

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 636.1.09:616.24-002:616-097.1:616-08:611.013.1

Neža Adamič, dr.vet.med

**VPLIV ZDRAVLJENJA Z MEZENHIMSKIMI MATIČNIMI
CELICAMI NA KRONIČNO OBSTRUKTIVNO OBOLENJE
DIHAL PRI KONJIH**

Doktorska disertacija

**EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELLS TREATMENT
ON EQUINE RECURRENT AIRWAY OBSTRUCTION**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Neža Adamič

Vpliv zdravljenja z mezenhimijskimi matičnimi celicami na kronično obstruktivno obolenje dihal pri konjih.

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za reprodukcijo in velike živali Veterinarske fakultete v Ljubljani in v Laboratoriju za genomiko na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentor: Izr. prof. dr. Modest Vengušt

Somentor: prof. dr. Gregor Majdič

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: Prof. dr. Milka Vrecl Fazarinc

Član: Izr. prof. dr. Janko Mrkun

Član: Doc. dr. Uroš Rajčević

POSVETILO

In nature, nothing is perfect and everything is perfect.

Alice Walker

Dedkoma Janezu in Štefanu, ki sta mi odprla vrata v naravo.

IZVLEČEK

Konjska astma je pogosta kronična bolezen dihal, ki pomembno vpliva na zdravje in dobrobit konj. Trenutne strategije zdravljenja konjske astme temeljijo na lažšanju simptomov in ne zdravijo bolezni. Lahko imajo tudi znatne stranske učinke.

Cilj naše raziskave je bil oceniti lokalne in sistemske učinke intrabronhialne administracije avtolognih mezenhimijskih matičnih celic, pridobljenih iz maščobnega tkiva (Adipose derived mesenchymal stem cells, AD-MSK) na potek konjske astme. Konje smo naključno razdelili v dve skupini in jih zdravili z AD-MSK ali deksametazonom. Za ugotavljanje terapevtskih učinkov smo natančno opredelili klinično izražanje bolezni pri posameznem konju in opravili meritve pljučnih funkcij in endoskopski pregled dihalnih poti. Ob endoskopiji smo opravili tudi bronhoalveolarno lavožo, izpirke pa citološko pregledali in izmerili vrednosti izražanja sporočilne RNK določenih vnetnih citokinov in koncentracijo njihovih beljakovin. Po končani obravnavi smo konje spremljali še eno leto in primerjali dolgoročno stabilnost kliničnih znakov med obema skupinama. Kljub temu, da zdravljenje z AD-MSK ni povzročilo takšnega izboljšanja kliničnih znakov astme kot zdravljenje kontrolne skupine, smo zaznali znatno izboljšanje pri izražanju in koncentraciji posameznih vnetnih spremenljivk. V primerjavi s kontrolnim zdravljenjem, pa je imelo zdravljenje z AD-MSK pozitiven dolgoročni učinek na stabilnost klinične slike.

Na podlagi rezultatov te raziskave zaključujemo, da ima intrabronhialno zdravljenje z AD-MSK omejen kratkoročen učinek in pozitiven dolgoročen učinek na simptome kronične astme pri konjih.

Ključne besede: bolezen konj – zdravljenje; astma – imunologija – veterinarska – zdravljenje z zdravili – preventiva in kontrola; bronhoalveolarni izpirek – citologija – imunologija; citokini – učinki zdravil; interlevkini – imunologija; imunski odziv – učinki zdravil; mezenhimijske matične celice – citologija – imunologija – klasifikacija; pljuča – patologija; vnetje – imunologija – patofiziologija – terapija z zdravili – veterinarsko

N. Adamič: Vpliv zdravljenja z mezenhimijskimi matičnimi celicami na kronično obstruktivno obolenje dihal pri konjih.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

ABSTRACT

Equine asthma is a common chronic disease of the respiratory tract that significantly affects horses' health and well-being. Current therapeutic strategies are based on symptomatic treatment and do not alter the disease's long-term progression, and their side effects are worrying.

Our study aimed to evaluate the local and systemic effects of intrabronchial administration of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSK) on severe equine asthma. Horses were randomly divided into two groups and treated with AD-MSK or dexamethasone. To determine the therapeutic effects of intrabronchial treatment with AD-MSK, we precisely defined clinical signs, and performed lung function tests and endoscopic examination of the airways in horses included in the study. Bronchoalveolar lavage was performed, and the samples were cytologically examined, and the mRNA expression values of specific inflammatory cytokines and the concentration of their proteins were measured. After treatment, the horses were monitored for another year, and the long-term stability of clinical signs between the two groups was compared. Although non-inferiority of AD-MSK treatment was not confirmed, improvement in certain inflammatory variables was observed after cell therapy. However, intrabronchial treatment with AD-MSK had a positive long-term effect on clinical stability of horses with severe asthma.

Results of the study indicate that intrabronchial treatment with AD-MSK has a limited short-term anti-inflammatory effect and a positive long-term clinical effect in asthmatic horses.

Keywords: Equine diseases – therapy; asthma – immunology – veterinary – drug therapy – preventive and control; bronchoalveolar lavage fluid – cytology – immunology; cytokines – drug effects; interleukines – immunology; immune response – drug effects; mesenchymal stem cells – cytology – immunology – classification; lung – pathology; inflammation – immunology – physiopathology – drug therapy – veterinary

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	5
ABSTRACT	7
KAZALO VSEBINE	9
KAZALO SLIK	11
KAZALO TABEL	13
KAZALO ENAČB	15
SEZNAM OKRAJŠAV	17
1 UVOD	21
2 PREGLED LITERATURE	23
2.1 KONJSKA ASTMA	23
2.1.1 Etiologija bolezni	23
2.1.2 Patofiziologija bolezni.....	24
2.1.2.1 Vnetje	24
2.1.2.2 Preobčutljivostni odziv in obstrukcija dihalnih poti.....	29
2.1.2.3 Preoblikovanje tkiva dihal	30
2.1.3 Klinični znaki SEA.....	31
2.1.4 Diagnostika bolezni.....	32
2.1.4.1 Merjenje pljučnih funkcij	32
2.1.4.2 Endoskopski pregled dihal.....	34
2.1.4.3 Pridobivanje in analiza bronhoalveolarnega izpirka	34
2.1.4.4 Patomorfološke spremembe pri SEA	35
2.1.5 Obravnava in zdravljenje astmatičnih konj	36
2.1.5.1 Prilagoditev bivalnega okolja	36
2.1.5.2 Medikamentozno zdravljenje	36
2.1.5.3 Uspeh zdravljenja SEA s klasično terapijo.....	38
2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IN NJIHOVA UPORABA V REGENERATIVNI MEDICINI.....	39
2.2.1 Tipi matičnih celic.....	39
2.2.2 Vir MSC	40
2.2.2.1 Tkivni izvor MSC	40
2.2.2.2 Avtologi in alogeni vir MSC	41
2.2.3 Terapevtsko učinkovanje MSC	42

	10
2.2.3.1 Parakrino delovanje MSC.....	42
2.2.3.2 Izločanje zunajceličnih veziklov	43
2.2.3.3 Nekrobiologija MSC.....	44
2.2.3.4 Prenos mitohondrijev.....	45
2.2.4 Usmeritev in naseljevanje (homing) MSC	45
2.2.5 Posebnosti konjskih MSC	46
2.2.6 Terapevtski učinki MSC na obolenja dihal.....	46
3 MATERIAL IN METODE	49
3.1 RAZISKOVALNI PROTOKOL	49
3.2 ŽIVALI	50
3.3 KLINIČNO OCENJEVANJE.....	51
3.4 MERJENJE PLJUČNE FUNKCIJE	51
3.5 ODVZEM MAŠČOBNEGA TKIVA	52
3.6 IZOLACIJA IN GOJENJE AD-MSC.....	52
3.7 ENDOSKOPSKI PREGLED DIHAL IN BRONHOALVEOLARNA LAVAŽA	53
3.8 CITOLOŠKI PREGLED BRONHOALVEOLARNEGA IZPIRKA	54
3.9 ANALIZA IZRAŽANJA mRNK CITOKINOV (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ) S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO Z REVERZNO TRANSKRIPCIO (RT-qPCR)	54
3.10 KVANTIFIKACIJA CITOKINOV (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ) Z ENCIMSKOIMUNSKIMI TESTI.....	55
3.11 OBRAVNAVA KONJ PO ZADNJEM VZORČENJU.....	56
3.12 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	56
4 REZULTATI	58
4.1 KLINIČNI PREGLED, BRONHOSKOPIJA IN CITOLOŠKA PREISKAVA BALF ..	60
4.2 RELATIVNA KVANTIFIKACIJA mRNK CITOKINOV IN KONCENTRACIJE NJIHOVIH PROTEINOV	63
4.3 SPREMLJANJE KLINIČNIH SIMPTOMOV SEA PO ZAKLJUČKU ZDRAVLJENJA	66
5 RAZPRAVA	68
6 ZAKLJUČKI	74
7 POVZETEK	75
8 SUMMARY	77
9 ZAHVALE	79
10 LITERATURA	81

KAZALO SLIK

Slika 1. Raziskovalni protokol.	50
Figure 1. Research protocol.	
Slika 2: Diferenciacijski potencial konjskih AD-MSC.	59
Figure 2: Multilineage differentiation potential of equine AD-MSCs.	
Slika 3: Klinična ocena in endoskopska ocena.	61
Figure 3: Clinical score and endoscopic score.	
Slika 4: Bronhoalveolarni izpirek astmatičnega konja.	61
Figure 4. Bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic horse.	
Slika 5: Rezultati citološke analize bronhoalveolarnega izpirka.	63
Figure 5. Bronchoalveolar lavage fluid cytology.	
Slika 6: Relativna kvantifikacija mRNK citokinov in koncentracije njihovih proteinov. ...	66
Figure 6: Relative quantification of cytokines' mRNA and their protein concentration.	
Slika 7: Sledenje pacientov.	67
Figure 7: Follow-up.	

KAZALO TABEL

Tabela 1. Plevralni pritisk, klinična ocena in endoskopska ocena. 60

Table 1. Pleural pressure, clinical and endoscopic score

Tabela 2. Rezultati citološke analize bronhoalveolarnega izpirka. 62

Table 2. Bronchoalveolar lavage fluid cytology

Tabela 3. Relativna kvantifikacija mRNA citokinov in koncentracije njihovih proteinov. 65

Table 3. Relative quantification of cytokines' mRNA and their protein concentration

KAZALO ENAČB

Enačba 1. Matematični model relativne kvantifikacije po Pfafflu.	55
Equation 1. Pfaffl's mathematical model of relative expression ratio	

SEZNAM OKRAJŠAV

$\Delta P_{pl_{max}}$	Največje spremembe v intraplevralnem pritisku
AD-MSC	Mezenhimske matične celice, pridobljene iz maščobnega tkiva; <i>Adipose tissue derived mesenchymal stem cells</i>
AHR	Povečana preobčutljivost dihal; <i>Airway hyperresponsiveness</i>
ARDS	Sindrom akutne dihalne stiske; <i>Acute respiratory distress syndrome</i>
ASM	Gladka mišičnina dihalnih poti; <i>Airway smooth muscles</i>
BAL	Bronhoalveolarna lavaža; <i>Bronchoalveolar lavage</i>
BALf	Bronhoalveolarni izpirek; <i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
BM-MSC	Mezenhimske matične celice, pridobljene iz kostnega mozga; <i>Bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>
CD	Diferenciacijski skupki; <i>Cluster of differentiation</i>
cDNK	Komplementarna deoksiribonukleinska kislina
C_{dyn}	Dinamična popustljivost (komplianca) pljuč
CI	Interval zaupanja; <i>Confidence interval</i>
COPD	Kronično obstruktivno obolenje dihal; <i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
DEX	Skupina konj, ki je za zdravljenje prejela deksametazon; <i>Dexamethasone</i>
DMEM	Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (orkajšano iz angl. <i>Dulbecco – modified eagle medium</i>)
DR	Območje zaznavanja; <i>Detection range</i>
EA	Konjska astma; <i>Equine asthma</i>
ECA	Konjski kromosom; <i>Equine chromosome</i>
ECM	Zunajcelični matriks; <i>Extracellular matrix</i>
ECV	Zunajcelični vezikli; <i>Extracellular vesicles</i>

ELISA	Encimskoimunski test; <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	Konjska pašna astma; <i>Equine pasture asthma</i>
ESC	Embrionalne matične celice; <i>Embryonic stem cells</i>
GAPDH	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HSC	Hematopoetske matične celice; <i>Hematopoietic stem cells</i>
IDO	Indolamin-2,3-dioksigenaza
IFN γ	Interferon gama
IL	Interlevkin
IPSC	Inducirane pluripotentne matične celice; <i>Induced pluripotent stem cells</i>
ISCT	Mednarodno društvo za celično terapijo; <i>International Society for cellular therapy</i>
IV	Intravenski vnos
I κ B	Inhibitorni protein- κ B
LME	Linearni model mešanih učinkov; <i>Linear mixed effect</i>
LPS	Lipopolisaharidi
MHC	Poglavitni histokompatibilnostni kompleks; <i>Major histocompatibility complex</i>
miRNK	Mikro RNK; <i>MicroRNA</i>
mRNK	Informacijska RNK; <i>Messenger RNA</i>
MSC	Mezenhimske matične celice; <i>Mesenchymal stem cells</i>
NBB	N-butilspolamonijev bromid
NF- κ B	Jedrni dejavnik kapa-B; <i>Nuclear factor kappa-B</i>
NK	Naravne celice ubijalke; <i>Natural killer cells</i>
P _{adj}	Prilagojena p-vrednost; <i>P-value adjusted</i>
PBS	Fiziološka raztopina v fosfatnem pufru; <i>Phosphate-buffer saline</i>

PG	Prostaglandin
Ppl	Tlak v plevralni votlini
R _L	Rezistenca pljuč; <i>Lung resistance</i>
RT-qPCR	Obratna transkripcija in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo; <i>Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction</i>
SCT	Skupina konj, ki je za zdravljenje prejela MSC; <i>Stem cell treatment</i>
SD	Standardni odklon; <i>Standard deviation</i>
SEA	Huda oblika konjske astme; <i>Severe equine asthma</i>
T1	Čas začetka zdravljenja; <i>Time 1</i>
T2	Čas zaključka zdravljenja; <i>Time 2</i>
TCC	Skupno število celic; <i>Total cell count</i>
TGF-β	Transformirajoči rastni dejavnik beta; <i>Transforming growth factor beta</i>
Th	T-celica pomagalka; <i>T-helper cell</i>
TLR	Tolični receptor; <i>Toll-like receptor</i>
TNFα	Tumor nekrotizirajoči dejavnik alfa; <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
T-reg	Regulatorna T-celica
TRM	Model Tobit regresije naključnih učinkov; <i>Tobit (censored regression) model</i>
TSG-6	TNF-stimulirajoči gen-6
TT	Telesna teža

1 UVOD

Kronično obstruktivno obolenje dihal pri konjih, danes imenovano huda oblika konjske astme (Severe equine asthma, SEA), je pogosta bolezen dihal pri konjih. Kvaliteta življenja in predvsem fizična sposobnost prizadetih konj sta okrnjeni, bolezen pa predstavlja tudi velik logističen in finančni zalogaj za lastnike (1, 2). Bistvene lastnosti bolezni so povečana preobčutljivost in odzivnost dihal na antigene v vdihanem zraku (Airway hyperresponsiveness, AHR), ter posledičen razvoj kroničnega nevtrofilnega vnetja dihalnih poti, bronhokonstrikcije in kopičenja sluzi. Zaradi naštetih sprememb je pljučna funkcija oslABLJENJA, dolgoročno pa se preoblikujejo tudi tkivne strukture dihalnih poti (3–6). Poleg bistvenega zmanjševanja izpostavljenosti dovzetnih konj antigenom (prašnim delcem), so za hitrejše lajšanje bronhokonstrikcije potrebna imunosupresivna in bronhodilatatorna zdravila (4, 5). Čeprav je z uspešno obravnavo obolelih konj mogoče doseči določeno obdobje klinične remisije, dokončne ozdravitve s trenutno dostopnimi terapijami ne dosežemo, ker omenjene terapevtske strategije nimajo znatnega vpliva na patološko preoblikovanje sten dihalnih poti (1, 4–10). Imunosupresivno zdravljenje lahko povzroči nezaželjene stranske učinke, ki so najpogosteje povezani z zaviranjem delovanja nadledvične žleze, spreminjanjem presnove kosti, patološkimi spremembami v tkivnih strukturah kopita (laminitis) in povečano dovzetnostjo za okužbe (2, 5, 10–13). Večina konj s SEA kljub zdravljenju občasno razvije resne klinične znake; njihova atletska sposobnost pa je kronično okrnjena (1). Zato simptomatsko zdravljenje, ki se trenutno uporablja za obvladovanje SEA pri konjih, ne zagotavlja ustrezne terapevtske rešitve za dolgoročno omilitev ali ozdravitev astme.

V humani in veterinarski medicini se celično zdravljenje uveljavlja kot terapija za številne bolezni. Enega izmed možnih celičnih virov predstavljajo mezenhimske matične celice (Mesenchymal stem cells, MSC), ki so prisotne v odraslem organizmu, tehnika njihove izolacije in gojenja pa je razmeroma preprosta. Tradicionalno se je terapevtsko delovanje matičnih celic povezovalo z njihovo diferenciacijo v različne celične tipe in nadomeščanjem poškodovanega tkiva (14), danes pa njihove terapevtske sposobnosti pripisujejo predvsem imunomodulatornim lastnostim (15). Zdravljenje z MSC se je izkazalo za uspešno tudi pri vnetnih spremembah v pljučih pri ljudeh in živalih (16–19). Pri mišjih (20–26) in mačjih (27) modelih astme, ter drugih eksperimentalno povzročenih vnetnih boleznih dihal (28–30), je imelo zdravljenje z MSC pozitiven učinek na lokalni imunski odziv. Trenutno je poleg rezultatov naše raziskave (31)

objavljena le še ena raziskava celičnega zdravljenja astmatičnih konj (32), ki poroča o kratkotrajnem lajšanju kliničnih znakov in vnetja v pljučih po enkratni intratrahealni aplikaciji mononuklearnih celic, pridobljenih iz kostnega mozga.

V sklopu naše raziskave smo proučevali učinke intrabronhialnega vnosa avtolognih, iz maščobe pridobljenih (Adipose-derived, AD) MSC pri konjih s SEA. Postavili smo dve delovni hipotezi:

- 1) Matične celice bodo s svojim imunosupresivnim delovanjem prekinile kronično vnetje v dihalnih poteh pri astmatičnih konjih.
- 2) Imunosupresivni učinek mezenhimijskih matičnih celic bo vplival na izražanje vnetnih citokinov v dihalih astmatičnih konj.

Rezultati raziskave bodo pomembni za razumevanje in oblikovanje učinkovitih terapevtskih strategij za zdravljenje SEA. Pričakujemo tudi translacijsko vrednost te raziskave, saj so konji najustreznejši model za proučevanje humanega nevtrofilnega tipa astme.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 KONJSKA ASTMA

Konjska astma (Equine asthma, EA) je najpogostejša kronična bolezen dihal pri konjih (2). Opredeljuje jo značilno močno vnetje spodnjih dihalnih poti, ki je posledica pretiranega imunskega odziva na zunanje dejavnike (33). Bistvena lastnost bolezni je reverzibilna obstrukcija dihalnih poti in posledično povečan napor pri dihanju (dispneja) v mirovanju (4, 5, 34). Z ustrezno obravnavo pacientov lahko obstrukcijo in klinične znake olajšamo in bolezen spravimo v stanje začasne remisije.

2.1.1 Etiologija bolezni

Prevalenco SEA je težko oceniti, ker je delež populacije konj z astmo lahko v fazi klinične remisije in jih je klinično težje prepoznati (5, 35, 36). Podatki o prevalenci zato variirajo med 2 in 80 % (2, 35, 37–39).

Z obsežnimi retrospektivnimi raziskavami je bilo potrjeno povečano tveganje za razvoj SEA s povečevanjem starosti konj (7 let in več), sezono (zimsko in spomladansko obdobje), prebivanjem v urbaniziranem okolju, prebolelimi okužbami dihal, ter izpostavitve konj senu in predvsem slami slabe kvalitete zgodaj v življenju (5,38,40,41).

Bolezen ima tudi dedni značaj (42, 43). Prvi dokaz za to je bilo opažanje, da kljub izpostavljenosti rizičnim okoljskim dejavnikom, vsi konji ne obolijo za SEA. Ramseyer in sod. (2007) opisujejo štirikrat večjo verjetnost pojava bolezni pri potomcih staršev obolelih za SEA, v primerjavi s potomci zdravih staršev (43). S podrobnejšim preučevanjem genoma dovzetnih družin konj so s povečanim tveganjem za nastanek SEA povezali regiji na konjskem kromosomu (Equine chromosome, ECA) 13 in ECA 15 (44, 45). Znotraj omenjenih kromosomskih regij se nahaja več kandidatnih genov, vključno z geni za interlevkine (IL) (45, 46).

Osrednjo vlogo pri razvoju SEA ima izpostavljenost antigenom. V dihalih dovzetnih konj se razvije izrazito nevtrofilno vnetje že znotraj šestih ur po izpostavitvi prašnemu senu (4, 47–53). Zanimiv je podatek, da vsi konji (SEA-dovzetni in nedovzetni) razvijejo vnetni odgovor na vdihavanje prašnih delcev, ki se izraža s povečanim pritokom nevtrofilnih granulocitov v dihalne poti, pljučno disfunkcijo pa razvijejo le SEA-dovzetni konji (4, 54).

V senu in hlevu so prisotni številni potencialno pro-vnetni agensi: bakterijski endotoksini, več kot 50 vrst plesni, peptidoglikani, proteaze, mikrobnih toksini, krmne pršice, rastlinski ostanki in anorganski prah (4, 55–57). Poglavitno vlogo pri nastanku bolezni imajo verjetno plesni in endotoksini, ki se v slabše konzervirani krmni pojavljajo v večjih količinah (58, 59). Vhlevljeni konji so izpostavljeni 8 do 10-krat višjim koncentracijam endotoksinov kot konji, vzdrževani na pašnikih (60). Na končno koncentracijo prahu oziroma antigenov v dihalni okolici konj močno vpliva tudi prisotnost drugih živali in konstrukcijska značilnost hleva (61).

Poleg klasične oblike SEA, ki se razvije pri vhlavljenih konjih, poznamo tudi t.i. konjsko pašno astmo (Equine pasture asthma, EPA) (34). Konji, oboleli za EPA, razvijejo značilne klinične znake astme, ko so na prostem. Obolenje se po navadi izboljša kmalu po premiku konj v zaprte prostore (34). Zaradi tega se predpostavlja, da so vzročni dejavniki za EPA biološki pašni delci. Specifični antigeni, ki pogojujejo nastanek EPA, še niso natančno opredeljeni. Najverjetnejši etiološki dejavnik je cvetni prah (34). Verjetnost za nastanek EPA se poveča v vlažnem okolju zaradi nastanka mikrometerskega aerosola cvetnega prahu (34, 37).

2.1.2 Patofiziologija bolezni

Kljub temu, da je SEA predmet številnih raziskav, patofiziologija obolenja še vedno ostaja slabo opredeljena (2, 4, 5). Za natančnejše razumevanje SEA bo verjetno potrebno opredeliti posamezne značilnosti vnetja oz. fenotipe obolenja.

2.1.2.1 Vnetje

Vnetje dihalnih poti je bistvena lastnost SEA, ki se razvije zaradi pretiranega imunskega odziva na lokalnem tkivnem nivoju (4, 62, 63), kar je vezano na spremenjeno gensko regulacijo transkripcijskih dejavnikov, sproščanje vnetnih mediatorjev in aktivacijo vnetnih celic (64). Obolenje je sicer opisano kot bronhiolitis, vendar lahko vnetne spremembe opazimo tudi v bolj proksimalnih delih prevodnega dela dihalnih poti (33, 65). Odkritje, da le določen delež konj v neki splošni populaciji razvije klinične znake astme (4, 53, 54), je bila podlaga za hipotezo o alergijskem obolenju (5). Sprva se je razvila teorija, da se pri SEA razvije preobčutljivostna reakcija tipa 1 (66–70). Zaradi značilnega nevtrofilnega bronhiolitisa pa nekateri strokovnjaki menijo, da bi razvoj SEA lahko bila posledica tipa 3 preobčutljivostne reakcije (4, 5, 63, 71). Mehanizem razvoja vnetja v dihalih astmatičnih konj je kompleksen in dinamičen proces kombinacije prirojenega in pridobljenega imunskega odziva (63), katerega rezultat je kopičenje

velikega števila nevtrofilnih granulocitov v dihalih (3). Le-ti skupaj z limfociti T in lokalnimi celicami v pljučih (mastociti, makrofagi, endotelijskimi, bronhialnimi in respiratornimi epitelijskimi celicami) predstavljajo vir vnetnih mediatorjev, ki usmerjajo patogenezo bolezni (4). Nevtrofilni granulociti s sproščanjem vnetnih mediatorjev, vključno s citokini (IL-1 β , IL-6 in IL-17, ter tumor nekrotizirajočim dejavnikom alfa (TNF α)) in kemokini (na primer IL-8), vplivajo na razvoj bronhokonstrikcije, povečano izločanje sluzi in preoblikovanje pljučnega tkiva (34, 71, 72). Motena je tudi aktivacija dejavnikov, ki bi pri SEA delovali reverzibilno na dejavnike, ki vodijo do vnetja. Gre predvsem za moteno izražanje transkripcijskih dejavnikov, ki vplivajo reverzibilno na diferenciacijo nevtrofilnih granulocitov in posledično njihov stimulativen vpliv na vnetje (73). Za zagotavljanje ravnovesja med efektorsko obrambno vlogo nevtrofilnih granulocitov in poškodovanjem okolnega tkiva, je zelo pomembno tudi uravnavanje življenjske dobe nevtrofilnih granulocitov z apoptozo (4, 5, 34, 52, 73–75). Motena apoptoza nevtrofilnih granulocitov je neposredno povezana s številnimi obolenji (76), vključno s SEA (34, 77).

Pri vnetnem odzivu dihal in obnovi tkiva imajo pomembno vlogo tudi alveolarni makrofagi (5). Alveolarni makrofagi izločajo številne mediatorje vnetja, ki so med drugim močni kemoatraktanti za nevtrofilne granulocite (5, 78). Gostota makrofagov v bronhoalveolarnem izpirku (Bronchoalveolar lavage fluid, BALf), pridobljenem pri astmatičnih konjih, je večja kot v BALf-u zdravih kontrolnih konj (5, 79). V pljučih konj je tako prvi odziv na vdihane antigene aktivacija alveolarnih makrofagov, ki jim sledi invazija nevtrofilnih granulocitov; skupaj pa predstavljajo prvo obrambno linijo na površini prevodnih dihalnih poti (80).

S sekrecijo številnih citokinov je v patogenezo vnetja dihal pomembno vpleten tudi T-celično posredovan imunski odziv (4, 5). V patogenezi SEA imajo pri uravnavanju imunskega odziva pomembno vlogo predvsem T-celice pomagalke (T-helper cells, Th) in celice T zaviralke (4). Pri humani astmi prevladuje Th2-tip limfocitov, ki s produkcijo svojih citokinov (IL-4 in IL-5) sprožijo sintezo IgE in eozinofilno vnetje (2, 4, 81–83). Podobna patogeneza je bila predlagana tudi pri konjih, zlasti zaradi ugotovljenih povišanih vrednosti informacijske RNK (Messenger RNK, mRNK) za IL-4 v BALf-u obolelih konj (84–87). Povišane vrednosti IL-4 v BALf vzorcih konj so bile zaznane v kratkem časovnem obdobju po antigenskem izzivu, kar potrjuje alergijsko komponento obolenja (4, 84, 88). Vendar je patogeneza vnetja pri SEA v nekaterih fazah drugačna od humane; že samo povišanje deleža eozinofilnih granulocitov in mastocitov v bronhoalveolarnem tkivu pri konjih, v primerjavi s humano astmo, je zelo variabilna (4, 64).

Drugi raziskovalci pa so v BALF-u astmatičnih konj ugotovili povišano izražanje mRNK za interferon gama (IFN γ) in prevladovanje odziva Th1 (4, 84, 89–91).

Verjetno je, da na potek vnetja dihalnih poti pri SEA vpliva uravnotežen (nepolariziran) imunski odziv, ki temelji na Th1 in Th2 odzivu (4, 5, 88).

Nekateri raziskovalci navajajo, da so nevtrofilni granulociti prevladujoč ali celo ekskluziven regulator vnetja pri SEA, saj niso zaznali izražanja mRNK za IL-4 ali IFN- γ . Ustvarili naj bi lastno kompleksno citokinsko mrežo, saj poleg elementarnega IL-8 (bistvenega za imunomodulacijo v akutni fazi odziva) izločajo tudi TNF α in IL-1 β , ki sta prevladujoča pro-vnetna citokina (92). Preko teh citokinov nevtrofilni granulociti usmerijo delovanje in vnetni odziv drugih celic v dihalih (makrofagov, epitelijskih celic, endotelijskih celic in gladkomišičnih celic) (72), ki z nadaljnjim izločanjem IL-8 postavljajo vlogo tega citokina v center patogeneze SEA.

IL-8 je vnetni kemokin, ki spodbuja diferenciacijo T-celic in je hkrati najmočnejši kemoatraktant nevtrofilnih granulocitov v dihalih (4, 93–95). Izražanje gena za IL-8 je pri SEA konstantno povišano (95, 96), stimulirano pa je najpogosteje s strani TNF α in IL-1 β (97). Poleg samega privabljanja nevtrofilnih granulocitov na mesto vnetja, IL-8 uravnava tudi njihovo adhezijo in prehod skozi endotelij na mesto vnetja in jih nadalje spodbuja k fagocitozi in sproščanju encimov, ter vpliva na preoblikovanje tkiva dihal (98–101).

Pomembno vlogo pri progresiji in vzdrževanju vnetja pri SEA ima poleg TNF α in IL-1 β tudi IL-17 (102–104); ti dejavniki potem skupaj aktivirajo signalno zanko jedrnega dejavnika kapa-B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B) (103, 105–109). Povišano gensko izražanje omenjenih treh citokinov je bilo ugotovljeno tudi v BALF vzorcih astmatičnih konj (84, 88, 91, 94, 95, 110).

TNF α je zaradi izrazitega pro-vnetnega učinka neposredno vključen v večino vnetnih procesov in sodeluje pri aktivaciji signalnega omrežja povezanega z nastankom in vzdrževanjem vnetja, ki izhaja tako iz prirojene kot iz pridobljene imunosti (111, 112). Proizvajajo ga predvsem makrofagi, deloma pa tudi druge celice, ki pri razvoju vnetja sodelujejo z vzpostavitvijo kompleksne citokinske mreže (93, 94, 112). Na nevtrofilne granulocite TNF α sicer nima neposrednega učinka, vpliva pa na adhezijske molekule na endoteliju in izražanje drugih kemotaktičnih dejavnikov (IL-8) (95, 112, 113). Prek NF- κ B TNF α nadalje vpliva na proizvodnjo prostaglandinov (PG) (112) in izločanje sluzi (114). Največkrat je hkrati z njim povišano tudi izražanje pro-vnetnega citokina IL-1 β . Alveolarni makrofagi proizvajajo IL-1 β kot odziv na dražljaje (na primer lipopolisaharide (LPS)) (115), čemur sledi kaskadno

sproščanje pro-vnetnih mediatorjev TNF α , IL-6 ali IL-8, in izražanje adhezijskih molekul v gladkomišičnih celicah dihalnih poti (Airway smooth muscles, ASM), epitelijjskih in endotelijskih celicah (116). Kljub strukturalni različnosti imata IL-1 β in TNF α podobne biološke lastnosti (102), vnetje pa spodbuja aktivacijo obeh (117). Njuni sinergijski učinki usklajujejo pro-vnetne spremembe na tkivni in celični ravni ter sprožajo in stopnjujejo vnetne odzive (94, 112, 118). Inducirata tudi močno gensko ekspresijo IL-8 s strani različnih celic, ki pa nadalje deluje kot kemotaktični dejavnik za nevtrofilne granulocite (95, 112, 113, 119).

Citokini celic tipa Th17 prav tako pomembno sodelujejo pri patogenezi vnetja (120), vključno z astmo (121). Učinkujejo na metaplazijo respiratornega epitelija in povečano stopnjo preoblikovanja dihalnih poti (121). Pri razvoju nevtrofilnega vnetja ima IL-17 posredno vlogo z indukcijo izražanja mRNK za IL-8 s strani vnetnih, epitelijjskih in endotelijskih celic (109, 122). Poleg njihovega sinergijskega delovanja v zgodnjih fazah vnetja, IL-17 povratno pozitivno vpliva na izločanje TNF- α in IL-1 β s strani makrofagov (103). Povišano ekspresijo mRNK za IL-17 so zaznali tudi pri astmatičnih konjih po izpostavitvi prašnemu senu (95, 123, 124). IL-17 vpliva na razvoj nevtrofilije v dihalih astmatičnih konj, ki pa ni odzivno na zdravljenje s kortikosteroidi (109). Verjetno zaviralno vpliva tudi na proces apoptoze nevtrofilnih granulocitov in tako pomembno vpliva na obstojnost nevtrofilije v dihalih astmatičnih konj (109). Zaradi pomembnosti IL-17 v patogenezi vnetja, bi terapija, ki bi omejila njegovo izražanje, koristila pacientom z astmo v humani in veterinarski medicini.

Za razvoj klinične slike SEA je torej odgovoren pretiran in nenadzorovan imunski odziv. Celice prirojenega imunskega sistema preko receptorjev za prepoznavanje vzorcev (Pattern recognition receptors, PRR) prepoznajo različne antigenske molekule. Posledično se v telesu aktivira več signalnih poti in transkripcijskih dejavnikov, ki nadalje spodbujajo izražanje genov (125). Eden izmed glavnih transkripcijskih dejavnikov v večini živalskih celic je NF- κ B (126), ki vpliva na številne stresne, vnetne in prirojene imunske odzive, vpliva pa tudi na celično zorenje in preživetje (127). Pri sesalcih sestavlja mrežo NF- κ B beljakovin pet monomerov (p65/RelA, RelB, cRel, p50 in p52), ki tvorijo različne homodimere in heterodimere, ki se v jedru različno vežejo na DNK in posledično aktivirajo specifičen nabor genov (127, 128). V citoplazmi nestimuliranih celic se nanje tesno vežejo inhibitorni proteini- κ B (I κ B) in jih zadržijo v neaktivnem stanju. Pri sesalcih obstajajo trije glavni I κ B proteini (I κ B- α , β in ϵ). Signali, ki stimulirajo sproščanje NF- κ B molekul, to storijo tako, da sprožijo signalno pot, ki vodi do fosforilacije, ubikvitilacije in posledične razgradnje I κ B proteinov (127, 129). Signalno

pot NF- κ B v živalskih celicah aktivirajo različni receptorji na celični površini (128). V dihalih so predstavniki takih receptorjev tolični receptorji (Toll like receptors, TLR). TLR so družina transmembranskih receptorjev, ki prepoznajo molekularne vzorce in kot odgovor nanje sprožajo signalne kaskade, ki vodijo do aktivacije transkripcijskih dejavnikov, tudi NF- κ B (128, 130–132). Za prepoznavanje endotoksinov (zlasti LPS), ki so glavni posredniki vnetnega pljučnega odziva na organski prah (53), je bistven TLR-4 (133, 134). V dihalih ga izraža več tipov celic, vključno s pljučnimi epitelijskimi celicami (108, 135), alveolarnimi makrofagi (136), endotelijskimi celicami (137, 138) in ASM (139). Ko se omenjeni receptorji ob antigenskem dražljaju aktivirajo, sprožijo večproteinsko kaskado ubikvitilacije in fosforilacije, kar sprosti NF- κ B iz inhibitornega beljakovinskega kompleksa. NF- κ B nato preide v jedro in sproži transkripcijo velikega števila genov (127, 129). Med geni, ki jih aktivira sproščeni NF- κ B, je tudi gen, ki kodira I κ B- α . Ta aktivacija vodi do povečane sinteze proteina I κ B- α , ki se veže na NF- κ B in ga inaktivira, kar ustvarja regulatorno negativno povratno zanko (127). Eden izmed inhibitorjev NF- κ B je tudi protein A20; njegovo izražanje sprožijo različni stimulusi, med drugim tudi TNF α in IL-1 β . A20 deluje kot negativni regulator TLR-posredovanega vnetnega odgovora v dihalih in na ta način varuje gostitelja pred škodljivim prekomernim odgovorom na antigen (140). Pri konjih s SEA so vrednosti NF- κ B v BALf-u močno povišane, njegova koncentracija pa je povezana s stopnjo pljučne disfunkcije (64). Aktivnost NF- κ B v bronhialnem prostoru je povezana tudi z deležem nevtrofilnih granulocitov in njihovim procesom apoptoze (4, 64, 141). V jedrih nevtrofilnih granulocitov se namreč nahaja protein I κ B- β (katerega ekspresija, za razliko od I κ B- α , ni regulirana s strani NF- κ B), ki velja za najpomembnejši NF- κ B inhibitor pri konjih. Pri astmatičnih konjih so vrednosti I κ B- β nižje v primerjavi z nedovzetnimi konji, kar je najverjetneje mehanizem, ki preprečuje deaktivacijo NF- κ B. Zakasnela apoptoza nevtrofilnih granulocitov pri konjih s SEA pa ima, kot že omenjeno, eno glavnih vlog pri vzdrževanju vnetja (4, 142). Dodatno aktivirani nevtrofilni granulociti izločajo velike količine IL-1 β in TNF α , ki aktivirata NF- κ B, le-ta pa nadalje inducira izražanje obeh in na ta način ustvarja povratno zanko (4). Inhibitorni učinek proteina A20 je pri tem nezadosten (134).

NF- κ B p50/p65 je najbolj pogost heterodimer v procesu vnetja. Vendar so NF- κ B kompleksi v bronhoalveolarnem tkivu pri konjih s SEA v večini p65-homodimeri (4, 64, 85), kar morda razlaga odsotnost povišane ravni eozinofilnih granulocitov v BALf pri SEA. Izguba p50 lokusa pri knockout miših namreč zmanjšuje eozinofilni vnetni odgovor v dihalih (143). Ravno NF-

κ B-p65 podenota je z vezavo na DNK sposobna inducirati močno transkripcijsko aktivacijo provnetnih genov, kot je na primer IL-8 (129, 144). Ker p65 homodimere inducirajo IL-8 (ki je najbolj potenten kemoatraktant za nevtrofilne granulocite), ne pa tudi drugih kemoatraktantov, bi prisotnost teh določenih NF- κ B kompleksov v pljučih konj lahko morda razložilo, zakaj je fenotip vnetja pri SEA nevtrofilne narave (4). Povišana TLR4-signalizacija v kombinaciji s povečano aktivnostjo NF- κ B in nezadostnim regulatornim odgovorom A20 torej bistveno vplivajo na razvoj vnetja pri SEA dovzetnih konjih (60, 134). Poleg proizvodnje vnetnih mediatorjev pa stimulacija TLR-4 in NF- κ B privede tudi do povišanega izražanja mucina MUC5AC in hipersekrecije sluzi v dihalih (95).

2.1.2.2 Preobčutljivostni odziv in obstrukcija dihalnih poti

Obstrukcija dihalnih poti je patognomonična za SEA. Izraz se nanaša na anatomsko zožitev ali zaporo dihalnih poti, kar ima za posledico zmanjšan pretok zraka. Obstrukcijo dihal pri SEA povzročata predvsem izrazita bronhokonstrikcija (bronhospazem) in nabiranje večjih količin viskozne sluzi, vzrok zanju pa je preobčutljivostni odgovor dihal (AHR) na vdihane snovi (4, 145). V grobem obstajata dve komponenti AHR. Prva je spremenljiva ali epizodna AHR, dodatno pa se razvije še razmeroma trajna (konstantna) AHR (146). Spremenljiva komponenta AHR je povezana s trenutno izpostavljenostjo antigenom in posledičnim akutnim vnetnim odzivom ter razvojem klinične slike (147). Nasprotno pa je konstantna AHR posledica strukturnih in regulatornih sprememb v dihalnih poteh in odraža trajno prisotnost vnetja (71, 146), kar pomeni, da je AHR prisotna tudi pri konjih, ki v mirovanju ali pri zmerni obremenitvi (izpust, paša) ne kažejo očitnih kliničnih znakov.

Izpostavljenost dihalnih poti specifičnim dražljajem (npr. povišana koncentracija prahu v okolju, povišana koncentracija amonijaka v okolju, ter temperaturne in/ali tlačne spremembe v okolju) lahko pri SEA konjih sproži nastanek in prenos senzoričnih živčnih signalov v aferentni parasimpatični avtonomni živčni sistem in krčenje ASM. Krčenje ASM vodi do difuzne obstrukcije dihalnih poti in posledičnega razvoja značilnih kliničnih znakov oteženega dihanja (148). Bronhokonstrikcija in pljučna funkcija se izrazito izboljšata že v nekaj minutah po aplikaciji bronhodilatatornih zdravil, kar potrjuje, da je pljučna funkcija pri SEA močno povezana s patologijo ASM (4). Poleg bronhokonstriktorskega učinka imajo ASM tudi imunomodulatorni vpliv. Proizvajajo in reagirajo lahko na številne mediatorje vnetja, kar vodi

do migracije in proliferacije celic, proizvodnje beljakovin zunajceličnega matriksa (Extracellular matrix, ECM) in spremenjene odzivnosti tkiva (4, 5, 8).

Tudi kopičenje sluzi je značilen, a nespecifičen odziv različnih oblik vnetja dihalnih poti (51). Nabiranje velikih količin goste in lepljive sluzi v dihalnih poteh je dosledna najdba pri astmatičnih konjih (4–6, 34, 53), pojavlja pa se v soodvisnosti z nevtrofilnim vnetjem in kašljem (71, 149, 150). Razlog je lahko povečano izločanje sluzi ali pa povečano število vrčastih celic (ki pri konjih domnevno izločijo večino mucina (4, 65, 151)). Poleg povečanega oziroma pospešenega nastajanja sluzi je vzrok za nabiranje sluzi v dihalih tudi zmanjšan očistek sluzi, ki je lahko posledica sprememb mukociliarnega aparata ali fizikalnih lastnosti sluzi (4, 151). Gerber in sod. (2000, 2004) so opisali spremembe reoloških lastnosti sluzi, ki so sovpadale s kliničnim poslabšanjem SEA (150, 152). Kvantitativne in kvalitativne spremembe v kemični zgradbi sluzi so izražene v stranskih verigah ogljikovih hidratov mucinov dihalnih poti (153). To je lahko posledica sprememb izražanja določenih genov za mucin (5), na kar pri astmatičnih konjih vplivajo pro-vnetni citokini (TNF α) (63, 114, 154, 155). Vpliv na reološke lastnosti sluzi imata tudi sama hidracija sluzi in prisotnost vnetnih celic (nevtrofilnih granulocitov) (4).

Podatki o učinkovitosti mukociliarnega očistka pri konjih s SEA so si nasprotujoči (4). Izguba ciliranih celic in/ali spremenjena ciliarna struktura sta bili ugotovljeni samo pri omejenem številu konj s SEA (156, 157). Odpoved mukociliarne funkcije pa verjetno povzroči povečana viskoznost sluzi v dihalnih poteh (153). Pri hudih oblikah astme lahko sluz, ki se akumulira v večjih jezercih znotraj mešičkov, celo mineralizira. Taki bronhialni in alveolarni čepki so pogosti pri napredovani obliki bolezni in najverjetneje prispevajo k ireverzibilnemu in progresivnemu slabšanju respiratorne funkcije (4, 65, 71, 156, 158–160).

2.1.2.3 Preoblikovanje tkiva dihal

Izraz "preoblikovanje" ali remodelacija opredeljuje patološke dogodke, ki privedejo do strukturnih in arhitekturnih sprememb tkiva (34). Te spremembe povzročijo delno ali nepovratno obstrukcijo dihalnih poti, AHR in pospešen upad pljučne funkcije (71). Histološko se preoblikovanje dihalnih poti izraža s hiperplazijo epiteljskih in vrčastih celic, povišano maso ASM ter spremembo v nalaganju kolagenskih in elastičnih vlaken (5, 161). Pri SEA so te spremembe sicer generalizirane v vseh predelih spodnjih dihalnih poti, najbolj pa so očitne v spodnjih dihalnih poteh s premerom manjšim od 2 mm (162).

Spremembe na nivoju ASM se smatrajo kot najbolj patognomonične. Astmatični konji imajo 50 % (163) do celo 300 % (164, 165) povečano volumensko gostoto oziroma površino ASM v spodnjih dihalih v primerjavi z zdravimi konji. K temu verjetno prispevata tako hiperplazija kot hipertrofija ASM (162).

Pljučno funkcijo poslabša tudi izguba elastičnosti pljuč. Ustrezno prehodnost majhnih dihalnih poti namreč zagotavlja njihova povezava s pljučnim parenhimom preko elastičnih in kolagenskih vlaken (34). Spremenjena struktura, položaj in funkcionalnost teh vlaken preprečuje, da bi najmanjše dihalne poti ostale odprte (34, 166). Strukturne spremembe pridejo do izraza predvsem med izdihom, ko se premer dihalnih poti zoži (34). Z občutno oslavljenim izdihom ostane del zraka, ki doseže mešičke, ujet (34). To vodi do pojava dihanja s povečano funkcionalno rezidualno kapaciteto pljuč, kar vodi v prenapihnenost (hiperinflacijo) pljuč in povečanega pljučnega polja (34). S to patologijo so povezana predvsem kolagenska vlakna tipa I in III. Kolagen tipa III je povezan z raztegljivostjo tkiva, medtem ko je kolagen tipa I glavni matrični element, ki se nateznim silam upira in s tem vzdržuje integriteto tkiva (162). Količina obeh tipov kolagena je v distalnih dihalnih poteh astmatičnih konj močno povečana (167, 168). Obdobje remisije in zdravljenje s kortikosteroidi lahko zavre in delno zmanjša patološko kopičenje kolagena (7). Tudi količina elastičnih vlaken v dihalnih poteh astmatičnih konj je povečana v primerjavi z zdravimi konji. Vendar preoblikovanje elastičnih vlaken ne sovпада z izražanjem klinične slike SEA (168).

2.1.3 Klinični znaki SEA

Karakterističen klinični znak pri SEA je povečan dihalni napor (dispneja), ki se pojavlja tudi v mirovanju (34). V obdobju remisije se klinični znaki po navadi delno ali popolnoma umirijo. Kljub temu pa se dispneja zaradi preoblikovanja pljučnega tkiva in konstantno prisotnega vnetja (čtetudi umirjenega) skoraj vedno pojavi ob fizičnem naporu (5). Drugi klinični znaki (povečana frekvenca dihanja, dihanje z razširjenimi nosnicami, kašelj in izcedek iz nosu) so bolj nespecifične narave (5, 34). Kašelj je učinkovit mehanizem čiščenja mukoidnih izločkov iz predela sapnika in velikih bronhijev, ne pomaga pa pri odstranjevanju sluzi iz bolj distalnih predelov pljuč. Ob močno napredovanih stanjih so pogosti napadi paroksizmalnega kašlja (5). Spremenjen je tudi vzorec dihanja; vdih je po navadi hiter, medtem ko je izdih podaljšan in poudarjen. Izdih je velikokrat dvofazen, saj pride najprej do upada prsnega koša, nato pa na koncu izdiha še do aktivnega iztiska zraka s krčenjem trebušne mišičnine (2). Pri konjih s takšno

dinamiko dihanja opazimo hipertrofijo poševnih trebušnih mišic, ki jo v kliničnem žargonu imenujemo 'nadušna linija' (2, 5). Opazimo lahko tudi premikanje peri-analnega območja, ki je sinhrono z dihanjem in je posledica intenzivnega napora ob dihanju (5). Avskultacija prsnega koša lahko razkrije pojačane dihalne tone obojestransko, razširjeno območje avskultacije zaradi zastajanja zraka v distalnih predelih in nenormalne oziroma patološke zvoke (hropce in žvižge) (5, 34). Patološki toni so posledica nabiranja sluzi v dihalnih poteh in njihove zožitve. Višji intraplevralni tlak, potreben za premikanje zraka skozi zoženo dihalno pot, poveča hitrost zraka in turbulenco, ki jih zaznamo kot pojačane dihalne tone (2). Spremembe povezane s hemogramom, serumsko biokemijo in presnovnimi parametri v krvi so zelo nespecifične in nediyagnostične za SEA (5, 6).

Kljub oteženemu dihanju konji ohranijo apetit, ostanejo živahni in odzivni; v primeru, da ni prisotne sekundarne infekcije, so afebrilni (5). Hudi kronični primeri lahko shujšajo, kar je največkrat posledica povečane porabe energije za dihanje (5). Lahko pa pride do razvoja sekundarnih pljučnic, saj so konji s SEA bolj dovzetni za bakterijske in virusne okužbe. Akutno poslabšanje SEA oziroma dlje trajajoč povečan napor ob dihanju je povezan tudi s povečanim tlakom v pljučni arteriji in obremenitvijo desnega srca (34, 169). Med klinično remisijo se krvni tlak sicer normalizira, na srcu pa kljub temu ostanejo patološke spremembe v obliki odebelitve stene desnega prekata (169), kar privede do *cor pulmonale*. Slednji je tudi najpogostejši vzrok pogina (170), če konj ni prej evtanaziran zaradi humanih razlogov. Evtanazija je pravzaprav najpogostejša oblika smrti konj s SEA, saj veterinarski stroški in prilagoditve pri oskrbi konja za lastnike niso več finančno vzdržni (5, 34, 41).

2.1.4 Diagnostika bolezni

Na SEA po navadi posumimo na podlagi zgodovine in klinične slike. Dokončno diagnozo postavimo z meritvami pljučnih funkcij, endoskopskim pregledom dihal in citološko analizo odvzetega BALf-a.

2.1.4.1 Merjenje pljučnih funkcij

S testiranjem pljučnih funkcij ocenjujemo sile in upore v pljučih, ki se pojavijo ob aktu vdihavanja in izdihavanja. Pri tem se največkrat poslužujemo merjenja sprememb v transpulmonarnem ali (intra)plevralnem pritisku, dinamične (elastične) popustljivosti pljuč (C_{dyn}), upornosti pljuč (R_L) in intenzivnosti dela, ki je potreben za premik prsne/trebušne stene. Pri SEA so delo,

največje spremembe v intraplevralnem pritisku ($\Delta P_{pl_{max}}$) in R_L po navadi povišani, zmanjšana pa je C_{dyn} (4). C_{dyn} in R_L sta pri konjih relativno slabo občutljivi diagnostični metodi, ker se spremenita šele pri napredovanem obolenju (4). Zaradi tega se najpogosteje poslužujemo merjenja $\Delta P_{pl_{max}}$. $\Delta P_{pl_{max}}$ predstavlja razliko oz. razpon intraplevralnega tlaka med najnižjim tlakom vdiha in največjim tlakom izdiha. Pri konjih s kroničnim obolenjem dihal je $\Delta P_{pl_{max}}$ povečan (171–173). Za merjenje intraplevralnega tlaka se lahko uporabi direktna oz. neposredna metoda ali intraplevralna ezofagealna oz. posredna metoda. Metodi sta medsebojno dobro primerljivi (172, 174), vendar je neposredna metoda bolj invazivna. Med plevralna lista vstavimo kateter in direktno merimo razliko med tlaki na manometru (173). Pri posredni metodi v požiralnik do nivoja prsnega koša vstavimo daljši kateter, ki ima na svojem koncu fiksirano tlačno komorico (balonček). Na ta način se za oceno plevralnega tlaka uporablja torakalni tlak v požiralniku (175–178). Ker je slednja metoda manj invazivna in njena izvedba enostavnejša, se je poslužuje večina klinikov in raziskovalcev. Slabosti te metode so intrinzični ton požiralnika in da na rezultate meritev lahko vplivajo tudi akcija srca, akt požiranja, kašelj, postavitve tlačne komorice oziroma dolžina vstavitve katetra (174, 179). Kljub temu, da posredna metoda merjenja intraplevralnega pritiska ne zagotavlja največje natančnosti, še vedno predstavlja zanesljivo diagnostično orodje za SEA in ostala obstruktivna obolenja pljuč (172).

Objavljen je širok razpon normalnih vrednosti meritev pljučnih funkcij pri konjih, kar otežuje interpretacijo rezultatov individualnih testov. Poleg realnih razlik med posamezniki lahko na rezultate vpliva cirkadiana in/ali sezonska variabilnost (4, 173, 180, 181) ter razlike v metodologiji (postavitve konca ezofagealnega balona, volumna mrtvega prostora v ceveh, uporaba sedativov) (4, 182). Povprečne vrednosti $\Delta P_{pl_{max}}$ za konje z zdravimi dihali, ki so jih na podlagi svoje raziskave določili Deegen in sodelavci (1987), so $2,8 \pm 0,6$ cmH₂O (172). Pri konjih, obolenih za SEA, poročajo o močno povišanih vrednostih $\Delta P_{pl_{max}}$, rezultati meritev pa so odvisni tudi od same stopnje bolezni (171, 172, 183–187). Pri diagnostiki SEA je pomembno tudi ugotavljanje reverzibilnosti obstrukcije dihal, ki jo dosežemo z aplikacijo bronhodilatatornih sredstev med izvajanjem meritev (34).

2.1.4.2 Endoskopski pregled dihal

Endoskopija zgornjih in spodnjih dihal omogoča vizualizacijo in ocenjevanje stopnje vnetja sluznice, količine in vrste izločkov v dihalnih poteh ter stopnje bronhokonstrikcije (4, 188).

Endoskopijo dihalnega sistema izvajamo na stoječi, sedirani živali.

Endoskopija dihalnih poti pri konjih, obolelih za SEA, razkrije variabilno količino viskozne sluzi že v sapniku (71, 149, 150, 189, 190). Bifurkacija sapnika je pogosto odebeljena (edematozna) in sluznica dihalnih poti je hiperemična ter razdražljiva (5, 191). Konji zato ob dotiku endoskopa z dihalno sluznico pogosto zakašljajo. Ob tem lahko pride do dinamičnega kolapsa intratorakalnih dihalnih poti (192). V izogib temu je pred začetkom endoskopije priporočljiva aplikacija bronhodilatatorja, ki omogoča varnejše in natančnejše vzorčenje (193, 194). Med endoskopijo lahko opazimo celo razširjene in/ali deformirane stene bronhijev, kar je največkrat posledica bronhiektazije (omejene in trajne razširitve večjih dihalnih poti), ki se lahko pojavi pri hudih in dolgotrajnih primerih SEA (195).

2.1.4.3 Pridobivanje in analiza bronhoalveolarnega izpirka

Bronhoalveolarna lavaža (Bronchoalveolar lavage, BAL) je postopek, s katerim pridobimo vzorec izločkov, ki prekrivajo površino dihalnih poti in mešičkov. Sam postopek je varen, ponovljiv in primerno občutljiv za odkrivanje vnetja na celičnem nivoju (4).

Na splošno velja, da je reprezentativen že en sam vzorec izpirka pridobljen iz kateregakoli segmenta pljuč (4, 5, 196–199). Aplikiramo lahko 250–500 mL sterilne izotonične tekočine (fiziološke raztopine ali fosfatno-puferirane fiziološke raztopine (Phosphate-buffered saline, PBS)) pogrete na telesno temperaturo (37 °C) (198, 200). Tekočino po aplikaciji takoj reaspiriramo. Po navadi na tak način pridobimo 40–60 % aplicirane tekočine. Pri konjih z močno izraženimi kliničnimi simptomi SEA je lahko izpirka zaradi razdraženosti in intenzivnega kašljanja ter dinamičnega kolapsa dihalnih poti med postopkom tudi manj (4, 194, 201).

Najbolj kvaliteten vzorec pridobimo pri sediranih konjih in primerno zagozdenem endoskopu (198). Sama izbira tehnike in predhodna fizična aktivnost konja na rezultate BAL-citološke analize nimata vpliva (198,202). Za sedacijo se po navadi uporabi intravenska aplikacija α 2-agonista v kombinaciji s sintetičnim opioidnim analgetikom butorfanolom (198). Slednji ima poleg sedativnih in analgetičnih učinkov v določenih odmerkih (0,02 mg/kg telesne teže (TT) IV (203)) tudi antitusičen učinek in pomembno zmanjša refleks kašljanja med postopkom (204). Pri postopku pridobivanja BALf so zapleti redki (198).

Diagnostično pomemben je že makroskopski pregled pridobljenega izpirka, ki zajema barvo, motnost in prisotnost sluznih kosmičev ali drugih struktur (4, 198). BALf, pridobljen pri zdravem konju, je brezbarven in blago moten. Povečana motnost je po navadi povezana z večjo vsebnostjo celic (198, 205). Vzorec nadalje centrifugiramo na nižjih obratih, iz sedimenta pripravimo razmaze, ki jih posušimo in obarvamo z Diff-Quick (modificiran Romanowski), Giemsa ali Leishmanovim barvilom (198). Za diferencialno citološko analizo preštejemo vsaj 400 do 500 celic (198, 205, 206). Na rezultate citološke analize lahko vplivajo količina aplicirane tekočine, mesto vzorčenja, postopek re-aspiracije, reakcija živali na poseg, določitev vzorčenega alikvota, priprava in rokovanje z vzorcem in/ali izbrana metoda štetja celic. Glede na konsenz strokovnjakov iz leta 2016 so BALf referenčne vrednosti sledeče (6, 205):

- 1) pri uporabi 250 ml aplicirane tekočine se za normalne vrednosti smatra manj kot 530 celic/ μ L skupnega števila celic z jedrom, od tega $\leq 5\%$ nevtrofilnih granulocitov, $\leq 1\%$ eozinofilnih granulocitov in $\leq 2\%$ metakromatsko obarvanih celic, ter 50 – 70 % makrofagov in 30-50 % limfocitov. Epitelijske in vrčaste celice so redke (6, 198);
- 2) Pri uporabi 500 mL aplicirane tekočine je potrebna prilagoditev referenčnih vrednosti BALf, ker podvojitev volumna aplicirane tekočine na določen predel dihal povzroči nižje skupno število celic in deleža posamezne oblike celic (6).

Diagnostično vrednost citološke analize izpirka določimo tudi na podlagi posameznega primera ob upoštevanju zgodovine bolezni, klinične slike, okrnjenosti pljučne funkcije in ugotovitev, pridobljenih z endoskopijo dihal (6, 199, 207, 208). Pri konjih, obolelih za SEA, je značilen močno povišan delež nevtrofilnih granulocitov ($> 25\%$). Delež limfocitov in alveolarnih makrofagov se na račun povišanih vrednosti nevtrofilnih granulocitov zmanjša (4, 6, 209, 210). Pri hudo prizadetih živalih lahko nevtrofilni granulociti predstavljajo celo več kot polovico vseh celic.

2.1.4.4 Patomorfološke spremembe pri SEA

Zaradi značilnega poteka bolezni in zastajanja zraka so pljuča pri konjih s SEA ob patomorfološkem pregledu po navadi svetlorožnata, mehka oziroma puhasta. Dajejo občutek prenapihnenosti, a ob tem največkrat ne zaznamo emfizematoznih sprememb, saj so stene mešičkov intaktne. Prenapihnenost pljuč je posledica ujetja zraka zaradi izrazite bronhokonstrikcije in povečane količine viskozne sluzi (2, 4, 211–213). Histopatološke spremembe so omejene predvsem na vnetja bronhiolov, ki se izražajo z infiltracijo vnetnih

celic, predvsem limfocitov v peribronhialnem tkivu, in z invazijo lumna z nevtrofilnimi granulociti in sluzjo. Eozinofilne granulocite redko opazimo (2). Pri patološki preiskavi v veliko primerih ugotovimo tudi hipertrofijo zunanjih poševnih trebušnih mišic in desnega ventrikla srca (169).

2.1.5 Obravnava in zdravljenje astmatičnih konj

2.1.5.1 Prilagoditev bivalnega okolja

Zmanjšanje izpostavljenosti konja prahu je ključnega pomena za uspešno dolgoročno odpravljanje dispneje (4–6). Pri SEA se remisija kliničnih znakov in vnetja dihalnih poti najhitreje doseže s premikom konj na prosto (5). Kadar to ni mogoče, je potrebno omejiti izpostavljenost hlevskemu prahu s spreminjanjem režima krmljenja in nastiljanja ter z optimizacijo prezračevanja (5, 6, 214, 215). Pomembno je, da se spremembe v oskrbi konja uveljavijo v celotnem hlevu in pri vseh konjih, ki delijo zračni prostor (216). Pri konjih, obolelih za EPA, pa je bistven umik konj iz pašnika oziroma območja, kjer so se razvili klinični znaki, in jih prestaviti v zaprt prostor, kjer prav tako nadziramo prašnost v okolici (5).

Pri opisanih ukrepih moramo biti zelo dosledni. Že zgolj enkratna izpostavitve konj suhemu in prašnemu senu navzlic temu, da so konstantno na prostem, lahko privede do vnetnega odziva dihalnih poti (5, 79). Ob primerni prilagoditvi okolja vnetje dihalnih poti in posledični klinični znaki po navadi izzvenijo. Odprava kliničnih znakov astme s strogimi spremembami v okolju se največkrat začne nekaj dni po ustrezni prilagoditvi okolja, lahko pa traja tudi do nekaj tednov (187). Kljub vsem ustreznim prilagoditvam je pri nekaterih konjih lahko ohranjena manjša stopnja vnetja dihal in abnormalna funkcija pljuč (5, 217–219).

2.1.5.2 Medikamentozno zdravljenje

Kadar ustreznih ukrepov za zmanjšanje prahu v konjski okolici ni mogoče v celoti izvajati, kadar le-to ni zadovoljivo ali kadar je potrebno urgentno lajšanje dispneje, se je za zdravljenje SEA potrebno poslužiti ustreznih zdravil (5, 13, 220).

Najučinkovitejša protivnetna zdravila, ki so trenutno na voljo za lajšanje kliničnih znakov SEA, so kortikosteroidi. Delovanje dihal izboljšajo z zaviranjem učinkov vnetnih celic in njihovih mediatorjev ter posledičnim zmanjšanjem krčenja ASM, potenciranjem bronhodilatatornih učinkov kateholaminov in zmanjšanjem proizvodnje sluzi (5). Vsa zdravila iz te družine imajo enak mehanizem delovanja: vežejo se na celične glukokortikoidne receptorje, ki so v velikih

količinah prisotni na površini bronhialnih celic. Ta vezava aktivira zapleteno znotrajcelično kaskado dogodkov, ki vodijo do inhibicije aktivacije citoplazemskega NF- κ B oziroma njegovega prehoda v jedro celice (129, 221–223). Kortikosteroidi so trenutno najučinkovitejše zdravilo za lajšanje SEA, vendar je lahko njihova aplikacija povezana z neželenimi sistemskimi in lokalnimi učinki (2, 5). Številni kliniki se zaradi tega raje poslužujejo inhalacijske terapije s kortikosteroidi. Le-ta je učinkovita predvsem zaradi velikega števila glukokortikoidnih receptorjev v dihalih, in tako zagotavlja največjo koncentracijo zdravila na efektorskih mestih. Vendar lahko tudi inhalacijski kortikosteroidi negativno vplivajo na delovanje nadledvične žleze (4, 6). Poleg tega vsi konji inhalacijske terapije ne prenašajo dobro in se ji upirajo. Pri kortikosteroidni terapiji se sprva poslužujemo visokih odmerkov, ko pa se klinični znaki umirijo, se odmerki empirično zmanjšujejo, dokler ni dosežen učinkovit vzdrževalni odmerek ali zdravljenje v primeru zadovoljive remisije lahko prekinemo (5). Kljub zdravljenju vnetje dihal pogosto vztraja, klinična slika pa se, še posebej v primerih, ko se hkrati ne izvaja strog režim nadzora okolja, po prenehanju uporabe zdravil poslabša (5, 6).

Za zdravljenje SEA so učinkoviti številni kortikosteroidi (5), med katerimi je najpogosteje uporabljen sistemski kortikosteroid deksametazon (5). Medtem, ko lahko klinično izboljšanje (v smislu olajšanega dihanja) opazimo že v nekaj urah po začetni terapiji (224), je maksimalen učinek (v smislu izboljšanja pljučne funkcije) opazen šele čez nekaj dni ali celo tednov (4, 5). Neustrezni (prenizki) odmerki sicer prehodno izboljšajo obstrukcijo dihalnih poti, vendar nimajo zadostnega vpliva na zmanjšanje samega vnetja v dihalih (225–227). Poleg deksametazona se za sistemsko zdravljenje SEA uporablja tudi prednizolon (13, 217), prednizon (227–229), izoflupredon acetat (230) in triamcinolon acetonid (5, 231). Predvsem slednji je med kliniki priljubljen zaradi enkratnega odmerjanja in dolgoročnega učinka, ki traja do štiri tedne po aplikaciji. Vendar za rutinsko zdravljenje konj ni priporočljiv zaradi izrazite supresije nadledvične žleze, ki traja še nekaj tednov po administraciji (4, 5, 231).

Ker kortikosteroidi ne omogočajo takojšnjega olajšanja obstrukcije dihalnih poti, se za reševanje respiratorne stiske konja uporabljajo bronhodilatatorji (4–6). Za razliko od kortikosteroidov je njihovo delovanje hitro, vendar kratkotrajno (5). Med akutno obstrukcijo dihalnih poti bronhodilatatorji zmanjšajo pljučni upor in $\Delta P_{pl_{max}}$ ter hkrati omogočajo hitrejše odstranjevanje izločkov iz dihal, ne vplivajo pa na vnetni proces. Nanje se hitro razvije toleranca (5). Ob dajanju bronhodilatatorjev je nujno potrebno zagotoviti zmanjšanje prahu v dihalni okolici konja in po potrebi zdraviti pacienta tudi s kortikosteroidi. Vnetje spodnjih

dihalnih poti se po uporabi bronhodilatatorjev lahko celo poslabša zaradi povečane obremenitve distalnih dihalnih poti z antigeni (5, 6). Samostojna dolgoročna uporaba bronhodilatatorjev v nespremenjenem okolju je tako celo kontraindicirana (2). Pri človeški astmi je bila uporaba β -agonističnih bronhodilatatorjev celo povezana s povečano smrtnostjo (2, 232).

Zaradi njihovih potencialno hudih neželenih učinkov antiholinergičnih zdravil običajno ne dajemo ob rutinskem zdravljenju konjske astme (5). Atropin, ki je kompetitivni antagonist muskarinskih receptorjev, po intravenskem vnosu zagotavlja hitro in učinkovito bronhodilatacijo (sicer krajšo od dveh ur), a je povezan s tahikardijo, midriazo, povečano viskoznostjo dihalnih izločkov, ileusom in posledično koliko (233). Tudi po inhalacijski administraciji atropina so bili zabeleženi podobni neželeni stranski učinki (234). Za inhalacijsko terapijo je varno zdravilo ipratropijev bromid, strukturni analog atropina, ki začne delovati približno 15–30 minut po administraciji, bronhodilatacija pa traja štiri do šest ur (5, 235, 236).

Čeprav lahko uporaba mukokinetičnih zdravil pomaga zmanjšati količino izločkov v velikih dihalnih poteh, so dokazi o njihovi učinkovitosti pri izboljšanju kliničnih znakov SEA slabi (5, 6). Antitusična sredstva za zdravljenje SEA niso indicirana, saj kašelj omogoča eliminacijo dihalnih izločkov (5).

Zaradi omejene terapevtske uspešnosti zdravil, ki se trenutno uporabljajo za lajšanje simptomov SEA, se lastniki odločajo tudi za zdravljenje z alternativnimi metodami (akupunktura, razna zelišča). Učinkovitost in varnost aplikacije alternativnih metod in zdravil nista natančno raziskani (5). Uporaba hiposenzibilizacije ali imunoterapije za zdravljenje SEA se je uveljavila zaradi komercialne razpoložljivosti *in vitro* serumskih antigenih testov. Njihova učinkovitost prav tako nima nedvoumne znanstvene podlage (5).

2.1.5.3 Uspeh zdravljenja SEA s klasično terapijo

Kljub temu, da pri večini pravilno obravnavanih konj dosežemo izboljšanje pljučne funkcije, s klasičnimi terapevtskimi pristopi, opisanimi v tem sklopu, ne dosežemo ozdravitve (1, 5). Glavna pomanjkljivost je, da ne preprečijo in/ali zdravijo patološkega preoblikovanja sten dihalnih poti (4–10).

Potreba po novih terapevtskih možnostih je zato velika. Slednje se morda odpira z razvojem področij regenerativne medicine.

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IN NJIHOVA UPORABA V REGENERATIVNI MEDICINI

Regenerativna medicina je veja medicine, ki teži k razvoju metod in postopkov za rast, obnovo ali nadomeščanje poškodovanih in obolelih celic, tkiv in končno organov. Vejo regenerativne medicine predstavlja tudi zdravljenje z matičnimi celicami (14). Bistvo zdravljenja z matičnimi celicami je premagati nezmožnost regeneracije poškodovanega tkiva po akutnem ali kroničnem obolenju. V humani in veterinarski medicini se zdravljenje z matičnimi celicami uveljavlja kot terapijska možnost za številne bolezni.

2.2.1 Tipi matičnih celic

Po definiciji so matične celice nediferencirane celice, sposobne samoobnavljanja in diferenciacije v različne specializirane celice (237). Glede na vir pridobivanja jih razvrščamo na embrionalne (Embryonic stem cells, ESC), odrasle in inducirane pluripotentne matične celice (Induced pluripotent stem cells, iPSC) (238, 239). Glede na njihovo stopnjo razvoja in zmožnost diferenciacije jih nadalje razvrščamo na pluripotentne in multipotentne celice (240). O prvi izolaciji človeških ESC so poročali leta 1998 (241), sama uporaba v medicini pa je naletela na številne etične, moralne in kulturne zadržke, saj je bilo njihovo pridobivanje povezano s človeškimi zarodki. Zato je bilo potrebno najti vir matičnih celic, ki ni bil vezan na zarodke. Alternativno sta leta 2006 predstavila Takahashi in Yamanaka, ki sta odrasle mišje fibroblaste reprogramirala v pluripotentne matične celice z retrovirusno transdukcijo štirih genov (OCT4, c-Myc, SOX2 in KLF4), kar je omogočilo pretvorbo somatske celice iz končno diferenciranega stanja v embrionalno celico (239). Te celice so poimenovali iPSC in so po svoji morfologiji, rastnih lastnostih in izražanju označevalnih genov podobne ESC. Čeprav je odkritje iPSC predstavljalo izjemen napredek v regenerativni medicini, lahko retrovirusne transdukcije ustvarijo kromosomske spremembe, ki povečajo tveganje za tumoregenez (239). Bolj aplikativno alternativo ESC predstavljajo matične celice, ki so naravno prisotne v odraslem organizmu. Kostni mozeg in kri iz popkovine vsebujeta hematopoetske matične celice (Hematopoietic stem cells, HSC) in ne-hematopoetske ali mezenhimijske matične celice (MSC). Slednje se nahajajo tudi v številnih drugih tkivih. Te celice so multipotentne, ker se lahko diferencirajo v različne tipe telesnih celic. HSC se lahko diferencirajo v različne celice imunskega sistema, eritrocite in trombocite, MSC pa v celice kosti, hrustanca, ligamentov, tetiv,

maščobe, kože, mišic, nevroglije in vezivnega tkiva. MSC se v telesu aktivirajo kadar je to potrebno za nadomestitev mrtvih, poškodovanih ali obolelih celic (14).

V primerjavi z drugimi vrstami matičnih celic so MSC etično bolj sprejemljive, njihovo pridobivanje, izolacija in gojenje do visokega števila pa so relativno enostavni. Da bi preprečil zmedo na področju raziskovanja matičnih celic odraslih, je Odbor za mezenhimijske in tkivne matične celice Mednarodnega društva za celično terapijo (International Society for cellular therapy, ISCT) predlagal niz standardov za določitev humanih MSC za laboratorijske znanstvene raziskave in predklinične študije (242). Pri tem so izpostavili naslednje pogoje:

1. MSC so adherentne in se pritrjujejo na podlago plastičnih posodic za gojenje tkivnih kultur (kadar se vzdržujejo v standardnih pogojih kulture),
2. 95 % populacije MSC mora izražati specifične označevalce – diferenciacijske skupke (Cluster of differentiation, CD) (CD105, CD73 in CD90) in ne smejo izražati drugih (CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79a ali CD19 in HLA razreda II), in
3. MSC morajo biti sposobne diferenciacije v osteoblaste, adipocite in hondroblaste pod standardnimi pogoji diferenciacije *in vitro*.

2.2.2 Vir MSC

2.2.2.1 Tkivni izvor MSC

Glede na vir imajo MSC lahko različne lastnosti, kar moramo upoštevati pri izbiri optimalnega postopka terapije z matičnimi celicami za sanacijo specifične bolezni. Najpogosteje uporabljena vira za MSC sta kostni mozeg (Bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSC) in maščobno tkivo (AD-MSC). Predvsem maščobno tkivo je še posebej privlačen vir MSC zaradi minimalno invazivnega postopka, potrebnega za pridobitev teh celic.

Čeprav imajo BM-MSC in AD-MSC podobno površinsko imunofenotipizacijo in trilinejsko diferenciacijo (243–245), obstajajo med njimi pomembne razlike v smislu proliferacijske in diferenciacijske sposobnosti celic ter njihovih sekretornih profilov glede na tkivo izvora in celo na živalsko vrsto darovalca. Prednosti AD-MSC so enostavnejši dostop do maščobnega tkiva, večje število celic na gram tkiva in višja stopnja proliferacije celic kot pri BM-MSC (17, 243, 244, 246–249), slednje pa izražajo večjo sekretorno proizvodnjo topnih dejavnikov in eksosomov (248, 249). Pasje AD-MSC imajo v primerjavi z BM-MSC večji hondrogeni (244) in osteogeni potencial (248), medtem ko sta pri konjih hondrogeni in osteogeni potencial bolj izražena pri BM-MSC (250, 251). Zdi se, da imajo konjske BM-MSC v primerjavi z AD-MSC

tudi višjo migracijsko zmogljivost (252). Lastnosti AD-MSC so nadalje odvisne tudi od samega anatomskega mesta resekcije. Visceralno maščobno tkivo zagotavlja večje število MSC v primerjavi s podkožnim maščobnim tkivom (253), iz visceralne maščobe pridobljene AD-MSC pa imajo tudi boljši proliferacijski potencial (254), dlje trajajočo multipotentnost v celični kulturi in bolj izražen osteogeni potencial (255). Za AD-MSC velja, da bolj učinkovito inhibirajo imunski odziv in imajo nižjo imunogenost v primerjavi z BM-MSC (256). Variabilnost v smislu pridobivanja in uporabe MSC povečujejo še drugi dejavniki. Med splošne sodijo živalska vrsta, starost in zdravstveno stanje darovalcev. Med bolj specifične pa spada namen njihove uporabe.

Trenutno nimamo določenih minimalnih meril za identifikacijo živalskih MSC (242). Medtem ko vse živalske MSC adherentne in izražajo diferenciacijski potencial, vse ne izražajo iste kombinacije površinskih antigenov, opisanih za človeške MSC. Večina ne-humanih MSC izraža CD29 in CD44, izražanje CD73, CD90 in CD105 pa se razlikuje glede na živalsko vrsto in izvorno tkivo celic (257–259). Pomanjkanje standardov za izolacijo, kultiviranje in karakterizacijo živalskih MSC zato onemogoča dosledno primerjavo rezultatov med študijami, raznolikost tkivnih virov pa povzroča težave pri določanju meril za natančno definiranje MSC.

2.2.2.2 Avtologni in alogeni vir MSC

Glede na odnos med darovalcem in prejemnikom lahko vir matičnih celic razvrstimo na avtologen, alogen ali ksenogen. V kolikor prejemnik za terapijo prejme svoje lastne celice, jih imenujemo avtologne matične celice, alogene matične celice se zbirajo in aplicirajo pri darovalcu in prejemniku iste vrste, medtem ko so ksenogene matične celice tiste, ki se presajajo in uporabljajo med posamezniki različnih vrst (260). Izolacija in namnožitev avtolognih matičnih celic je zamudna in povezana z dragim postopkom, medtem ko alogene celice predstavljajo možnost takojšnjega dostopa. Poleg tega lahko na potencial avtolognih MSC vpliva starost bolnikov (254, 261–264) in obstoječa klinična ali subklinična bolezen (265). Glaven zadržek pred terapijo z alogenimi matičnimi celicami predstavlja možnost, da prejemnikove CD8⁺ T-celice prepoznajo površinske molekule MHC na alogenih MSC, kar vodi v neposredno citotoksičnost ali produkcijo aloprotiteles (266). To je bilo opisano tudi pri konjih (267–269), kar pa po do sedaj poznanih podatkih ni klinično pomembno. Magri in sod. (2019) niso zaznali klinično pomembnih razlik ob primerjavi učinkov enkratnih in ponavljajočih aplikacij alogenih celic za zdravljenje osteoartritisa pri konjih (270). Možni so

tudi lokalni neželeni učinki na mestu vnosa alogeni celic, kar je najverjetneje posledica prejemnikovega imunskega prepoznavanja celic po ponovni izpostavitvi (268, 271, 272).

2.2.3 Terapevtsko učinkovanje MSC

Terapevtski učinek MSC se je najprej pripisoval njihovi migraciji na predel poškodovanega tkiva in zmožnosti diferenciacije v različne celične linije. Vendar, v obdobju enega tedna po sistemski aplikaciji MSC se v telesu ohrani celo manj kot 1 % MSC (17, 273–276). V zadnjih letih se zato bolj izpostavlja njihov imunoregulatoreni učinek, ki poteka s pomočjo parakrinega signaliziranja in interakcije z lokalnimi celicami imunskega sistema. MSC zavirajo aktivacijo in proliferacijo efektorskih T-celic, ki so odgovorne za poškodbe tkiva pri številnih boleznih, povečajo pa delež regulatornih T-celic (T-reg), ki zavirajo potek imunskih procesov in preprečujejo avtoimunost (277, 278). MSC zavirajo nadaljnje poškodbe tkiva in produkcijo pro-vnetnih citokinov preko interakcije z makrofagi. To je delno doseženo z zaviranjem proizvodnje reaktivnih kisikovih zvrsti (Reactive oxygen species, ROS) (279) in povečanjem proizvodnje IL-10 (280). Nadalje so zavrite kemotaktične lastnosti B-celic, saj MSC znižujejo izražanje B-celičnih kemotaktičnih receptorjev in ligandov (281, 282). Skupek imunomodulacijskih učinkov MSC torej vključuje njihovo parakrino delovanje, izločanje zunajceličnih veziklov (Extracellular vesicles, ECV), imunomodulacijsko delovanje apoptotičnih MSC ali njihovih delov (nekrobiološki učinek) in mitohondrijski prenos membranskih veziklov in organelov (283).

2.2.3.1 Parakrino delovanje MSC

Primaren mehanizem delovanja MSC je najverjetneje njihova parakrina signalizacija, kar ima za posledico funkcionalne spremembe lokalnega imunskega odziva (284–288). Parakrini učinki MSC se izražajo s sekrecijo različnih bioaktivnih molekul, zajemajoč signalne peptide (IL-6, IL-8 in žilni endotelni rastni dejavnik (Vascular endothelial growth factor, VEGF), ekstracelularne matriksne proteine (kolagen in elastin) in druge učinkovalce (17, 289). Med pomembnejše učinkovalce parakrinega delovanja MSC spadajo transformirajoči rastni dejavnik (Transforming growth factor, TGF) β , indolamin-2,3-dioksigenaza (IDO), prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-10 in TNF-stimulirajoči gen-6 (TSG-6).

TGF- β so skupina edinstvenih večnamenskih rastnih dejavnikov, ki vplivajo tudi na migracijo in naseljevanje (homing) MSC (290, 291), ter na njihovo proliferacijo in diferenciacijo. TGF-

β sprožijo tudi preklap makrofagov iz vnetnih (M1) v proti-vnetne ali regulativne (M2) fenotip in tako pomembno sodeluje pri indukciji T-reg (292–296).

Presnovni encim IDO je topen dejavnik, ki ga izločajo MSC v vnetnem okolju (286). IDO katalizira reakcije, ki vodijo do inhibicije proliferacije T-celic in indukcije nastanka T-reg (297), inhibicije B-celic (298) in naravnih celic ubijalk (Natural killer (NK) cells) (284), in je povezan z vzdrževanjem M2 fenotipa makrofagov (299).

PGE₂, glavni prostaglandin, modulira proizvodnjo kemokinov, zavira privabljanje vnetnih celic in poveča diferenciacijo regulacijskih celic (300). Je ključni mediator pri inhibiciji NK-celic (284) in ima vlogo pri polarizaciji makrofagov v smeri fenotipa M2 (301). Njegova vloga je bila nedavno dokazana tudi pri čiščenju apoptotičnih celic s strani MSC (302).

IL-10 je proti-vnetni citokin, ki omejuje odzivnost imunskih odgovorov tipa Th1 in Th2 in pomožne funkcije makrofagov ter dendritičnih celic (303). Zavira tudi ekspanzijo T-celic (304) in spodbuja produkcijo T-reg (305). Vir IL-10 še ni popolnoma dognan; možno je, da IL-10 v vnetnem okolju proizvajajo MSC same, ali pa le-te stimulirajo druge celice, ki začnejo ali povečajo izločanje IL-10 (303).

TSG-6 je z vnetjem-povezan protein s proti-vnetnimi in zaščitnimi lastnostmi (306). Izražajo ga različne celice kot odziv na vnetne dražljaje, vključno z MSC. Ima več funkcij, vezanih predvsem na imunosupresivno modulacijo in preoblikovanje ECM (307). Izražanje TSG-6 vpliva na morfologijo MSC, velikost njihovih ECV, hitrost proliferacije, diferenciacijski potencial, preživetje in sposobnost, da tvorijo kolonije. Zato ima ključni pomen pri ohranjanju lastnosti MSC (308). Izkazalo se je, da TSG-6 prav tako inducira preklap med M1 in M2 fenotipom makrofagov in poveča število T-reg celic, kar je imelo za posledico lažanje simptomov vnetnih stanj pri poskusnih modelih številnih obolenj (309–312).

MSC so torej zmožne spremeniti potek vnetja in posledice določenih bolezni s svojim parakrinim delovanjem na posameznikov imunski odziv. Na podlagi predvidenega ali pričakovanega cilja MSC terapije je možna tudi *in vitro* predpriprava MSC z različnimi stimulansi, ki imitirajo mikrookolje vnetega ali poškodovanega ciljnega tkiva. Na ta način se optimizira učinkovanje MSC že pred samo aplikacijo v telo prejemnika (313).

2.2.3.2 Izločanje zunajceličnih veziklov

Vezikli so prenašalci mikro RNK (MicroRNK, miRNK), mRNK, proteinov in mitohondrijev, ki jih ščiti membrana. Slednja ECV-jem omogoča potovanje na druge predele telesa (314, 315).

ECV v grobem delimo v skupine eksosomov (vezikli endocitotskega izvora s premerom 30 - 150 nm, obdanih s plazemsko membrano), mikroveziklov (premer 100 – 1000 nm, ne-endocitotskega izvora) in apoptotičnih telesc (premer 50 nm - 5 μ m; sprostijo se med membranskim brstenjem (blebbing) apoptotičnih celic) (316). MSC izločajo eksosome in vsaj tri druge vrste ECV podobnih velikosti (317).

Nekatere snovi, ki jih MSC sicer izločajo s parakrinim delovanjem, izločajo tudi z ECV in tako omogočajo prenos efektorjev na daljše razdalje po telesu (312, 318–320). Predstavljajo tudi potencial za izkoriščanje učinkov MSC na brezceličen način, kar lahko zmanjša možne stranske učinke celične terapije (314, 315). Verjetno pa je, da je za nekatere imunomodulatorne lastnosti MSC pomemben ravno medcelični stik (282, 285, 286, 321). Ko so toplotno-deaktivirane MSC (brez sekretoma, vendar s popolno integriteto membrane) aplicirali po IV poti, je prišlo do enakega uravnavanja delovanja monocitov kot pri uporabi živih celic; povečala se je koncentracija IL-10 in zmanjšala raven IFN γ , kar kaže na pomembnost neposrednega celičnega stika (282).

Pri iskanju aplikacij za terapevtsko uporabo ECV je glavna omejitev pomanjkanje standardiziranih tehnik za izolacijo in čiščenje ECV. Ligandi in tovor se razlikujejo med vrstami ECV, kar vodi v domnevo, da ima vsaka vrsta ECV drugačno funkcijo. Pomanjkanje standardiziranih metod za izolacijo eksosoma vodi v nezmožnost ločitve eksosomov od drugih podobno velikih ECV. Pomanjkljiva je tudi standardizacija metod za meritev čistosti ECV (322–324). Mednarodno društvo za zunajcelične vezikle (International Society for Extracellular Vesicles) zato svetuje, da se pri terapevtski uporabi ECV uporablja generični izraz "zunajcelični vezikel" in se izogne imenski kategorizaciji v podvrste. V kolikor se uporabi ime posamezne podvrste, jo je nujno natančno opredeliti. Potrditev funkcionalnosti ECV terapije zahteva, da do terapevtskega učinka pride brez medceličnega stika in, da le-ta ni dosežen z ECV-nepovezanimi topnimi parakrinimi dejavniki (325).

2.2.3.3 Nekrobiologija MSC

Tudi apoptoza celic ima pomembno vlogo v imunomodularnem učinku MSC. Fagocitni očistek umirajočih celic (eferocitoza) ne sodeluje le pri lajšanju vnetja in obnavljanju funkcije poškodovanega tkiva, temveč tudi pri imunskih odzivih vnetih tkiv (326). Imunski odziv po aplikaciji MSC ni odvisen zgolj od njihove aktivne imunomodulacijske aktivnosti, ampak posredno izhaja tudi iz reakcije drugih celic, ki jo sproži prisotnost MSC (282). MSC so po

aplikaciji v telesu (po IV aplikaciji) podvržene apoptozi ob prisotnosti citotoksičnih celic, predvsem CD56+ NK-celic in CD8+ T-celic. Apoptotične MSC nato fagocitirajo makrofagi, ki na koncu dosežejo imunosupresivno aktivnost s proizvodnjoIDO (327). Apoptotične celice tudi stimulirajo monocite k izločanju PGE₂ (328). Mehanizem MSC imunosupresije, ki izhaja iz apoptoze, je bolj izražen pri bolnikih, pri katerih se izraža visoka citotoksičnost (327, 328). De Witte in sod. (2018) so nadalje dokazali, da fagocitoza MSC po IV aplikaciji v pljučih povzroči izražanje specifičnega fenotipa monocitov na lokalnem in sistemskem nivoju, ki nadalje uravnava pridobljeni imunski odziv z indukcijo T-reg celic (329).

2.2.3.4 Prenos mitohondrijev

Tudi prenos mitohondrijev je eden izmed mehanizmov učinkovanja MSC, saj so sposobne medceličnega prenosa organelov preko tunelirnih nanocevk. S to aktivnostjo podajo možnost za aktivacijo ali nadgradnjo aerobnega metabolizma v somatskih celicah sesalcev, ki imajo slabo funkcionalne ali nefunkcionalne mitohondrije (330). V mišjem modelu pljučnice so bile humane BM-MSC sposobne prenosa svojih mitohondrijev skozi tunelirne nanocevke v alveolarne makrofage, kar je privedlo do njihove okrepljene fagocitoze in celo protimikrobnega učinka (331). Prenos mitohondrijev je bil uspešen tudi v pogojih *in vivo* po sistemsko apliciranih BM-MSC v mišjem modelu diabetične nefropatije (332).

2.2.4 Usmeritev in naseljevanje (homing) MSC

Poleg kompleksnih mehanizmov imunomodulacije je pomembna tudi sposobnost naseljevanja oziroma migracije MSC na področje poškodovanega tkiva. Usmeritev MSC je tesno povezana s kemičnimi dejavniki, kot so kemokini, citokini in rastni dejavniki. Za usmerjanje celic so pomembni tudi sami mehanski dejavniki, kot so mehansko naprežanje tkiva, togost matrice in mikrogravitacija (15).

Za zagotovitev lokalno visokega števila celic v relativno hitrem času je najbolj učinkovita metoda administracije MSC lokalna transplantacija. Vendar intraparenhimska injekcija MSC v nekaterih primerih ni mogoča (333). Enostavnejše so torej sistemske aplikacije, med katerimi je IV-pot najmanj invazivna, a močno omeji število MSC v ciljnem tkivu (17, 334–336). Migracija MSC je omejena že s samim izstopom iz sistemskega krvnega obtoka (337). Zelo očitno je tudi ujetje MSC v pljučni mikrocirkulaciji zaradi njihove velikosti (23, 273, 329, 334, 338–341). Dodatni razlog za kopičenje MSC v pljučih so tudi molekulske interakcije MSC s

pljučnim endotelijem. Wang in sod. (2015) so bili prvi, ki so dokazali, da je kritični vzrok ujemanja MSC v pljučnem tkivu njihovo prekomerno izražanje in aktivacija integrinov (342). Blokada integrinov je povzročila znatno zmanjšanje ujetja MSC v pljučnem tkivu pri miših, povečano raven cirkulirajočih MSC v krvi in izboljšala usmerjanje MSC v ciljna tkiva (342). Ob spremljanju označenih živih celic po sistemski infuziji se je nadalje izkazalo, da so MSC kratkožive in jih 24 ur po infuziji v organizmu niso več zaznali (273, 329). Kljub kopičenju celic v pljučih in kratki preživitveni sposobnosti po IV administraciji MSC izražajo dolgoročen učinek preko apoptoze in fagocitoze s strani imunskih celic (329).

2.2.5 Posebnosti konjskih MSC

Konjske MSC so adherentne in sposobne diferenciacije v številne linije (343, 344). Mnogokrat se za dokazovanje verodostojnosti uporablja označevalce kot zahtevajo smernice ISCT, ki so podane za določanje humanih MSC (242, 344, 345). Imunotipizacijo konjskih celic pa ovira pomanjkanje oziroma omejena dostopnost specifičnih označevalcev in monoklonalnih protiteles (346–348), ter neuspele navzkrižne reakcije z označevalci drugih vrst (349).

Kot vir MSC pri konjih so primerni kostni mozeg, maščobno tkivo in popkovina, saj ustrezajo načelom ISCT. Pri konjih se za zdravljenje najpogosteje uporabljajo BM-MSK ali AD-MSK, ki se v pogojih *in vitro* dobro diferencirajo in množijo (344, 350). Konjske BM-MSK imajo boljši diferenciacijski potencial kot AD-MSK in verjetno predstavljajo primernejši vir celic za zdravljenje oziroma regeneracijo muskuloskeletnega sistema. Teh razlik sicer še niso potrdili v pogojih *in vivo* (344, 351). Maščobno tkivo zagotavlja večjo količino MSC z višjim proliferativnim potencialom (344). Tudi kriopreservirane AD-MSK so obdržale svojo proliferativno in diferenciacijsko sposobnost (352).

Zaradi narave poškodb in velikega interesa po hitrem okrevanju je alogeni vir celic v konjski medicini bolj zaželen kot avtologni. Alogena terapija namreč znatno zmanjša čas, ki je potreben za izolacijo in namnožitev avtolognih MSC, omogoča pa tudi uporabo bolj homogenih celičnih populacij z dokazano kapaciteto diferenciacije v različne linije (348, 353, 354).

2.2.6 Terapevtski učinki MSC na obolenja dihal

Čeprav so številne bolezni dihal in njihovo zdravljenje s konservativnimi in kirurškimi metodami dobro definirane, ostajamo pri nekaterih obolenjih dihal omejeni na simptomatsko

zdravljenje. Neustrezen imunski odziv in/ali medicinska obravnava lahko vodita do trajnega patološkega preoblikovanja tkiva in trajnega upada pljučne funkcije.

MSC imajo sposobnost modulacije imunskih celic tudi pri obolenjih pljuč (355). Sposobne so celo diferenciacije v alveolarne epiteljske celice v pogojih *in vitro* (356). Vedno več raziskav kaže na možne terapevtske učinke MSC pri zdravljenju astme. Učinek MSC, ugotovljen v predkliničnem preizkušanju zdravljenja astme, je povezan z uravnavanjem citokinov, ki izhajajo iz Th1, Th2 in Th17 tipa imunskega odgovora (22–24, 26, 357). Vnos BM-MSC znatno zmanjša eksperimentalno povišan vnetni indeks in število eozinofilnih in nevtrofilnih granulocitov v BALf-u podgan do ravni, ki so jih imele kontrolne zdrave živali brez astme (21). V skupini, ki je prejela BM-MSC, sta se število vrčastih celic in količina kolagena pomembno zmanjšala. Podobno ugodni učinki zdravljenja eksperimentalno inducirane astme z MSC so opisani pri miših (22, 358–360) in mačkah (27).

MSC imajo velik potencial tudi pri zdravljenju sindroma akutne dihalne stiske (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) (361). ARDS nastane zaradi močnega vnetnega odziva, ki povzroči poškodbe pljuč, hipoksemijo, izgubo pljučne compliance in pljučni edem, ki lahko vodijo v odpoved organov in smrt (361, 362). Vnetje povzroči invazija nevtrofilnih granulocitov in makrofagov v alveolarni prostor, ki skupaj s proizvodnjo provnetnih citokinov (IL-6, IL-1 β , IL-8 in TNF α) vodi do poškodbe endoteljskih in epiteljskih celic. Za obolenje obstaja samo simptomatska terapija. Številne celice so bile opredeljene kot potencialni kandidati za terapevtsko uporabo, med katerimi so zaradi svojega imunomodularnega potenciala najbolj zanimive MSC (361). Njihov terapevtski potencial je bil prikazan v več modelih ARDS *in vivo* in rezultati številnih predkliničnih in kliničnih raziskav so potrdili varnost njihove uporabe (29, 30, 361).

Trenutno je aktualno predvsem proučevanje njihovega terapevtskega učinka na ARDS, ki ga povzročijo respiratorni virusi (363). Vpliv matičnih celic na respiratorna obolenja je bil raziskan tudi pri bolnikih s COVID-19 (Coronavirus disease 2019), ki jo povzroča virus SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) (19, 363). Predklinične in klinične preiskave uporabljajo vrsto različnih celičnih virov, odmerkov, strategij odmerjanja in ciljne populacije bolnikov, da bi optimizirali učinek zdravljenja (363)

Po trenutno zbranih dokazih se smatra, da je uporaba MSC za zdravljenje bolezni pljuč varna (17). V eni izmed raziskav so pri bolnikih s COPD po zdravljenju z MSC celo ugotovili znatno znižanje C-reaktivnega proteina (364). V dveh raziskavah so poročali, da z računalniško

tomografijo prsnega koša še šest mesecev in eno leto po zdravljenju z MSC niso ugotovili nikakršnih fibrotičnih ali tumorogenih sprememb (365, 366). Nadalje so Stolk in sod. (2016) analizirali razlike v histologiji pljuč in ekspresiji določenih genov pri pacientih s COPD po zdravljenju z BM-MSC. Zdravljenje ni povzročilo povišane ekspresije pro-fibrotičnih genov ali izražanja mRNK proliferacijskih markerjev v tkivu pljuč, prav tako ni bilo zaznanih sprememb v histološki zgradbi (366).

Intratrahealna aplikacija bioloških terapevtskih učinkovin za klinično uporabo ima nekaj prednosti pred sistemsko. Zmanjšata se potreba po številu apliciranih celic in možnost razvoja neželenih sistemskih stranskih učinkov. Intratrahelana aplikacija omogoča tudi direkten dostop do lokalnega pljučnega imunskega sistema in hitrejšo interakcijo z njim (17). Glede na trenutno poznane učinke zdravljenja z MSC, ima njihova terapevtska uporaba pri obolenjih dihal (in drugih obolenjih) zelo velik potencial za lajšanje simptomov, ozdravitev in zmanjšanje trpljenja ljudi in živali.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RAZISKOVALNI PROTOKOL

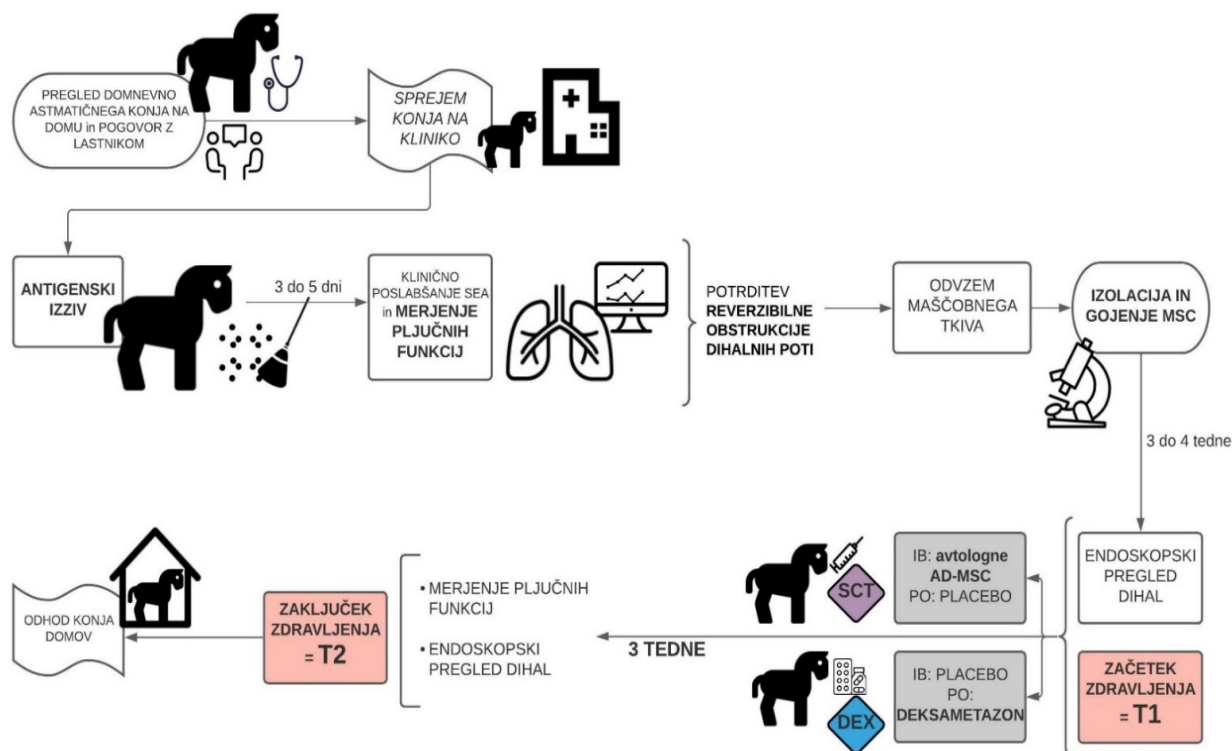
Klinično raziskavo smo zasnovali kot randomizirano, dvojno-slepo, s placebo kontrolirano raziskavo (U34401-37/2017/9; Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in okolje RS). Vsi sodelavci v raziskavi so bili glede režima zdravljenja posameznega konja zaslepljeni. Režim zdravljenja, ki je temeljil na vnaprej določeni randomizaciji, je poznala le znanstvena sodelavka, ki je za konje pripravila celice ali deksametazon in ni sodelovala pri drugih postopkih raziskave. Ostalim sodelavcem se je randomizacijska shema razkrila po tem, ko smo zaključili z vsemi laboratorijskimi analizami vzorcev in pridobili vse potrebne podatke za statistično analizo. Lastnikom smo obliko zdravljenja razkrili po tem, ko smo od njih pridobili podatke o dolgoročnem učinkovanju zdravljenja.

V raziskavo smo vključili dvajset konj s SEA. Vsi konji so bili nastanjeni v istem hlevu na Kliniki za konje na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Lastniki so pred vključitvijo konja v raziskavo podpisali soglasje po tem, ko smo jim pisno in ustno opisali postopke in potek raziskave, ter se pogovorili o možnih predvidenih ali nepredvidenih stranskih učinkih obeh režimov zdravljenja.

Konji so bili vhlavljeni pod enotnimi pogoji in pod rednim veterinarskim nadzorom. Dvakrat na dan smo pred njimi stresli prašno oz. plesnivo seno z namenom spodbuditi disperzijo antigena in sprožiti poslabšanje aktivne bolezni. Po doseženem kliničnem poslabšanju smo opravili test pljučne funkcije. Diagnoza SEA je temeljila na zgodovini sezonsko oteženega dihanja, natančnem kliničnem pregledu, izključitvijo kužnega obolenja, rezultatih meritev pljučnih funkcij, endoskopiji dihalnih poti in citološki analizi BALf-a. Ko smo potrdili diagnozo konjske astme in reverzibilno bronhokonstrikcijo, smo pri vsakem konju odvzeli košček maščobnega tkiva za izolacijo MSC.

Z zdravljenjem smo začeli, ko so bile matične celice namnožene do ustreznega, predhodno določenega števila. Konji so bili razdeljeni v dve skupini ($n = 10$ / skupino) in prejeli MSC ali deksametazon. MSC ali placebo (sterilni PBS) smo endoskopsko injicirali v desni pljučni reženj (Čas 1; T1). Konje, ki so intrabronhialno prejeli placebo, smo zdravili peroralno z deksametazonom vmešanim v manjšo količino koncentrirane krme (DEX skupina) v odmerkih 0,165 mg/kg tri dni v razmaku 24 ur, 0,083 mg/kg tri dni v razmaku 24 ur, 0,04 mg/kg osem dni v razmaku 24 ur in 0,02 mg/kg tri dni v razmaku 24 ur, ter končno 0,02 mg/kg štiri dni v

razmaku 48 ur (224, 367, 368). Konji, ki so intrabronhialno prejeli MSC (SCT skupina (Stem cell treatment)), so dnevno prejeli enako količino koncentriranih krmil brez dodanega deksametazona. Tri tedne po začetku zdravljenja (Čas 2: T2) smo ponovili diagnostične postopke in ponovno odvzeli bronhoalveolarni izpirek (Slika 1).



Slika 1: Raziskovalni protokol. T1, začetek zdravljenja; IB, intrabronhialna aplikacija; AD-MSC, avtologne mezenhimske matične celice, pridobljene iz maščobnega tkiva (adipose-derived mesenchymal stem cells); PO, peroralna aplikacija; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje (stem cell treatment); DEX, skupina konj, zdravljeni z deksametazonom; T2, zaključek zdravljenja.

Figure 1: Research protocol. T1, beginning of treatment; IB, intrabroncheal application; AD-MSC, adipose-derived mesenchymal stem cells; PO, peroral application; SCT, Stem cell treatment; DEX, dexamethasone treatment; T2, end of treatment.

3.2 ŽIVALI

V raziskavo smo vključili dvajset odraslih konj (enajst kobil in devet kastratov), predstavnikov sedmih različnih pasem (štirje quarter-horse, dva lipicanske, dva islandske pasme, ter dva šetlandska ponija, enega italijanskega kasača, enega argentinskega konja in osem križancev).

Vsi konji so imeli potrjeno zgodovino SEA. Povprečna starost je bila 15,2 leti s standardnim odklonom (SD) $\pm 3,5$ let.

Merila za vključitev v raziskavo so bili znaki kliničnega poslabšanja astme ob antigenem izzivu, ki je bil dosežen z disperzijo hlevskega prahu oziroma antigenov v dihalni okolici konj, in potrjena reverzibilna obstrukcija dihalnih poti.

3.3 KLINIČNO OCENJEVANJE

Klinična ocena, ki je temeljila na vnaprej definirani lestvici, je opredelila klinične simptome pri vsakem konju v času T1 in T2, kot so opisali Beeler-Marfisi in sod. (369). Klinični znaki zajeti v klinični oceni so bili: frekvenca dihanja, izcedek iz nosu, aktivnost trebušne in perianalne mišičnine ob dihanju, premikanje oz. pozicija nosnic ob dihanju, avskultacija sapnika, avskultacija prsnega koša (prisotnost bronhialnih tonov, prisotnosti hropcev in/ali piskov), prisotnost in karakteristika kašlja, resonanca prsnega koša, frekvenca bitja srca, avskultacija srca in rektalna temperatura. Numerična ocena, sestavljena iz navedenih kliničnih znakov, je podala skupno klinično oceno v razponu od 0 do 26. Višji rezultat pomeni težjo obliko klinične bolezni (369).

3.4 MERJENJE PLJUČNE FUNKCIJE

Za meritve pljučnih funkcij smo optimizirali postopek za merjenje $\Delta P_{pl_{max}}$ z uporabo ezofagealnega balonskega katetra, ki je temeljil na predhodno opisanih postopkih (173, 178, 179, 185). Ezofagealni balonski kateter smo izdelali iz balona (dolžine 5 cm; zunanega premera 17 mm), ki smo ga nepredušno pritrdili na konec polietilenske cevi (dolžine 300 cm; notranjega premera 5,4 mm; zunanega premera 9 mm). Na predelu cevi, ki ga je prekrival balon, smo v polietilensko cev napravili več lukenj, da smo omogočili neomejen pretok zraka.

Nekooperativne živali ($n = 6$) smo v izogib poškodbam sedirali (detomidin 0,01 mg / kg TT IV (Domidine®, Dechra). Konje, ki smo jih sedirali v času T1, smo z enakim zdravilom enakega odmerka sedirali tudi v času T2, z namenom zagotovitve enakih pogojev vzorčenja pri posameznem konju. Kateter smo konju vstavili skozi nos in nadaljevali po ventralnem nosnem prehodu do žrela in naprej do sredine prsnega dela požiralnika. Pri vsakem konju smo predhodno izmerili in označili dolžino vstavljenega katetra med nosnico in osmim do desetim medrebrnim prostorom glede na potek požiralnika. Tako smo lahko omogočili enako pozicijo balona v času T1 in času T2 pri posameznem konju. Po vstavitvi ezofagealnega katetra smo

balon napolnili z 20 mL zraka. Razlike v tlaku med vdihom in izdihom v prsnem košu so se tako izražale s stiskanjem balona, kar se je preko katetra prenašalo do senzorjev pritiska v prenosni detekcijski napravi Venti Graph (Boehringer Ingelheim Vetmedica; Ingelheim / Boucke GmbH u. Co., Nemčija). Povprečno vrednost $\Delta P_{pl_{max}}$ smo določili na podlagi 8–15 reprezentativnih ciklov dihanja. Vrednosti $\Delta P_{pl_{max}}$ nad 5 cmH₂O smo obravnavali kot oviran pretok zraka skozi dihalne poti, kar je pomenilo obstrukcijo dihalnih poti. Za potrditev reverzibilnosti obstrukcije dihalnih poti smo konjem aplicirali enkratni odmerek N-butilspolamonijevega bromida (NBB) IV (0,3 mg / kg TT) (Buscopan compositum, Boehringer Ingelheim, Nemčija) (193).

3.5 ODVZEM MAŠČOBNEGA TKIVA

Maščobno tkivo smo odvzeli iz podkožja ob korenu repa. Mesto odvzema smo obrili in aseptično pripravili. Aplicirali smo 20 mL lokalnega anestetika (2-odstotni lidokain; Xylocaine, AstraZeneca, UK). Sledil je kirurški rez dolžine tri do štiri centimetre in izrez približno treh do štirih gramov dobro prekrvavljenega maščobnega tkiva. Maščobo smo potopili v 15 mL sterilnega predhodno ohlajenega DMEM (Gibco, USA) transportnega medija in jo takoj prenesli v laboratorij.

3.6 IZOLACIJA IN GOJENJE AD-MSC

Maščobno tkivo je bilo obdelano znotraj dveh ur po odvzemu vzorca. Najprej je bilo sprano s PBS (Gibco, ZDA) in razrezano na manjše fragmente. Fragmenti so bili nato potopljeni v encimski raztopini (0,1-odstotna kolagenaza tipa II; Sigma - Aldrich, DE) in čez noč postavljeni na laboratorijski stresalnik, nastavljen na 37 °C in 400 vrtljajev/minuto. Prebavljeno tkivo smo nato štiri minute centrifugirali pri 1600 vrt./min. Celične pelete in neprebavljeno maščobno tkivo smo naselili v štiri plošče s šestimi jamicami (TPP, Švica), jim dodali hranilni medij DMEM z nizko vsebnostjo (1 g/L) glukoze (Gibco, ZDA) z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (FBS; Gibco, ZDA) in antibiotiki (Penicilin-streptomycin solution; Cytiva, Avstrija). Celice smo gojili pri 37 °C, nasičeni vlažnosti in 5 % CO₂.

Hranilni medij smo menjavali v 2- do 3-dnevnih presledkih. Ko so celice dosegle 80- do 90-odstotno gostoto, smo jih prenesli v večje gojitvene posodice (T300; TPP, Švica). Celice v celični kulturi smo gojili do druge ali tretje pasaže (v osmih T300 gojitvenih posodicah na konja) in končnega števila 100 milijonov celic. Ko so se MSC namnožile do zadostnega števila,

smo jih tripsinizirali z 0,5-odstotno raztopino tripsina z dodano EDTA (Gibco, Kanada) in sprali (vsaj trikrat) s sterilnim PBS. Natančno število celic smo izmerili s samodejnim števcem celic (CytoSMART, Corning Incorporated, Nizozemska). Suspenzijo 100 milijonov celic smo centrifugirali in končno peleton resuspendirali v 30 mL PBS. Končno suspenzijo smo prenesli v sterilno 60-mililitrsko brizgo, ki je bila predhodno zakrita s temnim, neprosojnim ovojem. Vsebina brizge je bila nato aplicirana v desni dodatni (akcesorni) reženj pljuč.

Alikvot celic smo ponovno nacepili in določili njihov multilinijski diferenciacijski potencial z indukcijo adipogene, osteogene in hondrogene diferenciacije z gojenjem v ustreznih diferenciacijskih medijih (StemPro Adipogenesis / Osteogenesis / Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA). Adipogeno diferenciacijo smo določili z barvanjem z barvilom Oil-Red-O (Sigma - Aldrich, DE). Osteogeno diferenciacijo smo določili z barvanjem z barvilom Alizarin-Red S (Sigma - Aldrich, DE). Hondrogeno diferenciacijo smo določili z barvanjem z barvilom Alcian blue (Sigma - Aldrich, DE). Preostanek celic pa smo zamrznili hranilnem mediju DMEM Glutamax (Gibco, USA) z dodatkom 20 % FBS (Premium Grade, Gama Irradiated, VWR, Austria) in 10 % dimetilsulfoksida (Sigma Aldrich, DE) pri -80 °C.

3.7 ENDOSKOPSKI PREGLED DIHAL IN BRONHOALVEOLARNA LAVAŽA

Pred endoskopskim pregledom dihal in BAL-om smo konjem aplicirali inhalacijski bronhodilatator (pet do šest vdihov salbutamola; Ventolin, 100 µg / vpih, GSK) in jih sedirali z intravensko aplikacijo detomidina (0,01 mg/kg TT; Domidine® 10 mg/mL, Dechra) in butorfanola (0,02 mg/kg TT; Butomidol 10mg/mL, Richterpharma). Bronhoskop (Karl Storz - Endoscope, Karl Storz GmbH & Co) smo vstavili skozi nosnico in preko nosnih prehodov v sapnik in spodnja dihalna. Dihalne poti smo pred prehodom endoskopa anestezirali s 30 mL 0,4 % lidokaina. Na podlagi predhodno opisane lestvice (369) smo kvantitativno ocenili odstopanja od normalnih vrednosti na vizualizirani površini dihal v razponu med 0 in 15. Kvantifikacija je zajela stopnjo rdečine in otekline stene dihalnih poti, količino in lokacijo izločkov/sluzi, prisotnosti krvi in/ali kašlja. Višji rezultat pomeni hujšo obliko bolezni (369).

Bronhoalveolarno lavažo smo izvedli z zagozditvijo bronhoskopa v sapnico desnega dodatnega režnja pljuč, kamor smo aplicirali 500 mL sterilne tople (37 °C) fiziološke raztopine. Fiziološko raztopino smo nato z aspiratorjem takoj odsesali nazaj iz dihal in s tem pridobili vzorec BALf-a (198). Po končanem postopku sta bila zabeležena količina in makroskopski izgled BALf-a. BALf smo do nadaljnje obdelave shranili na ledu.

Vzorci BALF-a smo obdelali znotraj ene ure po odvzemu. Pripravili smo razmaze za citološko analizo. Preostanek BALF-a smo nato 4 minute centrifugirali na 1600 vrt./minuto. Supernatant smo shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celične pelete smo sprali s sterilnim PBS, ponovno centrifugirali in jih prav tako shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8 CITOLOŠKI PREGLED BRONHOALVEOLARNEGA IZPIRKA

Skupno število celic (Total cell count, TCC) smo določili z avtomatskim veterinarskim hematološkim analizatorjem (SCIL ABC Vet Plus+, Horiba). Osem alikvotov BALF-a po $200\text{ }\mu\text{L}$ smo centrifugirali 6 minut pri 600 vrt./min ($\sim 40\text{ g}$) v citocentrifugi (Centric 250, Domel). Razmaze smo posušili, jih fiksirali z metilnim alkoholom in pobarvali z Giemsa barvilom (Giemsa's azur-eosin-methylene blue solution; Sigma - Aldrich, DE) po navodilih proizvajalca. S svetlobnim mikroskopom (BX45 Olympus microscope, Olympus) smo pri 600x povečavi nato kvantitativno in kvalitativno ovrednotili vsaj 400 vnetnih celic na vsakem od štirih razmazov posameznega vzorca. Rezultate smo podali kot deleže posameznih vrst levkocitov.

3.9 ANALIZA IZRAŽANJA mRNK CITOKINOV (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ) S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO Z REVERZNO TRANSKRIPCijo (RT-qPCR)

Skupno RNK celic v BALF-u smo ekstrahirali z uporabo trizola (TRIzolTM Reagent, Thermo Fisher Scientific, USA) v skladu s protokolom proizvajalca. Za vsak vzorec smo izmerili koncentracijo in čistost celotne ekstrahirane RNK izmerili z UV spektrofotometrom (NanoDropTM Lite Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm (A_{260}/A_{280}).

Opravili smo RT-qPCR na vseh vzorcih celičnih peletov BALF-a. Dva μg skupne RNK vsakega vzorca smo obratno prepisali v komplementarno deoksiribonukleinsko kislino (cDNK) z uporabo kompleta za povratno transkripcijo cDNK (komplet za reverzno prepisovanje cDNK z visoko zmogljivostjo, Thermo Fisher Scientific, Litva) v skladu s protokolom proizvajalca. Vse reakcije smo izvedli v skupnem volumnu $20\text{ }\mu\text{L}$. Vsak vzorec je na koncu vseboval cDNK s koncentracijo $100\text{ ng}/\mu\text{L}$. Obratno prepisovanje smo izvedli s termičnim ciklerjem (2720 Thermo Cycler, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) v pogojih, predlaganih v protokolu proizvajalca: pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minut, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 120 minut, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 minut in na koncu ohladili na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pred končnim shranjevanjem na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V vsakem vzorcu smo izmerili izražanje genov IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR). Za referenčni gen smo uporabili konjski gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH) (370). Za vsak preiskovani gen in za referenčni gen smo na vzorcu posameznega konja pripravili standardne krivulje s šestimi zaporednimi redčitvami cDNK (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64). Za izračun učinkovitosti pomnoževanja smo uporabili dobljene nagibe regresijskih krivulj za vsak gen posebej. Analizo smo izvedli z uporabo komercialno pripravljene PCR mešanice (TaqMan® Universal Master Mix z UNG, Thermo Fisher Scientific) in komercialno pripravljenih oligonukleotidnih zaporedij posameznih genov (TaqMan® Gene Expression Assays, Thermo Fisher Scientific). Relativno kvantifikacijo (371) smo izračunali z metodo po Pfafflu (372, 373) in ga podali kot razmerje med preiskovanim genom in referenčnim genom (Enačba 1).

$$\text{Gene expression ratio} = \frac{E_{GOI}^{(CtGOI_{cal} - CtGOI)}}{E_{RG}^{(CtRG_{cal} - CtRG)}}$$

Enačba 1: Matematični model relativne kvantifikacije po Pfafflu (372). GOI, proučevani gen; RG, referenčni gen, E_{GOI} , učinkovitost pomnoževanja proučevanega gena; E_{RG} , učinkovitost pomnoževanja referenčnega gena; $CtGOI_{cal}$, prazni cikel proučevanega gena; ΔCt_{RG} , prazni cikel referenčnega gena; cal, kalibracija.

Equation 1: Pfaffl's mathematical model of relative expression ratio (372). GOI, gene of interest; RG, reference gene, E_{GOI} , real-time PCR efficiency of gene of interest transcript; E_{RG} , real-time PCR efficiency of reference gene transcript; $CtGOI_{cal}$, quantification cycle of the gene of interest; ΔCt_{RG} , quantification cycle of the reference gene; cal, study calibrator.

Za pomnoževanje in zbiranje podatkov smo uporabili LightCycler 96 (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija). Pomnoževanje vzorcev, pridobljenih pred in po zdravljenju pri istem konju, smo analizirali v trojnikih na isti plošči (s 96 luknjicami) s posameznim volumnom 20 μ L in 20 ng cDNK.

3.10 KVANTIFIKACIJA CITOKINOV (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ) Z ENCIMSKOIMUNSKIMI TESTI

Za kvantifikacijo citokinov z encimskoimunskimi testi (ELISA) testi smo uporabili Nori Equine IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α , IFN γ ELISA komplete za vzorce BALf (Genorise Scientific, Inc) v skladu s protokoli proizvajalca, ki temeljijo na principu kvantitativne sendvič ELISE. Meje zaznavnosti uporabljenih testov ELISA so bile 94-6000, 31-2000, 10-600, 94-6000, 31-2000 in 15-1000 pg/mL za IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ test. Določene razlike

znotraj testa so bile 6 % za IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17 in TNF α ELISA teste ter 7 % za IFN γ ELISA test. Določene razlike med testi pa so bile 9 % za IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ ELISA teste in 11 % za IL-1 β ELISA test.

Za teste ELISA smo uporabili supernatante vzorcev BALf. Standarde z znanimi koncentracijami in vsak vzorec smo v dvojnikih prenesli v jamice z vezanim protitelesom za ustrezní konjski citokin. Po enourni inkubaciji pri sobni temperaturi smo plošče trikrat sprali s 300 μ L testnega pufrá in v vsako jamico dodali delovno razredčino detekcijskega protitelesa. Inkubirali smo eno uro pri sobni temperaturi. Nadalje smo dodali konjugirano raztopino in raztopino substrata, inkubirali 20 minut in spirali po predpisanem protokolu proizvajalca, ter na koncu ustavili reakcijo s Stop-raztopino. Optično gostoto standardov in vzorcev smo analizirali na čitalniku mikroplošč (SunriseTM, Tecan Trading AG, Švica) pri valovni dolžini 450 nm in s popravkom valovne dolžine na 540 nm v skladu z navodili proizvajalca. Na podlagi dobljenih rezultatov optične gostote standardov in njihove poznane koncentracije (pg/mL) smo oblikovali štiri-parametrsko polinomsko standardno krivuljo. Iz krivulje smo nato na podlagi izmerjene optične gostote vzorcev odčitali koncentracijo iskanega produkta (pg/mL).

3.11 OBRAVNAVA KONJ PO ZADNJEM VZORČENJU

Konje smo po zaključeni obravnavi (po T2) poslali domov v oskrbo lastnikov in lokalnih veterinarjev. Do datuma 26. 10. 2020 lastniki niso vedeli, katero obliko zdravljenja je njihov konj prejel. Ta datum smo določili kot zaključek raziskave, ko so bili vsi vzorci analizirani in raziskovalni protokoli zaključeni. Na ta datum smo se z lastniki ponovno slišali in pogovorili o stanju njihovih konj. Razkrili smo jim tudi obliko zdravljenja, ki jo je njihov konj prejel.

3.12 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatki so predstavljeni kot povprečja in standardni odmiki (SD), razlike med T1 in T2 pa so predstavljene kot povprečja z ustreznimi 95-odstotnimi intervali zaupanja [CI]. Pri testih ELISA je podan tudi delež vrednosti, ki se je nahajal nad območjem zaznavanja (Detection rate; DR).

Za primarni rezultat učinkovitosti je bila izvedena analiza neinferiornosti za razliko v ΔPpl_{max} med skupinama SCT in DEX z upoštevanjem enostranskega CI 97,5 %, ki je bil določen z invertiranjem t-testa za dva vzorca ob predpostavki enakih varianc. Predpostavka normalnosti je bila preverjena s Shapiro-Wilkovim testom normalnosti; predpostavko o enakih variancah

smo ovrednotili z Bartlettovim testom za homogenost variance. Izračun velikosti vzorca je temeljil na predpostavki, da je bil $\Delta P_{pl_{max}}$ podoben v obeh zdravljenih skupinah. Za pridobitev 80 % statistične moči z dvostranskim $\alpha = 0,025$ je bilo potrebnih deset bolnikov na skupino. Tako je bilo možno določiti neinferiornost SCT v primerjavi z DEX. Meja neinferiornosti je bila opredeljena na ≤ 7 cmH₂O ob predpostavki, da je SD razlike med začetkom (T1) in koncem zdravljenja (T2) enaka pet (5) v obeh skupinah. Osnova za te predpostavke so bili rezultati opisanih v Picandet et al. (2003), kjer se je $\Delta P_{pl_{max}}$ pri konjih, zdravljenih z deksametazonom, ob primerjavi izhodiščne vrednosti in vrednosti ob koncu zdravljenja v povprečju zmanjšala s 35 na 8 cmH₂O (230).

Razlike med obema zdravljenjema so bile ocenjene z uporabo linearnih modelov mešanih učinkov (LME). V analizo je bilo vključeno naključno prestrezanje za vsakega posameznega konja, da se je zagotovilo upoštevanje uporabe več meritev za vsakega posameznega konja. Z istim namenom se je uporabil Tobit regresijski model naključnega učinka (TRM) za rezultate z vrednostmi izven DR. Randomizacija je bila upoštevana z vključitvijo interakcije med časom in zdravljenjem, ob predpostavki, da se skupini na začetku nista razlikovali. Kjer je bilo potrebno, so bili podatki preoblikovani v logaritem (z uporabo naravnih logaritmov), da se je izpolnila predpostavka o normalnosti. LME in TRM so bili obdelani z uporabo paketa R nlme50 oziroma censReg51 (374). Vse p-vrednosti so bile prilagojene na analitični model večkratnih primerjav z uporabo metode Benjaminija in Hochberga (375) za nadzor stopnje lažnih statistično signifikantnih rezultatov.

V nadaljevalni fazi obravnave konj smo opredelili obdobje po T2, v katerem konji niso ponovno razvili objektivnih simptomov astme. Analiza zgodovine dogodkov je bila izvedena v razponu med T2 in končnim datumom raziskave, ki je bil subjektivno določen na 26. oktober 2020. V tem razponu je bil dokumentiran čas med T2 in zaključkom raziskave, če se klinični znaki niso pojavili, ali čas med T2 in datumom, ko so se klinični znaki astme znova pojavili. Z uporabo Kaplan-Meier metode smo ocenili delež konj v obeh skupinah, ki v tem obdobju ni doživel kliničnega poslabšanja.

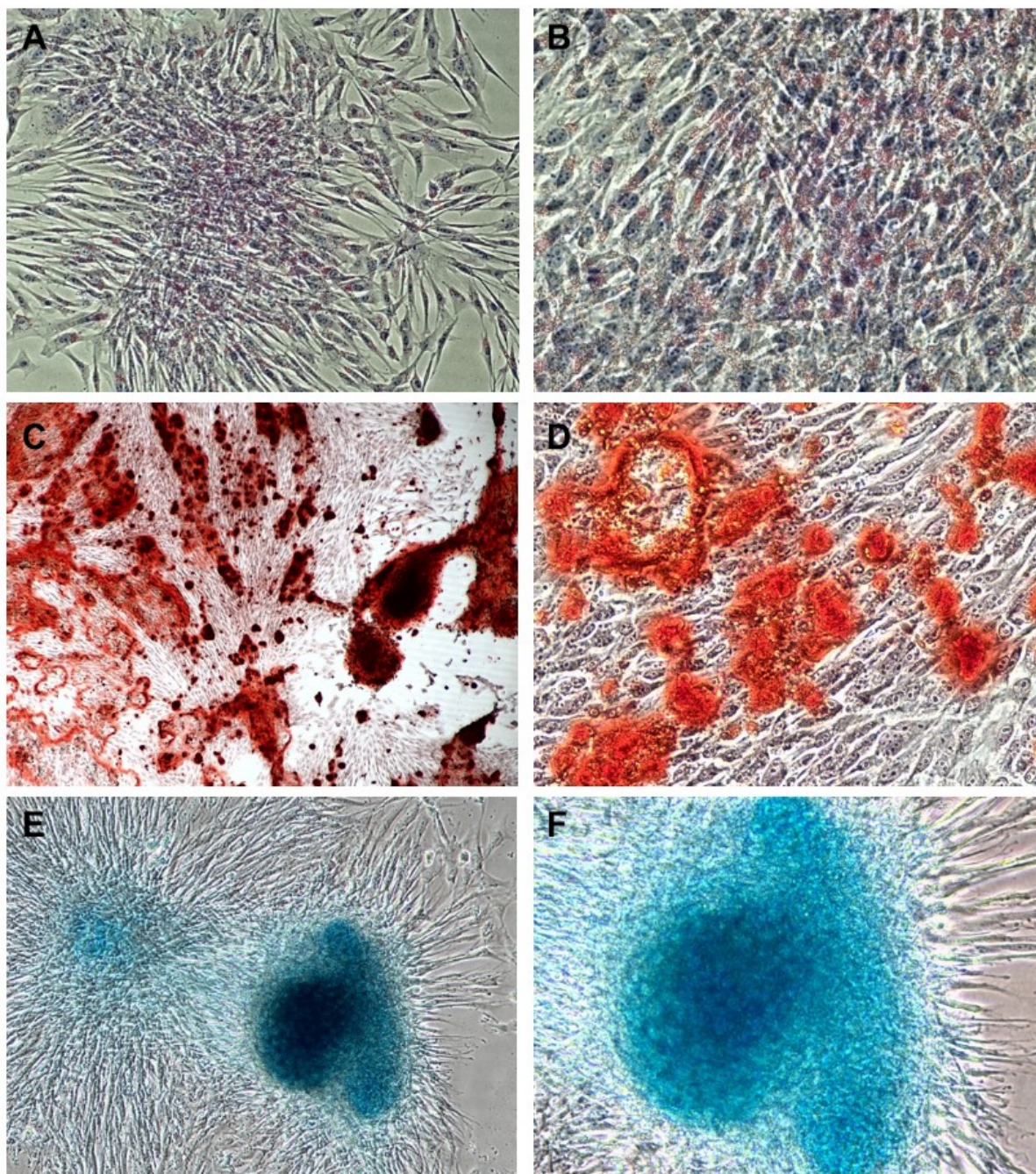
Vse analize so bile izvedene z R (376). Analiza preživetja je bila izvedena s CRAN-Package survival (377). Prilagojene p-vrednosti (P adjusted, P_{adj}) nižje od 0,05 smo obravnavali kot statistično pomembne.

4 REZULTATI

Vsi konji, vključeni v raziskavo, so zaključili raziskovalni protokol. Skupina SCT je vključevala štiri kobile in šest kastratov, starih 15,5 (\pm 3,9) leta. V skupino DEX je bilo vključenih sedem kobil in trije kastrati, stari 14,9 (\pm 2,9) leta.

Multilinijski diferenciacijski potencial gojenih AD-MSK smo potrdili z indukcijo adipogene, osteogene in hondrogene diferenciacije (Slika 2).

Pri skupini SCT nismo opazili nobenih stranskih učinkov. V skupini DEX smo pri sedmih konjih v prvih dneh po začetku zdravljenja opazili blage znake vnetja kopit (topla kopita, pulzacija digitalnih arterij), a je le-to pri vseh potekalo brez hujših zapletov in spontano izzvenelo po nekaj dneh.



Slika 2: Diferenciacijski potencial konjskih AD-MSC. Adipogena diferenciacija konjskih AD-MSC in barvanje z Oil-Red-O in hematoksilinom pri 100x (A) in 200x (B) povečavi. Osteogena diferenciacija konjskih AD-MSC in barvanje z Alizarin Red S pri 40x (C) in 200x (D) povečavi. Hondrogena diferenciacija konjskih AD-MSC in barvanje z Alcian Blue pri 100x (E) in 200x (F) povečavi.

Figure 2: Multilineage differentiation potential of equine AD-MSCs. Adipogenic differentiation of equine AD-MSC (A, B); staining with Oil-Red-O and hematoxylin at 100x (A) and 200x (B) magnification. Osteogenic differentiation of equine AD-MSC (C, D); staining with Alizarin Red S at 40x (C) and 200x (D) magnification. Chondrogenic differentiation of equine AD-MSC (E, F); staining with Alcian Blue at 100x (E) and 200x (F) magnification.

4.1 KLINIČNI PREGLED, BRONHOSKOPIJA IN CITOLOŠKA PREISKAVA BALf

Ne-inferniornosti SCT nismo potrdili. Obe obliki zdravljenja sta sicer pokazali tendenco zmanjševanja $\Delta P_{pl_{max}}$ (za $9,3 \pm 5,8$ cmH₂O v DEX skupini in za $1,6 \pm 5,4$ cmH₂O v SCT skupini), vendar se ta med SCT in DEX ni razlikovala ($P_{adj} = 0,1$) (Tabela 1).

Kvantitativna klinična ocena se je v SCT skupini statistično pomembno zmanjšala za 3,4 [-5,464; -1,303] ($P_{adj} = 0,01$), pri čemer se je v DEX skupini zmanjšala še za nadaljnjih 3,1 [-5,889; -0,277]. Razlike med DEX in SCT vseeno niso bile statistično znatne ($P_{adj} = 0,1$) (Tabela 1; Slika 3). Kvantitativna endoskopska ocena je pri SCT med T1 in T2 ostala nespremenjena, medtem ko se je pri DEX zmanjšala. Razlika med SCT in DEX vseeno ni bila statistično znatna ($P_{adj} = 0,1$) (Tabela 1; Slika 3).

Vrednosti TCC v BALf-u (Slika 4) se s časom v SCT skupini niso bistveno spremenile. Prav tako se povprečna vrednost skupnega števila celic v BALf-u ni razlikovala med SCT in DEX ($P_{adj} = 0,7$). Podobno je bilo ugotovljeno pri analizi diferencialnega števila levkocitov ($P_{adj} \geq 0,2$) (Tabela 2; Slika 5).

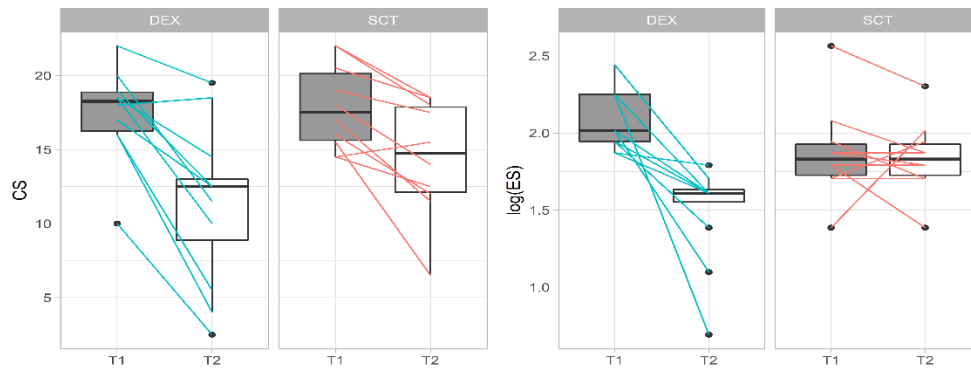
Tabela 1. Plevralni pritisk, klinična ocena in endoskopska ocena.

Table 1. Pleural pressure, clinical score and endoscopic score.

	SCT povprečna vrednost (SD)		DEX povprečna vrednost (SD)		SCT razlika med T2 in T1		Razlika med DEX in SCT za čas T2 in T1	
	T1	T2	T1	T2	Učinek ^b [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)	Učinek ^c [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)
$\Delta P_{pl_{max}}^*$	12,015 (9,640)	10,420 (9,702)	14,780 (5,497)	5,122 (2,887)	0,663 [0,450; 0,979]	0,04 (0,1)	0,533 [0,317; 0,896]	0,02 (0,1)
CS	17,900 (2,885)	14,450 (3,912)	17,500 (3,197)	11,100 (5,753)	-3,384 [-5,464; -1,303]	0,003 (0,01)	-3,083 [-5,889; -0,277]	0,03 (0,1)
ES*	6,800 (2,418)	6,450 (1,571)	8,400 (1,955)	4,600 (1,243)	0,880 [0,707; 1,096]	0,24 (0,4)	0,670 [0,513; 0,875]	0,005 (0,1)

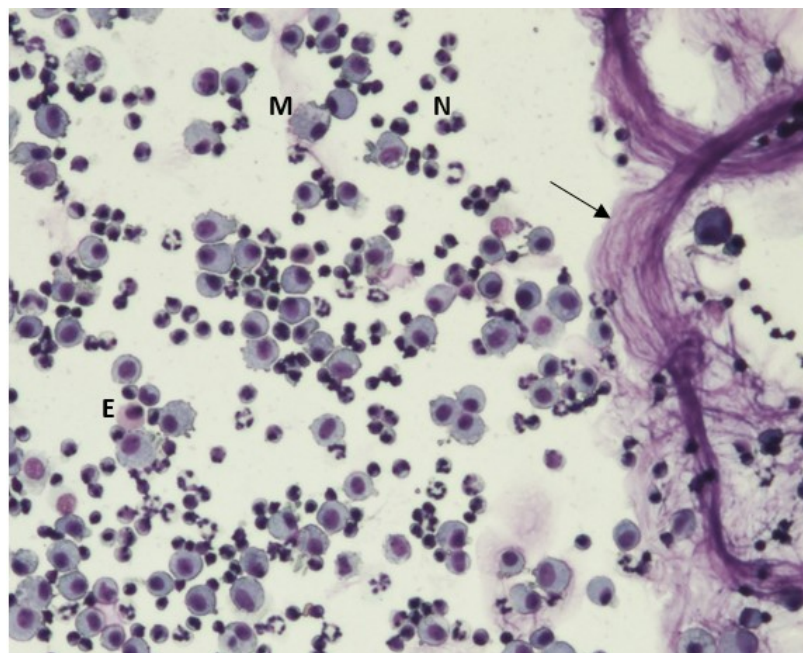
$\Delta P_{pl_{max}}$, največja sprememba v pleuralnih pritiskih v dihalnem ciklu; CS, klinična ocena (clinical score); ES, endoskopska ocena; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje (stem cell treatment); DEX, skupina konj, zdravljen z dexametazonom; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; * logaritmična transformacija; ^b YT2-YT1 (ne-transformiran izid) ali YT2/YT1 (logaritmsko transformiran) za SCT, ocenjeno z modelom linearnih mešanih učinkov; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (ne-transformiran izid) ali (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logaritmsko transformiran), ocenjen z modelom linearnih mešanih učinkov.

$\Delta P_{pl_{max}}$, maximal change in pleural pressure; CS, clinical score; ES, endoscopic score; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; * logarithmic transformation (descriptive values are reported on the original scale); ^b YT2-YT1 (non-transformed outcome) or YT2/YT1 (logarithmic transformation) for SCT as estimated with linear mixed effects model; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (non-transformed outcome) or (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logarithmic transformation) as estimated with linear mixed effects model.



Slika 3: Klinična ocena in endoskopska ocena. CS, klinična ocena (clinical score); ES, endoskopska ocena (endoscopic score); SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje (stem cell treatment); DEX, skupina konj, zdravljena z deksametazonom; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; log, logaritmična transformacija; modra črta, posamezen konj v DEX skupini; rdeča črta, posamezen konj v SCT skupini.

Figure 3: Clinical score and endoscopic score. CS, clinical score; ES, endoscopic score; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; log, logarithmic transformation; blue line, individual horse in DEX group; red line, individual horse in SCT group.



Slika 4: Bronhoalveolarni izpirek astmatičnega konja. Barvanje po Giemsi, 200x povečava. N, nevtrofilni granulocit; M, alveolarni makrofag; E, eozinofilni granulocit; puščica; čep ek sluzi (Kuršmanova spirala).

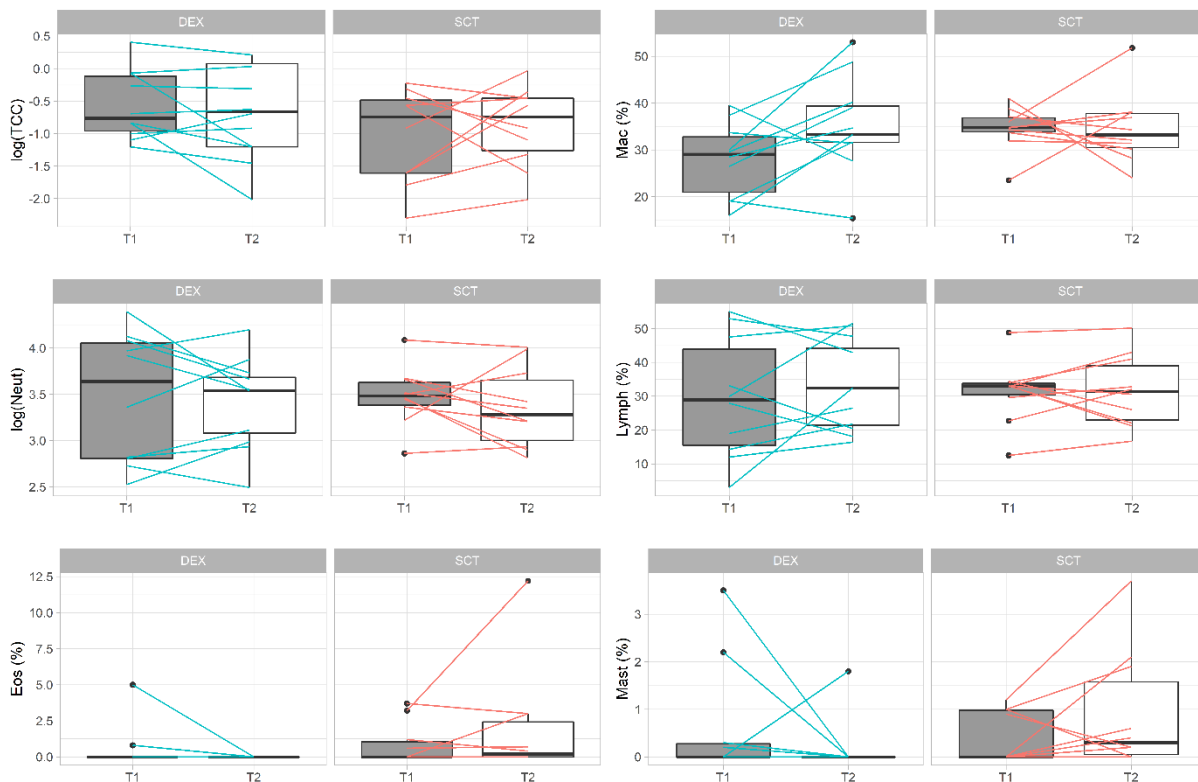
Figure 4: Bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic horse. Giemsa stain, 200x magnification. N, neutrophil; M, alveolar macrophage; E, eosinophil; arrow, Curschmann's spiral.

Tabela 2. Rezultati citološke analize bronhoalveolarnega izpirka.

Table 2. Bronchoalveolar lavage fluid cytology.

	SCT povprečna vrednost (SD)		DEX povprečna vrednost (SD)		SCT razlika med T2 in T1		Razlika med DEX in SCT za čas T2 in T1	
	T1	T2	T1	T2	Učinek ^b [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)	Učinek ^c [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)
TCC*	0,437 (0,256)	0,483 (0,261)	0,650 (0,382)	0,540 (0,359)	1,033 [0,681; 1,568]	0,87 (0,9)	0,848 [0,492; 1,463]	0,53 (0,7)
Mac (%)	34,580 (4,693)	34,510 (7,563)	27,930 (7,932)	35,520 (10,653)	2,665 [-3,611; 8,941]	0,38 (0,5)	2,190 [-5,452; 9,831]	0,60 (0,7)
Neut (%)*	33,950 (11,060)	31,310 (14,240)	39,550 (24,475)	33,820 (16,305)	0,886 [0,674; 1,164]	0,36 (0,5)	1,058 [0,733; 1,526]	0,75 (0,8)
Lymph (%)	31,390 (9,217)	31,550 (10,630)	29,460 (17,911)	32,860 (14,146)	0,527 [-6,740; 7,795]	0,88 (0,9)	2,506 [-7,217; 12,228]	0,59 (0,7)
Eos (%)	0,870 (1,421)	1,930 (3,804)	0,580 (1,573)	0,000 (0,000)	1,148 [-0,299; 2,595]	0,11 (0,3)	-1,816 [-3,670; 0,038]	0,05 (0,2)
Mast (%)	0,410 (0,534)	0,910 (1,249)	0,620 (1,219)	0,180 (0,569)	0,406 [-0,337; 1,148]	0,27 (0,4)	-0,751 [-1,635; 0,133]	0,09 (0,2)

TCC (WBC/mm³), skupno število celic v BALf-u (total cell count); Mac, makrofagi; Neut, nevtrofilni granulociti; Lymph, limfociti; Eos, eozinofilni granulociti; Mast, mastociti; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje; DEX, skupina konj, zdravljeni z deksametazonom; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; * logaritmična transformacija; ^b YT2-YT1 (ne-transformiran izid) ali YT2/YT1 (logaritmsko transformiran) za SCT, ocenjeno z modelom linearnih mešanih učinkov; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (ne-transformiran izid) ali (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logaritmsko transformiran), ocenjen z modelom linearnih mešanih učinkov. TCC (WBC/mm³), mean total cell count (BALf); Mac, macrophages; Neut, neutrophils; Lymph, lymphocytes; Eos, eosinophils; Mast, mast cells; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; * logarithmic transformation (descriptive values are reported on the original scale); ^b YT2-YT1 (non-transformed outcome) or YT2/YT1 (logarithmic transformation) for SCT as estimated with linear mixed effects model; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (non-transformed outcome) or (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logarithmic transformation) as estimated with linear mixed effects model.



Slika 5: Rezultati citološke analize bronhoalveolarnega izpirka. TCC (WBC/mm^3), skupno število celic v BALf-u (total cell count); Mac, makrofagi; Neut, nevtrofilni granulociti; Lymph, limfociti; Eos, eozinofilni granulociti; Mast, mastociti; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje; DEX, skupina konj, zdravljen z deksametazonom; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; log, logaritmična transformacija; modra črta, posamezen konj v DEX skupini; rdeča črta, posamezen konj v SCT skupini.

Figure 5: Bronchoalveolar lavage fluid cytology. TCC (WBC/mm^3), mean total cell count (BALf); Mac, macrophages; Neut, neutrophils; Lymph, lymphocytes; Eos, eosinophils; Mast, mast cells; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; log, logarithmic transformation (descriptive values are reported on the original scale); blue line, individual horse in DEX group; red line, individual horse in SCT group.

4.2 RELATIVNA KVANTIFIKACIJA mRNK CITOKINOV IN KONCENTRACIJE NJIHOVIH PROTEINOV

Iz vseh BALf vzorcev smo uspešno izolirali RNA s povprečno vrednostjo A_{260}/A_{280} 1,84 ($\pm 0,14$). Glede na standardne krivulje so bile vrednosti učinkovitosti pomnoževanja 1,86 za GAPDH, 2,19 za IL-1 β , 2,01 za IL-4, 1,84 za IL-8, 2,24 za IL-17, 1,95 za TNF α in 2,03 za INF γ .

Kvantifikacija mRNK je bila uspešna za vse citokine, medtem ko je bilo odkrivanje citokinskih proteinov (z ELISA testi) uspešno le za IL-1 β , IL-4 in TNF α . Koncentracije preostalih citokinov

so bile pod vrednostjo DR. Izražanje mRNK pri večini citokinov je v obdobju zdravljenja ostalo stabilno v obeh skupinah. Le izražanje mRNK IL-17 se je zmanjšalo s statistično pomembnostjo v SCT skupini ($P_{\text{adj}} = 0,05$). Izražanje mRNK IL-17 se je zmanjšalo tudi pri DEX, kar pa se ni razlikovalo od SCT ($P_{\text{adj}} = 0,2$) (Tabela 3; Slika 6).

Koncentracija citokinov IL-1 β ($P_{\text{adj}} = 0,001$), IL-4 ($P_{\text{adj}} = 0,001$) in TNF α ($P_{\text{adj}} = 0,02$) se je pri SCT znatno zmanjšala. Zmanjšanje koncentracij IL-1 β , IL-4 in TNF α smo opazili tudi v DEX skupini, ki pa se po prilagoditvi vrednosti P ni bistveno razlikoval od SCT (Tabela 3; Slika 5).

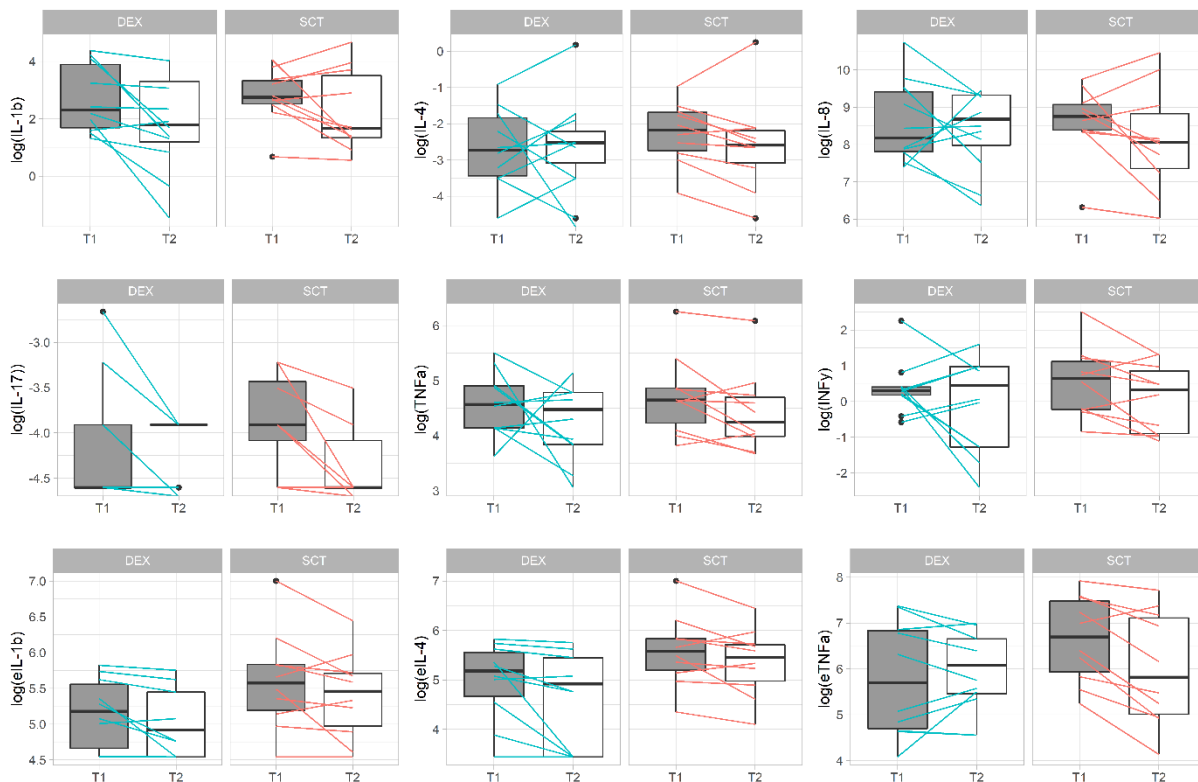
Tabela 3. Relativna kvantifikacija mRNK citokinov in koncentracije njihovih proteinov.

Table 3. Relative quantification of cytokines' mRNA and their protein concentration.

	SCT povprečna vrednost (SD) [% > DR]		DEX povprečna vrednost (SD) [% > DR]		SCT razlika med T2 in T1		Razlika med DEX in SCT za čas T2 in T1	
	T1	T2	T1	T2	Učinek ^b [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)	Učinek ^c [95 % CI]	P vrednost (prilagojena)
IL-1 β *	22,510 (17,260)	24,078 (34,070)	27,651 (30,293)	11,089 (16,941)	0,608 [0,281; 1,315]	0,19 (0,4)	0,472 [0,171; 1,307]	0,14 (0,3)
IL-4*	0,140 (0,106)	0,190 (0,385)	0,116 (0,122)	0,182 (0,359)	0,812 [0,329; 2,003]	0,6 (0,7)	0,796 [0,252; 2,510]	0,7 (0,8)
IL-8*	7470,490 (5017,252)	8013,460 (11453,562)	10222,300 (13818,670)	5742,500 (4475,492)	0,607 [0,296; 1,245]	0,2 (0,4)	1,137 [0,445; 2,905]	0,8 (0,8)
IL-17*	0,019 (0,014)	0,009 (0,010)	0,020 (0,021)	0,005 (0,008)	0,409 [0,201; 0,831]	0,02 (0,05)	0,432 [0,167; 1,120]	0,08 (0,2)
TNF α *	146,908 (140,452)	112,709 (119,865)	113,907 (67,441)	78,013 (48,822)	0,780 [0,487; 1,250]	0,3 (0,4)	0,803 [0,442; 1,458]	0,4 (0,7)
INF γ *	2,831 (3,534)	1,610 (1,330)	2,113 (2,654)	1,551 (1,587)	0,665 [0,342; 1,290]	0,2 (0,4)	0,782 [0,330; 1,850]	0,5 (0,7)
eIL-1 β *	370,062 (293,004) [90]	279,188 (156,496) [90]	217,321 (84,624) [80]	203,012 (84,247) [60]	0,699 [0,586; 0,833]	< 0,001 (< 0,001)	0,828 [0,678; 1,011]	0,06 (0,2)
eIL-4*	340,817 (291,316) [100]	257,304 (165,533) [100]	198,584 (97,086) [90]	203,012 (84,247) [60]	0,555 [0,422; 0,731]	< 0,001 (< 0,001)	0,676 [0,482; 0,949]	0,02 (0,1)
eTNF α *	1102,100 (878,340) [100]	740,418 (759,764) [100]	609,070 (606,676) [100]	473,075 (378,766) [100]	0,553 [0,376; 0,812]	0,005 (0,02)	1,765 [1,033; 3,014]	0,04 (0,1)

e, z ELISA – testi določena koncentracija citokina; IL, interlevkin; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje; DEX, skupina konj, zdravljen z deksametazonom; DR, razpon zaznavanja (detection range) posameznega ELISA testa; % > DR, delež spremenljivk nad DR; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; * logaritmična transformacija; ^b YT2-YT1 (ne-transformiran izid) ali YT2/YT1 (logaritmično transformiran) za SCT, ocenjeno z modelom linearnih mešanih učinkov ali Tobit regresijskim modelom; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (ne-transformiran izid) ali (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logaritmično transformiran), ocenjen z modelom linearnih mešanih učinkov ali Tobit regresijskim modelom.

e, ELISA determined concentration of cytokine; IL, Interleukine; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; DR, Detection range for ELISA assays; % > DR, proportion of variables above DR; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; * logarithmic transformation (descriptive values are on the original scale); ^b YT2-YT1 (non-transformed outcome) or YT2/YT1 (logarithmic transformation) for SCT as estimated with linear mixed effects model or Tobit regression; ^c (YT2-YT1)DEX-(YT2-YT1)SCT (non-transformed outcome) or (YT2/YT1)DEX/(YT2/YT1)SCT (logarithmic transformation) as estimated with linear mixed effects model or Tobit random effects model.

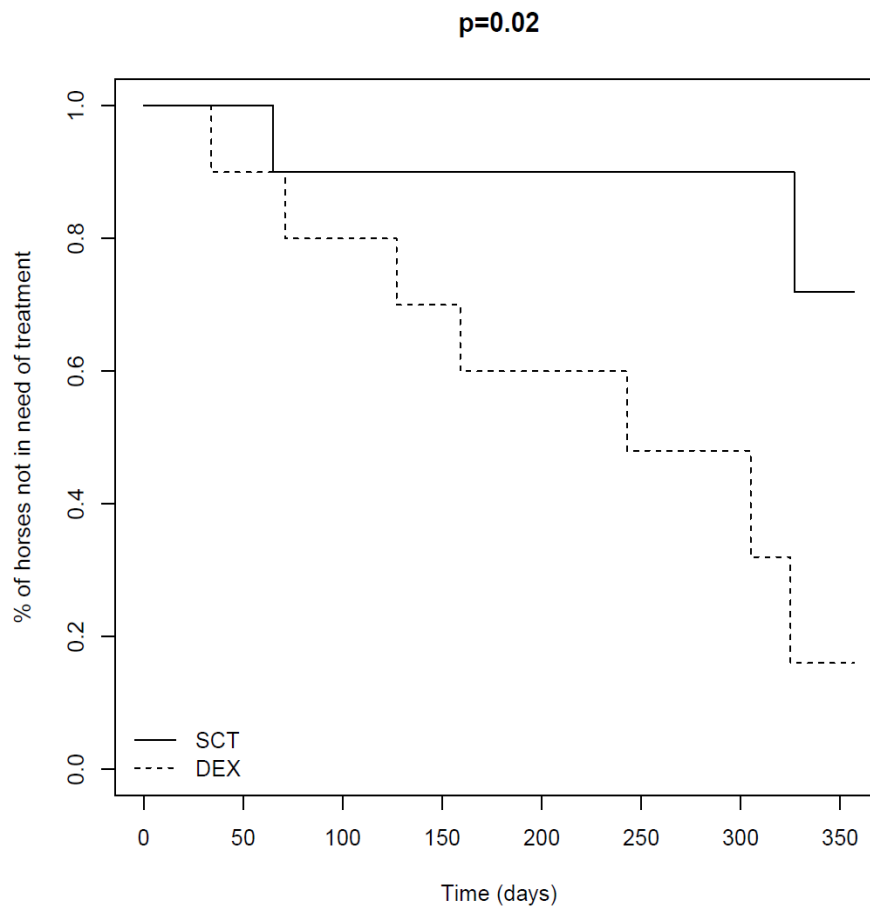


Slika 6: Relativna kvantifikacija mRNA citokinov in koncentracije njihovih proteinov. e, z ELISA – testi določena koncentracija citokina; IL, interlevkin; SCT, skupina konj, ki je prejela celično zdravljenje; DEX, skupina konj, zdravljen z deksametazonom; T1, začetek zdravljenja; T2, zaključek zdravljenja; log, logaritmična transformacija; modra črta, posamezen konj v DEX skupini; rdeča črta, posamezen konj v SCT skupini.

Figure 6: Relative quantification of cytokines' mRNA and their protein concentration. e, ELISA determined concentration of cytokine; IL, Interleukine; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; T1, Beginning of treatment; T2, End of treatment; log, logarithmic transformation (descriptive values are on the original scale); blue line, individual horse in DEX group; red line, individual horse in SCT group.

4.3 SPREMLJANJE KLINIČNIH SIMPTOMOV SEA PO ZAKLJUČKU ZDRAVLJENJA

Obdobje po T2, v katerem konji niso ponovno razvili objektivnih simptomov astme, je bilo daljše v skupini SCT. Postopen ponovni pojav ali poslabšanje objektivnih simptomov astme je bil v skupini DEX pri večini konj dokumentiran kmalu po prekinitvi zdravljenja, medtem ko je večina konj v skupini SCT ostala brez objektivnih simptomov SEA še 300 dni po zaključeni obravnavi ($P = 0,02$) (Slika 7).



Slika 7: Sledenje pacientov. Ponovni pojav ali poslabšanje objektivnih simptomov SEA v odvisnosti od časa. SCT, skupina konj, ki je prejela celčno zdravljenje (stem cell treatment); DEX, skupina konj, zdravljena z deksametazonom; p, vrednost p.

Figure 7: Follow-up. The moment expressed in the number of days after completion of treatment in the study when horses developed objective SEA symptoms and needed re-treatment. SEA, Severe equine asthma; SCT, Stem cell treatment; DEX, Dexamethasone treatment; p, p - value.

5 RAZPRAVA

Imunomodulatorni učinki MSC predstavljajo možnost za ozdravitev ali vsaj omilitev nekaterih trdovratnih kroničnih obolenj, ki jih trenutne terapijske strategije ne uspejo ozdraviti ali vsaj znatno olajšati. V tej klinični raziskavi smo pokazali odziv mediatorjev vnetja in simptomov SEA na zdravljenje z avtolognimi MSC, ki smo jih pridobili iz maščobe. V kratkem časovnem obdobju je imelo zdravljenje z AD-MSK učinek na nekatere iniciatorje vnetja; pozitiven učinek zdravljenja se je pokazal dolgoročno v obliki lajšanja kliničnih simptomov SEA.

V okviru respiratorne medicine je objavljenih več raziskav, ki temeljijo na zdravljenju z MSC. Rezultati teh raziskav so variabilni, ko opredeljujejo vpliv MSC na patogenezo vnetja, predvsem na izražanje in prevajanje mediatorjev vnetja, dosledno pa v raziskavah poročajo o znatnem zmanjšanju vnetja in/ali kliničnem izboljšanju. Pri mišjem modelu astme so Cho in sod. (2014) poročali o zmanjšanju kliničnih simptomov in vnetja po intravenski aplikaciji AD-MSK. Ti pozitivni učinki so sovpadali z zmanjšanim izražanjem citokinov, ki sodelujejo v Th2 tipu imunskega odgovora, in povečanim izražanjem citokinov, ki sodelujejo v Th1 tipu imunskega odgovora, v BALf-u (22). Na mišjem modelu astme so do podobnih zaključkov prišli tudi Marinas-Pardo in sod. (2014), ki so intravensko aplicirali označene AD-MSK. Zaznali so hitro lajšanje vnetja dihalnih poti, vezanega na izražanje Th1 citokinov. Ugotovili so tudi kopičenje celic v pljučih, hkrati pa izključili integracijo celic v pljučni parenhim in s tem njihov potencialni pro-modularni učinek (23). Vendar je potrebno poudariti, da se je pri tem učinek zdravljenja z MSC ob kontinuiranem antigenskem izzivu manjšal (23).

V naši raziskavi je imelo merjenje ΔPpl_{max} dva pomena. Prvi je bil diagnostičen, pri čemer smo z uporabo bronhodilatatorja (NBB) dokazali reverzibilnost obstrukcije dihalnih poti pri vseh konjih s SEA (193). Drugi namen meritev je bila ocena učinkovitosti terapije. Da bi zmanjšali ali odpravili variabilnost pri vzorčenju, vključno s sedacijo pri nekaterih konjih, smo uniformirali merilne pogoje za vsakega konja, s čimer smo zagotovili enakost postopkov v T1 in T2. Že dnevne ali sezonske spremembe in spremembe cirkadianega ritma posameznika namreč vplivajo na vrednosti ΔPpl_{max} pri astmatičnih konjih (4, 173, 180, 181). Te spremembe so povezane z dnevnim nihanjem vnetnih mediatorjev (178) ali slabšanjem bronhospazma, na katerega med drugim vpliva tudi temperatura v okolici (378). Učinke endogenih cirkadianih sprememb smo zmanjšali s ponavljanjem meritev (v T1 in T2) v istem časovnem obdobju dneva. Da bi odpravili vpliv vremena in sezone, bi morali vse konje obravnavati hkrati, kar pa

bi zahtevalo laboratorijsko in hospitalno infrastrukturo in logistiko, ki nista na voljo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani ali drugi veterinarski ustanovi.

Pri vseh konjih smo uspešno opravili BAL in pridobili vzorce BALf. Pri vseh konjih smo makro- in mikroskopsko ugotovili povečano celičnost izpirkov in velike količine sluzi, značilne za SEA (71, 149, 150). Razpršenost rezultatov smo nadalje upoštevali pri izbiri kompleksnih statističnih modelov. Širok razpon rezultatov je najverjetneje posledica tehnike odvzema izpirka in reakcija posameznega konja na poseg, na delež posameznih vrst vnetnih celic pa verjetno vplivajo tudi različni fenotipi bolezni, ki pa za SEA še niso določeni (34). Pri vseh konjih smo potrdili izrazito povečan delež nevtrofilnih granulocitov v BALf-u, kar je ob hkratni izključitvi okužbe diagnostično za SEA (4–6).

Intrabronhialna administracija bioloških zdravil omogoča neposreden dostop do, in hitrejšo interakcijo z imunskim sistemom pljuč. V primerjavi s sistemskim zdravljenjem je potrebno manjše število celic, zmanjša pa se tudi možnost morebitnih škodljivih sistemskih stranskih učinkov zdravljenja (17). Zaradi tega smo v tej raziskavi aplicirali MSC intrabronhialno. Vir MSC v tej raziskavi je bilo maščobno tkivo, ki se lahko pridobi z relativno enostavno in minimalno invazivno metodo; enostavna pa je tudi tehnika izolacije MSC iz maščobnega tkiva (246, 247).

Aplikacija 100 milijonov avtolognih AD-MSC je imela v naši raziskavi omejen kratkoročni terapevtski učinek in pozitiven dolgoročni učinek na klinično izražanje SEA. Kratkoročni učinki so bili izraženi z izboljšanjem posameznih parametrov, kot so kvantitativna klinična ocena, zmanjšano izražanje IL-17 mRNK in znižanje koncentracij IL-1 β , IL-4 in TNF α v BALf-u. V SCT skupini so k izboljšanju sicer kazale težnjo tudi številne druge spremenljivke, a je imel deksametazon v kratkoročnem obdobju izrazitejše pozitivne učinke v primerjavi s SCT. Pri spremljanju dolgoročnega učinka zdravljenja se je potreba po veterinarski intervenciji med obema skupinama bistveno razlikovala. Večina lastnikov je v obdobju po končani obravnavi konj nadaljevala z enakim režimom oskrbe in ni bistveno spremenila njihovega življenjskega okolja. Do datuma, s katerim smo označili zaključek raziskave, lastniki niso vedeli, katero terapijo je njihov konj prejel. Klinični status konj, zdravljenih z MSC, je bil dolgoročno stabilnejši v primerjavi s konji, zdravljenimi z deksametazonom. Ob podrobnejšem spremljanju nekaterih konj, so štirje lastniki konj iz skupine SCT poročali o opazno redkejšem kašljanju in izboljšani delovni sposobnosti svojih konj. Večina lastnikov konj iz DEX skupine pa je poročalo izrazito poslabšanje kmalu po končani obravnavi v raziskavi. Ti rezultati kažejo na

možen dolgoročni imunomodulatorni učinek MSC v primerjavi s strogo imunosupresivnim učinkom glukokortikoidov. Zaznani dolgoročni učinki zdravljenja z matičnimi celicami v naši raziskavi so skladni z dolgoročnim uspehom zdravljenja astmatičnih mačk (27). Trzil in sod. (2016) so poročali zmanjšanje števila vnetnih celic, AHR in preoblikovanja dihalnih poti, ki so jih zaznali devet mesecev po zdravljenju mačk z AD-MSK (27). Ob tem je potrebno poudariti, da terapevtski učinek MSC najverjetneje ni povezan z njihovim preživetjem v lokalnem tkivu. Številni raziskovalci so ugotovile kratkoživost MSC v pljučih, saj jih 24 ur po infuziji niso več zaznali (273, 329). Na lokalni imunski odziv pa naj bi kljub temu vplivale še znatno in dolgoročno po fagocitozi celih MSC ali njihovih delov s strani makrofagov (329).

Z namenom proučitve vpliva zdravljenja z MSC na različne poti imunskega odziva, smo v našo raziskavo vključili tudi izražanje pro-vnetnih citokinov (IL-1 β , IL-8 in TNF α) in citokinov - predstavnikov imunskega odziva tipa 1 (IFN γ), tipa 2 (IL -4) in tipa 17 (IL-17) v BALf. Raziskavo smo zasnovali tako, da smo pri dovtetnih konjih z antigenskim izzivom sprožili imunski odziv in konstantno prisotnost simptomov SEA. Tako je izražanje citokinov v tej raziskavi odraz stabilnega stanja klinično poslabšane SEA. To je najverjetneje tudi razlog, da so bili v času vzorčenja (BAL-a) citokini IL-4, IL-17 in IFN γ , ki imajo ključno vlogo predvsem v zgodnji - alergeni fazi odziva dihal (88, 95, 123, 379), izraženi v nižjih vrednostih v primerjavi z raziskavami, ki so analizirale spremenljivke takoj po antigenskem odzivu. Pri vseh konjih so bile v času T1 zaznane močno povišane ravni izražanja mRNK za IL-1 β , TNF α in IL-8, kar kaže na intenziven potek vnetja in vztrajen pro-vnetni dražljaj. Trenutno so glukokortikoidi del rutinskega zdravljenja SEA ravno zaradi njihove učinkovite sposobnosti zaviranja izražanja pro-vnetnih genov (118, 122, 380). A tudi v DEX skupini je pri posameznih konjih izražanje pro-vnetnih citokinov ostalo nespremenjeno, kar je v konjski medicini poznan problem, ki pa še nima definirane patogeneze (109).

V naši raziskavi izražanje mRNK ni bilo vedno povezano z zaznavnimi koncentracijami citokinskih proteinov z ELISA testi. Razlike v zaznavanju lahko v prvi vrsti pripišemo spremenljivi stabilnosti mRNK za posamezne citokine. Ta odstopanja so pričakovana pri analizah bioloških vzorcev (381–383). Večina raziskovalcev poroča o močni korelaciji med mRNK IFN γ in koncentracijo njenih proteinov ter o variabilni korelaciji med mRNK TNF α in IL-8 ter njunimi proteini. Izražanje koncentracije mRNK in proteinov pa slabo korelira pri IL-1 β , IL-4 in IL-17 (382). Ti podatki so zbrani iz analiz citokinov v človeški periferni krvi, ki je stabilnejši biološki medij kot BALf (382). Nizke koncentracije proteina IFN γ v naših BALf

vzorcih so bile torej najverjetneje posledica nizkega izražanja njihove mRNK. Tudi drugi regulatorni mehanizmi lahko vplivajo na prevajanje citokinov, od katerih so nekateri povezani s posttranskripcijsko regulacijo in, kot že omenjeno, utišanjem mRNK z miRNK (384–388). Vse te ugotovitve izhajajo iz humane in eksperimentalne medicine. Natančni podatki za konje, še posebej pri obolenjih dihal, pa niso na voljo (32, 389, 390).

Zdravljenje z MSC v naši raziskavi je vplivalo na izražanje gena za IL-17. To je citokin, ki ima pri številnih boleznih ključno vlogo pri sprožitvi vnetnega odgovora. Natančna patogeneza aktivacije vnetnega odgovora s strani IL-17 je slabo poznana (391). Verjetno je IL-17 kritični citokin, ki združuje aktivacijo T-celic z mobilizacijo nevtrofilnih granulocitov (392), in tako posredno spodbuja njihovo kemotakso in aktivacijo, in zakasni ali prepreči njihovo apoptozo (109). Med drugim IL-17 vpliva tudi na izražanje TNF α in IL-1 β (393), kar bi lahko bilo povezano z ugotovljenimi nižjimi vrednostmi TNF α in IL-1 β proteinov v BALf vzorcih v tej raziskavi. Zmanjšano izražanje IL-17 je torej lahko bistveno prispevalo k izboljšanju klinične slike in dolgoročnemu pozitivnemu učinku zdravljenja z MSC. Na koncentracijo IL-17 pa lahko vpliva tudi izražanje določenih miRNK (387). Ker matične celice lahko vplivajo na izražanje posameznih miRNK, bi v končni fazi lahko posredno vplivale na transkripcijo IL-17 mRNK (387, 394). Učinek zdravljenja z deksametazonom na ekspresijo IL-17 je bil v naši raziskavi še bolj očiten, pri tem pa moramo upoštevati, da je vpliv obeh načinov zdravljenja na imunski odziv drugačen (395).

V SCT skupini se je po zdravljenju znatno zmanjšala tudi količina IL-1 β , IL-4 in TNF α proteinov v BALf-ih. V naših vzorcih smo zaznali visoko ekspresijo tako mRNK IL-1 β , kot njenih proteinov. V obeh skupinah (SCT in DEX) smo ob primerjanju vrednosti med T1 in T2 opazili znatno zmanjšanje tako IL-1 β mRNK kot proteina, čeprav je bilo statistično značilno le zmanjšanje proteinov. Glukokortikoidi imajo poznan zaviralni učinek na transkripcijo, stabilnost mRNK in post-transkripcijsko izražanje IL-1 β (386, 396, 397). Glede na naše rezultate imajo MSC podoben učinek. Natančna opredelitev mehanizmov, ki so privedli do tega, pa je tudi v tem primeru problematična, saj je sinteza IL-1 β nadzorovana tako na transkripcijski kot na posttranskripcijski oziroma translacijski ravni (398, 399). Ker je mRNK IL-1 β med T1 in T2 ostala stabilna, lahko na podlagi naših rezultatov predpostavimo, da je zdravljenje najverjetneje učinkovalo na translacijo izraženih genov ali pa je posttranslacijsko oslabilo izražanje beljakovine. Enako bi lahko veljalo tudi za IL-4. Nizka izraženost mRNK za IL-4 in precej visoka zaznavnost njenih proteinov v naših vzorcih odstopata od rezultatov

drugih raziskovalcev, ki so poročali o dobri korelaciji med mRNK in proteini IL-4 (400). Prisotnost IL-4 v človeških vzorcih kaže na prevladovanje imunskega odziva tipa Th2 (401–403). Th2 imunski odziv nadalje modulira stabilnost mRNK s pozitivno povratno zanko (400, 404, 405). To bi lahko pojasnilo nizko stabilnost IL-4 mRNK v pljučih astmatičnih konj, saj Th2 polarizacija pri astmatičnih konjih nima prevladujočega vpliva. Hkrati pa se iz vsake molekule mRNK prevede več kopij proteina; nizke ravni mRNK IL-4 lahko torej vseeno zagotovijo veliko količino proteinov (406).

V naših vzorcih smo zaznali visoke vrednosti mRNK in proteinov TNF α , kar nakazuje na izrazit pro-vnetni stimulus. Ti rezultati pa odstopajo od rezultatov opisanih s strani Montgomeryja in sod. (2018), ki so ugotovili nizke vrednosti proteinov TNF α v dihalih astmatičnih konj. Pri tem je potrebno omeniti, da skupina ni proučevala vpliva zdravljenja, temveč je primerjala parametre med astmatičnimi in zdravimi konji (390). Izražena mRNK TNF α (407–409) in njeni proteini (407, 408) imajo sicer kratko razpolovno dobo in nizko stabilnost v sistemski cirkulaciji in bioloških vzorcih. Regulativni mehanizmi, ki nadzorujejo sintezo TNF α na posttranskripcijski ravni, so odvisni od vrste celic in aktivacijskih poti celic (410, 411). V splošnem aktivacija makrofagov z določenimi dražljaji (npr. LPS) spodbuja blokirano prevajanje TNF α , kar ima za posledico visoke ravni TNF α (411). Na prevajanje lahko vpliva tudi miRNK-346, ki blokira izražanje kinaze, ki sicer stabilizira mRNK TNF α in posledično vpliva na prevajanje in izločanje njenih proteinov (384–386). Statistično značilno zmanjšanje beljakovin TNF α in komaj zaznavna sprememba v izražanju mRNK v SCT skupini je pomemben rezultat naše študije. Kaže namreč na vpliv MSC na posttranskripcijsko in/ali translacijsko fazo izražanja gena TNF α .

Močno povečano izražanje mRNK IL-8 je v vzorcih BALf pri astmatičnih konjih pogosto zelo izrazito in značilno (94–96, 110), s čimer sovpadajo tudi rezultati te raziskave. Nezaznavne vrednosti beljakovin IL-8 v naših BALf vzorcih pa so bile nekoliko presenetljive. Razloge je treba iskati v post-transkripcijskih in pred- in post-translacijskih dogodkih. V bioloških vzorcih je mRNK IL-8 zelo stabilna (409, 412), medtem, ko ima protein IL-8 relativno kratko stabilnost v plazmi in verjetno tudi v BALf-u (413). Po drugi strani pa so receptorji IL-8 gosto izraženi na nevtrofilnih granulocitov (109, 414, 415), ki so v vnetnem okolju astmatičnih konjskih pljuč prisotni v velikem številu. Prosti proteini se v tem primeru verjetno hitro vežejo na receptorje in jih z ELISA testom ni več moč zaznati (416). Prevajanje mRNK IL-8 v proteine je lahko tudi blokirano s strani miRNK (388). Ob upoštevanju nizke koncentracije proteina IL-8 v naših

vzorcih se mora porajati tudi pomislek, da se pomembna vloga za razvoj nevtrofilnega vnetja v dihalih astmatičnih konj pripisuje napačnemu citokinu.

V naši raziskavi nismo proučevali in opredelili vpliva zdravljenja na preoblikovanje lokalnega pljučnega tkiva, za kar pa bi bilo potrebno izvesti večkratno biopsijo pljučnega tkiva. Ponavljajoča se biopsija pljuč bi verjetno sprožila vnetni odziv, nepovezan s SEA, kar bi otežilo interpretacijo rezultatov. Dolgoročna stabilnost klinične slike pri SEA v SCT skupini pa se lahko posredno razloži z znižanjem AHR, ki pa je med drugim odvisna tudi od preoblikovanja tkiva dihalnih poti (27, 146, 417, 418). Takšno interpretacijo podpira raziskava Mariñas-Pardo in sod. (2014) na modelu mišje astme, v kateri so spremljali porazdelitev, interakcije in preživetje intravensko apliciranih označenih AD-MSK (23). Čeprav MSK niso vplivale na preoblikovanje ECM, so dolgoročno povzročile zmanjšano nalaganje vlaken v dihalnih poteh (23). Tudi drugi raziskovalci so poročali o zmanjšani hitrosti preoblikovanja dihalnih poti v smislu odlaganja kolagena v pljučnem parenhimu po zdravljenju z MSK (24, 26, 419). Znatno zmanjšanje vnetja dihalnih poti in preoblikovanja tkiva je zajeto tudi v nedavni metaanalizi 32 objavljenih raziskav živalskih modelov astme, zdravljenih sistemsko ali lokalno z MSK (357). Čeprav z glukokortikoidi uspešno rešujemo hude oblike dihalne stiske, ostaja zmanjšanje izpostavljenosti prahu ključen ukrep za lajšanje simptomov SEA. To zahteva prilagoditve v oskrbi konj, kar je povezano s povečanjem finančnega vložka in neposrednega dela oskrbnikov konj, vključuje pa tudi spremembe v infrastrukturi objektov in okolice. Takšna investicija pa ima lahko samo začasen in delen učinek, pri nekaterih konjih pa učinka sploh ni. Nove in bolj učinkovite strategije zdravljenja SEA so zato nujne, MSK pa so primeren kandidat za raziskave v tej smeri. Naša raziskava je odkrila več pozitivnih učinkov zdravljenja SEA z AD-MSK. Nekatere spremembe so bile zajete z oceno parametrov po kratkoročnem obdobju, najbolj spodbudni pa so bili dolgoročni učinki SCT na klinično stabilnost SEA. Natančnih mehanizmov zdravljenja z MSK na razvoj in obstojnost konjske astme v naši raziskavi nismo uspeli opredeliti. Prav tako moramo poudariti, da kljub uporabi zelo konservativnega statističnega modela, rezultati te študije ne ponujajo novega režima zdravljenja. Predstavljajo pa pomemben začetek pri oblikovanju smernic za nove terapevtske strategije za zdravljenje SEA. V prihodnosti moramo predvsem natančneje raziskati vpliv MSK na izražanje in prevajanje genov posameznih vnetnih mediatorjev. Boljše poznavanje post-transkripcijske in translacijske regulacije citokinov pri SEA bo verjetno pripomoglo tudi k boljšemu razumevanju same patogeneze SEA in drugih kroničnih obstruktivnih obolenj dihal pri živalih in ljudeh.

6 ZAKLJUČKI

Intrabronhialna administracija 100 milijonov avtolognih AD-MSK je imela omejen kratkoročni učinek, vendar pozitiven dolgoročni učinek, ki se je izrazil kot dolgoročna stabilnost kliničnih znakov SEA. Ti rezultati kažejo na možen dolgoročni imunomodulatorni učinek intrabronhialno apliciranih avtolognih AD-MSK in verjetno delno spremembo poteka vnetja v dihalih astmatičnih konj v primerjavi z učinkovanjem glukokortikoidov.

Zdravljenje z AD-MSK vnetja dihal ni odpravilo kljub ugotovljeni izboljšavi določenih kliničnih in vnetnih parametrov, zato smo prvo zastavljeno hipotezo ovrgli. Imunosupresivne učinke MSC pa smo potrdili z ugotavljenimi spremembami izražanja in prevajanja vnetnih citokinov.

Rezultati raziskave so pomembni za podrobnejše razumevanje imunopatogeneze SEA in razvoj novih terapevtskih strategij, ki bi bile osnovane na MSC. Ker je konjska astma ustrezen model za proučevanje človeške astme (predvsem nevtrofilnega tipa), bodo rezultati koristni tudi za razvoj terapevtskih strategij v humani medicini.

7 POVZETEK

Huda oblika konjske astme (Severe equine asthma; SEA) je pogosto kronično obolenje dihal pri konjih, ki pomembno vpliva na zdravje in dobro počutje konj. Trenutne terapijske strategije lahko začasno uspešno izboljšajo pljučno funkcijo in omilijo simptome pri nekaterih konjih, vendar ne spremenijo dolgoročnega napredovanja SEA. Povzročijo lahko tudi nezaželene stranske učinke. Razvoj regenerativne medicine je omogočil številne nove terapijske pristope, s katerimi se skuša bolj dolgoročno vplivati na imunski odziv in se hkrati izogniti neželenim učinkom klasičnih zdravil. Cilj naše raziskave je bil oceniti varnost in terapijsko učinkovitost intrabronhialne administracije iz maščobe pridobljenih mezenhimskih matičnih celic (Adipose-derived mesenchymal stem cells; AD-MSC) za zdravljenje SEA.

V raziskavo smo vključili dvajset odraslih konj, ki so bili diagnosticirani s SEA. Konje smo naključno razdelili v dve skupini ($n = 10$) in jih zdravili z intrabronhialno aplikacijo avtolognih AD-MSC ali peroralnim deksametazonom. Na začetku in tri tedne po začetku zdravljenja smo opravili meritve sprememb plevralnega tlaka med dihalnim ciklom ($\Delta P_{pl_{max}}$), s čimer smo ocenili pljučno funkcijo, in bronhoskopski pregled dihalnih poti. Opravili smo citološko analizo bronhoalveolarnega izpirka (Bronchoalveolar lavage fluid; BALF) in izmerili vrednosti izražanja IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-17, TNF α in IFN γ mRNK in koncentracijo njihovih beljakovin v BALF-u na začetku in po treh tednih zdravljenja. Počutje konj in klinično izražanje SEA pri posameznikih smo nadalje spremljali še eno leto po zaključeni obravnavi. Za oceno razlik med zdravljenjem smo izvedli analizo neinferiornosti in linearni model mešanih učinkov.

Neinferiornosti zdravljenja z MSC nismo ugotovili. Zdravljenje z MSC pa je kljub temu znatno izboljšalo kvantitativno klinično oceno ($P = 0,01$), zmanjšalo se je izražanje IL-17 mRNK ($P = 0,05$) in koncentracije IL-1 β ($P \leq 0,001$), IL-4 ($P \leq 0,001$) in TNF α ($P = 0,02$). Zdravljenje z MSC je imelo tudi pozitiven dolgoročni učinek na klinične znake SEA ($P = 0,02$). Z detekcijo prepisa in prevajanja posameznih citokinov smo ugotovili razlikovanje med učinkovanjem obeh načinov zdravljenja. Za razliko od glukokortikoidov, ki zavirajo izražanje genov vnetnih citokinov, MSC verjetno vplivajo na prevajanje genov v funkcionalne proteine. Z izsledki naše raziskave bolj natančnega mehanizma delovanja MSC nismo uspeli opredeliti.

Na podlagi izsledkov te raziskave lahko zaključimo, da je imela intrabronhialna aplikacija avtolognih AD-MSC omejen kratkoročni protivnetni učinek in pozitiven dolgoročen učinek na stabilnost simptomov SEA. Rezultati raziskave so pomembni za podrobnejše razumevanje

N. Adamič: Vpliv zdravljenja z mezenhimijskimi matičnimi celicami na kronično obstruktivno obolenje dihal pri konjih.

Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

76

poteka vnetja v astmatičnih dihalih konj in razvoj bolj učinkovitih terapij za zdravljenje obstruktivnih obolenj dihal pri konjih in drugih vrstah, vključno s človekom.

8 SUMMARY

Severe equine asthma (SEA) is a common chronic respiratory disease and a significant equine health and welfare problem. Current therapeutic strategies temporarily improve lung function and limit clinical exacerbations in some horses but cannot reverse the long-term progression of SEA; moreover, side effects are possible. The evolution of regenerative medicine has enabled several new therapeutic strategies that primarily target the severity of the immune response and minimize the likelihood of side effects that occur after the use of conventional therapeutic strategies. Therefore, the objective of this study was to evaluate the safety and therapeutic efficacy of intrabronchial administration of adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) in SEA.

Twenty adult horses diagnosed with SEA were included in the study. Horses were randomly divided into two groups (n=10/group) and treated with either intrabronchial application of autologous MSC or oral dexamethasone. Maximum change in pleural pressure during respiratory cycle ($\Delta P_{pl_{max}}$) and bronchoscopy were performed to assess lung function and inflammation at baseline and three weeks after treatment initiation. Bronchoalveolar lavage fluid (BALf) was analyzed cytologically, and IL -1 β , IL -4, IL -8, IL -17, TNF α and IFN γ mRNA ratio and protein concentration were measured at baseline and after treatment initiation. Horses were monitored for one year for recurrence of SEA. A non-inferiority analysis and a linear mixed-effects model were performed to evaluate differences between treatments.

Non-inferiority of MSC treatment was not established. However, MSC administration significantly improved clinical score ($P = 0.01$), decreased expression of IL -17 mRNA ($P = 0.05$) and IL -1 β ($P \leq 0.001$), IL -4 ($P \leq 0.001$), TNF α ($P = 0.02$) protein levels, and had a positive long-term effect on SEA clinical signs ($P = 0.02$). We found a difference between the effects of both treatments on the inflammatory cascade by detecting the transcriptional and translational expression levels of above-mentioned cytokines. Unlike glucocorticoids, which inhibit the expression of inflammatory cytokine genes, MSCs likely affect the translational phase in the cascade of interleukin production. However, the results of our study did not allow us to determine the exact mechanism of MSC influence on airway inflammation.

Intrabronchial administration of autologous AD-MSC had a limited short-term anti-inflammatory effect and a positive long-term effect on SEA. These results are critical for a more

detailed understanding of inflammation in SEA and the development of alternative therapies to treat equine asthma and/or obstructive airway diseases in other species, including humans.

9 ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Modest Venguštu, ki me je strokovno vodil pri prvih korakih znanstvenega delovanja. Profesionalnost, prijaznost in potrpežljivost, ki jo je ob tem izkazoval, so mi v velik vzor. Hvaležna sem za priložnost, da sem lahko delovala pod njegovim skrbnim mentorstvom.

Zahvaljujem se so-mentorju prof. dr. Gregor Majdiču, ki me je s preudarnostjo in mirnostjo vodil skozi prvo znanstveno pisanje in se vedno odzval na moja vprašanja ali znanstvene zadrege s konstruktivnimi pogovori.

Zahvaljujem se članom komisije, prof. dr. Milki Vrecl Fazarinc, izr. prof. dr. Janku Mrkunu in doc. dr. Urošu Rajčeviču, ki so s svojimi predlogami pomembno vplivali na doktorsko delo.

Zahvaljujem se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje v okviru usposabljanja mladega raziskovalca.

Iz srca se zahvaljujem vsem lastnikom konj, ki so sodelovali z menoj. Z vključitvijo svojih živali v raziskavo so pomembno doprinesli k razvoju novih terapevtskih možnosti za zdravljenje konjske astme.

Hvala dr. Sonji Prpar Mihevc, ki mi je nesebično pomagala pri laboratorijskem delu in mi bila velik vzor organiziranosti in delovne etike, ter pri tem ustvarjala prijetno vzdušje.

Zahvaljujem se dr. Petri Kramarič za pomoč pri kliničnem delu s konji. Njen topel odnos do konj in lastnikov mi je večni vzor.

Zahvaljujem se Roku Blagusu za pomoč in vodenje skozi statistično obdelavo pridobljenih podatkov.

Hvala znan. sod. dr. Urošu Krapežu za pomoč pri izvedbi nekaterih laboratorijskih analiz in izjemno zanimiv pogovor o dobljenih rezultatih.

Iskrena hvala Mateju in Betki, ki sta oskrbovala konje in potrpežljivo upoštevala moja navodila in želje. Za pomoč pri oskrbi konj se zahvaljujem tudi vsem študentkam, zaposlenim na Kliniki za konje Veterinarske fakultete.

Hvala Mateji Bogataj za pomoč pri administrativnih zadevah in večno prijaznost. Za tople nasmeh in prijazne besede se zahvaljujem tudi vsem ostalim sodelavkam in sodelavcem, ki so mi v času doktorskega dela stali ob strani.

Na koncu se zahvaljujem moji družini, v prvi vrsti mami, očetu in Katki, ki so me vsak na svoj ljubeč način potrpežljivo bodrili na tej poti.

In končno, iskreno se zahvaljujem Maticu, da mi je ves čas stal ob strani in mi pomagal v trenutkih, ko sem to najbolj potrebovala.

10 LITERATURA

1. Aviza G, Ainsworth D, Eicker S, Santiago M, Divers T, Perkins G. Outcome of horses diagnosed with and treated for heaves (recurrent airway obstruction). *Equine Vet Educ* 2001; 13: 243–6. doi: 10.1111/j.2042-3292.2001.tb00103.x
2. Léguillette R. Recurrent airway obstruction: heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2003; 19(1): 63–86, vi. doi: 10.1016/s0749-0739(02)00067-6
3. Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, Buechner-Maxwell VA. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J* 1996; 152(3): 283–306. doi: 10.1016/s0007-1935(96)80101-1
4. Robinson NE. International workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet J* 2001; 33(1): 5–19. doi: 10.2746/042516401776767412
5. Lavoie JP. Recurrent airway obstruction (heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J, eds. *Equine respiratory medicine and surgery*. Edinburgh : WB Saunders, 2007: 565–89.
6. Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R, Richard EA. Inflammatory airway disease of horses: revised consensus statement. *J V Intern Med* 2016; 30(2): 503–15. doi: 10.1111/jvim.13824
7. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47(5): 589–96. doi: 10.1165/rcmb.2011-0363OC
8. Barton AK, Gehlen H. Pulmonary remodeling in equine asthma: what do we know about mediators of inflammation in the horse? *Mediators Inflamm* 2016; 2016: e56932015. doi: 10.1155/2016/5693205

9. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep* 2017; 7: e8843. doi: 10.1038/s41598-017-09414-8
10. Cuming RS, Groover ES, Wooldridge AA, Caldwell FJ. Review of glucocorticoid therapy in horses. Part 1: Pharmacology. *Equine Vet Educ* 2018; 30(3): 141–50. doi: 10.1111/eve.12555
11. Eyre P, Elmes P, Stickland S. Corticosteroid-potentiated vascular responses of the equine digit: a possible pharmacologic basis for laminitis. *Am J Vet Res* 1979; 40(1): 135–8.
12. Cohen ND, Carter GK. Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200(11): 1682–4.
13. Mair TS. Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec* 1996; 138(9): 205–7. doi: 10.1136/vr.138.9.205
14. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641–50. doi: 10.1002/jor.1100090504
15. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells* 2019; 8(8): e784. doi: 10.3390/cells8080784
16. Antoniou KM, Karagiannis K, Tsitoura E, et al. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic lung diseases. *Biomed Rep* 2018; 8(4): 314–8. doi: 10.3892/br.2018.1067
17. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Clinical application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapeutics for inflammatory lung diseases. *J Clin Med* 2018; 7(10): e355. doi: 10.3390/jcm7100355
18. Simones AA, Beisang DJ, Panoskaltzis-Mortari A, Roberts KD. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia: a clinical review. *Pediatr Res* 2018; 83(1/2): 308–17. doi: 10.1038/pr.2017.237

19. Yen BL, Yen M, Wang L, Liu K, Sytwu H. Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: gleanings insights for possible use in COVID-19. *Stem Cells Transl Med* 2020; 9(10): 1163–73. doi: 10.1002/sctm.20-0186
20. Bonfield TL, Koloze M, Lennon DP, Zuchowski B, Yang SE, Caplan AI. Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299(6): L760–70. doi: 10.1152/ajplung.00182.2009
21. Lee SH, Jang AS, Kwon JH, Park SK, Won JH, Park CS. Mesenchymal stem cell transfer suppresses airway remodeling in a toluene diisocyanate-induced murine asthma model. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 3(3): 205–11. doi: 10.4168/aair.2011.3.3.205
22. Cho KS, Park MK, Kang SA, et al. Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: e436476. doi: 10.1155/2014/436476
23. Mariñas-Pardo L, Mirones I, Amor-Carro O, et al. Mesenchymal stem cells regulate airway contractile tissue remodeling in murine experimental asthma. *Allergy* 2014; 69(6): 730–40. doi: 10.1111/all.12392
24. Cruz FF, Borg ZD, Goodwin M, et al. Systemic administration of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell extracellular vesicles ameliorates *Aspergillus hyphal* extract-induced allergic airway inflammation in immunocompetent mice. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4(11): 1302–16. doi: 10.5966/sctm.2014-0280
25. Abreu SC, Antunes MA, Xisto DG, et al. Bone marrow, adipose, and lung tissue-derived murine mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(6): 1557–67. doi: 10.1002/sctm.16-0398
26. de Castro LL, Xisto DG, Kitoko JZ, et al. Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): e151. doi: 10.1186/s13287-017-0600-8

27. Trzil JE, Masseur I, Webb TL, et al. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. *J Feline Med Surg* 2016; 18(12): 981–90. doi: 10.1177/1098612X15604351
28. Hao Y, Ran Y, Lu B, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on canine radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018; 102(2): 407–16. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.05.068
29. Ihara K, Fukuda S, Enkhtaivan B, et al. Adipose-derived stem cells attenuate pulmonary microvascular hyperpermeability after smoke inhalation. *PLoS ONE* 2017; 12(10): e0185937. doi: 10.1371/journal.pone.0185937
30. Cardenes N, Aranda-Valderrama P, Carney JP, et al. Cell therapy for ARDS: efficacy of endobronchial versus intravenous administration and biodistribution of MAPCs in a large animal model. *BMJ Open Respir Res* 2020; 7(1): e000308. doi:10.1136/bmjresp-2018-000308corr1
31. Adamič N, Prpar Mihevc S, Blagus R, et al. Effect of intrabronchial administration of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells on severe equine asthma. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 23. doi: 10.1186/s13287-022-02704-7
32. Barussi FCM, Bastos FZ, Leite LMB, et al. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respir Physiol Neurobiol* 2016; 232: 35–42. doi: 10.1016/j.resp.2016.07.002
33. Robinson NE. Recurrent airway obstruction (heaves). [online] In: Lekeux P, ed. *Equine respiratory diseases*. Ithaca, USA : International Veterinary Information Service, IVIS, 2001. http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/robinson/reference.asp (17 Mar 2020)
34. Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, et al. Equine asthma: current understanding and future directions. *Front Vet Sci* 2020; 7: 450. doi: 10.3389/fvets.2020.00450
35. Bracher V, von Fellenberg R, Winder CN, Gruenig G, Hermann M, Kraehenmann A. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in

- random populations of Swiss horses. *Equine Vet J* 1991; 23(2): 136–41. doi: 10.1111/j.2042-3306.1991.tb02738.x
36. Gerber V, Robinson NE, Luethi S, Marti E, Wampfler B, Straub R. Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Vet J* 2003; 35(5): 491–5. doi: 10.2746/042516403775600424
37. Larson VL, Busch RH. Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *Am J Vet Res* 1985; 46(1): 144–6.
38. Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2007; 39(4): 301–8. doi: 10.2746/042516407x180129
39. Jaarsma A, Verdegaal L, Smart C, Preston F, Caraguel C, Franklin S. Prevalence and risk factors associated with equine asthma in South Australian horses. In: *The Proceedings of the 2018 Equine Chapter Meeting at the ANZCVS Science*, 5. July – 7. July, 2017. Gold Coast, Queensland, Australia, 2018: 71.
40. McPherson EA, Lawson GHK, Murphy JR, Nicholson JM, Breeze RG, Pirie HM. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): factors influencing the occurrence. *Equine Vet J* 1979; 11(3): 167–71. doi: 10.1111/j.2042-3306.1979.tb01332.x
41. Couëtil LL, Ward MP. Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990–1999). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223(11): 1645–50. doi: 10.2460/javma.2003.223.1645
42. Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S. The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* 1991; 23(6): 457–60. doi: 10.1111/j.2042-3306.1991.tb03761.x
43. Ramseyer 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(1): 149–56. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[149:eogaef]2.0.co;2

44. Jost U, Klukowska-Rötzler J, Dolf G, et al. A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Vet J* 2007; 39(3): 236–41. doi: 10.2746/042516407x171110
45. Swinburne J, Bogle H, Klukowska-Rötzler J, et al. A whole-genome scan for recurrent airway obstruction in Warmblood sport horses indicates two positional candidate regions. *Mamm Genome* 2009; 20(8): 504–15. doi: 10.1007/s00335-009-9214-5
46. Gerber V, Baleri D, Klukowska-Rötzler J, Swinburne JE, Dolf G. Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2009; 23(3): 626–30. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0292.x
47. Mair TS. Value of tracheal aspirates in the diagnosis of chronic pulmonary diseases in the horse. *Equine Vet J* 1987; 19(5): 463–5. doi: 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02645.x
48. Derksen FJ, Scott JS, Miller DC, Slocombe RF, Robinson NE. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis* 1985; 132(5): 1066–70. doi: 10.1164/arrd.1985.132.5.1066
49. Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy* 1993; 23(10): 821–8. doi: 10.1111/j.1365-2222.1993.tb00259.x
50. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after ‘natural (hay and straw) challenges’. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 36(3): 207–22. doi: 10.1016/0165-2427(93)90020-5
51. Dixon PM, Railton DI, McGorum BC. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. *Equine Vet J* 1995; 27(6): 428–35. doi: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb04423.x
52. Brazil TJ. Pulmonary neutrophil recruitment, activation and clearance in equine chronic obstructive pulmonary disease. Edinburgh : The University of Edinburgh, 1999. Doktorska disertacija.

53. Pirie RS, Dixon PM, Collie DDS, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 2001; 33(3): 311–8. doi: 10.2746/042516401776249732
54. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW. Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after ‘natural (hay and straw) challenges’. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 36(3): 223–37. doi: 10.1016/0165-2427(93)90021-u
55. Pearson CC, Sharples TJ. Airborne dust concentrations in livestock buildings and the effect of feed. *J Agric Eng Res* 1995; 60(3): 145–54.
56. Samadi S, Wouters IM, Houben R, Jamshidifard AR, Van Eerdenburg F, Heederik DJJ. Exposure to inhalable dust, endotoxins, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans, and airborne microorganisms in horse stables. *Ann Occup Hyg* 2009; 53(6): 595–603. doi: 10.1093/annhyg/mep040
57. Auger EJ, Moore-Colyer MJS. The effect of management regime on airborne respirable dust concentrations in two different types of horse stable design. *J Equine Vet Sci* 2017; 51: 105–9. doi: 10.1016/j.jevs.2016.12.007
58. Clarke A. Air hygiene and equine respiratory disease. *In Pract* 1987; 9(6): 196–204. doi: 10.1136/inpract.9.6.196
59. Séguin V, Garon D, Lemauviel-Lavenant S, et al. How to improve the hygienic quality of forages for horse feeding. *J Sci Food Agric* 2012; 92(4): 975–86. doi: 10.1002/jsfa.4680
60. 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(1): 54–7. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.09.001
61. Ivester KM, Couëtil LL, Zimmerman NJ. Investigating the link between particulate exposure and airway inflammation in the horse. *J Vet Intern Med* 2014; 28(6): 1653–65. doi: 10.1111/jvim.12458.

62. Uberti B, Morán G. Role of neutrophils in equine asthma. *Anim Health Res Rev* 2018; 19(1): 65–73. doi: 10.1017/S146625231800004X
63. Moran G, Folch H. Recurrent airway obstruction in horses - an allergic inflammation: a review. *Vet Med (Praha)* 2011; 56(1): 1–13.
64. Bureau F, Bonizzi G, Kirschvink N, et al. Correlation between nuclear factor- κ B activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(4): 1314–21. doi: 10.1164/ajrccm.161.4.9907010
65. Kaup FJ, Drommer W, Damsch S, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J* 1990; 22(5): 349–55. doi: 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04288.x
66. Halliwell REW, McGorum BC, Irving P, Dixon PM. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 38(3): 201–15. doi: 10.1016/0165-2427(93)90081-e
67. Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HHL, et al. Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66(3): 245–56. doi: 10.1016/s0165-2427(98)00202-5
68. Eder C, Crameri R, Mayer C, et al. 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* 2000; 73(3): 241–53. doi: 10.1016/s0165-2427(00)00154-9
69. Eder C, Curik I, Brem G, et al. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet J* 2001; 33(7): 714–20. doi: 10.2746/042516401776249264
70. Tahon L, Baselgia S, Gerber V, et al. In vitro allergy tests compared to intradermal testing in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127(1): 85–93. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.09.021

71. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J-P. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 2011; 16(7): 1027–46. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02033.x
72. Joubert P, Silversides DW, Lavoie J-P. Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon- γ . *Equine Vet J* 2001; 33(7): 730–3. doi: 10.2746/042516401776249246
73. Ai Z, Udalova IA. Transcriptional regulation of neutrophil differentiation and function during inflammation. *J Leukoc Biol* 2020; 107(3): 419-430. doi: 10.1002/JLB.1RU1219-504RR
74. Robinson NE. Respiratory function. In: Klein B, ed. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St.Louis, Missouri : Elsevier Saunders, 2013: 495–542.
75. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320(6): 365–76. doi: 10.1056/NEJM198902093200606
76. Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111(1/2): 56–66. doi: 10.1159/000074486
77. Turlej R, Fievez L, Sandersen C, et al. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax* 2001; 56(9): 696–702. doi: 10.1136/thorax.56.9.696
78. Franchini M, Gilli U, Akens MK, Fellenberg RV, Bracher V. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66(1): 53–65. doi: 10.1016/s0165-2427(98)00178-0
79. Tremblay GM, Ferland C, Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J* 1993; 25(3): 194–7. doi: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02941.x

80. Laan TTJM, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med* 2006; 20(1): 167–74. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[167:troami]2.0.co;2
81. Finkbeiner WE. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir Physiol* 1999; 118(2/3): 77–83. doi: 10.1016/s0034-5687(99)00080-8
82. Fredberg JJ. Airway smooth muscle in asthma: perturbed equilibria of myosin binding. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 Pt 2): S158–60. doi: 1164/ajrccm.161.supplement_2.a1q4-1
83. Holgate S, Davies D, Lackie P, Wilson S, Puddicombe S, Lordan J. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(2 Pt 1): 193-204. doi: 10.1016/s0091-6749(00)90066-6
84. 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 Immunopathol* 2002; 85(3): 147–58. doi: 10.1016/s0165-2427(01)00420-2
85. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(8): 1410–3. doi: 10.1164/ajrccm.164.8.2012091
86. Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, et al. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87(3): 385–9. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00081-8
87. Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie J-P. IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 97(1): 87–96. doi: 10.1016/j.vetimm.2003.08.013
88. Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108(1/2): 237–45. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.07.013

89. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3): 138–46. doi: 10.1016/0167-5699(96)80606-2
90. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8(3): 275–83. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80533-6
91. Ainsworth DM, Grünig G, Matychak MB, et al. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96(1): 83–91. doi: 10.1016/s0165-2427(03)00142-9
92. Cassatella MA, Gasperini S, Russo MP. Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 832(1): 233–42. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb46251.x
93. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression: part of host defence in pulpitis. *Cytokine* 2003; 22(3/4): 84–8. doi: 10.1016/s1043-4666(03)00116-9
94. Lavoie JP, Cesarini C, Lavoie-Lamoureux A, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med* 2011; 25(2): 322–9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0664.x
95. Padoan E, Ferraresso S, Pegolo S, Castagnaro M, Barnini C, Bargelloni L. Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 156(3): 190–9. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.09.020
96. Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, Bracher VD. 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(11): 1369–74. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.1369
97. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Respir J* 2001; 18(Suppl. 34): 3s–17s. doi: 10.1183/09031936.01.00266001
98. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl): 456–60.

99. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994; 56(5): 559–64.
100. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1): 12–24. doi: 10.1165/rcmb.2002-0166TR
101. Jundi K, Greene CM. Transcription of interleukin-8: how altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules* 2015; 5(3): 1386–98. doi: 10.3390/biom5031386
102. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160(7): 3513–21.
103. Granet C, Miossec P. Combination of the pro-inflammatory cytokines IL-1, TNF- α and IL-17 leads to enhanced expression and additional recruitment of AP-1 family members, Egr-1 and NF- κ B in osteoblast-like cells. *Cytokine* 2004; 26(4): 169–77. doi: 10.1016/j.cyto.2004.03.002
104. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11): 1133–41. doi: 10.1038/ni1261
105. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(7): 2336–40. doi: 10.1073/pnas.86.7.2336
106. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I- κ B- α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6): 3301–10. doi: 10.1128/mcb.13.6.3301-3310.1993
107. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker H-C. NF- κ B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF- α -, and IL-1 β -induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162(9): 5337–44.

108. Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grünig G, Erb HN, Tan JY. 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(4): 669–77. doi: 10.2460/ajvr.67.4.669
109. Murcia RY, Vargas A, Lavoie JP. The interleukin-17 induced activation and increased survival of equine neutrophils is insensitive to glucocorticoids. *PLoS One* 2016; 11(5): e0154755. doi: 10.1371/journal.pone.0154755
110. Hansen S, Otten ND, Birch K, Skovgaard K, Hopster-Iversen C, Fjeldborg J. Bronchoalveolar lavage fluid cytokine, cytology and IgE allergen in horses with equine asthma. *Vet Immunol Immunopathol* 2020; 220: e109976. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109976
111. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2): S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
112. Silva LB, dos Santos Neto AP, Maia SMAS, et al. The role of TNF- α as a proinflammatory cytokine in pathological processes. *Open Dent J* 2019; 13: 332–8. doi: 10.2174/1874210601913010332
113. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109(6): 699–705. doi: 10.1172/JCI15277
114. Oslund KL, Adamson G, Wu R. Evaluation of MUC5AC expression and upregulation in airway epithelial cells of horses. *Am J Vet Res* 2010; 71(6): 690–6. doi: 10.2460/ajvr.71.6.690
115. Becker S, Devlin RB, Haskill JS. Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin 1 by human alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1989; 45(4): 353–61.
116. Nambu A, Nakae S. IL-1 and allergy. *Allergol Int* 2010; 59(2): 125–35. doi: 10.2332/allergolint.10-RAI-0190

117. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32(4): 311–8. doi: 10.1165/rcmb.2004-0309OC
118. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87(6): 2095–147.
119. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1989; 1(1): 2–13. doi: 10.1016/1043-4666(89)91043-0
120. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015; 63: 435–49. doi: 10.1007/s00005-015-0344-z
121. Newcomb DC, Peebles RS. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(6): 755–60. doi: 10.1016/j.coi.2013.08.002
122. Bond SL, Hundt J, Léguillette R. Effect of injected dexamethasone on relative cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage fluid in horses with mild asthma. *BMC Vet Res* 2019; 15(1): e397. doi: 10.1186/s12917-019-2144-x
123. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105(1): 25–31. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.12.013
124. Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1 β and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am J Vet Res* 2007; 68(12): 1361–9. doi: 10.2460/ajvr.68.12.1361
125. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 2011; 3(6): 920–40. doi: 10.3390/v3060920

126. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 cytokine storm; What we know so far. *Front Immunol* 2020; 11: e1446. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446
127. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell: cell signaling*. 6th ed. New York : Garland Science, 2015: 873–4.
128. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016; 8(3): 227–41. doi: 10.1002/wsbm.1331
129. Levine SJ. NF-κB: a key signaling pathway in asthma. In: Finkel T, Gutkind JS, eds. *Signal transduction and human disease*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2003: 23–70.
130. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16(1): 3–9. doi: 10.1016/j.smim.2003.10.003
131. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease - master regulators or target practice? *Respir Res* 2010; 11(1): e148. doi: 10.1186/1465-9921-11-148
132. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 2015; 109(1): 14.12.1–10. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109
133. Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MKB, Dower SK. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(7): 984–9. doi: 10.1046/j.1365-2745.2002.01451.x
134. Berndt A, Derksen FJ, Venta PJ, Ewart S, Yuzbasiyan-Gurkan V, Robinson NE. Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(4): L936–43. doi: 10.1152/ajplung.00394.2006
135. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, et al. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem* 2003; 278(52): 53035–44. doi: 10.1074/jbc.M308093200

136. Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol* 2004; 172(4): 2613–20. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2613
137. Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003; 111(7): 1011–20. doi: 10.1172/JCI16510
138. Wassef A, Janardhan K, Pearce JW, Singh B. Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1201–8. doi: 10.14670/HH-19.1201
139. Morris GE, Whyte MKB, Martin GF, Jose PJ, Dower SK, Sabroe I. Agonists of toll-like receptors 2 and 4 activate airway smooth muscle via mononuclear leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(8): 814–22. doi: 10.1164/rccm.200403-406OC
140. Gon Y, Asai Y, Hashimoto S, et al. A20 inhibits toll-like receptor 2- and 4-mediated interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(3): 330–6. doi: 10.1165/rcmb.2003-0438OC
141. Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G, et al. Mechanisms of persistent NF- κ B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol* 2000; 165(10): 5822–30. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5822
142. Niedzwiedz A, Jaworski Z, Tykalowski B, Smialek M. Neutrophil and macrophage apoptosis in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with recurrent airway obstruction (RAO). *BMC Vet Res* 2014; 10: e29. doi: 10.1186/1746-6148-10-29
143. Yang L, Cohn L, Zhang DH, Homer R, Ray A, Ray P. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med* 1998; 188 (9): 1739–50. doi: 10.1084/jem.188.9.1739
144. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 1995; 270(2): 933–43. doi: 10.1074/jbc.270.2.933

145. Obel NJ, Schmitterlow CG. The action of histamine and other drugs on the bronchial tone in horses suffering from alveolar emphysema (heaves). *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1948; 4(1): 71–80. doi: 10.1111/j.1600-0773.1948.tb03489.x
146. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(3): 551–9. doi: 10.1016/j.jaci.2006.07.012
147. Fairbairn SM, Lees P, Page CP, Cunningham FM. Duration of antigen-induced hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction. *J Vet Pharmacol Ther* 1993; 16(4): 469–76. doi: 10.1111/j.1365-2885.1993.tb00213.x
148. Bacsı A, Pan L, Ba X, Boldogh I. Pathophysiology of bronchoconstriction: role of oxidatively damaged DNA repair. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; 16(1): 59–67. doi: 10.1097/ACI.0000000000000232
149. Robinson NE, Berney C, Eberhart S, et al. Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2003; 64(5): 550–7. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.550
150. Gerber V, Lindberg Å, Berney C, Robinson NE. Airway mucus in recurrent airway obstruction: short-term response to environmental challenge. *J Vet Intern Med* 2004; 18(1): 92–7. doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<92:amirao>2.0.co;2
151. Dixon PM. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *Vet Rec* 1992; 131(11): 229–35. doi: 10.1136/vr.131.11.229
152. Gerber V, King M, Schneider DA, Robinson NE. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2000; 32(5): 411–7. doi: 10.2746/042516400777591183
153. Jefcoat AM, Hotchkiss 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: 704–12. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.3.L704

154. Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, DeSouza MM, Wu R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 17036–43. doi: 10.1074/jbc.M210429200
155. Rousseau K, Kirkham S, McKane S, Newton R, Clegg P, Thornton DJ. Muc5b and Muc5ac are the major oligomeric mucins in equine airway mucus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(6): L1396–404. doi: 10.1152/ajplung.00444.2006
156. Kaup FJ, Drommer W, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I: alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet J* 1990; 22(5): 343–8. doi: 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04287.x
157. Willoughby RA, Ecker GL, McKee SL, Riddolls LJ. Use of scintigraphy for the determination of mucociliary clearance rates in normal, sedated, diseased and exercised horses. *Can J Vet Res* 1991; 55(4): 315–20.
158. McPherson EA, Lawson GHK. Some aspects of chronic pulmonary diseases of horses and methods used in their investigation. *Equine Vet J* 1974; 6(1): 1–6. doi: 10.1111/j.2042-3306.1974.tb03918.x
159. McPherson EA, Thomson JR. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse 1: nature of the disease. *Equine Vet J* 1983; 15(3): 203–6. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01764.x
160. Naylor JM, Clark EG, Clayton HM. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can Vet J* 1992; 33(9): 591–8.
161. Bullone M, Joubert P, Gagné A, Lavoie JP, Hélie P. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J* 2018; 50(5): 609–15. doi: 10.1111/evj.12806
162. Bullone M, Lavoie JP. The equine asthma model of airway remodeling: from a veterinary to a human perspective. *Cell Tissue Res* 2020; 380(2): 223–36. doi: 10.1007/s00441-019-03117-4

163. Bullone M, Beauchamp G, Godbout M, Martin JG, Lavoie JP. Endobronchial ultrasound reliably quantifies airway smooth muscle remodeling in an equine asthma model. *PLoS One* 2015; 10(9): e0136284. doi: 10.1371/journal.pone.0136284
164. Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(2): 382–8. doi: 10.1016/j.jaci.2006.03.044
165. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gélinas-Lymburner É, David F, Martin JG, Lavoie JP. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(1): 181–7. doi: 10.1165/rcmb.2010-0300OC
166. Bossé Y, Riesenfeld EP, Paré PD, Irvin CG. It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 437–62. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135851
167. Furness MC, Bienzle D, Caswell JL, DeLay J, Viel L. Immunohistochemical identification of collagen in the equine lung. *Vet Pathol* 2010; 47(5): 982–90. doi: 10.1177/0300985810375051
168. Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay JD, Lavoie JP. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307(3): L252–60. doi: 10.1152/ajplung.00019.2014
169. Sage AM, Valberg S, Hayden DW, Firshman AM, Jacob K. Echocardiography in a horse with cor pulmonale from recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2006; 20(3): 694–6. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[694:eiahwc]2.0.co;2
170. Dixon PM, Railton DI, McGorum BC. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine Vet J* 1995; 27(6): 422–7. doi: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb04422.x
171. McPherson EA, Lawson GH, Murphy JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. *Equine Vet J* 1978; 10(1): 47–53. doi: 10.1111/j.2042-3306.1978.tb02215.x

172. Deegen E, Klein HJ. Interpleuraldruckmessungen und Brochospasmodysetests mit einem transportablen Ösophagusdruck-Messgerät beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 1987; 3(4): 213–21. doi: 10.21836/PEM19870404
173. Klein HJ, Deegen E. Die intrapleurale Druckmessung: eine Methode zur Beurteilung der Lungenmechanik beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 1987; 3(3): 141–7. doi: 10.21836/PEM19870302
174. Boerma S, Meeus P, Sasse HHL. Intrathorakaler Druck beim Pferd: Zusammenhang zwischen intrapleuralem und ösophagealem Drücken. *Pferdeheilkunde* 1985; 1(7): 49–51. doi 10.21836/PEM19850712
175. Mead J, McIlroy MB, Selverstone NJ, Kriete BC. Measurement of intraesophageal pressure. *J Appl Physiol* 1955; 7(5): 491–5. doi: 10.1152/jappl.1955.7.5.491
176. Milic-Emili J, Mead J, Turner JM, Glauser EM. Improved technique for estimating pleural pressure from esophageal balloons. *J Appl Physiol* 1964; 19(2): 207–11. doi: 10.1152/jappl.1964.19.2.207
177. Mead J, Whittenberger JL. Physical properties of human lungs measured during spontaneous respiration. *J Appl Physiol* 1953; 5(12): 779–96. doi: 10.1152/jappl.1953.5.12.779
178. Hoffman AM. Clinical application of pulmonary function testing in horses.[online] In: Lekeux P, ed. *Equine respiratory diseases*. Ithaca, USA : International Veterinary Information Service, IVIS, 2002. <https://www.ivis.org/library/equine-respiratory-diseases/clinical-application-of-pulmonary-function-testing-horses>
179. Derksen FJ, Robinson NE. Esophageal and intrapleural pressures in the healthy conscious pony. *Am J Vet Res* 1980; 41(11): 1756–61.
180. Stadler P, Deegen E. Diurnal variation of dynamic compliance, resistance and viscous work of breathing in normal horses and horses with lung disorders. *Equine Vet J* 1986; 18(3): 171–8. doi: 10.1111/j.2042-3306.1986.tb03587.x

181. Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1999; 60(11): 1341–6.
182. Broadstone RV, Gray PR, Robinson NE, Derksen FJ. Effects of xylazine on airway function in ponies with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 1992; 53(10): 1813–7.
183. Gillespie JR, Tyler WS, Eberly VE. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J Appl Physiol* 1966; 21(2): 416–22. doi: 10.1152/jappl.1966.21.2.416
184. Gillespie JR, Tyler WS. Chronic alveolar emphysema in the horse. *Adv Vet Sci Comp Med* 1969; 13: 59–99.
185. Willoughby RA, McDonnell WN. Pulmonary function testing in horses. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1979; 1(1): 171–96. doi: 10.1016/s0196-9846(17)30204-5
186. Littlejohn A, Bowles F. Studies on the physiopathology of chronic obstructive pulmonary disease in the horse. III. The intrathoracic pressure. *Onderstepoort J Vet Res* 1980; 47(4): 193–6.
187. Thomson JR, McPherson EA. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J* 1984; 16(1): 35–8. doi: 10.1111/j.2042-3306.1984.tb01845.x
188. Hare JE, Viel L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med* 1998; 12(3): 163–70. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02112.x
189. Costa LR, Seahorn TL, Moore RM, Taylor HW, Gaunt SD, Beadle RE. Correlation of clinical score, intrapleural pressure, cytologic findings of bronchoalveolar fluid, and histopathologic lesions of pulmonary tissue in horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 2000; 61(2): 167–73. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.167

190. Range F, Mundhenk L, Gruber AD. A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Pathol* 2007; 44(6): 901–11. doi: 10.1354/vp.44-6-901
191. Mair TS. Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture. *Vet Rec* 1996; 138(4): 89–91. doi: 10.1136/vr.138.4.89
192. Koblinger K, Hecker K, Nicol J, Wasko A, Fernandez N, Léguillette R. Bronchial collapse during bronchoalveolar lavage in horses is an indicator of lung inflammation. *Equine Vet J* 2014; 46(1): 50–5. doi: 10.1111/evj.12096
193. Couetil L, Hammer J, Feutz MM, Nogradi N, Perez-Moreno C, Ivester K. Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2012; 26(6): 1433–8. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00992.x
194. Varegg MS, Kløverød KM, Austnes MK, et al. The effect of single pretreatment with salbutamol on recovery of bronchoalveolar lavage fluid in horses with suspected or confirmed severe equine asthma. *J Vet Intern Med* 2019; 33(2): 976–80. doi: 10.1111/jvim.15359
195. Lavoie JP, Dalle S, Breton L, Hélie P. Bronchiectasis in three adult horses with heaves. *J Vet Intern Med* 2004; 18(5): 757–60. doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<757:bitahw>2.0.co;2
196. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW, Irving P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci* 1993; 55(1): 57–9. doi: 10.1016/0034-5288(93)90034-d
197. Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Vet J* 2002; 34(3): 288–91. doi: 10.2746/042516402776186137

198. Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008; 24(2): 423–35. doi: 10.1016/j.cveq.2008.04.003
199. Depecker M, Richard EA, Pitel PH, Fortier G, Leleu C, Couroucé-Malblanc A. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *Vet J* 2014; 199(1): 150–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.10.013
200. Couëtil LL, Hoffman AM, Hodgson J, et al. Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med* 2007; 21(2): 356–61. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[356:iadoh]2.0.co;2
201. Jean D, Vrins A, Beauchamp G, Lavoie JP. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2011; 72(6): 838–42. doi: 10.2460/ajvr.72.6.838
202. Clark CK, Lester GD, Vetro T, Rice B. Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust Vet J* 1995; 72(7): 249–52. doi: 10.1111/j.1751-0813.1995.tb03537.x
203. Robinson NE. Appendix 1. Table of common drugs and approximate dosages. Sprayberry KA, Robinson NE. *Robinson's current therapy in equine medicine*. 7th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2015: 933–948.
204. Westermann CM, Laan TT, van Nieuwstadt RA, Bull S, Fink-Gremmels J. Effects of antitussive agents administered before bronchoalveolar lavage in horses. *Am J Vet Res* 2005; 66(8): 1420–4. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1420
205. Cian F, Monti P, Durham A. Cytology of the lower respiratory tract in horses: an updated review. *Equine Vet Educ* 2015; 27(10): 544–53. doi: 10.1111/eve.12376
206. Fernandez NJ, Hecker KG, Gilroy CV, Warren AL, Léguillette R. Reliability of 400-cell and 5-field leukocyte differential counts for equine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Clin Pathol* 2013; 42(1): 92–8. doi: 10.1111/vcp.12013

207. Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J* 1994; 26(3): 227–9. doi: 10.1111/j.2042-3306.1994.tb04374.x
208. Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: the effect of time, temperature and fixatives. *Equine Vet J* 2002; 34(3): 297–301. doi: 10.2746/042516402776185967
209. Vrins A, Doucet M, Nunez-Ochoa L. A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991; 38(6): 472–9. doi: 10.1111/j.1439-0442.1991.tb01036.x
210. Winder NC, Grünig G, Hermann M, von Fellenberg R. Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with histologically diagnosed pulmonary disease. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1991; 133(3): 123–30.
211. Breeze RG. Heaves. The problem of disease definition. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1979; 1(1): 219–30. doi: 10.1016/s0196-9846(17)30207-0
212. Pirie RS, Couëtil LL, Robinson NE, Lavoie JP. Equine asthma: An appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Vet J* 2016; 48(4): 403–5. doi: 10.1111/evj.12586
213. Lavoie JP. Equine asthma - just a new name. [online] In: International congress of World equine veterinary association: proceedings. Verona : WEVA, 2019: 145–6. <https://www.ivis.org/library/weva/weva-international-congress-verona-2019/equine-asthma-just-a-new-name>
214. Clarke AF, Madelin TM, Allpress RG. The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 1987; 19(6): 524–30. doi: 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02665.x
215. Woods PS, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J* 1993; 25(3): 208–13. doi: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02945.x

216. Clements JM, Pirie RS. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: the benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. *Res Vet Sci* 2007; 83(2): 263–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.12.003
217. Beech J. Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1991; 7(1): 79–91. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30517-5
218. Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, et al. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J* 1998; 155(2): 189–95. doi: 10.1016/s1090-0233(98)80018-x
219. Votion DM, Vandenput SN, Duvivier DH, et al. Alveolar clearance in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1999; 60(4): 495–500.
220. Seahorn TL, Groves MG, Harrington KS, Beadle RE. Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208(2): 248–51.
221. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270(5234): 286–90. doi: 10.1126/science.270.5234.286
222. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(6): 867–70. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00159-8
223. van der Velden VH. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 1998; 7(4): 229–37. doi: 10.1080/09629359890910
224. Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CEA, Kobe CA, Boruta DT, Derksen FJ. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2004; 36(5): 426–30. doi: 10.2746/0425164044868413
225. Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, Shuman W. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* 1998; 59(8): 1033–8.

226. Lavoie JP, Léguillette R, Pasloske K, et al. Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2002; 63(4): 579–85. doi: 10.2460/ajvr.2002.63.579
227. Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, Berney C, Peroni D, Derksen FJ. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Vet J* 2002; 34(1): 17–22. doi: 10.2746/042516402776181105
228. Traub-Dargatz JL, McKinnon AO, Thrall MA, et al. Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride. *Am J Vet Res* 1992; 53(10): 1908–16.
229. Peroni DL, Stanley S, Kollias-Baker C, Robinson NE. Prednisone per os is likely to have limited efficacy in horses. *Equine Vet J* 2002; 34(3): 283–7. doi: 10.2746/042516402776186056
230. Picandet V, Léguillette R, Lavoie JP. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J* 2003; 35(4): 419–24. doi: 10.2746/042516403776014208
231. Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1993; 54(8): 1310–6.
232. Garrett J, Kolbe J, Richards G, Whitlock T, Rea H. Major reduction in asthma morbidity and continued reduction in asthma mortality in New Zealand: what lessons have been learned? *Thorax* 1995; 50(3): 303–11. doi: 10.1136/thx.50.3.303
233. Thomson JR, McPherson EA. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 2: Therapy. *Equine Vet J* 1983; 15(3): 207–10. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01766.x

234. Murphy JR, McPherson EA, Dixon PM. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): effects of bronchodilator drugs on normal and affected horses. *Equine Vet J* 1980; 12(1): 10–4. doi: 10.1111/j.2042-3306.1980.tb02286.x
235. Robinson NE, Derksen FJ, Berney C, Goossens L. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Vet J* 1993; 25(4): 299–303. doi: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02967.x
236. Duvivier DH, Bayly WM, Votion D, et al. Effects of inhaled dry powder ipratropium bromide on recovery from exercise of horses with COPD. *Equine Vet J* 1999; 31(1): 20–4. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03786.x
237. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 1997; 124(10): 1929–39.
238. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154–6. doi: 10.1038/292154a0
239. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
240. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5): 639–48. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00208-9
241. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145–7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
242. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–7. doi: 10.1080/14653240600855905

243. Russell KA, Chow NHC, Dukoff D, et al. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 2016; 11(12): e0167442 doi: 10.1371/journal.pone.0167442
244. Bearden RN, Huggins SS, Cummings KJ, Smith R, Gregory CA, Saunders WB. In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): e218. doi: 10.1186/s13287-017-0639-6
245. Sasaki A, Mizuno M, Ozeki N, et al. Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow. *PLoS One* 2018; 13(8): e0202922. doi: 10.1371/journal.pone.0202922
246. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294–301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
247. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 761–73. doi: 10.1089/scd.2007.0217
248. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 2012; 13(3): 299–310. doi: 10.4142/jvs.2012.13.3.299
249. Villatoro AJ, Alcoholado C, Martín-Astorga MC, Fernández V, Cifuentes M, Becerra J. Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species. *Vet Immunol Immunopathol* 2019; 208: 6–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.12.003
250. Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* 2008; 37(8): 713–24. doi: 10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x

251. Fideles SOM, Ortiz AC, Assis AF, et al. Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. *J Cell Biochem* 2019; 120(7): 11842–52. doi: 10.1002/jcb.28463
252. Arévalo-Turrubiarte M, Olmeo C, Accornero P, Baratta M, Martignani E. Analysis of mesenchymal cells (MSCs) from bone marrow, synovial fluid and mesenteric, neck and tail adipose tissue sources from equines. *Stem Cell Res* 2019; 37: e101442. doi: 10.1016/j.scr.2019.101442
253. Bahamondes F, Flores E, Cattaneo G, Bruna F, Conget P. Omental adipose tissue is a more suitable source of canine Mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 2017; 13(1): e166. doi: 10.1186/s12917-017-1053-0
254. Guercio A, Bella SD, Casella S, Marco PD, Russo C, Piccione G. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 2013; 37(8): 789–98. doi: 10.1002/cbin.10090
255. Yaneselli KM, Kuhl CP, Terraciano PB, et al. Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. *J Vet Sci* 2018; 19(1): 13–20. doi: 10.4142/jvs.2018.19.1.13
256. Ménard C, Dulong J, Roulois D, et al. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2020; 38(1): 146–59. doi: 10.1002/stem.3077
257. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* 2012; 2012: e975871. doi: 10.1155/2012/975871
258. Uder C, Brückner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: features and applications. *Cytometry A* 2018; 93(1): 32–49. doi: 10.1002/cyto.a.23239
259. Voga M, Kovač V, Majdic G. Comparison of canine and feline adipose-derived mesenchymal stem cells/medicinal signaling cells with regard to cell surface marker

- expression, viability, proliferation, and differentiation potential. *Front Vet Sci* 2020; 7: 610240. doi: 10.3389/fvets.2020.610240
260. FDA. Guidance for industry; Cell-based products for animal use. Rockville, MD : U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, 2015: 14 str. https://www.fda.gov/media/88925/download?source=govdelivery&utm_medium=email&utm_source=govdelivery (5. nov. 2020)
261. Sancak İ, Özen A, Bayraktaroğlu AG, Ceylan A, Can P. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the adipose tissue of young and old dogs. *Vet Fak Derg* 2016; 63(3): 297–302. doi: 10.1501/Vetfak_0000002743
262. Lee J, Lee KS, Kim CL, et al. Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2017; 18(2): 141–8. doi: 10.4142/jvs.2017.18.2.141
263. Zajic LB, Webb TL, Webb P, Coy JW, Dow SW, Quimby JM. Comparison of proliferative and immunomodulatory potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from young and geriatric cats. *J Feline Med Surg* 2017; 19(10): 1096–102. doi: 10.1177/1098612X16680703
264. Taguchi T, Borjesson DL, Osmond C, Griffon DJ. Influence of donor's age on immunomodulatory properties of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2019; 28(23): 1562–71. doi: 10.1089/scd.2019.0118
265. Marycz K, Kornicka K, Marędziak M, Golonka P, Nicpoń J. Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy. *J Cell Mol Med* 2016; 20(12): 2384–404. doi: 10.1111/jcmm.12932
266. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunol* 2017; 8: e292. doi: 10.3389/fimmu.2017.00292

267. Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, et al. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): e54. doi: 10.1186/s13287-015-0053-x
268. Joswig A-J, Mitchell A, Cummings KJ, et al. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): e42. doi: 10.1186/s13287-017-0503-8
269. Ursini TL, Amelse LL, Elkhenany HA, et al. Retrospective analysis of local injection site adverse reactions associated with 230 allogeneic administrations of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in 164 horses. *Equine Vet J* 2019; 51(2): 198–205. doi: 10.1111/evj.12992
270. Magri C, Schramme M, Febre M, et al. Comparison of efficacy and safety of single versus repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis of the metacarpophalangeal/metatarsophalangeal joint in horses: A clinical pilot study. *PLoS One* 2019; 14(8): e0221317. doi: 10.1371/journal.pone.0221317
271. Bertoni L, Branly T, Jacquet S, et al. Intra-articular injection of 2 different dosages of autologous and allogeneic bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells triggers a variable inflammatory response of the fetlock joint on 12 sound experimental horses. *Stem Cells Int* 2019; 2019: e9431894. doi: 10.1155/2019/9431894
272. Cabon Q, Febre M, Gomez N, et al. Long-term safety and efficacy of single or repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stromal cells for managing pain and lameness in moderate to severe canine osteoarthritis without anti-inflammatory pharmacological support: pilot clinical study. *Front Vet Sci* 2019; 6: e10. doi: 10.3389/fvets.2019.00010
273. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* 2012; 3: e297. doi: 10.3389/fimmu.2012.00297

274. Song YS, Lee HJ, Doo SH, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction. *Cell Transplant* 2012; 21(8): 1641–50. doi: 10.3727/096368912X637488
275. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol* 2013; 6(6): e26631. doi: 10.4161/cib.26631
276. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci* 2017; 18(9): e1852. doi: 10.3390/ijms18091852
277. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815–22. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559
278. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2(4): e34. doi: 10.1186/scrt75
279. Tsyb AF, Petrov VN, Konoplyannikov AG, et al. In vitro inhibitory effect of mesenchymal stem cells on zymosan-induced production of reactive oxygen species. *Bull Exp Biol Med* 2008; 146(1): 158–64. doi: 10.1007/s10517-008-0238-8
280. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15(1): 42–9. doi: 10.1038/nm.1905
281. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1): 367–72. doi: 10.1182/blood-2005-07-2657
282. Luk F, de Witte SFH, Korevaar SS, et al. Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells Dev* 2016; 25(18): 1342–54. doi: 10.1089/scd.2016.0068
283. Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem cells in veterinary medicine—Current state and treatment options. *Front Vet Sci* 2020; 7: 278. doi: 10.3389/fvets.2020.00278

284. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111(3): 1327–33. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997
285. Gao WX, Sun YQ, Shi J, et al. Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): e48. doi: 10.1186/s13287-017-0499-0
286. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, et al. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Front Immunol* 2017; 8: e1042. doi: 10.3389/fimmu.2017.01042
287. Laing AG, Fanelli G, Ramirez-Valdez A, Lechler RI, Lombardi G, Sharpe PT. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress. *PLoS One* 2019; 14(3): e0213170. doi: 10.1371/journal.pone.0213170
288. Souza-Moreira L, Soares VC, Dias SDSG, Bozza PT. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate lipid metabolism and lipid droplet biogenesis via AKT/mTOR – PPAR γ signalling in macrophages. *Sci Rep* 2019; 9(1): e20304. doi: 10.1038/s41598-019-56835-8
289. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev Rep* 2015; 11(2): 280–7. doi: 10.1007/s12015-014-9583-3
290. Deng M, Mei T, Hou T, et al. TGF β 3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): e258. doi: 10.1186/s13287-017-0693-0
291. Dubon MJ, Yu J, Choi S, Park KS. Transforming growth factor β induces bone marrow mesenchymal stem cell migration via noncanonical signals and N-cadherin. *J Cell Physiol* 2018; 233(1): 201–13. doi: 10.1002/jcp.25863

292. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; 31(9): 1980–91. doi: 10.1002/stem.1432
293. Schmidt A, Zhang XM, Joshi RN, et al. Human macrophages induce CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells via binding and re-release of TGF- β . *Immunol Cell Biol* 2016; 94(8): 747–62. doi: 10.1038/icb.2016.34
294. Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. *Liver Transpl* 2018; 24(5): 687–702. doi: 10.1002/lt.25049
295. Liu F, Qiu H, Xue M, Zhang S, Zhang X, Xu J, et al. MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): e345. doi: 10.1186/s13287-019-1447-y
296. Wu R, Liu C, Deng X, Chen L, Hao S, Ma L. Enhanced alleviation of aGVHD by TGF- β 1-modified mesenchymal stem cells in mice through shifting M Φ into M2 phenotype and promoting the differentiation of Treg cells. *J Cell Mol Med* 2020; 24(2): 1684–99. doi: 10.1111/jcmm.14862
297. Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176(11): 6752–61. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6752
298. Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* 2015; 33(3): 880–91. doi: 10.1002/stem.1881
299. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20(1): 187–95. doi: 10.1038/mt.2011.189

300. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; 188(1): 21-8. doi: 10.4049/jimmunol.1101029
301. Jin L, Deng Z, Zhang J, et al. Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy. *J Transl Med* 2019; 17(1): e251. doi: 10.1186/s12967-019-1999-8
302. Zhang Z, Huang S, Wu S, et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine* 2019; 45: 341–50. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.06.016
303. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5): 552–70. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552
304. de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 1995; 27(5): 537–41. doi: 10.3109/07853899509002465
305. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180(9): 5771–7. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771
306. Day AJ, Milner CM. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol* 2019; 78/79: 60–83. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.011
307. Milner CM, Higman VA, Day AJ. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 3): 446–50. doi: 10.1042/BST0340446
308. Romano B, Elangovan S, Erreni M, et al. TNF-stimulated gene-6 is a key regulator in switching stemness and biological properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2019; 37(7): 973–87. doi: 10.1002/stem.3010
309. Wang S, Lee JS, Hyun J, et al. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 promotes liver regeneration in mice with acute liver injury. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: e20. doi: 10.1186/s13287-015-0019-z

310. Um S, Kim HY, Lee JH, Song IS, Seo BM. TSG-6 secreted by mesenchymal stem cells suppresses immune reactions influenced by BMP-2 through p38 and MEK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Tissue Res* 2017; 368(3): 551–61. doi: 10.1007/s00441-017-2581-4
311. Song WJ, Li Q, Ryu MO, et al. TSG-6 released from intraperitoneally injected canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate inflammatory bowel disease by inducing M2 macrophage switch in mice. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): e91. doi: 10.1186/s13287-018-0841-1
312. An JH, Li Q, Bhang DH, Song WJ, Youn HY. TNF- α and INF- γ primed canine stem cell-derived extracellular vesicles alleviate experimental murine colitis. *Sci Rep* 2020; 10(1): e2115. doi: 10.1038/s41598-020-58909-4
313. Noronha N C, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): e131. doi: 10.1186/s13287-019-1224-y
314. Jung JW, Kwon M, Choi JC, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J* 2013; 54(5): 1293–6. doi: 10.3349/ymj.2013.54.5.1293
315. Mäkelä T, Takalo R, Arvola O, et al. Safety and biodistribution study of bone marrow–derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy* 2015; 17(4): 392–402. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.004
316. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2): e170. doi: 10.3390/ijms17020170
317. Lai RC, Tan SS, Yeo RWY, et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *J Extracell Vesicles* 2016; 5: e29828. doi: 10.3402/jev.v5.29828
318. Hyvärinen K, Holopainen M, Skirdenko V, et al. Mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles enhance the anti-inflammatory phenotype of regulatory

- macrophages by downregulating the production of interleukin (IL)-23 and IL-22. *Front Immunol* 2018; 9: e771. doi: 10.3389/fimmu.2018.00771
319. Crain SK, Robinson SR, Thane KE, et al. Extracellular vesicles from Wharton's jelly mesenchymal stem cells suppress CD4 expressing T cells through transforming growth factor beta and adenosine signaling in a canine model. *Stem Cells Dev* 2019; 28(3): 212–26. doi: 10.1089/scd.2018.0097
320. Park K-S, Svennerholm K, Shelke GV, et al. Mesenchymal stromal cell-derived nanovesicles ameliorate bacterial outer membrane vesicle-induced sepsis via IL-10. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): e231. doi: 10.1186/s13287-019-1352-4
321. Fu QL, Chow YY, Sun SJ, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy* 2012; 67(10): 1215–22. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02875.x.
322. Tan SS, Yin Y, Lee T, et al. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 2013; 2: e22614. doi: 10.3402/jev.v2i0.22614
323. Reiner AT, Witwer KW, van Balkom BWM, et al. Concise review: developing best-practice models for the therapeutic use of extracellular vesicles. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(8): 1730–9. doi: 10.1002/sctm.17-0055
324. Toh WS, Zhang B, Lai RC, Lim SK. Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration. *Cytherapy* 2018; 20(12): 1419–26. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.09.008
325. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7(1): e1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
326. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J Immunol* 2017; 198(4): 1387–94. doi: 10.4049/jimmunol.1601520

327. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017; 9(416): eaam7828. doi: 10.1126/scitranslmed.aam7828
328. Cheung TS, Galleu A, von Bonin M, Bornhäuser M, Dazzi F. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity. *Haematologica* 2019; 104(10): e438–41. doi: 10.3324/haematol.2018.214767
329. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, et al. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. *Stem Cells* 2018; 36(4): 602–15. doi: 10.1002/stem.2779
330. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(5): 1283–8. doi: 10.1073/pnas.0510511103
331. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, et al. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem Cells* 2016; 34(8): 2210–23. doi: 10.1002/stem.2372
332. Li C, Cheung MKH, Han S, et al. Mesenchymal stem cells and their mitochondrial transfer: a double-edged sword. *Biosci Rep* 2019; 39(5): eBSR20182417. doi: 10.1042/BSR20182417
333. Nowakowski A, Walczak P, Lukomska B, Janowski M. Genetic engineering of mesenchymal stem cells to induce their migration and survival. *Stem Cells Int* 2016; 2016: e4956063. doi: 10.1155/2016/4956063
334. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(1): 12–20. doi: 10.1159/000047856

335. Iso Y, Spees JL, Serrano C, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(3): 700–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.045
336. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; 5(1): 54–63. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.003
337. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *iScience* 2019; 15: 421–38. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004
338. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112(10): 1451–61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537480
339. Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, et al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect* 2014; 16(11): 923–35. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.016
340. Yan Y, Fang J, Wen X, et al. Therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. *Res Vet Sci* 2019; 126: 233–9. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.09.004
341. Ge J, Guo L, Wang S, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev Rep* 2014; 10(2): 295–303. doi: 10.1007/s12015-013-9492-x
342. Wang S, Guo L, Ge J, et al. Excess integrins cause lung entrapment of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2015; 33(11): 3315–26. doi: 10.1002/stem.2087
343. Pascucci L, Curina G, Mercati F, et al. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144(3/4): 499–506. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.07.017

344. Barberini DJ, Freitas NPP, Magnoni MS, et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(1): e25. doi: 10.1186/scrt414
345. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytherapy* 2013; 15(6): 641–8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006
346. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 2011; 75(8): 1431–43. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.008
347. Burk J, Badylak SF, Kelly J, Brehm W. Equine cellular therapy: from stall to bench to bedside? *Cytometry A* 2013; 83(1): 103–13. doi: 10.1002/cyto.a.22216
348. Borjesson DL, Peroni JF. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin Lab Med* 2011; 31(1): 109–23. doi: 10.1016/j.cll.2010.12.001
349. de Mattos Carvalho A, Alves ALG, Golim MA, et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132(2/4): 303–6. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.06.014
350. Koerner J, Nestic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1613–9. doi: 10.1634/stemcells.2005-0264
351. Gutierrez-Nibeyro SD. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27(2): 363–71. doi: 10.1016/j.cveq.2011.04.001

352. Mambelli LI, Santos EJC, Frazão PJR, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(1): 87–94. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0186
353. Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, et al. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 2011; 13(4): 419–30. doi: 10.3109/14653249.2010.536213
354. Carrade DD, Affolter VK, Outerbridge CA, et al. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 2011; 13(10): 1180–92. doi: 10.3109/14653249.2011.602338
355. Harrell CR, Sadikot R, Pascual J, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory lung diseases: current understanding and future perspectives. *Stem Cells Int* 2019; 2019: e4236973. doi: 10.1155/2019/4236973
356. Ma N, Gai H, Mei J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells in vitro. *Cell Biol Int* 2011; 35(12): 1261–6. doi: 10.1042/CBI20110026
357. Zhang LB, He M. Effect of mesenchymal stromal (stem) cell (MSC) transplantation in asthmatic animal models: a systematic review and meta-analysis. *Pulm Pharmacol Ther* 2019; 54: 39–52. doi: 10.1016/j.pupt.2018.11.007
358. Mohammadian M, Boskabady MH, Kashani IR, et al. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on lung pathology and inflammation in ovalbumin-induced asthma in mouse. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(1): 55–63.
359. Dai R, Liu J, Cai S, Zheng C, Zhou X. Delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates airway responsiveness and inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *Am J Transl Res* 2017; 9(5): 2421–8.

360. Dai R, Yu Y, Yan G, Hou X, Ni Y, Shi G. Intratracheal administration of adipose derived mesenchymal stem cells alleviates chronic asthma in a mouse model. *BMC Pulm Med* 2018; 18(1): e131. doi: 10.1186/s12890-018-0701-x
361. Horie S, Gonzalez HE, Laffey JG, Masterson CH. Cell therapy in acute respiratory distress syndrome. *J Thorac Dis* 2018; 10(9): 5607–20. doi: 10.21037/jtd.2018.08.28
362. Máca J, Jor O, Holub M, et al. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. *Respir Care* 2017; 62(1): 113–22. doi: 10.4187/respcare.04716
363. Khoury M, Cuenca J, Cruz FF, Figueroa FE, Rocco PRM, Weiss DJ. Current status of cell-based therapies for respiratory virus infections: applicability to COVID-19. *Eur Respir J* 2020; 55(6): e2000858. doi: 10.1183/13993003.00858-2020
364. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest* 2013; 143(6): 1590–8. doi: 10.1378/chest.12-2094
365. Chambers DC, Enever D, Ilic N, et al. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2014; 19(7): 1013–8. doi: 10.1111/resp.12343
366. Stolk J, Broekman W, Mauad T, et al. A phase I study for intravenous autologous mesenchymal stromal cell administration to patients with severe emphysema. *QJM* 2016; 109(5): 331–6. doi: 10.1093/qjmed/hcw001
367. DeLuca L, Erb HN, Young JC, Perkins GA, Ainsworth DM. The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2008; 22(2): 427–35. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0055.x
368. Ainsworth DM, Cheetham J. Disorders of the respiratory system. In: Reed S, Bayly W, Sellon D, eds. *Equine internal medicine*. 4th ed. St. Louis : Elsevier Saunders, 2018: 313–86.

369. Beeler-Marfisi J, Clark ME, Wen X, et al. Experimental induction of recurrent airway obstruction with inhaled fungal spores, lipopolysaccharide, and silica microspheres in horses. *Am J Vet Res* 2010; 71(6): 682–9. doi: 10.2460/ajvr.71.6.682
370. Beekman L, Tohver T, Dardari R, Léguillette R. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Molecular Biol* 2011; 12(1): e5. doi: 10.1186/1471-2199-12-5
371. Giguère S, Prescott JF. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67(1): 1–15. doi: 10.1016/s0165-2427(98)00212-8
372. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
373. Forlenza M, Kaiser T, Savelkoul HFJ, Wiegertjes GF. The use of real-time quantitative PCR for the analysis of cytokine mRNA levels. *Methods Mol Biol* 2012; 820: 7–23.
374. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-144, 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme> (5. nov 2020)
375. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 1995; 57(1): 289–300. <https://www.jstor.org/stable/2346101> (5. nov 2020)
376. R Core Team. R version 3.6.3. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing, 2020. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006> (5. nov 2020)
377. Therneau T. A package for survival analysis in S. version 2.38, 2015. <http://cran.nexr.com/web/packages/survival/citation.html> (5. nov 2020)

378. Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J* 2016; 48(4): 479–84. doi: 10.1111/evj.12559
379. Zamorano J, Rivas MD, Pérez-G M. Interleukin-4: a multifunctional cytokine. *Immunologia* 2003; 22(2): 215–24.
380. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(6): 557–72. doi: 10.1042/cs0940557
381. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 2009; 583(24): 3966–73. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036
382. Shebl FM, Pinto LA, García-Piñeres A, et al. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with HPV-16 L1 virus like particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(4): 978–81. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0064
383. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep* 2015; 5(1): e10775. doi: 10.1038/srep10775
384. Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2009; 182(8): 5088–97. doi: 10.4049/jimmunol.0801613
385. Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, et al. miR-346 controls release of TNF- α protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS One* 2011; 6(5): e19827. doi: 10.1371/journal.pone.0019827
386. Stellato C. Posttranscriptional gene regulation: novel pathways for glucocorticoids' anti-inflammatory action. *Transl Med UniSa* 2012; 3: 67–73.
387. Khan D, Ansar Ahmed S. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet* 2015; 6: e236. doi: 10.3389/fgene.2015.00236

388. Oglesby IK, Vencken SF, Agrawal R, et al. miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *Eur Respir J* 2015; 46(5): 1350–60. doi: 10.1183/09031936.00163414
389. Richard EA, Depecker M, Defontis M, et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med* 2014; 28(6): 1838–44. doi: 10.1111/jvim.12464
390. Montgomery JB, Husulak ML, Kosolofski H, Dos Santos S, Burgess H, Meachem MD. Tumor necrosis factor-alpha protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with severe equine asthma. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 202: 70–3. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.06.014
391. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends Mol Med* 2016; 22(3): 230–41. doi: 10.1016/j.molmed.2016.01.001
392. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000* 2015; 69(1): 142–59. doi: 10.1111/prd.12083
393. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129(3): 311–21. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x
394. Park J, Jeong S, Park K, Yang K, Shin S. Expression profile of microRNAs following bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp Ther Med* 2018; 15(6): 5495–502. doi: 10.3892/etm.2018.6118
395. Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med* 2010; 5(3): 133–9. doi: 10.4103/1817-1737.65040
396. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol* 1987; 139(12): 4129–34.

397. Lee SW, Tsou AP, Chan H, et al. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(4): 1204–8. doi: 10.1073/pnas.85.4.1204
398. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 1986; 137(10): 3189–94.
399. Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1990; 265(18): 10232–7.
400. Dokter WH, Esselink MT, Sierdsema SJ, Halie MR, Vellenga E. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the interleukin-4 and interleukin-3 genes in human T cells. *Blood* 1993; 81(1): 35–40.
401. Wong CK, Ho CY, Ko FWS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(2): 177–83. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01602.x
402. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* 2002; 17(1): 7–17. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00332-1
403. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. Interleukin-4: a cytokine to remember. *J Immunol* 2012; 189(9): 4213–9. doi: 10.4049/jimmunol.1202246
404. Umland SP, Razac S, Shah H, Kyle Nahrebne D, Egan RW, Motasim Billah M. Interleukin-5 mRNA stability in human T cells is regulated differently than interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(5): 631–42. doi: 10.1165/ajrcmb.18.5.3046
405. Yarovinsky TO, Butler NS, Monick MM, Hunninghake GW. Early exposure to IL-4 stabilizes IL-4 mRNA in CD4⁺ T cells via RNA-binding protein HuR. *J Immunol* 2006; 177(7): 4426–35. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4426

406. Popescu FD, Popescu F. A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in asthma. *Biologics* 2007; 1(3): 271–83.
407. Ferraiolo BL, Moore JA, Crase D, Gribbling P, Wilking H, Baughman RA. Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human tumor necrosis factor- α in mice. *Drug Metab Dispos* 1988; 16(2): 270–5.
408. Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Potential role of tumor necrosis factor- α in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes* 2012; 61(2): 372–82. doi: 10.2337/db11-0727
409. Mahmoud L, Al-Enezi F, Al-Saif M, Warsy A, Khabar KS, Hitti EG. Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA Biol* 2014; 11(2): 124–33. doi: 10.4161/rna.27863
410. Clark A. Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Res* 2000; 2(3): 172–4. doi: 10.1186/ar83
411. Mijatovic T, Houzet L, Defrance P, Droogmans L, Huez G, Kruys V. Tumor necrosis factor- α mRNA remains unstable and hypoadenylated upon stimulation of macrophages by lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 2000; 267(19): 6004–12. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01676.x
412. Villarete LH, Remick DG. Transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin-8. *Am J Pathol* 1996; 149(5): 1685–93.
413. Orlikowsky TW, Neunhoeffler F, Goelz R, et al. Evaluation of IL-8-concentrations in plasma and lysed EDTA-blood in healthy neonates and those with suspected early onset bacterial infection. *Pediatr Res* 2004; 56(5): 804–9. doi: 10.1203/01.PDR.0000141523.68664.4A
414. Chuntharapai, Lee, Hébert C, Kim K. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1994; 153(12): 5682–8.

415. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10(5): 593–619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886
416. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 307(1): 97–101. doi: 10.1016/0014-5793(92)80909-z
417. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J* 2007; 30(1): 134–55. doi: 10.1183/09031936.00146905
418. Hunter CL, Bowser JE, Wills RW, et al. Airway hyperresponsiveness is severe and persistent in an equine model of neutrophilic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020; 62(6): 808–10. doi: 10.1165/rcmb.2019-0049LE
419. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14): 8407–11. doi: 10.1073/pnas.1432929100