS von vier der fünf vollständig auswertbaren Probanden, die zuvor im Serum des sensibilisierten Pferdes inkubiert worden waren, zeigten eine signifikante Reduktion des Bronchuslumens zwei Minuten nach der Zugabe von Ovalbumin. Nach 10 Minuten trat eine signifikante Reduktion des Bronchuslumens noch bei den PCLS von zwei dieser vier Pferde auf, während die Kontrollschnitte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Reduktion zeigten. Zusammenfassend zeigt die Studie, dass eine passive Sensibilisierung equiner PCLS möglich ist. Das Ergebnis dieser Studie bestätigt die Hypothese, dass immunologische Reaktionen an der Entstehung zumindest einiger Formen chronischer Lungenerkrankungen beteiligt sein könnten.

Schlüsselwörter: passive Sensibilisierung, Ovalbumin, Pferd, COB, RAO, Bronchokonstriktion

Pilot study on passive sensitization against ovalbumin using equine Precision Cut Lung Slices (PCLS)

Hyperreactivity of small airways is one feature of equine recurrent airway obstruction (RAO). It was shown in rats, mice and humans that hyperreactivity is not only acquired by active immunisation, but can be conferred in vitro from sensitized to non-sensitized individuals using serum containing specific antibodies. The aim of this study was to establish a model of passive sensitization in equine PCLS and to work out a protocol that would allow further studies of underlying mechanisms and treatment options in RAO. Precision cut lung slices (PCLS) from 7 horses were incubated in 10% serum from a horse previously sensitized to ovalbumin by active immunisation and inhalative challenge. A control horse that had not been sensitized to ovalbumin donated serum to incubate control PCLS. After incubation PCLS were treated with 1% ovalbumin to induce bronchoconstriction. The bronchiole lumen was measured before, 2 and 10 minutes after addition of ovalbumin. PCLS of four out of five analysable horses, that had been incubated in serum from the sensitized horse, showed a significant reduction of the bronchiole lumen two minutes after the addition of ovalbumin, while there were no significant reductions in bronchiole lumen in the control PCLS at any time. After 10 minutes, only PCLS of two horses still showed a significant reduction in bronchiole lumen. In conclusion, passive sensitization was found to be possible in equine PCLS. Results of this study confirm the hypothesis that immunologic reactions may contribute at least to some chronic pulmonary diseases.

Keywords: passive sensitization, ovalbumin, horse, RAO, bronchoconstriction

Einleitung

Atemwegserkrankungen, vor allem die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COB), stellen beim Sportpferd einen wichtigen nutzungslimitierenden Faktor dar (Deegen 1986). Der im englischsprachigen Raum verwendete Begriff der „Recurrent Airway Obstruction“ (RAO) impliziert eine schubweise auftretende Hyperreagibilität der kleinen Atemwege, bei der eine möglicherweise primär allergische Reaktion gegen inhalierte Antigene wie Aspergillus species zu chronischen Veränderungen der Bronchialwand führt (Verdickung, Hypertrophie der glatten Muskulatur, Reduktion inhibitorischer Mechanismen), und schließlich in einer unspezifischen Hyperreagibilität gegen eine Vielzahl von Stimuli mündet.

Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist vielfach untersucht worden. Cysteinhaltige Leukotriene und in geringerem Maße auch Histamin dienen als Mediatoren im sensibilisierten

Gewebe (Schild et al. 1951, Davis et al. 1982, Yamaguchi et al. 1982, Creese et al. 1986, Björk et al. 1990, Malo et al. 1994). Das Modell der Precision-Cut-Lung-Slices (PCLS) (Martin et al. 1996), welches durch Vietmeier et al. (2007) auch für das Pferd etabliert wurde, eröffnet die Möglichkeit, pharmakologische und pathophysiologische Grundlagen des Bronchospasmus in vitro an lebenden Lungenschnitten (ex vivo) zu untersuchen. In früheren Studien am PCLS-Modell konnte so auch beim Pferd eine Bronchokonstriktion bei gesunden und an COB erkrankten Probanden durch Histamin und Leukotriene induziert werden (Vietmeier et al. 2007, Schwalfenberg 2007, Barton et al. 2010). An Ratte, Maus und beim Menschen konnte gezeigt werden, dass eine Hyperreagibilität nicht nur durch aktive Immunisierung erworben, sondern in vitro durch im Serum enthaltene spezifische Antikörper von sensibilisierten auf nicht sensibilisierte Individuen übertragen werden kann. So führte die Zugabe von Gräserpollen-Extrakt zu humanen PCLS von nicht allergischen

Patienten, die über Nacht im Serum sensibilisierter Probanden inkubiert worden waren, zu einer sofortigen Kontraktion kleiner Bronchien (Wohlsen et al. 2001).

Über den Mechanismus der passiven Sensibilisierung ist im Gegensatz zur aktiven bislang wenig bekannt. In verschiedenen Studien wurden Änderungen des elektrischen Potentials der glatten Muskulatur (postjunctional factors) als Ursache der Hyperreagibilität diskutiert, z.B. Veränderungen der Geschwindigkeit und der Stärke der glatten Muskelzellverkürzung (Mitchell et al. 1994), eine veränderte Ca^{2+} -Mobilisation (Black et al. 1989) und Veränderungen in durch die Proteinkinase C vermittelten Reaktionen (Rossetti et al. 1995). Die Rolle des IgE im sensibilisierenden Serum und sein Beitrag zur spezifischen bzw. unspezifischen Hyperreagibilität sind bislang wenig untersucht (Rabe et al. 1998). Es ist nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen Reagibilitätsgrad und Konzentration von allergen-spezifischem IgE gibt, ob IgE allein eine spezifische (allergenvermittelte) oder unspezifische (histaminvermittelte) Reaktion auslöst oder ob die allergen- und histaminvermittelten Reaktionen unabhängig voneinander ablaufen. Rabe et al. (1998) konnten jedoch zeigen, dass der anti-IgE-Antikörper 17-9 eine passive Sensibilisierung von humanen Bronchien verhindern konnte.

Der IgE-Gehalt im Serum eines sensibilisierten Patienten scheint den Expressionsgrad des Fc RI-Rezeptors zu regulieren, wie durch die Behandlung humaner Probanden mit anti-IgE Antikörpern und die folgende 96%ige Reduktion von Fc RI-Rezeptoren auf Basophilen und entsprechend reduzierter Funktion dieser Zellen ex vivo gezeigt werden konnte (MacGlashan et al. 1997). Die anti-IgE Antikörper führten außerdem zu einer signifikant reduzierten pulmonalen Infiltration mit eosinophilen Granulozyten nach inhalativer Allergen-Challenge (Coyle et al. 1996). Dieser Effekt wird durch die Blockade der Bindung zwischen IgE und CD 23, einem niedrig affinen Rezeptor für IgE (Fc RI) erreicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, dieses Modell der passiven Sensibilisierung auf das equine PCLS-Modell zu übertragen und ein Versuchsprotokoll zu etablieren, durch das weitere Studien hinsichtlich therapeutischer Ansatzpunkte der RAO möglich werden.

Material und Methode

Vor Beginn des Hauptversuches der Studie wurde ein Proband gegen Ovalbumin (Albumin from chicken egg white, Grade V, Sigma, Deutschland) sensibilisiert (Az 33.42502-05-07A487). Dieses erfolgte nach dem Protokoll von Bowles et al. (2002), wobei zunächst 10 mg Ovalbumin in 225 mg Aluminium in die lange Sitzbeinmuskulatur injiziert wurden. Nach jeweils zwei und vier Wochen wurde die Reaktion durch eine 2 x 5 tägige Inhalation von 120 ml 0,125%iger Ovalbumin-Lösung über einen Ultraschall-Vernebler geboostert (Air One, Hippomed/Neu-Tech GmbH, Deutschland). Wiederrum 14 Tage später wurde Serum des so sensibilisierten Pferdes nach venöser Blutentnahme gewonnen und bei $-18^{\circ}C$ kryokonserviert (Abb. 1).

Im Institut für Veterinärimmunologie erfolgte eine Serumuntersuchung auf Immunglobuline gegen Ovalbumin bei

dem zuvor sensibilisierten Probanden sowie bei einem nicht gegen Ovalbumin immunisierten Kontrollpferd. Von dem sensibilisierten Pferd lagen zwei Proben 14 Tage nach Beendigung der Sensibilisierung und 4 Wochen später vor. Die Seren des sensibilisierten und des Kontrollpferdes wurden mittels indirektem ELISA-Verfahren in den Endverdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10.000 und 1:100.000 unter Einbeziehung relevanter Kontrollansätze auf das Vorliegen Ovalbumin-bindender Immunglobuline untersucht.

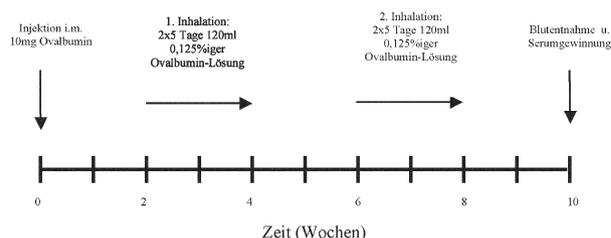


Abb. 1 Zeitplan zur Sensibilisierung eines Pferdes mit Ovalbumin
Time schedule to sensitize a horse against ovalbumin

Die Möglichkeit, Lungengewebe passiv zu sensibilisieren, wurde an PCLS von sieben Pferden untersucht, die aufgrund einer infausten Prognose (z.B. beidseitiger Blindheit) euthanasiert werden mussten. Vor der Euthanasie erfolgten eine klinische Atemwegsuntersuchung, eine Blutgasanalyse, eine Endoskopie der Atemwege mit Tracheobronchialsekret-Analyse und bronchoalveolärer Lavage. Direkt nach der Euthanasie, Herzstillstand und Erlöschen der Reflexe wurde der rechte Brustkorb im 9. Interkostalraum eröffnet, der Lobus accessorius der rechten Lunge entnommen (Vietmeier et al. 2007) und dieser in steriler, physiologischer Kochsalzlösung im Eisbad auf ca. $4^{\circ}C$ gekühlt.

Nach Verschluss kleiner Bronchien mittels Pean-Klemmen gelang die Befüllung des entnommenen Lobus accessorius mit verflüssigter „Low melting point-Agarose“ ($37^{\circ}C$, 3%, Typ VII, Sigma-Aldrich-Chemie, Deutschland), 1:1 gemischt mit Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, Biochrom AG Berlin) durch Injektion über den zuführenden Segmentbronchus. Nach Abkühlung auf Eis und der damit verbundenen Verfestigung der Agarose konnten Gewebeblocke mit einem zentralen Bronchus ausgestanzt und aus diesen mit einem Gewebeschneider (Krumdiek Tissue Slicer) ca. $400\mu m$ dicke Längsschnitte hergestellt werden. Die Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte unter einem inversen Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen) mit angeschlossener Digitalkamera, über welche die Lumina der beobachteten Bronchien mit den Programmen „Irfan View“ und „Scion Image Version Beta 4.0.2“ (www.scioncorp.com) ausgemessen werden konnten. Vitale Schnitte (aktives Flimmerepithel, intakte Epithelgrenzen) wurden über Nacht in $37^{\circ}C$ warmem RPMI-Medium im Wärmeschrank inkubiert, um die Agarose aus dem Bronchuslumen auszuwaschen.

Am folgenden Tag erfolgte eine weitere Beurteilung der PCLS unter dem Mikroskop und Evaluation der Vitalität der Schnitte durch Zugabe von $10^{-5} mol/l$ Metacholin (Barton et al. 2010). Im nachfolgenden Versuch wurden nur Schnitte in die statistische Auswertung einbezogen, die bei dieser Probekontraktion mit Metacholin innerhalb von 3 Minuten ein Lumen-

reduktion von mindestens 50% zeigten. Anschließend wurden die PCLS dreimal mit reinem RPMI-Medium gewaschen, um eine Wiederöffnung der Bronchien zu erreichen.

Die passive Sensibilisierung der Schnitte erfolgte durch eine vierstündige Inkubation der PCLS in 10%igem Serum bei 37° C im Wärmeschrank. Je 6-12 Schnitte wurden in einer Versuchs- und Kontrollgruppe mit Serum von sensibilisierten bzw. nicht sensibilisierten Pferden behandelt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe einer 1%igen Ovalbumin-Lösung sowohl zu den PCLS der Versuchs- als auch der Kontrollgruppe. Die Reaktion der Bronchien wurde nach 2 und 10 min vergleichend zum Ausgangswert erfasst. Um negative Auswirkungen des Verfahrens auf die Vitalität der PCLS auszuschließen, wurde die erhaltene Kontraktilität der Schnitte nach Abschluss der Versuchsphase durch erneute Inkubation mit Metacholin (10^{-5} mol/l) überprüft. Nur PCLS, die auch hier eine mindestens 50% Bronchuslumenreduktion zeigten, wurden in der nachfolgenden statistischen Auswertung berücksichtigt.

Die Veränderungen der Bronchuslumina 2 und 10 min nach Ovalbuminzugabe im Vergleich zum Ausgangswert nach der Inkubation im Serum wurden mittels eines one-way-ANOVA für gepaarte Stichproben auf statistische Signifikanz untersucht. Da von verschiedenen Pferden unterschiedlich viele PCLS Eingang in die statistische Auswertung fanden, erfolgte eine individuelle Auswertung für die Versuchs- und Kontrollgruppe der einzelnen Pferde. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p -Wert $<0,05$) wurde hierbei als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Bei der klinischen Atemwegsuntersuchung wurden vier Pferde als gesund oder geringgradig erkrankt, drei Pferde als mittel- bis hochgradig COB-erkrankt klassifiziert (Tab. 1). Im Serum des sensibilisierten Pferdes war ein Antikörper-Titer von

10.000 gegen das eingesetzte Ovalbumin nachweisbar, während bei dem Kontrollpferd keine Ovalbumin-bindenden Antikörper nachzuweisen waren. Vier Wochen später war der Titer des sensibilisierten Pferdes auf den Titer des Kontrollpferdes gefallen (Abb. 2).

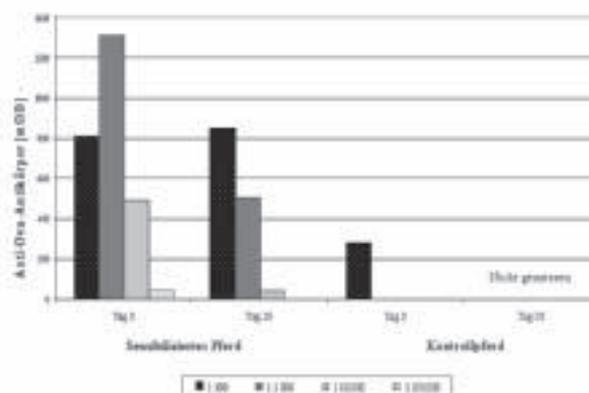


Abb. 2 Photometrische Messung der optischen Dichte [mOD] korrelierend zum Serum-Antikörpergehalt gegen Ovalbumin (Ova), an Tag 0 und 28 nach Inhalation in den Verdünnungsstufen 1:100 bis 1:100.000

Photometric measurement of optical density [mOD] correlating with serum antibodies against ovalbumin on day 0 and 28 post inhalative challenge in dilutions 1:100 to 1:100000

Bei vier von fünf auswertbaren Pferden konnte eine signifikante Bronchuslumenreduktion zwei Minuten nach Ovalbuminzugabe bei den Versuchsschnitten (nach passiver Sensibilisierung) nachgewiesen werden, während es bei den Kontrollschnitten (nach Inkubation in Kontrollserum) bei keinem der Probanden zu einer signifikanten Bronchuslumenverengung kam. Nach 10 min zeigten nur noch zwei der o.g. vier Pferde nach Inkubation in anti-Ovalbumin-Serum eine signifikante Bronchuslumenverengung während bei den Kontrollschnitten wiederum keine Lumenreduktion nachweisbar war. Abb. 3 zeigt exemplarisch einen Bronchialschnitt (Pferd Nr. 1) nach passiver Sensibilisie-

Tab 1 Darstellung auffälliger Befunde in der klinischen Atemwegsuntersuchung (WB = Warmblut, VB = Vollblut, H = Hengst, W = Wallach, S = Stute, hgr = hochgradig, mgr = mittelgradig, ggr = geringgradig, n.d. = nicht durchgeführt), vereinfacht dargestellt nach dem Untersuchungsscore von Ohnesorge et al. (1998)

Proband	1	2	3	4	5	6	7
Rasse	WB	WB	VB	WB	WB	WB	WB
Alter	11	10	9	15	14	22	12
Geschlecht	W	S	S	W	W	S	S
Allgemeinuntersuchung	+	-	-	-	-	-	-
Ruhedyspnoe	+	-	-	-	-	-	-
Perkussion	+	-	-	-	-	-	+
Auskultation	+	-	-	-	+	-	-
Endoskopie	+	-	-	-	+	+	+
TBS-Analyse	+	n.d.	n.d.	+	+	+	-
BALF-Analyse	+	+	+	+	+	+	+
Erkrankungsgrad	hgr	ggr	ggr	ggr	mgr	mgr	ggr

nung und nach Inkubation in Kontrollserum, zwei und zehn Minuten nach Ovalbumingabe. Alle PCLS von Pferd 2 und die Versuchsschnitte von Pferd 4 konnten statistisch nicht ausge-

wertet werden, da von diesen Probanden nicht ausreichend viele vitale PCLS vorlagen bzw. die Bronchokonstriktion nach Metacholinchallenge zu gering ausgefallen war.

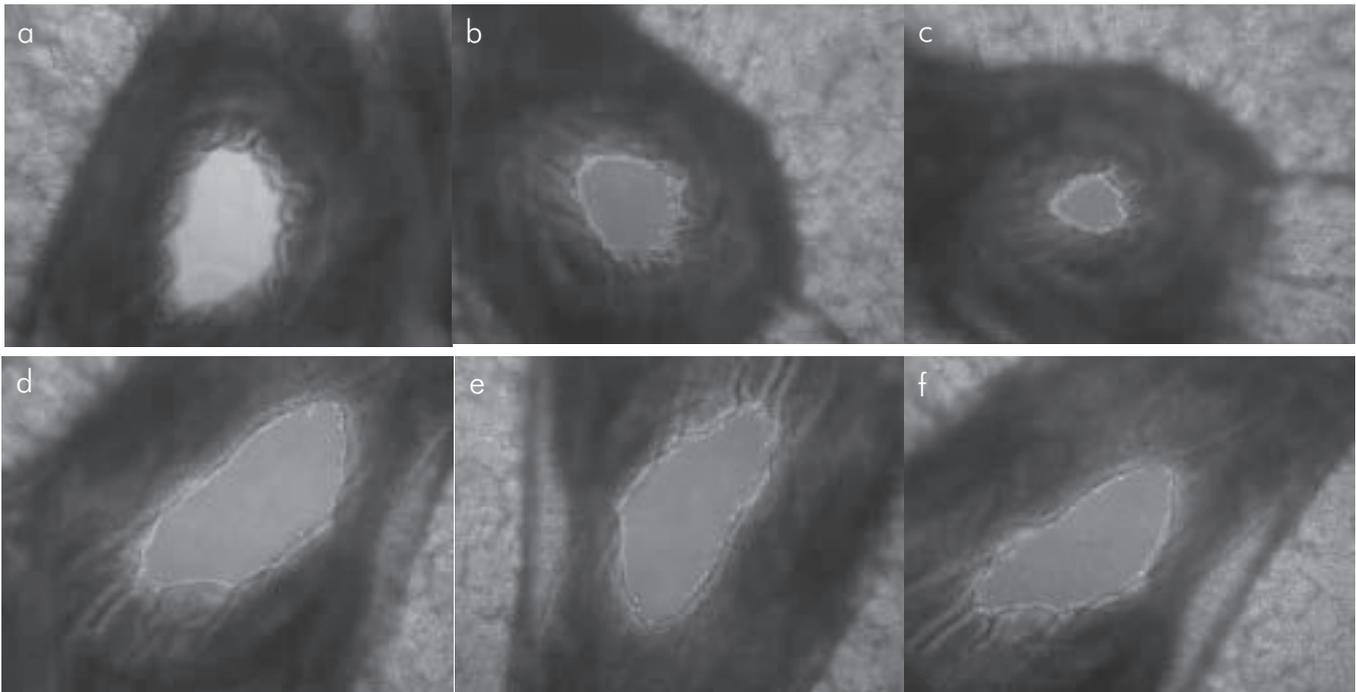


Abb. 3 Ausgangslumen und Bronchokonstriktion nach passiver Sensibilisierung eines PCLS (Pferd 1), vor (a) sowie 2 min (b) und 10 min (c) nach Ovalbuminzugabe. Im Vergleich dazu fehlende Bronchokonstriktion bei einem PCLS nach Inkubation in Kontrollserum vor (d) sowie 2 min (e) und 10 min (f) nach Ovalbuminzugabe
Original lumen and bronchoconstriction following passive sensitization of a PCLS (horse 1), before (a), 2 min (b) and 10 min (c) after addition of ovalbumin. In contrast to this bronchoconstriction is missing after incubation of a PCLS in control serum before (d), 2 min (e) and 10 min (f) after addition of ovalbumin

Tab. 2 Bronchokonstriktion 2 und 10 min nach Zugabe von Ovalbumin nach passiver Sensibilisierung bzw. Inkubation in Kontrollserum. Darstellung des Bronchuslumens in Prozent des Ausgangslumens vor Ovalbuminzugabe, Pferd 2 nicht auswertbar wegen zu geringer MCh-Response

Pferd Nr.	Versuchsschnitte (1:10.000)			Kontrollschnitte (1:0)		
	2 min	10 min	p-Wert d. ANOVA	2 min	10 min	p-Wert d. ANOVA
1	61.2 +/- 22.7 *	51.2 +/- 40.9 *	0.0145	94.9 +/- 13.5 n.s.	103.9 +/- 0.9 n.s.	0.4235
3	86.3 +/- 11.2 n.s.	87.0 +/- 29.6 n.s.	0.4815	100.4 +/- 3.1 n.s.	98.1 +/- 4.6 n.s.	0.6893
4	102.2 +/- 2.3	101.9 +/- 9.9	Zu wenig PCLS	106.0 +/- 11.8 n.s.	90.5 +/- 38.2 n.s.	0.3933
5	85.0 +/- 14.1 *	93.1 +/- 23.0 n.s.	0.0479	96.8 +/- 18.4 n.s.	99.9 +/- 25.3 n.s.	0.8219
6	91.8 +/- 1.4 *	96.6 +/- 5.7 *	0.0124	108.2 +/- 16.2 n.s.	121.9 +/- 15.3 n.s.	0.056
7	69.3 +/- 19.2 *	123.7 +/- 32.5 n.s.	0.0056	102.6 +/- 10.6 n.s.	117.2 +/- 26.2 n.s.	0.3017

Diskussion

Die RAO tritt bei hyperreagiblen Pferden als Reaktion auf die Inhalation bestimmter Allergene auf (Robinson et al. 1996, Matera et al. 2002). Bronchokonstriktion und Inflammation der kleinen Atemwege sind für die RAO charakteristisch und führen zur Obstruktion der Atemwege (Schoon und Deegen 1983, Fairbairn et al. 1993, Robinson et al. 1996, Olszewski et al. 1999). Hinsichtlich der beteiligten Antigene wurden zwischen erkrankten und gesunden Probanden unterschiedliche IgE und IgG-Level in der BALF gegen verschiedene Schimmelpilze gefunden, wobei die Ergebnisse nicht zwangsläufig eindeutig sind (Schmallenbach et al. 1998, Eder et al. 2000), so dass weitere Modelle zur Diagnostik auf diesem Gebiet erstrebenswert sind. Da vor allem hinsichtlich des Nachweises in BALF und Serum Unterschiede bestehen (Schmallenbach et al. 1998), ist ein Modell am lebenden Lungengewebe der Situation in vivo vergleichbarer. Wie bereits für die aktive Sensibilisierung beschrieben (Bowles et al. 2002), könnte auch die passive Sensibilisierung als Modell für weitere Studien über die RAO des Pferdes dienen.

Beim humanen allergischen Asthma gilt ein Zusammenhang zwischen IgE Konzentrationen im Serum und Hyperreagibilität der kleinen Atemwege als gesichert, und die passive Sensibilisierung von Lungengewebe mit IgE-haltigem Serum von Asthmatikern führt in vitro zu erhöhter Kontraktilität nach Challenge mit verschiedenen Agonisten (Berger et al. 1998). Haegen et al. (2005) konnten in Lungengewebeproben von RAO-Patienten und Kontrollpferden zwar keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IgE-Konzentration nachweisen, wohl aber in den Konzentrationen von Mastzellen in den Wänden der Bronchien, Bronchiolen und Blutgefäßwänden. Auch andere Autoren haben auf die Bedeutung der Mastzellen bei allergischen Lungenerkrankungen des Pferdes hingewiesen (Hare et al. 1998). In der vorliegenden Untersuchung scheint ein Zusammenhang zwischen dem allgemeinen Immunglobulingehalt des zur Inkubation verwendeten Serums und der Kontraktilität der PCLS zu bestehen, wobei zu klären bleibt, ob dieser Mechanismus eher IgE oder IgG abhängig abläuft.

Der Mechanismus scheint bei einigen Tierarten unabhängig vom IgE abzulaufen (Hamelmann et al. 1999), wie an IgE-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Oettgen et al. 1993), nicht jedoch vom IgG Subtyp. So konnten Hamelmann et al. (1999) an Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen mit anti-OA IgG1, nicht jedoch mit anti-OA IgG2 und IgG3, eine systemische anaphylaktische Reaktion auslösen.

Insbesondere für das Pferd ist eine Beteiligung von IgG Isotypen bei der Sensibilisierung allergischer Effektorzellen funktionell nachgewiesen: der in der Veterinärimmunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführte FIT (funktioneller in vitro Test zur Erfassung der Sensibilisierung Basophiler Granulozyten) erfasst bei über 90% der untersuchten Pferde eine Degranulation der Basophilen nach Kreuzvernetzung membranständiger IgG und IgE-Isotypen. (Rohwer 2004). Welcher der sieben beim Pferd nachgewiesenen IgG-Isotypen (Wagner 2006) in der Lage ist, eine passive Sensibilisierung hervorzurufen, kann mit dieser Studie nicht beantwortet werden. Letztlich gilt für die Human- wie Veterinärmedizin, dass der Einfluss allergenspezifischer IgG Isotypen auf die klinische Ausprägung der Typ I Allergie in der

Summe noch unverstanden bleibt (Wachholz und Durham 2004, Fraser et al. 2003, Foster et al. 2003).

Im Vergleich zu anderen Studien an PCLS von Ratten (Wohlsen et al. 2001) konnte in der vorliegenden Studie zwar bei 4 von 5 Pferden eine signifikante Verringerung des Bronchuslumens nach passiver Sensibilisierung nachgewiesen werden, allerdings ist der Effekt in dieser Studie am Pferd deutlich geringer als der an der Ratte. Lediglich bei Pferd 1 und 7 war die Bronchuslumenreduktion so deutlich, dass sie auch bei relativ hoher Standardabweichung signifikant war. Ursachen hierfür könnten in der Heterogenität des Probandengutes liegen. Da es sich durchschnittlich um relativ alte Pferde handelte, ist es möglich, dass diese bereits sensibilisiert waren. Handelsübliche Impfstoffe in Deutschland enthalten Ovalbumin (Produktinformation Intervet) als Adjuvans, so dass bei routinemäßig geimpften Pferden von einem vorausgegangenen Antigen-Kontakt ausgegangen werden muss. Bei dem Kontrollpferd handelte es sich um ein kürzlich importiertes Islandpferd, welches wahrscheinlich bisher nicht mit Ovalbumin-haltigem Impfstoff behandelt worden war (Leibold 2008). Der Effekt der passiven Sensibilisierung könnte daher bei den PCLS der Probanden dieser Studie geringer ausgefallen sein, als es bei allergiefrei aufgezogenen Labortieren der Fall ist, da hier in den Pferden möglicherweise regulative wenn nicht inhibitorische Isotypen induziert wurden, die einer passiven Sensibilisierung entgegenwirken (Ravetch und Clynes 1998, Aggarwal und Holmes 2000). Es bleibt weiteren Studien überlassen zu prüfen, ob durch Erhöhung der Konzentration an Serum oder Ovalbumin bzw. mit einem Wirkstoff, mit dem die Probanden definitiv keinen Kontakt gehabt haben können, deutlichere Effekte hervorzurufen sind.

Ferner konnte aufgrund der geringen Probandenzahl und der geringen Effekte durch die passive Sensibilisierung kein statistischer Zusammenhang zwischen Erkrankungsgrad im Sinne einer COB und der Kontraktilität der PCLS nach passiver Sensibilisierung gesichert werden. Pferd Nr. 1, welches die mit Abstand deutlichste Bronchokonstriktion nach passiver Sensibilisierung zeigte, war jedoch bei der klinischen Untersuchung mit hochgradigen Befunden einer COB aufgefallen (Tabelle 1).

Zusammenfassend gelang in dieser Studie die passive Sensibilisierung erstmals an PCLS des Pferdes. Bei der Mehrheit der auswertbaren Probanden zeigten sich in den Versuchsschnitten signifikante Bronchuslumenreduktionen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollschnitten, nachdem die PCLS zuvor in anti-Ovalbumin-Ig haltigem Serum inkubiert worden waren, und dann mit Ovalbumin eine Challengereaktion ausgelöst wurde. In weiteren Untersuchungen sollten anhand größerer Probandenzahlen verbesserte Dosis-Wirkungs-Korrelationen erstellt werden, um weitere Hinweise auf die immunologische Komponente in der Entstehung der COB zu erhalten.

Literatur

- Barton A., Niedorf F., Gruber A., Kietzmann M. und Ohnesorge B. (2010) Pharmacological studies of bronchial constriction inhibited by parasympatholytics and cilomilast using equine precision-cut lung slices. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 123, 229-235
- Berger P., Walls A.F., Marthan R. und Tunon-de-Lara J. M. (1998) Immunoglobulin E-induced passive sensitization of human airways: an immunohistochemical study. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157, 610-616

- Björck T., Harada Y., Dahlén B., Zetterström O., Johansson G., Rodriguez L., Hequist P. und Dahlén S. E. (1990) Further evidence that leukotrienes are the major mediators of allergic bronchoconstriction in human bronchi. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 21, 429-432
- Black J. L., Marthan R., Armour C. L. und Johnson P. R. A. (1989) Sensitization alters contractile responses and calcium influx in human airway smooth muscle. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 440-447
- Bowles K. S., Beadle R. E., Mouch S., Pourciau S. S., Littlefield-Chabaud M. A., Le Blanc C., Mistic L., Fermaglich D. und Horohov D. W. (2002) A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 385-389
- Coyle A., Wagner K., Bertrand C., Tsuyuki S., Bews J. und Heusser C. H. (1996) Central role of immunoglobulin E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J. Exp. Med.* 183, 1303-1310
- Creese B. R. und Temple D. M. (1986) The mediators of allergic contraction of human airway smooth muscle: a comparison of bronchial and lung parenchymal strip preparations. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13, 103-111
- Davis C., Jones T. R. und Daniel E. E. (1982) Studies of the mechanism of passive anaphylaxis in human airway smooth muscle. *Can. J. Physiol.* 61, 705-713
- Deegen E. (1986) Das chronisch lungenkranke Pferd und sein Einsatz im Sport. *Prakt. Tierarzt Colleg. Vet.* XVII: 15-19
- Eder C., Cramer R., Mayer C., Eicher R., Straub R., Gerber H., Lazar S. und Marti E. (2000) Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 241-253
- Fairbairn S. M., Page C. P., Lees P. und Cunningham F. M. (1993) Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin. Exper. Allergy* 23, 821-828
- Foster A. P., Knowles T. G., Moore A. H., Cousins P. D., Day M. J. und Hall E. J. (2003) Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 113-124
- Fraser M. A., McNeil P. E. und Gettinby G. (2003) Studies of serum total immunoglobulin E concentrations in atopic and non-atopic dogs. *Vet. Rec.* 152, 159-163
- Haegen van der A., Künzle F., Gerber V., Welle M., Robinson N. E. und Marti E. (2005) Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 325-334
- Hamelmann E., Takeda K., Oshiba A. und Gelfand E. W. (1999) Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness – a murine model. *Allergy* 54, 297-305
- Hamelmann E., Takeda K., Schwarze J., Vella A. T., Irvin C. G. und Gelfand E. W. (1999) Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 480-489
- Hare J. E., Viel L., Conlon P. D. und Marshall J. S. (1998) Evaluation of an in vitro degranulation challenge procedure for equine pulmonary mast cells. *Can. J. Vet. Res.* 62, 133-139
- Leibold W. (2008) persönliche Mitteilung
- MacGlashan D. W., Bochner B. S., Adelman D. C., Jardieu P. M., Togias A., McKenzie-Whight J., Sterbinsky S. A., Hamilton R. G. und Lichtenstein L. M. (1997) Down-regulation of Fc RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J. Immunol.* 158, 1438-1445
- Malo P. E., Bell R. L., Shaughnessy T. K., Summers J. B., Brooks D. W. und Carter G. W. (1994) The 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton in in vitro and in vivo models of antigen-induced airway anaphylaxis. *Pulm. Pharmacol.* 7, 73-79
- Martin C., Uhlig S. und Ullrich V. (1996) Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur. Respir. J.* 9, 2479-2487
- Matera M. G., Amorena M. und Lucisano A. (2002) Innervation of equine airways. *Pulm. Pharm. Ther.* 15, 503-511
- Mitchell R. W., Rühlmann E., Magnussen H., Leff A. R. und Rabe K. F. (1994) Passive sensitization of human bronchi augments smooth muscle shortening velocity and capacity. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 242, L218-L222
- Oettgen H. C., Martin T. R., Wynshaw B. A., Deng C., Drazen J. M. und Leder P. (1993) Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370, 367-370
- Ohnesorge B., Trötschel B. und Deegen E. (1998) Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 14, 450-455
- Olszewski M. A., Robinson N. E. und Derksen F. J. (1997) In vitro responses of equine small airways and lung parenchyma. *Respir Physiol* 109, 167-176
- Olszewski M. A., Robinson N. E., Zhu F. X., Zhang X. Y. und Tithof P. K. (1999) Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. *Am. J. Physiol.* 276, 522-529
- Rabe K. F. (1998) Mechanisms of immune sensitization of human bronchus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 161-170
- Rabe K. F., Watson N., Dent G., Morton B. E., Wagner K., Magnussen H. und Heusser C. H. (1998) Inhibition of human airway sensitization by a novel monoclonal anti-IgE antibody 17-9. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1429-1435
- Robinson N. E., Derksen F. J., Olszewski M. A. und Buerchner Maxwell V. A. (1996) The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. Vet. J.* 152, 283-306
- Rossetti M., Savineau J. P., Huguet C. und Marthan R. (1995) Role of protein kinase C in nonsensitized and passively sensitized human isolated bronchial smooth muscle. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol Biol)* 286, L966-L971
- Schild H. O., Hawkins D. F., Mongar J. L. und Herxheimer H. (1951) Reactions of isolated human asthmatic lung and bronchial tissue to a specific antigen: histamine release and muscular contraction. *Lancet* 1, 376-382
- Schmallenbach K. H., Rahmann I., Sasse H. H. L., Dixon P. M., Halliwell R. E. W., McGorum B. B., Cramer R. und Miller H. P. P. (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
- Schoon T. L. und Deegen E. (1983) Histopathologie der chronisch obstruktiven Bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden. *Tierärztliche Praxis* 11, 213-221
- Vietmeier J., Niedorf F., Bäumer W., Martin C., Deegen E., Ohnesorge B. und Kietzmann M. (2007) Reactivity of equine airways – a study on precision-cut lung slices. *Vet. Res. Commun.* 31, 611-619
- Wachholz P. A. und Durham S. R. (2004) Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4, 313-318
- Wagner B. (2006) Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev. Comp. Immuno.* 130, 155-64
- Wohlsen A., Uhlig S. und Martin C. (2001) Immediate allergic response in small airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1462-1469
- Wohlsen A., Martin C., Vollmer E., Branscheid D., Magnussen H., Becker W. M., Lepp U. und Uhlig S. (2003) The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur. Respir. J.* 21, 1024-1032
- Yamaguchi T., Kohroggi H., Honda I., Kawano O., Sugimoto M., Araki S. und Ando M. (1992) A novel leukotriene antagonist, ONO-1079, inhibits and reverses human bronchial contraction induced by leukotrienes C4 and D4 and antigen in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 923-929

Dr. Ann Kristin Barton
Klinik für Pferde
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 9
30559 Hannover
ann-kristin.barton@tiho-hannover.de