

6. Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen erlangen beim Pferd eine immer größere Bedeutung. Aufgrund klinischer Erscheinungen kann meist aber nur der Verdacht auf eine Allergie geäußert werden, der sich mangels geeigneter und für den Patienten gefahrloser Nachweismethoden nicht zuverlässig klären läßt. In dieser Arbeit sollten daher grundlegende Untersuchungen zur Entwicklung eines funktionellen in vitro Nachweises für Typ I Allergien beim Pferd durchgeführt werden. Das Konzept dieses Nachweises basiert auf dem aktuellen Wissensstand, daß auch beim Pferd basophile Granulozyten und Mastzellen die entscheidenden Zellen für die Auslösung einer Typ I Allergie sind. Diese Zellen tragen an ihrer mit Fc-Rezeptoren ausgestatteten Oberfläche ausgewählte Antikörpertypen, mit denen sie, je nach Spezifität der Antikörper, „passende“ Antigene so binden können, daß diese als „spezifische Allergene“ die Zellen zur Mediatorausschüttung stimulieren und damit eine Typ I Allergiereaktion auslösen. Einer dieser Mediatoren ist Histamin. Es wird kurzfristig nur von diesen beiden Zellarten in hohem Maße freigesetzt, so daß es als selektiver Indikator für den Nachweis der Aktivierung dieser Zellen genutzt werden kann, selbst wenn sie nur zu 1% oder weniger in einem Zellgemisch vertreten sind.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen der Untersuchungen an basophilen Granulozyten von Pferden bearbeitet:

1. *Welches Verfahren eignet sich am besten zum praktikablen und zuverlässigen Nachweis von freigesetztem Histamin?*

Dazu wurden zwei kommerzielle Nachweisverfahren aus der Humanmedizin für die Anwendung beim Pferd geprüft:

Im Vergleich zu einem enzymgekoppelten Immunsorptionsverfahren (ELISA), erwies sich der Radioimmunoassay (RIA) als deutlich zuverlässiger. Für das hier vorgestellte Verfahren war entscheidend, daß das nachzuweisende Histamin in einer Lösung frei von Serum oder Plasma vorlag. Deshalb wurde die Histaminfreisetzung nur an gewaschenen Blutzellen in plasmafreiem Puffer vorgenommen und in allen weiteren Untersuchungen mittels RIA quantifiziert.

2. *Durch welche Art der Beeinflussung von basophilen Granulozyten im Pferdeblut wird Histamin freigesetzt ?*

Zur **Spontanfreisetzung** von Histamin wurden die gewaschenen Blutzellen lediglich für 60 Minuten in einem physiologischen Puffer bei 37° C inkubiert. Zur **maximalen Histaminfreisetzung** wurden die Zellen entweder für 10 Minuten im Wasserbad gekocht (**physikalische Freisetzung**) oder die membranständigen Antikörper mittels optimaler Konzentration von Antikörpern gegen Pferdeimmunglobuline vernetzt, um so eine antikörpervermittelte Zellaktivierung und Histaminausschüttung zu erreichen (**Antikörperfreisetzung**). Die **Allergenfreisetzung** stellt die eigentliche Allergieprüfung *in vitro* dar. Hiermit soll die individuelle Ausstattung der basophilen Granulozyten mit Antikörpern, die sie *in vivo* gebunden haben, nachgewiesen werden. Dabei wird geprüft ob diese Antikörper in der Lage sind, ein verdächtiges Allergen so zu binden, daß es zur Histaminausschüttung als Zeichen für eine Aktivierung der basophilen Granulozyten kommt. Die **Antikörper-** und die **Allergenfreisetzung** erfolgten für 60 Minuten bei 37°C.

3. *Gibt es Unterschiede im Gesamthistamingehalt im Blut von Pferden mit und ohne klinische Zeichen einer Typ I Allergie ?*

Vergleichende Untersuchungen an insgesamt 84 Pferden mit und ohne Hinweis oder Anzeichen einer Allergie zeigten, daß es keine signifikanten Unterschiede im Histamingehalt des Blutes gesunder, allergieverdächtiger oder allergiekranker Pferden bestehen. Die mittlere Histaminkonzentration lag bei 26 ng/ml Blut mit starken intra- und interindividuellen Schwankungen (von 0 bis 90 ng/ml Blut).

4. *Welche Aus- und Bewertung der unterschiedlichen Histaminfreisetzungsformen eignen sich für eine klinisch relevante Aussage ?*

Aufgrund des intra- und interindividuell stark schwankenden Histamingehaltes in der jeweiligen Blutprobe darf die allergenvermittelte Histaminfreisetzung nur relativ zur maximalen und spontanen Histaminfreisetzung bewertet werden. Die **maximale Histaminfreisetzung** wird als 100 % gewertet, egal ob sie durch physikalische oder durch Antikörperfreisetzung erreicht wurde. Bei der **Spontanfreisetzung** wurden in 84 Untersuchungsansätzen im Mittel $2,2\% \pm 1,1\%$ (Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD)) von der maximalen Histaminfreisetzung erzielt. Deshalb gilt eine **allergenvermittelte Histaminfreisetzung** unter 6 % (M + dreifache SD) als negativ, zwischen 6 % und 9 % (M + sechsfache SD) als fraglich und über 9 % als positiv.

Anhand dieser Untersuchungs- und Bewertungsverfahren wurden bisher insbesondere Pferde mit und ohne Verdacht oder Anzeichen von Sommerkeczem untersucht. Dabei zeigte sich, daß die hier eingesetzten Allergenpräparationen von *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides variipennis* und *Acarus siro* keine unspezifische Histaminausschüttung verursachten. Im geprüften Konzentrationsbereich (0,05 bis 50 µg/ml) konnten dosisabhängige und individuell sehr unterschiedliche Reaktionen beobachtet werden. Wiederholungsuntersuchungen mit denselben Allergen-Präparationen bei denselben Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten, daß es Unterschiede in der Histaminfreisetzung zu den verschiedenen Untersuchungszeiten gibt.

5 *Welchen Einfluß hat die Art und Dauer der Lagerung der Blutprobe nach Entnahme auf die anschließende Histaminfreisetzung ?*

Die zuverlässigsten Ergebnisse wurden an Blutproben erzielt, die unmittelbar nach der Entnahme untersucht wurden. Ist eine Untersuchung innerhalb von 5 Stunden nach Blutentnahme möglich, empfiehlt sich die Lagerung der Blutprobe bei 4°C. Auch bis zu 24 Stunden nach Blutentnahme können bei einem Großteil der Blutproben noch zuverlässige Ergebnisse erzielt werden. Innerhalb dieses Zeitraums sollten die Proben jedoch bei Raumtemperatur gehalten werden.

Dieses funktionelle in vitro Verfahren könnte somit prinzipiell ein empfindliches und zuverlässiges Nachweisverfahren für Typ I Allergien werden. Dazu müssen jedoch noch eingehendere Untersuchungen die Sensitivität und Zuverlässigkeit dieses Verfahrens bei verschiedenen Allergien ermitteln. Insbesondere wird aber die Ursache dafür zu klären sein, warum bei einigen Tieren die Histaminausschüttung nach Allergenzusatz deutlich über der physikalischen oder der Antikörperfreisetzung lag.

7. Summary

Susanne Kaul: **Type I Allergies in the Horse:
Basic development of a functional in vitro assay**

Although there is a notable increase in allergic diseases of the horse, their diagnosis remains to be mainly clinical because reliable and for the patient innocuous allergy tests are lacking. The major intension of this work are basic investigations towards a functional in vitro assay of type I allergies in the horse based on the present state of knowlegde that basophils and mastcells are the prime initiators of type I allergies in the horse. By means of their Fc-receptors they accumulate antibodies of selected isotypes on their surface. Depending on their specificity these antibodies may bind their "fitting" antigens as bridging "allergens" causing the release of various mediators and, thus, the induction of type I allergy reactions. Histamine is one of these mediators. It can serve as a selective and sensitive marker for the activation of basophils and mastcells as only they are able to release considerable amounts of it within a short time period.

The following aspects of monitoring basophils in equine blood were investigated:

1 Which is the most suitable assay to monitor released histamine ?

We tested two commercially available histamine kits: In comparison to an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) the radioimmuno assay (RIA) tested proved to be far more reliable. For the presented assay it was essential to monitor histamine in a serum or plasma free solution. Thus, all further release assays were exclusively performed with washed, plasma free blood cells and subsequent histamine determination by RIA.

2 Which treatments of horse blood caused histamine release from the basophils ?

A low level of **spontaneous release** of histamine was obtained when washed blood was just incubated in physiological buffer at 37° C for 60 minutes. In order to obtain **maximal histamine release** washed cells were either boiled for 10 min. in a waterbath (**physical release**) or the membrane bound antibodies were crosslinked by an optimal concentration of suitable antibodies against equine immunoglobulins causing cell triggering and histamine release (**antibody release**). The actual testing for allergen specific reactivity was monitored by means of the **allergen release**: It was achieved when a suspected allergen was specifically recognized by the membrane bound antibodies resulting in cell triggering and histamine

release. This release is caused by bridging of a sufficient amount of allergen binding antibodies which were bound in vivo on the cell surface of basophils. **Antibody and allergen release** were performed at 37°C for 60 minutes.

3 *Are there differences in the total histamine content of blood of horses with and without clinical signs of type I allergy ?*

Comparative studies comprising samples of a total of 84 horses with and without signs of allergy revealed no significant difference in the histamine content of blood from healthy, suspected, and diseased animals. There was a mean concentration of 26 ng histamine per ml of blood with strong intra- and interindividual variations (from 0 to 90 ng/ml blood).

4 *Which way of evaluating the different forms of histamine release is most suitable to obtain clinically relevant results ?*

Physiological but tremendous variations of histamine contents among the individual blood samples require a relative evaluation of allergen released histamine in relation to the maximal and spontaneous release from each blood specimen. The maximal histamine release, no matter if it was obtained by physical or antibody release, provided the 100 % value. Spontaneous releases by specimens from 84 horses had a mean value of 2.2 % \pm 1.1 % (mean (M) \pm standard deviation (SD)) of their maximal release. Thus, an allergen induced histamine release below 6 % (M + three fold SD) of the relevant maximal release were considered negative. Allergen releases between 6 % and 9 % (M - six fold SD) were questionable and those above 9 % were weighed as positive.

These test conditions and evaluation parameters were preferentially applied to blood specimens of horses with and without symptoms of summer dermatitis. The allergen preparations of *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides variipennis*, and *Acarus siro* tested proved to be free of unspecific triggering of equine basophils. In concentrations ranging from 0.05 to 50 μ g/ml they caused dose dependent and individually very different reactions. Allergen specific releases of horses tested with the same allergens at various dates revealed differences in the amount of released histamine.

5 *Have the conditions and the time of blood storage after harvest an influence on the subsequent histamine release ?*

The most reliable results were obtained with blood tested immediately after harvest. For assays performed within 5 hours post harvest the blood sample should be stored at 4°C.

However, most of the blood specimens tested within 24 hours post harvest still provided reliable results if they blood was stored at room temperature.

Thus, this functional in vitro test system might provide a sensitive and reliable monitoring for type I allergies in the horse. However, it still requires further investigations regarding its range of applicability, including sensitivity and reliability. Of particular interest will be the reason for the observation in several horses, where individual blood specimens provided an allergen release far above the physical and the antibody release.