

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist die häufigste Augenerkrankung beim Pferd. Für ihre noch immer ungeklärte Ätiologie und Pathogenese werden hauptsächlich zwei mögliche Ursachen kontrovers diskutiert: Zum Einen Infektionen, insbesondere durch Leptospiren, und zum Anderen autoaggressive Immunmechanismen

Verschiedene Tiermodelle der experimentellen autoimmunen Uveitis, sowie vergleichbare Uveitiden beim Menschen basieren auf einer T-Zell abhängigen Entstehung dieser Erkrankungen. Beim Pferd ist dagegen über beteiligte Immunmechanismen bei der ERU nur wenig bekannt. Vorübergehende Untersuchungen wiesen auf eine Veränderung der Immunglobulinisotypen in der vorderen Augenkammer (VAK) und im Glaskörper (GK) an ERU erkrankter Pferde hin. In dieser Arbeit sollten daher Menge, Art und Verteilung von Immunglobulinen in gesunden und erkrankten Pferdeaugen, sowie die Reaktion dieser Antikörper mit dem okulären Gewebe, als möglicher Hinweis auf eine Autoaggressionserkrankung bei ERU untersucht werden.

Um Aussagen über die Herkunft und die Bedeutung der im Auge vorkommenden Immunglobuline machen zu können, wurden verschiedene Lokalisationen des Auges von gesunden und ERU erkrankten Tieren untersucht:

In der VAK und im GK wurden der Gesamtimmunglobulingehalt und das Vorkommen der Isotypen IgG_a, IgG_b und IgM mittels ELISA bestimmt. Dabei wurden bei an ERU erkrankten Augen für alle gemessenen Isotypen signifikant erhöhte Werte gegenüber den gesunden Pferden gemessen, wenngleich auch in gesunden Augen physiologischerweise Immunglobuline nachgewiesen wurden. Bei der Differenzierung nach Isotypen konnte insbesondere IgM in nur 2 von 60 Proben gesunder Augen nachgewiesen werden, während 79,6 % der an ERU erkrankten Tiere deutliche IgM-Titer im Auge (43 von 54 Proben) zeigten. Diese könnte man als Zeichen einer zunehmenden Gewebeerstörung mit erleichtertem Austritt von Serumimmunglobulinen in das Auge im chronischen Stadium der ERU werten. Dem widerspricht jedoch, daß in an ERU erkrankten Augen die Immunglobulingehalte um den Faktor 100 niedriger als im autologen Serums waren. Somit dürfte auch beim ERU-Patienten die „Blut-Augen-Schranke“ – oder besser eine „intraokuläre Barriere“ - weitgehend funktionsfähig bleiben.

Betrachtet man die Isotypen IgG_a und IgG_b im Auge im Vergleich zum Serum des jeweiligen Tieres, so zeigte sich bei den Uveitispatienten eine verstärkte Abweichung oder sogar Umkehr des okulären Isotypenverhältnisses, was auf eine erhebliche lokale Produktion von Immunglobulinen im Auge hinweist.

- Durch den immunhistologischen Nachweis der Immunglobuline im okulären Gewebe konnten, wie schon früher gezeigt, Lymphfollikel im Bereich des Ziliarkörpers mit zentralen

B-Zellarealen bei ERU erkrankten Augen beobachtet werden, die ebenfalls Hinweise auf eine lokale Aktivierung, B-Zellproliferation und Antikörperproduktion sind.

- Der immunhistologische Nachweis der Immunglobulinisotypen zeigte darüber hinaus, daß bereits im gesunden Auge physiologischerweise alle gemessenen Isotypen (IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), IgA, IgM) im Stroma des Ziliarkörpers und der Chorioidea vorkommen und vermutlich in diesen Bereichen aus den Gefäßen diffundierte Serumimmunglobuline darstellen. Darüber hinaus konnten bei an ERU erkrankten Augen in dem nicht pigmentierten Ziliarkörperepithel und in den plexiformen und Körnerschichten der Retina Immunglobuline nachgewiesen werden. Immunglobulinpositive Zellen wurden ausschließlich in erkrankten Augen und hier in dem nicht pigmentierten Epithel und dem Stroma des Ziliarkörpers dargestellt. Vorherrschende Isotypen waren IgGa und IgGb. Bei diesen Zellen könnte es sich möglicherweise um lokal produzierende B-Zellen handeln.

- Damit einher gehen auch die im Zytospot nachgewiesenen erhöhten Zellgehalte im Glaskörper erkrankter Pferde, bei denen es sich im chronischen, klinisch ruhenden Stadium der ERU vornehmlich um lymphoide Zellen handelt, von denen ein Teil immunglobulinpositiv war. Aber auch in 13 von 53 Flüssigkeitsproben gesunder Augen waren einige wenige lymphoide Zellen zu finden.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine beachtliche Immunglobulinproduktion im an ERU erkrankten Auge durch lokale B- und Plasmazellen. Die Antigen (Ag)-Spezifität dieser intraokulären Immunglobuline könnte Hinweise auf die Erkrankungsursache liefern. Daher wurden an einem Teil der Augen vergleichend Leptospiren-spezifische Antikörpertiter im GK durch einen Mikroagglutinationstest und ein immunhistologischer Isotypennachweis nach Inkubation okulären Gewebes mit Glaskörper und Serum gesunder und erkrankter Tiere durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß im Glaskörper gesunder Augen keine Anti-Leptospirenantikörper nachzuweisen sind, obwohl das Serum dieser Tiere deutlich Anti-Leptospirenantikörper enthält. Obwohl im Glaskörper Immunglobuline vorhanden waren, führte keine der GK-Proben gesunder Augen zu einer positiven Reaktion mit Augengewebe. Auch durch Inkubation mit Serum gesunder oder erkrankter Pferde konnte kein positiver immunhistologischer Immunglobulinnachweis im Auge gesunder Tiere erreicht werden. Dagegen wurde nach der Inkubation mit allen untersuchten Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden eine deutliche Bindung von Immunglobulinen an okulärem Gewebe gesunder Tiere beobachtet. Dies belegt zum Einen, daß die im Glaskörper von an ERU erkrankten Augen enthaltenen Antikörper okuläre Strukturen im Bereich des nicht pigmentierten Ziliarkörperepithels und der Retina in gesunden Pferdeauge erkennen und somit autoaggressive Reaktionen auslösen könnten, die zur Zerstörung des okulären Gewebes bei ERU beitragen. Zum Anderen zeigt dieser Befund, daß solche pathogenetisch

interessanten Antikörper ausschließlich in erkrankten Augen gebildet werden und nicht aus dem Serum stammen.

Auffällig war zudem, daß 3 der 12 untersuchten Glaskörperproben von erkrankten Augen keine nachweisbaren Anti-Leptospirenantikörper enthielten und dennoch, wenn auch schwächer, mit Antigenen in gesunden Augen reagierten. Demnach scheinen autoreaktive Antikörper im Glaskörper von ERU-Patienten nicht identisch mit den Anti-Leptospirenantikörpern zu sein.

Die Beobachtungen, daß in den Glaskörperproben gesunder Tiere mit positiven Anti-Leptospirenantikörpertitern im Serum keine Anti-Leptospirenantikörper nachweisbar waren, sondern ausschließlich in den Glaskörperproben an ERU erkrankter Pferde Anti-Leptospirenantikörper zu finden sind und zudem deren Spektrum meist wesentlich breiter und höherwertig als im autologen Serum ist, sprechen dafür, daß auch die okulären Anti-Leptospirenantikörper im erkrankten Auge selbst produziert werden und nicht aus dem Serum kommen.

Zusammenfassend empfiehlt sich die Hypothese,

- daß im Rahmen einer ERU die pathogenetisch relevanten autoreaktiven Antikörper ausschließlich im erkrankten Auge gebildet werden und nicht aus dem Serum kommen, also dort auch kaum nachweisbar sind;

Nun bleibt „nur noch“ zu klären, wer die primäre intraokuläre Bildung autoreaktiver Antikörper auslöst und wie ihre anschließende Bildung zwischen und in den ERU-Schüben reguliert wird.

7. SUMMARY

Johanna Corinna Eule:

"Occurrence of different immunoglobuline isotypes in serum and eyes of healthy horses and horses with Equine Recurrent Uveitis (ERU)"

The Equine Recurrent Uveitis (ERU) is the most common ocular disease in horses. In the etiology and pathogenesis of ERU infections particularly leptospirosis and autoaggressive immune mechanism are discussed controversially as two different possible causes.

Several animal models of experimental autoimmune uveitis and equivalent human uveitis are based on a T-cell mediated pathogenesis. Analogous studies of immune mechanism in ERU in horses are lacking. Previous studies showed changes in immunoglobuline (Ig) isotypes in the aqueous humor and the vitreous of horses with ERU. Therefore, the aim of this study was a) to investigate concentrations and distribution of different immunoglobuline isotypes in healthy control eyes and eyes with ERU and b) to exam the reaction of these antibodies with ocular structures as a hint for antibody mediated autoaggressive mechanisms in the pathogenesis of ERU.

Different localizations of control eyes and ERU eyes were studied to get information about origin and significance of Ig existing in eyes:

- Using ELISA techniques total Ig titers and titers of the isotypes IgGa, IgGb and IgM were measured in aqueous humor and vitreous. Compared to control eyes significantly increased titers were found in ERU eyes for all studied Ig isotypes. In particular IgM was detected only in 2 of 60 samples of control eyes, whereas 79,6 % of samples (43 of 54 samples) of ERU eyes revealed considerable IgM titers. Since intraocular Ig titers in ERU eyes are only about 1% of the autologous serum Ig titers, results can not be interpreted as an indication for eased extravasation of serum Ig due to damage of tissue in ERU eyes. Thus, we assume in the chronic stage of ERU there is still an intact intraocular barrier (syn. blood eye barrier).
- In control horses and horses with ERU the proportion of IgGa and IgGb isotypes in aqueous humor and vitreous were compared with the proportion of the same isotypes in the autologous serum. Results revealed a shift or even an inversion of the IgGa/IgGb ratio in samples of ERU eyes compared to controls, indicating a substantial local ocular production of Ig in diseased eyes.

- Immune histologically Ig positive cells were demonstrated in lymph follicles of the ciliary body and gave evidence for central B-cell areas in these follicles. Results are taken as additional indication for local ocular B-cell activation, proliferation, and Ig production.
- It was demonstrated by immune histology that in the stroma of the ciliary body and the choroid of healthy control eyes all studied Ig isotypes (IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), IgA, IgM) occur physiologically. Presumably these Ig isotypes diffused in those areas from intraocular blood vessels. Additionally, in ERU eyes all investigated Ig were detected in the non pigmented epithelium of the ciliary body as well as in the plexiforme and granulated layers of the retina. Furthermore, in ERU eyes Ig positive cells were stained in the non pigmented epithelium and in the stroma of the ciliary body. Dominating isotypes were IgGa and IgGb. It is supposed that the above mentioned Ig positive cells are locally produced B-cells.
- Above mentioned results are in accordance with results obtained in counts of nuclear cells in the aqueous humor and the vitreous. In the cytospot of samples of ERU eyes counts of nuclear cells were significantly higher compared to those of control eyes. In chronic and clinically silent stages of the ERU lymphocytes were differentiated predominantly. Some of these lymphocytes were Ig positive. In 13 of 53 samples of control eyes lymphocytes were detected as well, however, only sporadically.

In conclusion, results indicate substantial local Ig production by B- and plasma cells in eyes with ERU. The antigen (Ag) specificity of the intraocular Ig was supposed to give more information about the pathogenesis of ERU. Thus, antibody titers against leptospirae (micro agglutination test) in vitreous were measured. Titers were compared with results obtained by immune histological detection of Ig isotypes after incubation of ocular tissue of healthy controls with vitreous and serum of controls and horses with ERU

Although in serum of control horses considerable anti leptospirae antibody titers were found, no anti leptospirae antibodies could be detected in the autologous aqueous humor of these horses. Moreover, incubation with the aqueous humor of control eyes provoked in none of the cases a positive reaction for Ig in the subsequent immune histology of the ocular tissue. Likewise incubation of ocular tissue with serum of control horses or horses with ERU did not led to a positive immune histological Ig detection. However, Ig binding to ocular tissue (non pigmented epithelium of the ciliary body and retina) of healthy eyes was proven in all samples by immune histology after incubation with vitreous of ERU eyes. Results substantiate the assumption, that antibodies occurring in the vitreous of ERU eyes recognize ocular structures, which is a precondition for initiating antibody mediated autoaggressive reactions and by that the destruction of ocular structures in ERU. Further, it was shown that these antibodies are produced exclusively in ERU eyes and do not originate from serum.

In 3 of 12 samples of vitreous from ERU eyes no anti leptospira antibodies were detectable. Nevertheless, these samples reacted positively in the immune histology with antigens of control eyes. This indicates that there are autoreactive antibodies in the vitreous of ERU eyes which might not be identical with anti leptospira antibodies. In the vitreous of ERU eyes anti leptospirae antibody titers were higher and usually recognized a wider range of leptospira strains than in the autologous serum, indicating that ocular anti leptospirae antibodies might be produced locally in ERU eyes and do not originate from serum.

Basing on the results of this study we hypothesize

- that in eyes stricken with ERU pathogenetically relevant autoreactive antibodies are exclusively locally produced and have no serological origin. Thus, they are hardly detectable in serum.

Future studies must show, what initiates the intraocular production of autoreactive antibodies and how the subsequent Ig production is regulated, in particular between the different acute and silent stages of the Equine Recurrent Uveitis.