

## 6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, anhand von bestimmten Lymphozytensubpopulationen und einiger von ihnen produzierter Zytokine sowie dem Vorkommen einzelner Immunglobulinisotypen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) mögliche weitere Erkenntnisse über Ätiologie und Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes zu gewinnen. Dabei sollten besonders Hinweise mehrerer Autoren auf eine Typ-I-Hypersensitivität als eine Ursache der Erkrankung nachgegangen werden.

Hierzu wurde an 27 Pferden nach eingehender Untersuchung des Respirationstraktes zur Einteilung der Probanden in die Gruppen „klinisch lungengesund“ (Gruppe 1), „gering- bis mittelgradig an COB-erkrankt“ (Gruppe 2) und „hochgradig an COB-erkrankt“ (Gruppe 3) eine Bronchiallavage (BAL) durchgeführt. Von den gewonnenen Zellen wurde ein Differentialzellbild angefertigt und die Lymphozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Membranoberflächenstrukturen in der indirekten Immunfluoreszenz und anschließender durchflußzytometrischer Messung phänotypisiert. Mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde erstmals beim Pferd die Expression von messenger-RNA (mRNA) für Interleukin-2, Interleukin-4 und Interferon- $\gamma$  sowie für das equine Immunglobulin E in Zellen aus der BAL (BALC) untersucht. Schließlich wurden sowohl der Gesamtimmunglobulingehalt als auch der Gehalt verschiedener Immunglobulinisotypen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) in einem Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)-System gemessen.

Zum Vergleich wurden diese Untersuchungen parallel an Zellen aus dem peripheren Blut bzw. an Plasma der jeweiligen Pferde durchgeführt.

Es ergaben sich phänotypisch keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen zwischen den drei Pferdegruppen in der BAL, weder für CD4<sup>+</sup> und für CD8<sup>+</sup> noch für mlg<sup>+</sup> Zellen. Der größte Teil der Lymphozyten in der BAL wird von T-Zellen gebildet, B-Zellen machen lediglich einen Anteil von 0,6 bis 5,8% aus. Diese zeigen hauptsächlich IgA-, IgG- oder IgM-Moleküle an ihrer Oberfläche.

Bei Addition der Anteile der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und mlg<sup>+</sup> Lymphozyten ergab sich bei den Lymphozyten aus dem peripheren Blut eine Population ungefärbter Lymphozyten von etwa 9% ( $\pm 6,7\%$ ) und bei denen aus der Bronchiallavage ein Anteil von 29,8%  $\pm 1,8\%$  in der klinisch lungengesunden Gruppe 1, 17,0%  $\pm 1,5\%$  in der gering- bis mittelgradig lungenkranken Gruppe 2 und von 19,4%  $\pm 7,0\%$  in der hochgradig lungenkranken Gruppe 3. Diese ungefärbte CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und mlg<sup>+</sup> Population könnte sich bei den PBMC und den BALC aus  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen zusammensetzen.

Das Zytokinmuster der Zellen aus der BAL zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Pferdegruppen. Interleukin-4-mRNA wurde sowohl in PBMC-Proben als auch in BALC-Proben am häufigsten exprimiert, daneben wurde in vielen Proben gleichzeitig IFN- $\gamma$ -mRNA exprimiert, was für eine gemischte T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>-Zytokinantwort spricht. IL-2-mRNA wurde nur vereinzelt bei Pferden aus den Gruppen 2 und 3 sowohl in den BALC-Proben als auch in den PBMC-Proben nachgewiesen.

Auf eine vermehrte oder verminderte Expression von mRNA für  $\epsilon$  (IgE) in BALC bei den Pferden der Gruppen 2 und 3 im Vergleich zu Gruppe 1 gibt es keinen Hinweis, so daß bei den untersuchten Pferden zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht auf eine Typ-I-Hypersensitivität geschlossen werden kann.

In jeder der drei Gruppen gab es ein Pferd, das mehr als 10% Mastzellen in der BAL zeigte. Insgesamt war der Anteil an Mastzellen nicht mit dem Vorliegen einer COB oder der Expression von mRNA für  $\epsilon$  oder IL-4 korreliert, sondern mit dem Alter der Pferde: Fünfjährige und jüngere Pferde zeigten signifikant höhere Mastzellanteile in der BAL als sechsjährige und ältere Pferde.

In der Bronchiallavageflüssigkeit (BALF) der Gruppen 2 und 3 waren signifikant höhere IgA-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollpferden nachweisbar, was sich mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen (MAIR et al., 1988; HERMANN 1984; HALLIWELL et al. 1993) deckt und dafür spricht, daß IgA der relativ dominierende Immunglobulinisotyp auf den Schleimhäuten im Respirationstrakt ist. Es wird vermutlich nicht von den B-Lymphozyten in der BAL, sondern in peribronchiolär liegenden B-Lymphozyten gebildet.

Die Pferde der Gruppe 3 zeigten einen signifikant höheren IgM-Gehalt im Vergleich zu Gruppe 1, der auf einer durch die chronische Entzündung erhöhten Membrandurchlässigkeit der entzündlich veränderten Atemwege beruhen könnte.

Für die Lymphozyten aus dem peripheren Blut und für den Immunglobulingehalt im Plasma ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Das in den PBMC exprimierte Zytokinmuster ließ ebenfalls keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den drei Gruppen erkennen.

Die Lymphozytenzusammensetzung ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $mIg^+$  Lymphozyten) sowie die Expression der Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  in der BAL geben keinen Aufschluß über Ätiologie und Pathogenese der COB in den hier untersuchten Tieren.

## 7. Summary

**Mechthild Berendonk:** Investigations of different subsets of lymphocytes, regulatory cytokines, and immunoglobulin isotypes in bronchoalveolar lavage fluid of horses with and without chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

The aim of this study was to investigate immunological parameters, in particular signs of type I hypersensitivity, said to be majorly involved in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Therefore some subpopulations of lymphocytes, their cytokines and different immunoglobulin isotypes were analyzed in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of horses with and without COPD.

Based on clinical examinations of their respiratory tract 27 horses were classified into three groups: Group 1 contained seven horses without any sign of pulmonary disease. They served as controls. Group 2 comprised eight horses with slight to moderate symptoms and group 3 had twelve members with severe symptoms of bronchitis. Cells obtained in one bronchoalveolar lavage fluid of each of these horses were stained by Pappenheim. The phenotype of some subpopulations of lymphocytes was characterized by means of indirect membrane immunofluorescence with monoclonal antibodies against CD4 and CD8 molecules, membrane immunoglobulins (mIg) and their isotypes IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), IgA, and IgM, measured by a fluorescence activated cell scanner (FACScan). The expression of messenger RNA (mRNA) of Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), and Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in bronchoalveolar lavage cells (BALC) were analysed by reverse transcriptase - polymerase chain reactions (RT-PCR). This was the first investigation of these cytokines in equine BALC. Finally the content of immunoglobulin isotypes IgGa, IgGb, IgG(T), IgA and IgM were measured in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

In addition all tests were carried out in autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

There were no significant differences between the three groups of horses regarding the composition of lymphocyte subsets, neither in CD4<sup>+</sup> nor in CD8<sup>+</sup> or in mIg<sup>+</sup> lymphocytes. The vast majority of lymphocytes in the BAL were T cells, the portion of B cells ranged from 0.6 to 5.8% of all BAL lymphocytes. These B cells were usually positive for IgA, IgG<sub>A</sub>, or IgM.

In BALC as well as in PBMC there was a population of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and mIg<sup>+</sup> lymphocytes: in PBMC about 9% ( $\pm$  6,7%) in all groups, in BALC about 29.8%  $\pm$  1.8% in group 1, 17.0%  $\pm$  1.5% in group 2 and 19.4%  $\pm$  7.0% in group 3. This "unstained" CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>mIg<sup>+</sup> lymphocyte population might comprise CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells and natural killer cells (NK cells).

There were no detectable differences in the expression of cytokine-mRNA in BALC between the three groups of horses. The cells of nearly all probes from PBMC as well as from BALC expressed IL-4-mRNA. In many of those probes IFN- $\gamma$ -mRNA was expressed, too, indicating a mixed T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 cytokine response. IL-2-mRNA expression was detectable only sporadically in PBMC and BALC of some of the horses of group 2 and 3.

There was no hint to an increased or decreased expression of  $\alpha\epsilon$ -mRNA in BALC of horses of group 2 and group 3 in comparison with those of group 1. Therefore the results of the horses analysed in this study do not argue for a type I hypersensitivity as a major reason for their pulmonary disease, at least not at the time of that single sampling.

Each of the three groups contained one horse displaying more than 10% of mastcells among the BALC. The proportion of mastcells did not correlate with the degree the horses suffered from COPD neither with the expression of IL-4- or  $\alpha\epsilon$ -mRNA, but with the age of the horses. Usually horses up to five years of age showed significant higher proportions of mastcells in their BALC than those being six years or older.

Horses of group 2 and 3 had significantly more IgA in their BALF than those in the control group 1. This is compatible with the results from previous studies (MAIR et al. 1988; HERMANN 1984; HALLIWELL et al. 1993) concluding that IgA is the relatively dominant

immunoglobulin isotype in the respiratory mucous membrane in the horse. Probably it is not produced by B lymphocytes in the BAL, but by those in peribronchial tissue.

The horses of group 3 showed significantly higher levels of IgM in comparison to group 1. This might reflect an increased permeability of the vascular membranes due to inflammatory processes in the altered airways.

There were no significant differences between the three groups of horses in their lymphocyte subsets of the peripheral blood nor in their cytokine pattern expressed by PBMC.

The composition of lymphocytes ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $mIg^+$  lymphocytes) and the expression of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  in BAL provided no information about the etiology or pathogenesis of COPD in the horses studied.