

**Aus der Klinik für Pferde – Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Diagnostischer Wert der Matrix-Metalloproteinase 9
in Plasma und Bauchhöhlenpunktat als Marker für
Endotoxämie und Sepsis bei Pferden mit Kolik**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Abdollah Alalwani
Tierarzt aus Hama / Syrien**

**Berlin 2023
Journal-Nr.: 4385**

Aus der Klinik für Pferde – Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Diagnostischer Wert der Matrix-Metalloproteinase 9 in Plasma und Bauchhöhlenpunktat als Marker für Endotoxämie und Sepsis bei Pferden mit Kolik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Abdollah Alalwani

Tierarzt

aus Hama / Syrien

Berlin 2023

Journal Nr. 4385

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Dritter Gutachter: Univ. Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, colic, endotoxaemia, endotoxins,
sepsis, inflammation, metalloproteinases, biological markers,
diagnostic techniques, laboratory methods

Tag der Promotion: 27.06.2023

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-219-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I. Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 Die Kolik des Pferdes	3
2.1.1 Anamnese und Vorbehandlung	4
2.1.2 Die klinische Untersuchung	5
2.1.3 Abdominozentese	7
2.1.4 Labordiagnostik	8
2.2 Endotoxämie	9
2.2.1 Sepsisklassifizierung	11
2.2.2 Sepsis beim Pferd	13
2.2.3 Therapie bei Kolik und Sepsis	15
2.3 Matrix-Metalloproteinasen	19
2.3.1 MMP-9 beim Pferd	20
3 Material und Methode	23
3.1 patientengut	23
3.2 Vorbericht und Vorbehandlung	23
3.3 Klinische Kolikuntersuchung	24
3.4 Weiterführende Labordiagnostik	25
3.4.1 Blutproben	25
3.4.2 Bauchflüssigkeit	26
3.4.3 Sepsis Scoring	28
3.4.4 Sandwich-ELISA	29
3.4.5 MMP-9 - ELISA	30
3.5 Statistik	31
4 Ergebnisse	33
4.1 Sepsis Score	34
4.2 Ergebnisse der Labordiagnostik	36
4.2.1 Ergebnisse der Bauchpunktatanalysen	36
4.2.2 Ergebnisse der Blutuntersuchung	36
4.2.3 MMP-9 im Blut und Bauchpunktat	36
5 Diskussion	41
6 Zusammenfassung	47
7 Summary	49

8	Literaturverzeichnis	51
9	Anhang.....	67
10	Publikationsverzeichnis	75
11	Danksagung.....	76
12	Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte.....	77
13	Selbstständigkeitserklärung.....	78

I. Abkürzungsverzeichnis

AF	Atemfrequenz
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
BCS	Body condition score
BHP	Bauchhöhlenpunktat
Cl	Chlor
CRP	C-reaktives-Protein
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPJ	Duodenitis proximale Jejunitis
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	Englisch
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
RBC	Erythrozyten
<i>et al.</i>	Et alii, lateinisch: und andere
ECM	Extrazelluläre Matrix
ggr.	Geringgradig
TP	Gesamteiweiß
HC	Hämatokrit
Hz	Hertz
HF	Herzfrequenz
hgr.	Hochgradig
HCO ₃	Hydrogencarbonate
IKR	Interkostalraum
IL	Interleukin
IM	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
K	Kalium
KFZ	Kapillarfüllungszeit
kg	Kilogramm
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
KGW	Körpergewicht
WBC	Leukozyten
LPS	Lipopolysaccharide

MMP	Matrix-Metallo-proteinase
MZP	Messzeitpunkt
Mg	Milligramm
mg/dL	Milligramm/ Deziliter
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol pro Liter
ms	Millisekunde
min.	Minute
mgr.	Mittelgradig
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
Na	Natrium
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
NN	Normal to normal
NO	Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
n.u.	Normal units
PCV	Packed cell volume
PH	Potential des Wasserstoffs
PCT	Procalcitonin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
	Small conductance calcium-activated potassium
SK channels	channels
SC	Subkutan
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
Tab.	Tabelle
PLT	Thrombozyten
TierSchG	Tierschutzgesetz
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
U	Umdrehungen
U/ml	Units per milliliter
u.a.	Unter anderem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

1 Einleitung

Mit dem Begriff "Kolik" ist keine Krankheit an sich gemeint, er beschreibt vielmehr das Symptom der „Bauchschmerzen“. Die häufigste Ursache für diese Bauchschmerzen sind Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, aber auch Kolik durch Erkrankungen des Harnapparates und der Leber werden häufig erwähnt. Die Kolik ist der häufigste Notfall in der Pferdemedizin und eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität beim Pferd (Tinker *et al.*, 1997a; Ireland *et al.*, 2011). Etwa 4 von 100 Pferden haben jedes Jahr Symptome einer Kolik (Traub-Dargatz *et al.*, 1999). Die kritischen Fälle erfordern eine intensive medizinische oder chirurgische Behandlung, um ein erfolgreiches Ergebnis zu erzielen. Etwa 7 - 10% der Pferde haben eine Läsion, die eine chirurgische Korrektur erfordert (Proudman, 1992). Die Hauptursache für Kolik beim Pferd liegt im Bereich des Gastrointestinaltrakts (Grazl, 1936). Aus diesem Grund wird der Begriff in eine echte Kolik und eine falsche Kolik unterteilt. Unter der echten Kolik versteht man eine Läsion, die ausschließlich dem Bereich des Verdauungsystems entstammt (Grazl, 1936), während die falsche Kolik ihren Ursprung des Schmerzes in anderen Organen (Harnapparat, Leber, Genitaltrakt) hat. Ungeachtet der Schmerzquelle bevorzugen viele Autoren dagegen eine einheitliche Beschreibung der Kolik (Allen and Tyler, 1990; Tinker *et al.*, 1997a). Die ersten Publikationen lassen sich auf Columella aus dem 1. Jahrhundert n. Chr. zurückführen. Ursprünglich stammte der Begriff Kolik aus dem Griechischen ("kwliko") und bedeutete so viel wie "Darmleiden, Körperschmerzen." Später wurde die Bezeichnung als "Colica" latinisiert und als "krampfartiger Schmerz im Körper und seinen Organen" übersetzt (Grosche, 2000).

Die frühzeitige Erkennung und Überweisung von Pferden mit einer Läsion, die eine chirurgische Eingriff erfordert sind entscheidend, um ein erfolgreiches Ergebnis zu erzielen. Diese Analyse umfasst das Erfragen des Signalements, eine gründliche Anamnese, eine vollständige klinische Untersuchung einschließlich transrektaler Palpation und des Legen einer Nasenschlundsonde sowie die weiterführende Abklärung verschiedener Differenzialdiagnosen. Dadurch soll festgestellt werden, ob eine Überweisung an eine Klinik erforderlich ist. Eine Überweisung ist nicht nur für chirurgische Eingriffe erforderlich, sondern auch für eine fortgeschrittene, prä- und postoperative, intensivmedizinische Behandlung. Dazu zählen eine 24-Stunden-Überwachung, antiendotoxische Therapie, Flüssigkeitstherapie oder, bei ausbleibendem Behandlungserfolg, die Euthanasie (Southwood *et al.*, 2010).

Neben unterschiedlichen klinischen Untersuchungen stehen dem Tierarzt verschiedene labordiagnostische Untersuchungen zur Einschätzung des Erkrankungszustandes zur Verfügung. In vorherigen Studien wurden verschiedene Biomarker bei Pferden mit Kolik

bestimmt. In dieser Arbeit wurde die MMP-9 Konzentration im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit bei Pferden mit Kolik untersucht. Die Tiere wurden mit Hilfe eines modifizierten Sepsis-Scores als positiv, grenzwertig oder negativ für Sepsis eingeteilt. Anschließend wurde untersucht ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der MMP-9 Konzentration und dem Sepsis-Score beziehungsweise dem Überleben der Tiere gab.

.Das Ziel dieser Studie war es, die Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Plasma und Peritonealflüssigkeit von Pferden mit Koliken zu untersuchen und ob der Biomark MMP-9 als Frühmarkter für eine Sepsis oder eine Endotoxämie bei einer Kolik geeignet ist.

2 Literatur

2.1 Die Kolik des Pferdes

Die Bestimmung einer Kolikursache ist problematisch. In einigen Fällen ist die Ursache offensichtlich, z.B. bei einer Getreideüberladung oder einem Enterolithen, aber auch in diesen Fällen ist der Mechanismus, der das Problem auslöst oft unbekannt (Scantlebury *et al.*, 2015). In einer prospektiven Studie an 948 Pferden aus 31 Betrieben wurde ein Anstieg der Kolik Inzidenz zwischen 2 und 8 Jahren beobachtet (Tinker *et al.*, 1997b). In einer anderen Studie steigt das Risiko, an Kolik zu erkranken, bei Pferden über 10 Jahren um das 1,5-fache, verglichen mit Pferden im Alter von 1 bis 5 Jahren (Cohen *et al.*, 1999). Bestimmte Arten von Koliken treten in bestimmten Altersgruppen häufiger auf (Cohen *et al.*, 1995; Proudman *et al.*, 1991; Reeves *et al.*, 1989). Arabische Pferde scheinen besonders gefährdet zu sein, Koliken zu entwickeln (Tinker *et al.*, 1997b; White *et al.*, 1986), da beim Araber das Kolikrisiko ungefähr doppelt so hoch ist wie bei anderen Rassen (Cohen *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 1995). Die Größe des Pferdes kann ebenfalls ein Einflussfaktor sein. In einer Studie, in der die betroffenen Organe für die verschiedenen Arten von Koliken beschrieben wurden, scheinen große warmlütige Rassen eher von einer Rechtsdorsalverlagerung des Dickdarms (dorsal displacement of the large colon) betroffen zu sein. Großrahmige Hannoveraner sind prädisponiert für eine Linksdorsalverlagerung (Milz-Nierenbandverlagerung, nephrosplenic entrapment, White *et al.*, 1990). Im Allgemeinen wurde kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Koliken nach Geschlecht festgestellt (Cohen *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1999; Proudman *et al.*, 1991; Reeves *et al.*, 1989; Tinker *et al.*, 1997b; White *et al.*, 1968).

Koliken infolge einer Verstopfung des Darms durch Enterolithen treten häufig bei Pferden über 11 Jahren auf (Hassel *et al.*, 1999). Obstipationen und Verlagerungen des Colon ascendens scheinen bei Pferden im Alter von 7 bis 8 Jahren häufiger zu sein, während die Torsion und Strangulation des Dünndarms, des Dickdarms und der Obstruktion des Dünndarms mit zunehmendem Alter abnimmt (Cohen *et al.*, 1997; White *et al.*, 1990; White *et al.*, 1968). Darüber hinaus sind chirurgische Kolikbehandlungen bei älteren Pferden häufiger als bei jüngeren (Cohen *et al.*, 1997; White *et al.*, 1968). Die Obstipation des Colon descendens scheint hingegen bei Ponys häufiger zu sein (Cohen *et al.*, 1997).

Schließlich scheinen das Temperament und insbesondere die Reizbarkeit und Erregbarkeit des Pferdes Risikofaktoren in einer Fallkontrollstudie zu sein, die an 800 Equiden durchgeführt wurde (Reeves *et al.*, 1996). Laut Literatur sind die Faktoren, die das Risiko von Koliken erhöhen, die Fütterungspraktiken (Art und Qualität des Futters, Art und Änderungen der Fütterung), die intrinsischen Faktoren der Pferde (Geschlecht, Alter und Rasse), das

Management (Art und Änderungen der Unterbringung und Aktivität), Krankengeschichte (eine frühere Kolik, Verabreichung einer medizinischen Behandlung) und Parasitenbekämpfung (Vorhandensein von Würmern und Art des Entwurmungsprogramms) (Duncan *et al.*, 1972). In einer Studie wurden Risikofaktoren für Koliken in Österreich identifiziert und diese erhöhten Risikofaktoren waren verminderter Wasserverbrauch, hohe Krafffutteraufnahme und geringe hygienische Heuqualität (Kaya *et al.*, 2009). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Auftreten von Koliken möglicherweise nicht aufhört, aber mit besseren Futtermanagementpraktiken in Österreich abnehmen kann (Kaya *et al.*, 2009). Veränderungen im Fütterungsmanagement, die mit einem erhöhten Kolikrisiko verbunden sind, waren die wichtigsten Erkenntnisse in Bezug auf Futtermittel, dazu gehören Veränderungen sowohl beim Futter als auch beim Krafffutter und Veränderungen innerhalb der letzten 2 Wochen oder der letzten 12 Monate (Curtis *et al.*, 2019). Es wurde berichtet, dass Krippenbeißen und Koppen einen positiven Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Pferdekoliken haben (Curtis *et al.*, 2019).

Zusammenfassend stellt das Management den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung von Pferdekoliken dar, da es Folgendes umfasst: Ernährung, Futter- und Grasmenge, Häufigkeit der Fütterung, Gabe von Probiotika, Wasserverfügbarkeit, Umwelt (Box, Einstreu, Belüftung, Temperatur und Luftfeuchtigkeit), Bewegung, Leistung und tierärztliche Versorgung (Entwurmung und Zahnkontrollen) (Curtis *et al.*, 2019).

2.1.1 Anamnese und Vorbehandlung

Für die bessere Interpretation der Koliksymptome und zur Diagnosestellung muss der Tierarzt eine allgemeine klinische Untersuchung durchführen und die Pathophysiologie der Veränderungen im Verdauungssystem verstehen (Steckel, 1992). Zuvor sollten ausführliche Informationen vom Besitzer gesammelt werden (Anamnese), insbesondere über vorherige Erkrankungen, mögliche assoziierte Krankheiten und gegebenenfalls erste Behandlungen vom vorbehandelnden Tierarzt (z.B. mit Antiphlogistika, Spasmolytika oder Antibiotika). In Einzelfällen sollten auch Details über einen vorhergehenden chirurgischen Eingriff und aktuelle Therapien erfragt werden (Hough *et al.*, 1999). Diese Kenntnisse/Informationen sind im Hinblick auf potentielle Veränderungen der Vitalparameter notwendig, um die Schmerzsymptomatik und die klinischen Befunde adäquat interpretieren zu können. Eine Vorbehandlung mit Entzündungshemmern beispielsweise verändert die Schmerzäußerung des Pferdes und sollte bei einer Interpretation der klinischen Symptome unbedingt berücksichtigt werden. Auch das Ansprechen auf Schmerzmittel kann einen Hinweis auf den Schweregrad der Kolik geben. So wird ein Pferd mit einer Obstipation des Colon ascendens wahrscheinlich auf Schmerzmittel ansprechen, ein Pferd mit Dünndarmileus aber nicht.

Die Erfassung des Impf- und Entwurmungsstatus ist ebenso wichtig wie eine Beschreibung der aktuellen Haltungs-, Fütterungs- und Nutzungsbedingungen, um etwaige Kolikursachen zu identifizieren. So sind beispielsweise Zusammenhänge zwischen der Fütterung von Bermuda-Küstenheu und dem Risiko einer Ileumobstipation (Little and Blikslager, 2002) sowie die Assoziation zwischen Verhaltensstörungen wie das Krippenbeißen und einer Herniation von Dünndarm in das Foramen epiploicum beschrieben (Archer *et al.*, 2004).

2.1.2. Die klinische Untersuchung

Es gibt viele verschiedene Ursachen für eine Kolik beim Pferd. Daher ist eine systematische Untersuchung verschiedener Körpersysteme erforderlich. Die klinische Untersuchung findet in Abhängigkeit von der Anamnese, der Befunde, dem Schweregrad der Koliksymptome sowie dem verfügbaren Equipment und potentieller Sicherheitsbedenken statt. Die Erfassung von Temperatur sowie der Herz- und Atemfrequenz ermöglicht die Auswertung körperlicher Reaktionen auf Schmerz, Medikamente und auf die Therapie. Die Körpertemperatur sollte dabei immer vor einer rektalen Palpation gemessen werden. Die innere Körpertemperatur ist jedoch auch bei Patienten mit schwerer Kolik häufig unverändert. Pferde mit Schock können eine erniedrigte Körpertemperatur zeigen. Bei Pferden mit erhöhter Körpertemperatur liegt häufig eine Infektionskrankheit (beispielsweise eine Enteritis) und damit keine chirurgisch zu versorgende Kolikursache vor. Ausnahmen können beispielsweise eine septische Peritonitis oder eine Sandkolik sein. Bei Letzterer kann sich leichtes Fieber als Folge einer chronischen Schleimhautentzündung durch bakterielle Translokation entwickeln. Obwohl viele Sandkoliken erfolgreich mithilfe einer konservativen Therapie behandelt werden können, benötigen andere Fälle eine chirurgische Therapie, zum Beispiel bei einer sandbedingten Verlagerung des Kolons. Koliken mit Fieber sind Anzeichen einer entzündlichen oder infektiösen Erkrankung wie Duodenitis/proximale Jejunitis (DPJ) oder Kolitis. Pferde mit inneren Abszessen und gleichzeitiger Peritonitis können ebenfalls fieberhaft sein. Im Allgemeinen sollte die Entscheidung für einen chirurgischen Eingriff bei einem fieberhaften Pferd gut abgewogen werden, bis weitere diagnostische Untersuchungen dabei geholfen haben, die Hauptursache aufzuklären.

In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Herzfrequenz sowie kardiovaskuläre Veränderungen mit einer erhöhten Mortalität einhergehen (Reeves *et al.*, 1989; Furr *et al.*, 1995). Die Herzfrequenz ist ein Indikator für die physiologische Antwort auf Schmerz, Dehydration und Endotoxämie und somit hilfreich bei der Bestimmung der Prognose. Dies gilt für leichte sowie schwerwiegende Darmerkrankungen (Morton and Blikslager, 2002; Proudman *et al.*, 2005). Die Untersuchung der Maulschleimhäute, einschließlich der Messung der Kapillarfüllzeit, hilft bei der Bestimmung des

Hydratationsstatus und der Diagnose einer Endotoxämie. Bei der Endotoxämie verlängert sich die Kapillarfüllzeit und die Schleimhäute entwickeln eine rote oder purpurne Farbe. Eine dunkle "toxische Linie" kann entlang des Zahnfleischsaums sichtbar sein. Eine blasse Schleimhautfarbe kann als Folge einer intraabdominalen Blutung vorliegen. Die Auskultation der Peristaltik ermöglicht die subjektive Beurteilung der Dünn- und Dickdarmmotilität. Zäkale Motilität kann über die rechte Flanke auskultiert werden. Die Beckenflexur und das Kolon ascendens werden über die linke Flanke auskultiert. Die akustischen Charakteristika des Zäkums und des ventralen Dickdarms umfassen propulsive, retropulsive und Mischkontraktionen (Ross *et al.*, 1986). Die propulsiven Kontraktionen des Blinddarms und Dickdarms treten ungefähr alle 3 bis 4 Minuten auf, werden aber durch verschiedene Umstände, wie die Anorexia nervosa und Sedierungen (z.B. α 2-adrenerge Rezeptor-Agonisten) in der Frequenz verringert (Rutkowski *et al.*, 1989). Der Ileus führt zu fehlenden Darmgeräuschen und ist daher ein bedeutender Befund der klinischen Untersuchung. Die Verminderung oder das nicht Vorhandensein der Peristaltik wird häufiger mit einer mechanischen Obstruktion (strangulierend oder nichtstrangulierend) oder mit Zuständen, die zu systemischen Entzündungsreaktionen führen, assoziiert. Dies kann durch Dehydration, Dysbalancen im Elektrolythaushalt oder kardiovaskuläre Beeinträchtigungen verschlimmert werden. Pferde mit verminderter oder fehlender Peristaltik haben im Vergleich zu Pferden mit normalen Darmgeräuschen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen operativen Eingriff (Whitei *et al.*, 2005). Die gastrointestinale Motilität kann bei Pferden mit spastischer Kolik oder Enteritis erhöht sein. Physiologische Darmgeräusche schließen schwerwiegende Kolikursachen nicht aus. Die Bewertung der Darmmotorik ist damit nur einer von mehreren Punkten der klinischen Untersuchung und sollte zusammen mit den restlichen klinischen Parametern zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

Ein wichtiger Aspekt bei der klinischen Untersuchung ist die Beurteilung des Grades und der Dauer von Schmerzzeichen (Whitei *et al.*, 2005). Zu den offensichtlichen Zeichen des Schmerzes gehören Scharren, auf die Flanke schauen, in den Bauch treten, häufiges Hinlegen und wieder Aufstehen sowie Wälzen. Bauchschmerzen können sich aber auch durch unauffälligere Anzeichen wie somnolentes Aussehen, tiefe Kopfhaltung und zögerliche Bewegung (Ragle, 1999) zeigen. Der Grad des Schmerzes hängt oft mit dem Schweregrad der Kolik zusammen, die wiederum mit der Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs korreliert. Ein Kolonvolvulus, eine Drehung des Kolons um die mesenteriale Achse, führt zu flächig auftretenden ischämischen Verletzungen. Diese verursachen hochgradige Schmerzen, die auf eine Behandlung mit Analgetika und Sedativa nicht dauerhaft ansprechen werden. Im Gegensatz dazu führt eine nichtstrangulierende Obstruktion häufig zu einem weniger starken Schmerz, der auf eine Analgesie anspricht. Die Beobachtung der Reaktion auf die Behandlung mit NSAIDs oder Sedativa ist wichtig, um die Art des Schmerzes charakterisieren zu können

(Whitei *et al.*, 2005). Ein geringgradiger Schmerz spricht typischerweise über einen Zeitraum von 8 bis 12 Stunden auf die Behandlung mit einem NSAID an. Im Gegensatz dazu wird der mittelgradige Schmerz nur für eine begrenzte Zeit auf eine Analgesie ansprechen und erfordert eine wiederholte Verabreichung. Der hochgradige Schmerz manifestiert sich durch medikamentöse Therapieresistenz, was häufig ein Indikator für die Notwendigkeit einer sofortigen Operation ist. Das Leitsymptom Schock in Kombination mit Bewegungsunlust wird überwiegend bei einer Darmruptur (Pratt *et al.*, 2003) oder strangulierenden Läsionen des Dünndarms beobachtet. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der klinischen Untersuchung ist der Ernährungszustand. Pferde mit Sandakkumulation neigen zu einem niedrigeren Body Condition Score (= BCS, einem Score zur Bewertung des Ernährungszustandes, wobei ein niedriger BCS für einen schlechteren Ernährungszustand steht), während Pferde mit Enterolithiasis aufgrund einer Alfalfa-reichen Diät zu einem höheren BCS neigen. Ein schlechter Körperzustand kann auch auf anderweitige grundlegende Krankheitsprozesse, wie unzureichende Ernährung, schlechte Zähne oder Parasitenbefall, hinweisen.

2.1.3 Abdominozentese

Die Analyse des Bauchhöhlenpunktates ist eine einfache und sensitive Untersuchung zur Feststellung von viszeralen Veränderungen. Besonders bei komplexen Fällen ermöglicht die Bewertung der peritonealen Flüssigkeit eine Einschätzung der pathologischen Vorgänge im Abdomen. Die vorherige Sonographie des ventralen Abdomens kann dabei helfen, eine Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle zu lokalisieren, was das Risiko einer Enterozentese verringert. Das Punktat sollte in einem Einwegröhrchen zur Messung der Proteinkonzentration und in einem EDTA-Röhrchen zur Erfassung von Zellzahl und Hämatologie gesammelt werden. Unmittelbar nach der Entnahme sollte die Flüssigkeit visuell beurteilt werden. Normale Peritonealflüssigkeit hat ein klares, farbloses bis hellgelbes Aussehen. Blut im Punktat ist ein Indikator für eine Darmstrangulation, wobei eine kleine Menge an Blut bei der Punktion eines Gefäßes in der Bauchdecke auftreten und somit iatrogen verursacht worden sein kann. Physiologischerweise sammelt sich bei der Zentrifugation des Punktates ein kleiner Absatz aus roten Blutkörperchen, wodurch Flüssigkeit mit einem unauffälligen Aussehen zurückbleibt (Milne, 2004). Der Normwert für das Gesamtprotein in der abdominalen Flüssigkeit beträgt weniger als 2 g/dl. Liegt eine Darmerkrankung vor, nimmt der Wert zu. Wenn eine strangulierende Läsion vorliegt, findet zunächst ein Austritt von Proteinen, gefolgt von roten Blutzellen und schließlich Leukozyten in die Bauchhöhle statt. Dies führt zu einem trüben und rötlich-braunen Punktat. Das Vorhandensein von Partikeln oder Futterbestandteilen in der Flüssigkeit deutet auf eine Ruptur und eine somit infauste Prognose hin. In dieser Situation muss darauf geachtet werden, dass die Probe nicht durch eine versehentliche Enterozentese verfälscht wurde. Es ist auch möglich, versehentlich die Milz zu

punktieren, was zu einer Probe mit einem blut-ähnlichem Hkt. führt. Zusätzlich kann an der Peritonealflüssigkeit klinische Biochemie durchgeführt werden, um weitere Parameter, einschließlich Fibrinogen, Lactat, Phosphat, Glucose und pH-Wert, zu bestimmen. Ein hoher peritonealer Laktatwert ist ein empfindlicherer Indikator für eine strangulierende Obstruktion als der Plasmalaktatwert (Latson *et al.*, 2005). Bei Pferden mit Verdacht auf eine septische Peritonitis können die Glukosekonzentrationen im Serum und in der Peritonealflüssigkeit miteinander verglichen werden. Ein pH-Wert unter 7,3 und ein niedriger Glukosespiegel im Punktat (weniger als 30 mg/dL) in Kombination mit einem signifikanten Unterschied zwischen dem Serum- und dem Punktatglukosespiegel (mehr als 50 mg/dL) sind Indikatoren für eine septische Peritonitis (Hoogmoed *et al.*, 1999). Die Blasenruptur bei Fohlen führt zu einer 1,5-2fach erhöhten Kreatinin Konzentration in der Peritonealflüssigkeit im Vergleich zum Serumwert. Gleichzeitig ist der Serumharnstoffwert erhöht. Eine 60 U/ml übersteigende Interleukin-6(IL-6) - Aktivität konnte in der peritonealen Flüssigkeit bei 155 erwachsenen Pferden mit Enteritis, stranguliertem Darm und tödlich verlaufender Kolik assoziiert werden (Barton and Collatos, 1999). IL-6-Werte von unter 24 U/ml sind bei der Vorhersage des Überlebens nützlicher als abnormale Werte bei der Vorhersage tödlicher Erkrankungen. Die Erhöhung der alkalischen Phosphatase in der Peritonealflüssigkeit korreliert mit der Schwere der Darmschädigung, einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Notwendigkeit für eine Operation und einer schlechteren Überlebensprognose (Saulez *et al.*, 2004).

2.1.4 Labordiagnostik bei Kolik

Die Verwendung der Labordiagnostik ist zu einem wichtigen Bestandteil für die Beurteilung und Behandlung bei Kolikpatienten geworden. Eine sorgfältige klinische Untersuchung kann, zusammen mit der Analyse von Leber- und Nierenenzymen, eine spezifischere Diagnose und Prognose liefern. Die Messung des Hämatokrits (Hkt.) und des Gesamtproteins (TP) kann unter Verwendung einer Zentrifuge und eines Refraktometers durchgeführt werden, um schnell den Hydrationsstatus des Patienten zu bewerten. Bei Pferden ist ein hoher Hämatokrit sowohl bei Dün- als auch bei Dickdarmerkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Proudman *et al.*, 2005; Proudman *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist bei Patienten, die aufgrund einer Dünndarmerkrankung eine operative Behandlung hatten, ein niedriger TP-Wert mit einer schlechten Prognose verbunden (Morton und Blikslager, 2002; Proudman *et al.*, 2005). Die Einführung von Point-of-Care-Analysatoren war hilfreich für rasch verfügbare Informationen über den Elektrolyt- und den Säure-Basen-Haushalt (Saulez *et al.*, 2005). Obwohl die Mehrheit der Veränderungen, die in der Hämatologie beobachtet werden, unspezifisch sind sie bei der Diagnose von Entzündung, Endotoxämie oder Sepsis nützlich. Diese Veränderungen können als Thrombozytopenie, Lymphopenie, Leukopenie und als Neutropenie mit dem Auftreten von unreifen und toxischen Neutrophilen offensichtlich sein.

Pferde, die durch Magenrückfluss oder Durchfall Flüssigkeit verlieren, zeigen im Blutelektrolytbild häufig Anomalien wie einen niedrigen Natrium-, Kalium-, Calcium- und Bicarbonatspiegel. Dies kann durch eine Flüssigkeitstherapie effektiv behandelt werden. Da Laktat ein Produkt der anaeroben Glykolyse ist, kann der Laktatwert eine ischämische Schädigung widerspiegeln und ist somit hilfreich bei der Einschätzung der Prognose (Latson *et al.*, 2005). Bei Pferden mit einem Kolonvolvulus, die eine Serumlaktatkonzentration von mehr als 6 mmol/L haben, wird eine schlechtere Überlebensprognose assoziiert (Johnston *et al.*, 2007). Die Messung der Anionenlücke ermöglicht die indirekte Bestimmung des Blutlaktatwertes und ist bei der Prognose nützlich (Bristol *et al.*, 1982). Eine Studie an Pferden mit Verlagerung des großen Kolons zeigte in 49% der Fälle von rechts dorsalen Dislokationen eine erhöhte Serum- γ -Glutamyltransferase (GGT), aber nur bei 2% der Pferde mit linker dorsaler Dislokation (Gardner *et al.*, 2005). Dieser Anstieg der GGT bei Pferden mit dorsaler Verlagerung nach rechts wird auf eine Obstruktion des Gallengangs zurückgeführt.

2.2 Endotoxämie

Als Endotoxämie bezeichnet man das Vorkommen von Zellwandbestandteilen gramnegativer Bakterien im Blut. Diese Zellwandbestandteile sind Lipopolysaccharide (LPS), die in der Außenmembran von gramnegativen Bakterien vorhanden sind und bei deren Lyse freigesetzt werden. Eine Endotoxämie kann eine Folge von schwerwiegenden Veränderungen im Magen-Darm-Trakt sein, sie kommt aber auch im Rahmen extraintestinaler Erkrankungen vor. Sie entsteht immer dann, wenn es durch geschädigte Schleimhautbarrieren zum Übertritt von Bestandteilen gramnegativer Bakterien ins Blut kommt. Der Dickdarm der Pferde enthält eine große Menge gramnegativer Bakterien, die für die Verdauung von Struktur-Kohlenhydraten gebraucht werden. Sie zählen hier zur physiologischen Darmflora (Werners *et al.*, 2005). (Werners *et al.*, 2005). Bei Kolik unterschiedlicher Genese kann es zu einem vermehrten Absterben dieser gramnegativen Darmbakterien kommen. Es gibt verschiedene Mechanismen, die verhindern, dass LPS unter physiologischen Bedingungen den systemischen Kreislauf erreichen. Epithelzellen der Mukosa, eine Muzinschicht und andere dort ansässige Bakterien hemmen die Endotoxinbewegung im Darmlumen (Moore *et al.*, 2003). Die Epithelzellen der Darmschleimhaut sind untereinander durch Multiprotein-Verbindungskomplexe (tight junctions) verbunden. Diese Verbindungen verhindern den Durchtritt unerwünschter Stoffe (wie Bakterienbestandteile) aus dem Darmlumen in das angrenzende Gewebe (Harhaj and Antonetti, 2004). In einer Studie gelangten bei 17 gesunden Tieren gelegentlich geringe Mengen des Toxins über den Pfortaderkreislauf in die Leber, wo sie normalerweise abgebaut werden. Sie werden entweder durch hepatische Makrophagen, die als Kupffer-Zellen bekannt sind, oder zirkulierende Anti-Toxin-Antikörper entfernt, um eine systemische Entzündungsreaktion zu verhindern (Sykes und Furr, 2005). Unter

Krankheitsbedingungen können Endotoxine diese Abwehrmechanismen jedoch überwinden und eine wichtige Rolle bei der systemischen Entzündungsreaktion beim Pferd spielen. Strangulierende und auch entzündliche Darmerkrankungen führen je nach Schweregrad zu einer Schädigung der Darmschleimhaut und einer entsprechend reduzierten Darmbarriere (Morris *et al.*, 1991). Insbesondere oxidativer Stress und die Bildung freier Radikale kann zu einer Zerstörung der Verbindungen zwischen den Epithelzellen führen (McCuskey *et al.*, 1996). Nun kann es zu einem Übertritt der Lipopolysaccharide (LPS) ins Blut kommen. Wenn Endotoxine ins Blut gelangen, lösen sie unterschiedliche pathophysiologische Veränderungen aus (Xie *et al.*, 1994; Sair *et al.*, 1996). Im Körper werden LPS durch Leukozyten, Endothelzellen und Parenchymzellen über deren LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus myeloidem Differenzierungsfaktor 2 (MD2) und Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) erkannt und lösen ein Alarmsignal aus. Dieser Vorgang wird durch das LPS-Bindungsprotein (LBP) und CD14 (ein Oberflächenprotein von Monozyten und Makrophagen) unterstützt (Tobias *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1990; McCuskey *et al.*, 1996, Dauphinee *et al.*, 2006). Diese Interaktion löst die Produktion von Zytokinen, Leukozytenaktivierung und Entzündung aus. Eine übermäßige Stimulation kann zur gleichzeitigen Aktivierung mehrerer paralleler Kaskaden führen, die zu einem endotoxämischen Schock führen kann (Bohannon *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2002). Weitere klinische Folgen einer Endotoxämie sind unter anderem Hypoxämie, DIC und eine erhöhte Gefäßpermeabilität (Ikenouchi *et al.*, 2005).

Die ausgelöste Zytokinantwort und Aktivierung von Entzündungszellen führt zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. So produzieren beispielsweise Makrophagen Stickoxid (NO), das als hemmender intestinaler Neurotransmitter agiert (McCuskey *et al.*, 1996). Die Folge hiervon ist eine reduzierte Darmmotilität. Eine Untersuchung an endotoxämischen Mäusen zeigte, dass eine thorakale Epiduralanästhesie zu einer Reduktion der NO-Produktion und der Makrophagenmigration führte und die Epithelpermeabilität sowie den oxidativen Stress reduziert (Wagner und Antje, 2013).

Bei etwa 10 bis 30% der Koliker, die in eine Klinik überwiesen werden, kommt es im Zuge des Krankheitsgeschehens zu einem endotoxämischen Zustand (Barton und Collatos 1999; King und Gerring 1988; Meyers *et al.* 1982). Die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien zeigten, dass ungefähr 30% der adulten Pferde mit Koliken und 50% der kritisch kranken neugeborenen Fohlen, die an Unikliniken überwiesen wurden, LPS in ihrem Kreislauf haben (Barton *et al.*, 1998; Senior *et al.*, 2011). Wenn LPS detektiert wird, ist es typischerweise bei Pferden mit Erkrankungen, die entweder eine Entzündung oder eine Ischämie in ihrer Pathogenese aufweisen. In einer Studie war die Wahrscheinlichkeit, LPS im Kreislauf nachzuweisen, assoziiert mit Tachykardie, erhöhter Hämatokrit und klinischen Krankheiten oder chirurgischen Befunden, die typischerweise mit der Translokation von LPS aus dem Verdauungsapparat in den Kreislauf einhergehen (Senior *et al.*, 2011). Studien deuten darauf

hin, dass die klinischen Symptome einer Endotoxämie durch die von aktivierten Entzündungszellen synthetisierten, inflammatorischen Mediatoren ausgelöst werden. In diesen Studien wurden Endotoxine in unterschiedlicher Dosierung verabreicht und die entzündlichen Veränderungen sowie die klinischen Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem untersucht (Hoshino *et al.*, 1999). Endotoxine sind demnach nicht unmittelbare Auslöser der klinischen Symptome (Collatos *et al.*, 1995). Die Lipopolysaccharide der Zellwand lösen hierbei beim Pferd in wesentlich niedrigeren Konzentrationen Entzündungsreaktionen aus als andere Bakterienkomponenten.

Ein Forschungsschwerpunkt zum Thema Endotoxämie liegt im Bereich der beteiligten Entzündungsmediatoren und erfordert die Zusammenarbeit von Biochemie und Immunologie. Die Komplexität der Wirtsantwort auf LPS wurde kürzlich durch die Verwendung von quantitativer reverser Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion aufgeklärt. Statt Veränderungen der zirkulierenden Konzentrationen einiger Entzündungsmediatoren zu beobachten, ermöglicht dieser Ansatz, Veränderungen im Ausdruck einer Vielzahl von Genen in Zellen gleichzeitig zu überwachen. Dieser Ansatz wurde verwendet, um die Reaktion von Zellen zu bewerten, die von Pferden mit Koliken und Pferden nach Kohlenhydratüberladung des Verdauungstrakts isoliert wurden (Lopes *et al.*, 2010; Leise *et al.*, 2011). Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 sind während der Sepsis erhöht, sie haben jedoch keine ausreichende Sensitivität oder Spezifität für die Entwicklung klinischer Marker (Hina *et al.*, 2013). Ein in der Pferdemedizin vergleichsweise neuer Biomarker für systemische Entzündung ist Procalcitonin (PCT). PCT steigt schneller als das C-reaktive Protein (CRP) und sinkt mit abnehmender Entzündungsreaktion rasch wieder ab (Standage *et al.*, 2011). Eine Endotoxämie führt auch zu einer Aktivierung und Freisetzung verschiedener proteolytischer Enzyme wie den Matrix-Metallo-Proteinasen. So ist beispielsweise die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 bei Patienten mit Sepsis erhöht (Pugin *et al.*, 1999). Die Plasma-MMP-9-Konzentrationen sind nach LPS-Verabreichung zwischen einer und acht Stunden beim Menschen und zwischen 30 Minuten und sechs Stunden bei Pavianen erhöht (Pugin *et al.*, 1999; Paemen *et al.*, 1997). Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Spitze in der Konzentration von Plasma-MMP-9 bereits ein bis zwölf Stunden nach Auslösung der Sepsis auftritt (Pagenstecher *et al.*, 2000; Lalu *et al.*, 2004).

2.2.1 Sepsisklassifizierung

Neben dem Begriff der „Sepsis“ gibt es viele weitere Bezeichnungen, die im weiteren Sinne die klinischen Folgen einer Endotoxämie beschreiben. Die Sepsis, ursprünglich als Blutvergiftung definiert, ist eine generalisierte Entzündung nach Eindringen von Bakterien oder deren Bestandteilen in den Blutkreislauf. Sie kann durch eine Vielzahl von Krankheitserregern

verursacht werden. Der Begriff SIRS steht für Systemic Inflammatory Response Syndrome, wird anhand von klinischen Parametern definiert (Tabelle 1) und soll vor allem der Risikobewertung von Patienten im klinischen Alltag dienen. SIRS beschreibt eine komplexe pathophysiologische Reaktion, die sich nach einer Vielzahl akuter und schwerer Schäden wie Schock, Verbrennungen, Infektionen oder Exposition gegenüber Bakterienprodukten entwickeln kann (Bone et al. 1992). Im Jahr 1991 wurde das erste Scoring System für SIRS in den USA entwickelt. Ziel war es, ein umfassendes Konzept zu entwickeln, um von früher therapeutischer Intervention zu profitieren. Eine Studie war die Grundlage für weitere Untersuchungen in der Humanmedizin. Im Jahre 2012 haben sich verschiedene Organisationen und Kommissionen getroffen, um die Definitionen von Sepsis und SIRS zu überarbeiten (Tabelle 1). Wenn ein Patient neben 2 SIRS Kriterien eine akute Organfunktionsstörung von mindestens einem Organ zeigt, wird dies als schwere Sepsis bezeichnet. Eine weitere Funktionsstörung, die trotz adäquater Flüssigkeitstherapie mit einer anhaltenden oder wiederkehrenden Hypotonie oder Hypoperfusion einhergeht, wird als septischer Schock eingestuft. Wenn die Organfunktionsstörung so weit fortgeschritten ist, dass der Patient die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten kann, spricht man von einem Multi-Organ-Dysfunktionssyndrom (MODS) (Dellinger et al. 2013).

Tabelle1: Definition von Sepsis und verwandten Begriffen in der Humanmedizin (Dellinger et al. 2013).

Klassifikation	Parameter
Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C Herzfrequenz ≥ 90/Min Atmung ≥ 20/Min (oder PaCO ₂ < 32 mmHg) WBC ≥ 12.000/μl oder ≤ 4000/μl oder > 10% stabkernige neutrophile Granulozyten
Sepsis	Mindestens zwei SIRS-Kriterien sind erfüllt und durch eine bekannte oder vermutete Infektion verursacht
Schwere Sepsis	Sepsis mit akutem Organversagen
Septischer Schock	Sepsis mit anhaltender oder refraktärer Hypotonie oder Gewebhypoperfusion trotz ausreichender Flüssigkeit und Reanimation
Multiple Organ Dysfunction Syndrome	Das Vorhandensein einer Organfunktionsstörung bei einem akut kranken Patienten, so dass die Homöostase nicht ohne Intervention aufrechterhalten werden kann

2.2.2 Sepsis beim Pferd

In der Pferdemedizin gibt es gegenwärtig keine einheitliche Definition für Sepsis und SIRS. In der Literatur werden meist Definitionen aus der Humanmedizin genutzt und die klinischen Parameter entsprechend angepasst. Pferde reagieren auf Entzündung und Hypotension zum Teil anders als Menschen. Sie entwickeln allerdings auch Organversagen, pulmonale, gastrointestinale, renale und kardiovaskuläre Störungen oder eine DIC. Außerdem kann bei Pferden eine Hufrehe entstehen, für die es beim Menschen keine vergleichbare Erkrankung gibt. An labordiagnostischen Veränderungen sind bei endotoxämischen Pferden Hypokalzämie, Hypophosphatämie, Hypokaliämie und Hypomagnesiämie beschrieben. Außerdem können Parathormon (PTH) und Insulin im Serum erhöht sein (Toribio *et al.* 2005).

Es gibt auch in der Pferdemedizin viele Studien, die Sepsis untersucht haben. Eine Untersuchung an neonatalen Fohlen hat Kriterien für die Sepsis-Diagnose basierend auf mindestens 3 von 6 veränderten klinischen Parametern (Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie, Hyperlaktatämie, Hypoglykämie) beschrieben (Wong *et al.* 2015). Diese Studie basiert auf einem 1988 veröffentlichten Sepsisscore und enthält zusätzlich zu den oben genannten klinischen Parametern auch die Blut-L-Laktat- und Serum-Kreatininkonzentration sowie die Lymphozytenzahl. Der modifizierte Sepsis-Score zeigte allerdings keine signifikant bessere Sensitivität und Spezifität als das ursprüngliche Modell (Wang *et al.*, 2018).

Trotz modifizierter Scoringssysteme stellt sich weiterhin das Problem, dass eine niedrige Sensitivität den klinischen Nutzen dieser Scores einschränkt. Durch ein Absenken der notwendigen Scorepunkte, die zur Diagnose „Sepsis“ erreicht werden müssen, konnte die Sensitivität leicht verbessert werden (Weber *et al.* 2015).

Bei adulten Pferden gibt es im Vergleich zu Neonaten deutlich weniger Untersuchungen zum Thema Sepsis/SIRS. SIRS wird auch hier in den meisten Studien durch die Änderung von 2 oder mehr der folgenden Faktoren definiert: Herzfrequenz, Atemfrequenz, Temperatur und Leukozytenzahl. Es gibt eine Studie, die 3 verschiedene Modelle zu SIRS untersucht hat.

Die Patienten wurden in drei große Kategorien eingeteilt: (1) Magen-Darm-Fälle; (2) Fälle von Erkrankungen des Bewegungsapparates und der Haut (Wunden und Schnittwunden, septische Gelenke oder Sehnenblättern, Frakturen und andere); und (3) Fälle mit Erkrankungen anderer Organsysteme (Leber, Atemwege, Fortpflanzung, Urogenital, Immunsystem, multisystemische und andere).

Die Befunde der klinischen Untersuchung und die Leukozytenzahl wurden verwendet, um auf Grundlage der zuvor veröffentlichten menschlichen SIRS-Kriterien auch beim Pferd einen

Sepsis-Score zu erstellen (Tab. 2). Herangezogen wurden: Herzfrequenz, Atemfrequenz, Temperatur und Leukozytenzahl. Zusätzlich wurde die Blutlaktatkonzentration bei Einlieferung und die Farbe der Schleimhäute bewertet. Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Modelle (klinische Parameter plus Laktatkonzentration bei Einlieferung und Farbe der Schleimhäute) sind in Tabelle 3 aufgelistet. Ein erhöhter Blutlaktatspiegel und eine veränderte Schleimhautfarbe waren demnach signifikant mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert.

Tabelle 2: Sepsis (SIRS) Score für Pferde nach Breuer und Schusser (2012).

Parameter	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Allgemeinverhalten	ruhig, aufmerksam	ggr. vermindert	mgr. vermindert	hgr. vermindert
Herzfrequenz/min.	28-40	41-60	61-80	>80
Atmungsfrequenz/min	10-14	15-25	26-45	>45
Innere Körpertemperatur (°C)	37,5-38,0	37,0-37,4 oder 38,1-38,5	36,5-36,9 oder 38,6-39,0	< 36,5 oder > 39,0
Petechien	nicht vorhanden		vorhanden	
Diarrhoe	nicht vorhanden		vorhanden	
Dyspnoe	nicht vorhanden		vorhanden	
Wunden	nicht vorhanden		vorhanden	
Vermehrte Pulsation	nein	ggr.	mgr.	hgr.
Schleimhäute	blassrosa	ggr. gerötet	mgr. gerötet	hgr. gerötet
Infektion nachweisbar	nein			ja
WBC (G/l)	4,9-12,6	4,0-4,8 oder 12,7-15,0	3,0-3,9 oder 15,1-20,0	< 3,0 oder > 20,00
Stabkernige Neutrophile (%)	0-1	2-5	5-10	>10
Thrombozyten (G/l)	122-315	60-121	30-59	<30
Kalzium (mmol/l)	2,7-3,2	<2,7		
Fibrinogen (g/l)	2-4	4,1-6	6,1-8	>8

Tabelle 3: Sensitivität und Spezifität für unterschiedliche Modelle des Sepsis Scores (SIRS) (Roy et al 2017).

Modell	Sensitivität	Spezifität
SIRS-Score	0.62	0.89
SIRS-Score + Laktat	0.74	0.76
SIRS-Score + Schleimhautfarbe	0.71	0.84
SIRS-Score + Laktat + Schleimhautfarbe	0.82	0.81

2.2.3 Therapie bei Kolik und Sepsis

Bei Kolik ist es wichtig, so schnell und genau wie möglich, klinische und weiterführende Untersuchungen durchzuführen, um eine ausreichende Informationsgrundlage für die nachfolgende Therapie und Prognose zu haben. Nicht nur die Kolikursache, sondern auch die unmittelbare Entscheidung über therapeutische Maßnahmen (wie konservative oder operative Behandlung), beeinflussen die Überlebenschancen der betroffenen Patienten. Die Ziele des medizinischen Managements sind neben Schmerzlinderung die Korrektur und Aufrechterhaltung des Hydratationsstatus, einschließlich Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, sowie die Behandlung einer möglichen Endotoxämie. Dies wird durch die Kombination von Analgetika, Flüssigkeitstherapie und antiendotoxämischer Therapie erreicht. In einigen Fällen können Relaxantien oder motilitätssteigernde Medikamente eingesetzt werden. Arzneimittel, die zur Analgesie verwendet werden, umfassen Spasmolytika, NSAIDs, α -2-Agonisten und Opioide. Die Flüssigkeitstherapie kann enteral oder intravenös verabreicht werden, nachdem das Defizit anhand der klinischen Symptome und Laborparameter abgeschätzt wurde. Ein fortlaufender Flüssigkeitstherapieplan hilft, den Erhaltungsbedarf und die laufenden Verluste zu berücksichtigen. Die Flüssigkeitstherapie ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie bei Pferden mit Hypovolämie, Hypotonie, septischem Schock oder Säure-Basen- und Elektrolyt-Störungen. Insbesondere bei einer Langzeitinfusionstherapie kann es nötig sein Kalium, Calcium und Magnesium zur Infusionslösung zuzusetzen. Eine antibiotische Therapie ist bei adulten Pferden und besonders bei Neonaten mit Endotoxämie oder Sepsis indiziert. Die Auswahl des Antibiotikums erfolgt optimalerweise anhand eines Resistenztests, allerdings ist dies je nach Ursache der Sepsis zum Teil nicht praktikabel. Der Nachweis einer Bakteriämie erfolgt über eine Blutkultur (vor Medikamentengabe gewonnen), die Anzucht von Bakterien ist hierbei schwierig. Bei einer Endotoxämie durch strangulierende oder ischämische Darmanteile kann von einem Auslösen durch gramnegative Bakterien

ausgegangen werden. Diese Bakterienbestandteile sind allerdings im Blut nicht vermehrungsfähig und eine chirurgische Therapie ist wichtiger als eine antibiotische. Die Durchführung einer mikrobiellen Anzucht und eines Resistenztests nimmt einige Tage in Anspruch, weshalb septische Patienten zunächst mit Antibiotika mit einem breiten Wirkspektrum versorgt werden sollten. Die aktuellen Informationen zur Resistenzlage, der Pharmakokinetik und der Gesetzeslage müssen beachtet werden.

Anhand mehrerer antimikrobieller Sensitivitätsstudien an neonaten Fohlen mit Sepsis ist die derzeitige Empfehlung zur empirischen Behandlung eine Kombination von verschiedenen Antibiotika wie Aminoglykosiden in Kombination mit Penicillin G oder der dritten Generation von Cephalosporinen (Tab. 4). Die gezielte Therapie sollte angepasst werden, sobald die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung vorliegen. Aminoglykoside sollten allerdings bei Neonaten mit Hypovolämie oder Nephropathie vermieden werden. Im Rahmen der Intensivtherapie ist es wichtig, regelmäßig die Vitalparameter einschließlich der Exträmitätentemperatur zu überprüfen und auf Urinabsatz und Ödembildung zu achten. Außerdem sollten, insbesondere bei Neonaten, die Glukose- und Elektrolytkonzentrationen im Blut gemessen werden und eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt werden. Bei neonaten Fohlen mit schweren Erkrankungen kann eine Nebennierenrindeninsuffizienz auftreten, die mit Hilfe eines ACTH-Stimulationstests nachgewiesen werden kann (Hart *et al.* 2009, 2011, 2012). Der Einsatz von Vasopressoren zur Verbesserung der peripheren Durchblutung sollte für spezifische Fälle, die nicht auf eine reine Flüssigkeitstherapie ansprechen, vorbehalten werden. Zu den antiendotoxämischen Therapieoptionen gehören die Beseitigung der zugrundeliegenden Ursache, die Neutralisierung von zirkulierendem Endotoxin, die Hemmung der Endotoxin-induzierten Aktivierung der Entzündungskaskade und die Hemmung der Endotoxin-induzierten Veränderungen der Koagulation und der fibrinolytischen Systeme. Das kationische antimikrobielle Polypeptid Polymyxin B bindet als „Toxinfänger“ an die Lipid-A-Untereinheit der LPS und reduziert deutlich die klinischen Symptome einer Endotoxämie. Zu diesen Therapieoptionen zählen weiterhin auch Plasma (das Antikörper gegen die Lipid-A-Untereinheit des LPS enthält), Heparin und Pentoxifyllin. Üblicherweise werden NSAIDs aufgrund ihrer Fähigkeit, die Prostaglandinproduktion durch Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels zu verhindern, eingesetzt. Der am häufigsten verwendete Wirkstoff ist Flunixin-Meglumin, das entweder in einer Dosierung von 0,25 mg/kg KGW oder 1,1 mg/kg KGW verabreicht wird. Die Verwendung der niedrigen Dosis ist darin begründet, um die Anzahl der negativen Auswirkungen einer experimentellen Endotoxinverabreichung zu reduzieren, sodass nur noch ein niedrigeres Risiko für Nebenwirkungen besteht. Nebenwirkungen von NSAIDs wie gastroduodenale Ulzerationen und papilläre Nierennekrosen können insbesondere bei dehydrierten Tieren auftreten.

In der Humanmedizin stehen unterschiedliche weitere entzündungshemmende Medikamente zur Verfügung: Ethylpyruvat (EP) ist ein Derivat von Pyruvat, das entzündungshemmende Wirkungen ausübt, indem es die Bindung von DNA an NF κ B blockiert und die Expression proinflammatorischer Zytokine hemmt (Fink 2003; Mizutani *et al.* 2011). Ein sogenanntes Nanopartikel-Targeting von neutrophilen Granulozyten vermeidet die Adhäsion der Neutrophilen an den Blutgefäßwänden und damit deren Auswanderung zum Ort des Entzündungsgeschehens (Wang *et al.* 2014). Studien weisen darauf hin, dass es im Rahmen einer Sepsis zu Unterschieden in der Genexpression bei Menschen und Mäusen kommt (Seok *et al.*, 2013). Hier liegt die Annahme nahe, dass es auch zwischen Pferd und anderen Tierarten bzw. dem Menschen Unterschiede gibt. So hat sich herausgestellt, dass natürliche und synthetische Lipid-A-basierte Verbindungen beim Menschen als LPS-Antagonisten, bei Pferden jedoch als Agonisten wirken (Bryant *et al.*, 2007). Sie können daher in der Pferdemedizin nicht als Therapeutika eingesetzt werden.

Tabelle 4: Dosierungen von häufig verwendeten Medikamenten für Pferde mit Endotoxinämie oder Sepsis.

Medikament	Dosierung	Referenz
Polymyxin B sulphat	5000 U/kg KGT i.v.	Barton <i>et al.</i> (2004)
	6000 U/kg KGT every 8 h for 5 treatments i.v.	Morresey and Mackay (2006)
	10 000 U/kg KGT i.v.	Parviainen <i>et al.</i> (2001)
Dexamethasone	0,5 - 2 mg/kg KGT i.v.	(Allen 1993a; Robinson 1997)
Prednisolon	0,25-2 mg/kg KGT i.v.	Templeton <i>et al.</i> (1987)
Pentoxifyllin	7.5 mg/kg KGT Bolusinjektion, gefolgt von 1,5 mg / kg /st für 3 St i.v.	Barton <i>et al.</i> (1997a,b)
	7.5 mg/kg KGT Bolusinjektion, gefolgt von 3 mg / kg /st für 3 St i.v.	Barton <i>et al.</i> (1997a,b)
	10 mg/kg KGT j12 St for 8 Tagen p.o.	Liska <i>et al.</i> (2006)
Clenbuterol	0.75 µg/kg KGT i.v. einmalige Verabreichung	Laan <i>et al.</i> (2006)
	0.8 µg/kg KGT p.o. einmalige Verabreichung	Cudmore <i>et al.</i> (2013)
Flunixin Meglumin	0.25 mg/kg KGT alle 8h i.v.	Semrad <i>et al.</i> (1987)
	1.1 mg/kg KGT alle 12h i.v.	Naylor <i>et al.</i> (2014)
Meloxicam	0.6 mg/kg KGT j 12 ST i.v.	Naylor <i>et al.</i> (2014)
Phenylbutazone	4.4 mg/kg KGT i.v.	King and Gerring (1989)
	20 mg/kg KGW i.v. einmalige Verabreichung	Kelmer <i>et al.</i> (2008)

Dimethyl sulphoxide (DMSO)	1 g/kg KGW i.v. einmalige Verabreichung	Reeves <i>et al.</i> (1990), Kelmer <i>et al.</i> (2008)
Ketamin (zur Analgesie)	1.5 mg/kg/St i.v.	Lankveld <i>et al.</i> (2006)
	Startdosen von 4,8; 3,6; 3,0; 2,4 mg/kg/h in Intervallen von 10 min i.v., gefolgt von einer Erhaltungsrate von 1,5 mg / kg / ST für 320 min	Alcott <i>et al.</i> (2011)
Ethyl pyruvate	150 mg/kg KGT in 1L lactated Ringer's solution infused In 60 min	Schroeder <i>et al.</i> (2011), Jacobs <i>et al.</i> (2013)
Phospholipid emulsions	200 mg / kg KGT über einen Zeitraum von 2 Stunden infundiert	Winchell <i>et al.</i> (2002)
	100 mg / kg KGT über einen Zeitraum von 30 Minuten infundiert	Moore <i>et al.</i> (2007)
Amikacin	21–25 mg/kg i.m. oder i.v. 1x tgl.für Fohlen	Wilson and Madigan (1989); Marsh and Palmer (2001); Sanchez (2005); Theelen <i>et al.</i> (2014a)
Gentamicin	6.6 mg/kg i.m. oder i.v. 1x tgl.	
Sodium/potassium	22,000–44,000 IU/kg KGW i.v. alle 6 h	
Procaine	22,000–44,000 IU/kg KGW i.m. alle 12 h	
Ampicillin sodium	15–50 mg/kg KWT i.m. oder i.v. alle 6–8 h	
Ceftiofur	2–5 mg/kg i.m. oder i.v., alle 6–12 h	
Oxytetracycline	6.6–15 mg/kg i.v. J. 12–24 ST. Adulte Pferde	Bertin <i>et al.</i> (2013)
Dobutamin	1–15 µg/kg KGW/min i.v. kontinuierliche Infusionsrate.	
Dopamin	1–20 µg/kg KGW/min i.v. kontinuierliche Infusionsrate.	
Norepinephrin	0.05–1 µg/kg KGW/min i.v. kontinuierliche Infusionsrate.	
Epinephrin	0.01–0.05 mg/kg KGW i.v.	
Vasopressin	0.0005–0.001 IU/kg KGW/min i.v. kontinuierliche Infusionsrate.	
Heparin mit niedrigem Molekulargewicht	50 IU/kg KGW alle 24 h s.c. Adulte Pferde	Feige <i>et al.</i> (2003)
Heparin mit niedrigem Molekulargewicht	100 IU/kg alle 24 h s.c. Fohlen	Armengou <i>et al.</i> (2010)

2.3 Matrix-Metalloproteinasen

MMPs sind eine große Familie von Proteinen in der extrazellulären Matrix (ECM), die Enzyme mit gemeinsamen funktionellen Domänen und gleichen Aktivierungsmechanismen darstellen. Alle MMPs werden als Zymogene oder als Pro-MMPs sekretiert, bei denen es sich um eine inaktive oder latente Form handelt. Diese latenten MMPs müssen aktiviert werden, um ECM-Komponenten spalten zu können (Maskos and Bode, 2003). Sie werden durch Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert und von einer Reihe von proinflammatorischen Zellen und Bindegewebszellen einschließlich Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen, Neutrophilen und Lymphozyten ausgeschieden. MMPs werden durch verschiedene Arten von Inhibitoren gehemmt, wobei Metalloproteinasen-Gewebe-Inhibitoren (TIMPs) die wichtigsten sind (Brew *et al.*, 2000). Das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs ist für die Kontrolle des ECM-Abbaus und die Remodellierung von normalem und abnormalem Gewebe verantwortlich (Bode *et al.*, 1999). TIMPs können MMPs durch Bildung eines 1:1-Komplexes hemmen (Visse and Nagase, 2003). Eine Störung des MMP-TIMP-Gleichgewichts kann zu Erkrankungen führen.

Typ und Struktur der Matrix-Metalloproteinasen werden in 10 Untergruppen eingeteilt. Untergruppen von MMPs sind Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), Matrilysine (MMP-7, MMP-26), Furin-aktivierte sekretierte MMPs (MMP-11, MMP-28), Transmembrantypen (MMP-14, MMP-15, MMP-16), GPI-linked Membrantypen (MMP-17, MMP-24, MMP-25), Vitronectin-linked Insert-MMPs (MMP-21), Cys/Pro-Rich-IL-1-receptor like domain MMPs (MMP-23) und MMPs ohne Gruppenbezeichnung (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-27, MMP-28) (Yong *et al.*, 2001; Krizkova *et al.*, 2011). Molekulargewichte von MMPs (latente Form) liegen zwischen 28.000 und 76.000 Da. Das kleinste MMP ist MMP-7 mit einem Molekulargewicht (latent / aktiv) von 28.000 / 19.000 Da. Das größte MMP ist MMP-9 mit einem Molekulargewicht (latent / aktiv) von 76.000 / 67.000 Da.

MMPs können bei der Pathogenese von Entzündungen beispielsweise durch das Spalten von Entzündungsmediatoren anti-inflammatorische, aber auch pro-inflammatorische Effekte durch ihr Mitwirken beim Anlocken von Entzündungszellen auslösen (Haro *et al.* 2000). MMP9 förderten in Modellversuchen bei Mäusen mit Schlaganfällen, Herzinfarkten, Asthma, Aorten-Aneurysmen, autoimmunen Encephalomyelitiden und Alzheimer die Entstehung von Entzündungen, während sie bei Modellen von Nierenerkrankungen und Dermatitiden antientzündliche Wirkung hatten (Lee *et al.* 2005; Lanone *et al.* 2002; Lelongt *et al.* 2001; Asahi *et al.* 2001; Pyo *et al.* 2000).

In der Pferdemedizin weisen aktuelle Forschungsansätze auf die bedeutende Rolle der Matrix-Metalloproteinasen bei der Regulation von Entzündungskaskaden im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen hin. Für orthopädische Erkrankungen beim Pferd, die mit Entzündungen einhergehen, wie eine Laminitis, Synovitis oder Arthritis, erfolgten bereits Nachweise, dass diese von einer vermehrten Aktivität beziehungsweise Produktion vor allem von MMP2, 9 und 8 begleitet werden (Loftus *et al.* 2009; Fietz *et al.* 2008; Marttinen *et al.* 2006). Pferden, denen LPS zugeführt wurde, verfügen außerdem über eine erhöhte Konzentration von MMP 2 und 9 im Plasma, die sich durch die Gabe von nichtsteroidalen Entzündungshemmern und Antibiotika (Doxyzyklin, Oxytetracyklin, Flunixin-Meglumin und Pentoxifyllin) wieder senken lässt (Fugler *et al.* 2013). Des Weiteren konnte eine vermehrte gelatinolytische Aktivität von MMP2 im Serum von Pferden mit einer akuten Kolik zur Abschätzung eines Nierenversagens nachgewiesen werden (Arosalo *et al.* 2007).

2.3.1 MMP-9 beim Pferd

Bei Pferden gibt es verschiedene Hinweise auf erhöhte MMP-Aktivität im Zusammenhang mit Osteoarthritis und Gelenkerkrankungen. Erhöht sind im Detail MMP-1, MMP-2, MMP-9 und MMP-14. (Zrimsek *et al.*, 2007). Laminare MMPs wurden erstmals an Hufrehe-Patienten isoliert, als entdeckt wurde, dass laminitisches Gewebe eine signifikant höhere MMP-2- und MMP-9-Aktivität als nichtlaminitisches Gewebe aufwies (Pollitt *et al.*, 1998). Hypoxie erhöhte die Expression von aktivem MMP-2 und -9 in Keratinozytenkulturen signifikant. Diese Hochregulation wurde nach 6 Stunden beobachtet und erreichte nach 24 Stunden ihren Höhepunkt. Es wird angenommen, dass die Gelatinase MMP-2 eher am Umbau des normalen Gewebes als an der Pathogenese der Krankheit beteiligt ist, da sie auch bei gesunden Pferden vorhanden ist und durch Antigenstimulation relativ wenig verändert wird (Koivunen *et al.*, 1997b; Raulo *et al.*, 2001a). Umgekehrt wird MMP-9 als das wichtigste aktive MMP angesehen, das in der Lunge von RAO-Pferden vorhanden ist, nachdem sie verschiedenen Reizstoffen aus Heustaub, wie Schimmelpilzen und Milbenextrakten, ausgesetzt waren (Simonen-Jokinen *et al.*, 2005a, b). Sowohl Pro-MMP-9 als auch aktives MMP-9 sind in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit (BALF) der betroffenen Pferde im Vergleich zu gesunden Pferden nach Exposition gegenüber verschimmeltem Heu oder Stroh signifikant erhöht (Nevalainen *et al.*, 2002). Diese MMP-9-Spiegel sind signifikant mit der Anhäufung von Neutrophilen korreliert, was die Entzündungskomponente dieser allergischen Reaktion hervorhebt (Nevalainen *et al.*, 2002). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass Pilze wie *Aspergillus fumigatus*, die sich auf organischem Material befinden, bei betroffenen Pferden durch Aktivierung von latentem Pro-MMP-9 Epithelschäden verursachen können (Simonen-Jokinen *et al.*, 2006). In früheren Studien konnten Forscher einen signifikanten Anstieg der MMP-9-Konzentration in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit von Pferden nachweisen, die

an leichtem bis mittelschwerem und schwerem equinem Asthma litten, was sich während einer erfolgreichen Therapie normalisierte (Barton *et al.*, 2015; Barton *et al.*, 2016). Eine weitere Studie wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression des extrazellulären Matrix-Metalloproteinase-Induktors (EMMPRIN) in Equiden-Lungen nachgewiesen werden kann und ob EMMPRIN gemeinsam mit der Expression von Matrix-Metalloproteinase 2 und 9 in bronchoalveolärer Spülflüssigkeit (BALF) von Pferden mit chronischer Lungenerkrankung vorhanden ist. Die Expression des EMMPRIN-Proteins wurde in BALF-Zellen aller Pferde identifiziert. Die Expression von EMMPRIN-Protein korrelierte mit der Expression von MMP-2- und -9-Proteinen, der gelatinolytischen Aktivität von MMP-9 und der Neutrophilie der Atemwege (Rossi *et al.*, 2017). Es wurde gezeigt, dass präkorneale Tränenfilmproben mit Ulzera signifikant höhere MMP-2 und MMP-9 Konzentrationen enthalten als gesunde Augen (Strubbe *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass die Expression der Kollagenase MMP-1 und der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 für die Epithelwanderung bzw. den Umbau der Hornhaut verantwortlich sind (Mulholland *et al.*, 2005). Obwohl die gelatinolytische Aktivität bei Pferden mit ulzerativer Keratitis anfangs hoch ist, nimmt sie mit der Heilung der Geschwüre ebenfalls ab (Ollivier *et al.*, 2004). MMP-2 und MMP-9 wurden außerdem aus Wundgewebe und -flüssigkeit von Pferden isoliert (Cochrane, 1997). Dort sind MMP-2 und MMP-9 wichtig für den Heilungsprozess. Eine weitere Studie zeigte, dass die Änderungen der MMP-2- und MMP-9-Aktivitäten für die Gewebereorganisation wichtig sein können, die für den Eisprung im Eierstock des Pferdes erforderlich ist (Sessions *et al.*, 2009). Nach Kenntnisstand gibt es keinen endgültigen Beweis für die Rolle von MMPs bei der Erhöhung der Darmpermeabilität beim Pferd, obwohl eine kürzlich durchgeführte Studie ergab, dass Pferde mit Koliken im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren höhere Serumkonzentrationen von MMP-2 aufwiesen. (Arosalo *et al.*, 2007) zu der Annahme, dass MMP-2 bei der Pathogenese von Koliken eine Rolle spielen könnte, möglicherweise über eine erhöhte Zellpermeabilität (Arosalo *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass Pferde in den Prodromalstadien der durch Kohlenhydrate induzierten Laminitis eine vorübergehende Phase mit erhöhter Darmpermeabilität erfahren (Weiss *et al.*, 2000), während der Toxine aus dem Darm in den Kreislauf gelangen können.

3 Material und Methode

Die praktischen Untersuchungen wurden im Zeitraum zwischen September 2015 und September 2019 in der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin durchgeführt. Alle Pferde zeigten nach Aussage der Haustierärzte Koliksymptome. In der vorliegenden Studie wurden alle diesbezüglichen Informationen dokumentiert. Die studienbezogenen labordiagnostischen Auswertungen erfolgten aus weiterverwendeten Proben (Plasma und Bauchhöhlenflüssigkeit), die im Rahmen der Routinediagnostik entnommen worden waren.

Es wurden nur Pferde in die Studien aufgenommen, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Abdominozentese durchgeführt wurde. Es handelte sich somit nach § 8a Abs. 1 Nr. 3b des Tierschutzgesetzes nicht um einen anzeige- oder genehmigungspflichtigen Tierversuch.

3.1 Patientengut

Insgesamt wurden 47 Warmblutpferde, die in die Pferdeklinik der Freien Universität Berlin eingewiesen wurden, in die vorliegende Studie eingeschlossen. Diese wurden aufgrund einer Kolik unterschiedlichen Schweregrades zur genauen Untersuchung und Therapie in die Klinik überwiesen. Die Grunddaten einzelner Pferde wie Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe und Anamnese wurden dokumentiert. Die Ergebnisse der klinischen, weiterführenden und labordiagnostischen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Studie ausgewertet. Die Pferde wurden nach Art der Kolik in verschiedene Gruppen aufgeteilt.

In der Anamnese wurden Kolikdauer, Kontinuität, Vorbehandlung, Fütterung, Haltung und Nutzung des Pferdes sowie Entwurmungsstatus festgehalten. Erste Informationen wurden vom Besitzer oder Hausarzt eingeholt. Im Rahmen der durchgeführten Eingangsuntersuchung wurde eine Diagnose oder Verdachtsdiagnose erstellt und entschieden, ob die Erkrankung medizinisch oder chirurgisch behandelt werden musste. Im Anschluss erfolgte gegebenenfalls eine diagnostisch-therapeutische Laparotomie.

3.2 Vorbericht und Vorbehandlung

Die Dauer der Kolik umfasste die Zeit zwischen dem Auftreten der ersten Koliksymptome, wie vom Besitzer berichtet, und der klinischen Bewertung in der Klinik. Die Information wurde in Stunden angegeben.

Die Symptome der Kolik wurden stündlich dokumentiert. Nach anfänglicher Behandlung der Kolik wurde diese als intermittierend oder kontinuierlich beurteilt.

Die Beurteilung des Kolikgrades erfolgte anhand des allgemeinen Verhaltens und der Stärke der Koliksymptome: keine Kolik (allgemeines Verhalten ruhig und aufmerksam), geringgradige Kolik (leichte Unruhe, Scharren des Bodens), mittelgradige Kolik (häufiges Urinieren, Hinlegen und Aufstehen, langes Liegen auf der Seite) oder hochgradige Kolik (heftiges Wälzen, Schwitzen, Tachypnoe, Verletzungen des Körpers und des Gesichts durch Wälzen und Umschlagen, Apathie).

Die vorberichtliche Behandlung durch den überweisenden Tierarzt beinhaltete in den meisten Fällen Spasmoanalgetika (meist Butylscopolamin und Metamizol), selten Flunixin-Meglumin und Xylazin und die Verabreichung von Laxantien in Form von Natriumsulfat und Paraffinöl.

3.3 Klinische Kolikuntersuchung

Die Körpertemperatur wurde rektal mit Hilfe eines Digitalthermometers bestimmt. Die gemessenen Werte wurden in °C angegeben. Die normale Temperatur für ein ruhendes Pferd beträgt 37 bis 38 °C. Die Verwendung der Nasenschlundsonde wurde dokumentiert und klassifiziert als negativ (physiologischer Mageninhalt) oder positiv (Rückfluss von Mageninhalt, Gas, Reflux von mehr als 3 Liter, in einigen Fällen Bestimmung des pH-Wertes). Die Atemfrequenz wurde von schräg hinten anhand der Flankenbewegung/Flankendehnung gezählt. Die Atemzüge wurden pro Minute angegeben. Die normale Atemfrequenz des Pferdes liegt bei 8 bis 16 Atemzügen in der Minute. Der Herzschlag wurde mit dem Stethoskop hinter der linken Ellenbogenspitze abgehört und pro Minuten angegeben. Herzfrequenzen von 25-40 Schlägen pro Minute sind bei ruhenden Pferden physiologisch. Die Pulsqualität wurde an der A. facialis beurteilt. Darmgeräusche wurden mit dem Stethoskop durch Abhören der oberen und unteren Flanke auf der linken und rechten Seite ausgewertet. Bei der Bewertung der Elastizität der Haut wurde eine Hautfalte in der Mitte bis zum unteren Drittel des Halses gezogen und ihr Verstreichen bewertet. Als physiologisch gilt ein vollständiges Verstreichen der Hautfalte innerhalb von 2 Sekunden. Eine Verzögerung von 5 Sekunden oder mehr wird als deutlich pathologisch gewertet.

Die Kopfschleimhäute sollten rosa, glänzend und feucht sein. Blasse oder trockene Schleimhäute sprechen für eine Dehydratation, ikterische Schleimhäute können auf eine Lebererkrankung hinweisen während bläulich-violette Schleimhäute eine Endotoxämie anzeigen können. Das Blutangebot dient der Beurteilung der Kreislaufsituation. Das Blutangebot wurde durch Kompression der Vena jugularis im unteren Drittel des Halses und Lösen des Staus beurteilt. Die Kapillarfüllungszeit (KFZ) wurde an der Maulschleimhaut im

Bereich der Gingiva des Ober- oder Unterkiefers geprüft. Die Schleimhaut wurde durch einen mäßig festen Fingerdruck komprimiert und die Kapillarfüllungszeit beurteilt. Physiologisch war Reperfusion in unter 3 Sekunden. Die Kotbeurteilung erfolgte nach Entnahme aus der Ampulla recti bei der transrektalen Palpation bzw. nach spontanem Kotabsatz. Der Appetit wurde als normal oder reduziert (Inappetenz) bewertet.

Bei der rektalen Untersuchung wurden folgenden Bewertungskriterien verwendet: Position der Darmabschnitte - Durchmesser der Darmabschnitte - Elastizität der Darmwand und Konsistenz des Darminhaltes - Motilität des Darms - Darmoberfläche - Ligament zwischen Milz und Niere -Schmerzhaftigkeit von Darmabschnitten).

Auf Grund der klinischen Befunde, sowie der laborbefunde und gegebenenfalls vorliegenden Operationsbefunde wurden verschiedene Kolikursachen diagnostiziert, die entweder im Magen, Dünndarm oder Dickdarm lokalisiert waren: Dilatation, Enteritis, Gastritis, Hernie, Ileus, Invagination, Meteorismus, Obstipation, Peritonitis, spastische Kolik, Torsion, Strangulation, Magendilatationen, Volvulus oder Dislokation (siehe Tabelle 10 im Anhang).

3.4 Labordiagnostik

3.4.1 Blutproben

Bei allen Kolikpatienten wurden Blutproben entnommen um die aktuelle HerzKreislaufsituation und Hydratation zu beurteilen. Die Entnahme erfolgte an der Jugularvene unter sterilen Kautelen und wurde vom jeweiligen diensthabenden Tierarzt durchgeführt (Abb. 1). Zu diagnostischen Zwecken erfolgte die Bestimmung von Hämatokrit, Gesamteiweiß, Differentialblutbild und der venösen Blutgasanalyse (siehe Tab. 13 im Anhang). Der Hämatokrit wurde nach Zentrifugation (Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge bei 12000 U/min für 3 Minuten) bestimmt. Die Plasma Gesamtproteinkonzentration wurde mit einem Refraktometer unter Verwendung der für die Hämatokritmessung zentrifugierten Probe gemessen.



Abbildung 1: Entnahme von venösem Blut aus der Jugularvene in einem sterilen Röhrchen bei einem Kolikpatienten.

Zur Gewinnung von Plasma und Serum für die Untersuchung auf MMP-9 wurden die Blutproben in 5 ml EDTA-Röhrchen für Plasma und in 10ml Serumröhrchen ohne Verdünner überführt und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden sie bei 3500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und das erlangte Material bis zur endgültigen Analyse bei -80°C eingefroren und am Ende der Studie an ein externes Labor (fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza) zur Messung von MMP-9 geschickt.

3.4.2 Bauchhöhlenflüssigkeit

Die Bauchhöhlenflüssigkeitsproben wurden am stehenden Pferd unter Fixation mit einer Oberlippenstrickbremse entnommen (Abb. 2, 3). Der Bereich zwischen dem Sternum und dem Nabel, ca. 5 Finger breit um die Mittellinie wurde geschoren und desinfiziert. Mithilfe einer Tuohy-Bauchhöhlenpunktionskanüle (19 Gauge), wurde die Haut in der Mittellinie an der tiefsten Stelle des Abdomens eingestochen und die Kanüle je nach Dicke von Haut/Unterhaut und Muskulatur etwa 3-5 cm vorgeschoben. Die Peritonealflüssigkeit wurde in ein 5 ml Röhrchen (ohne EDTA) gefüllt. Die Bauchhöhlenpunktate wurden makroskopisch analysiert,

das Gesamtprotein per Refraktometer bestimmt, das Laktat sowie die Gesamtzellzahl maschinell ermittelt (siehe Tab. 12 im Anhang) und der Rest der Ergussflüssigkeit bei 3500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Rotofix 32 Zentrifuge). Die zellfreie Probe wurde anschließend zur Konservierung für die MMP-9 Analysen bei -80 °C eingefroren und am Ende der Studie gesammelt zur Messung von MMP-9 in ein externes Labor versandt (fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza).

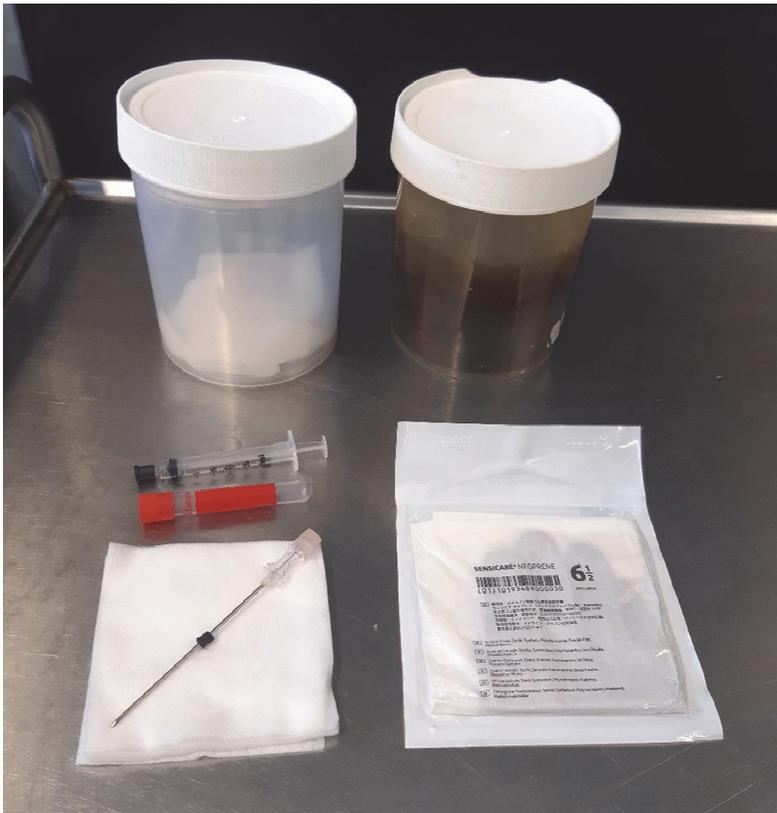


Abbildung 2: Entnahmetensilien (a) und Entnahme von Peritonealflüssigkeit in einem sterilen Röhrchen.



Abbildung 3: Sterile *Entnahme von Peritonealflüssigkeit in einem sterilen Röhrchen.*

3.4.3 Sepsis-Scoring

Zur Einschätzung des Schweregrads der Endotoxämie der Patienten wurden sie mittels eines modifizierten (reduzierten) Sepsis-Scores nach Breuer und Schusser anhand ihres klinischen Bildes und zweier Laborparameter (Leukozytenzahl in G/l und ionisiertes Kalzium in mmol/l) beurteilt (Tab. 5). Das Allgemeinbefinden, die Herzfrequenz, die Atemfrequenz, die innere Körpertemperatur, die Maulschleimhaut sowie die Anzahl der weißen Blutkörperchen pro Liter EDTA-Blut wurden festgehalten und von null bis maximal drei bewertet. Zusätzlich wurde die per venöser Blutgasanalyse bestimmte Konzentration an ionisiertem Kalzium mit null oder einem Punkt beziffert (siehe Tab. 9 im Anhang). Die maximal zu erreichende Punktzahl des Sepsis-Scores lag bei 19 Punkten. Patienten mit sechs Punkten oder weniger wurden als „negativ“ für das Vorliegen einer Sepsis beurteilt ($< 6/19$), jene mit sieben bis neun Punkten als „fraglich“ (7-9/19) und Pferde mit zehn oder mehr Punkten als „positiv“ ($> 10/19$).

Tabelle 5 „Sepsis Score“ modifiziert nach Breuer und Schusser (2012): Klassifikation in negativ ($\leq 6/19$ Punkte), fragwürdig (7-9/19 Punkte) oder positiv ($\geq 10/19$ Punkte) für Sepsis.

Parameter/Punkte	0	1	2	3
Allgemeinbefinden	ungestört	ggr. reduziert	mgr. reduziert	hgr. reduziert
Herzfrequenz	28-40	41-60	61-80	> 80
Atemfrequenz	10-14	15-25	26-45	> 45
Temperatur [°C]	37,5-38,0	37,0-37,4 od. 38,1-38,5	36,5-36,9 od. 38,6- 39,0	<36,5 od. >39,0
Maulschleimhaut	blassrosa	ggr. gerötet	mgr. gerötet	hgr. gerötet, toxic line
Ca²⁺ [mmol/l]	1,5–1,8	< 1,5		
WBC [G/l]	4,9–12,6	4,0–4,8 od. 12,7–15,0	3,0–3,9 od. 15,1– 20,0	<3,0 od. >20,0

3.4.4 Sandwich-ELISA

Die gesammelten Blut- und Peritonealflüssigkeitsproben wurden mithilfe eines ELISAs im fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie zur Quantifizierung verschiedener Entzündungsmarker analysiert. Eine der ELISA-Techniken (Sandwich-ELISA oder auch Antigen-ELISA) verwendet zwei Antikörper (AK), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen (Epitope) an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (engl. coat antibody oder capture antibody) wird an

eine feste Phase (meist Mikrotiterplatten mit 96 wells genannten Vertiefungen) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen: Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt, und zurück bleibt nur das am ersten Antikörper gebundene Antigen. Ein zweiter primärer, unmarkierter Detektionsantikörper wird hinzugefügt, um das Sandwich zu vervollständigen. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Das Ergebnis kann quantifiziert werden, indem ein markierter sekundärer Antikörper hinzugefügt wird, der an den zweiten primären Antikörper bindet und die enzymatische Farbreaktion katalysiert. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten.

3.4.5 MMP-9 - ELISA

Die aus dem Patientengut gewonnenen Proben und die Bestandteile des Kits wurden auf Raumtemperatur erwärmt (18-25°C). Die Standards wurden gemäß der Anleitung erstellt und die Verdünnungen wurden kalibriert. 100µl jeder Verdünnung von Standard, Leerwert und Proben wurden in die entsprechenden Wells hinzugefügt, bedeckt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert (Abb. 4). Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt. 100 µl Detektor (A) wurden zu jedem Well hinzugegeben, mit Platten bedeckt und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt, 350 µl Waschpuffer wurden zum Waschen verwendet und 1-2 Minuten ruhen lassen. Die Flüssigkeit wurde aus allen Wells vollständig entfernt, indem die Platte auf absorbierendes Papier getupft wurde. Die Wells wurden dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde jeglicher verbleibender Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden 100 µl der Detektor B Arbeitslösung in jedes Well gegeben und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Waschschrte wurden insgesamt fünfmal durchgeführt. 90 µl TMB-Substratlösung wurden zu jedem Well gegeben. Mit einer Platten bedeckt wurden die Wells für 30 Minuten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde durch Zugabe einer Substratlösung blau. 50 µl Stopplösung wurden in jedes Well gegeben, so dass die Flüssigkeit gelb wurde. Die Absorption wurde durch einen ELISA Mikroplattenleser (Fluorescence Reader Tecan "infinite") bei 450 nm gemessen.

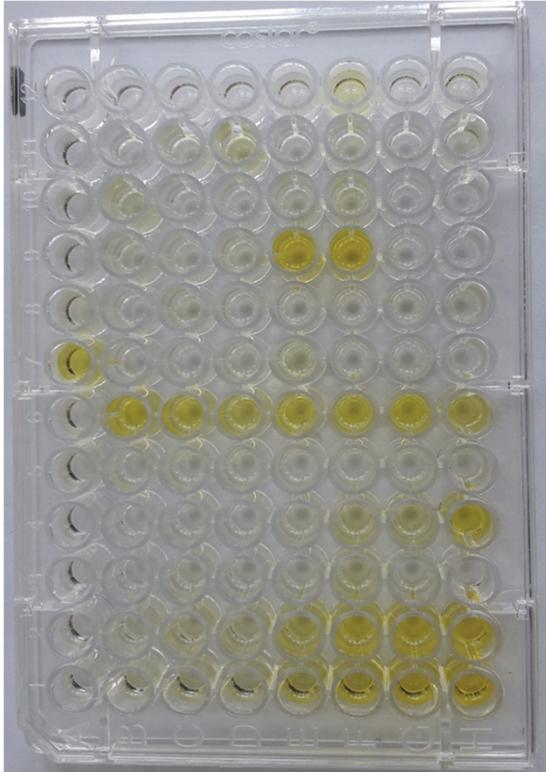


Abbildung 4: ELISA – Mikroplatte für MMP-9.

3.5 Statistik

Die Daten wurden statistisch analysiert und mit SPSS Statistics® (Version 25) grafisch dargestellt. Die einzelnen numerischen Parameter wurde als Medianwerte (\bar{x}_M), arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Die Daten wurden mit Hilfe des Shapiro Wilks-Tests und der Sichtprüfung auf Normalverteilung getestet. Um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen, wurden die MMP-9-Konzentrationen in Plasma und Peritonealflüssigkeit auf die Basis von 10 logarithmiert. Der Einfluss des Sepsis-Scores, der Rasse, des Geschlechts, des Alters und des Körpergewichts auf die MMP-9-Konzentrationen in Plasma bzw. Peritonealflüssigkeit wurde mit Hilfe eines allgemeinen linearen Regressionsmodells untersucht. Die schrittweise Rückwärtsauswahl wurde verwendet, um Variablen zu eliminieren, die nicht wesentlich zum Modell beitragen. Für Peritonealflüssigkeit blieben Rasse und Gesamtbewertung im endgültigen Modell, für Plasma blieben Gewicht und Gesamtbewertung erhalten. Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ eingestellt. Eine ROC-Analyse wurde durchgeführt, um Grenzwerte für MMP-9-Konzentrationen mit der höchsten Sensibilität und Spezifität zu berechnen. Die Unterscheidungskraft der einzelnen Faktoren, die zur Sepsisbewertung beitragen, wurde mit Hilfe einer linearen Diskriminanzanalyse untersucht. Mit dieser Methode kann bewertet werden, welche der Faktoren zur

Unterscheidung zwischen den Sepsis-Bewertungsgruppen gut geeignet sind. Der Test der Gleichheit der Gruppenmittelwerte wurde verwendet, um Variablen zu identifizieren, die zwischen den Gruppen gut unterscheiden (p-Wert $<0,05$). Die Bewertung der Funktionen erfolgte anhand des Eigenwerts, des Prozentsatzes der Varianz, der auf die Funktion zurückzuführen ist, und der jeweiligen p-Werte von Wilks Lambda. Die standardisierten kanonischen Diskriminanzfunktionskoeffizienten wurden verwendet, um die mittleren Diskriminanzkoeffizienten zu berechnen, die den Einfluss der Variablen auf die Sepsis-Bewertungsgruppen erklären.

4 Ergebnisse

Insgesamt 47 Pferde, die aufgrund von Koliksymptomen in die Pferdeklinik der Freien Universität Berlin eingewiesen wurden, wurden in die vorliegende Studie eingeschlossen (Tabelle 10 im Anhang). Diese Pferde waren unterschiedlicher Rassen (Tabelle 6). Es waren 26 Stuten, 14 Wallache und sieben Hengste (Abb. 5) mit einem mittleren Alter von $14,3 \pm 7,9$ Jahren und einem mittleren Gewicht von 512 ± 135 kg KGW. Von den 47 Pferden mit einer akuten Kolik wurden 27 konservativ therapiert, 16 operiert und vier Tiere euthanasiert.

Tabelle 6: Rasseverteilung, Gewicht und Geschlecht der Kolikpatienten.

Nr	Rasse	Alter	Körpergewicht in kg	Geschlecht
1	Polnisches Warmblut	14	550	3
2	Haflinger	20	550	1
3	Mecklenburger	10		1
4	Warmblut	15	600	1
5	schweres Warmblut	8	695	2
6	schweres Warmblut	11	695	2
7	Quarter Horse	23	470	2
8	Engl. Vollblut	9		2
9	Zweibrücker	16	610	1
10	Quarter Horse	23	470	2
11	Deutsches Reitpony	10	375	2
12	Traber	13	400	1
13	Araber-Mix	16		1
14	Quarter Horse	0.2	140	3
15	Warmblut	29	510	2
16	Warmblut	29	510	2
17	Isländer	27		1
18	Shetlandpony	25		2
19	Warmblut	28	630	2
20	Welsh D Pony	7	550	2
21	Westfale	8	630	3
22	Brandenburger	11		2
23	Brandenburger	11		2
24	Brandenburger	11		2
25	Pony	2	200	3
26	Pony	17	400	2
27	Quarter Horse	2	240	3
28	Brandenburger	23	500	2
29	Hannoveraner	18	603	1
30	Oldenburger	8	493	1
31	Isländer	15	400	2

32	Traber	25	440	3
33	Oldenburger	9	540	2
34	Deutsches Sportpferd	11	600	1
35	Polnisches Warmblut	14	700	2
36	Polnisches Warmblut	14	700	2
37	Barockpinto	5	650	2
38	Vollblut	2	420	2
39	Westfale	10		2
40	Hannoveraner	7	600	1
41	Quarter Horse	25	500	1
42	Hannoveraner	9		3
43	Pony-Mix	10		1
44	Deutsches Reitpony	18	495	2
45	Trakehner	31		2
46	Quarab	12	490	2
47	Trakehner	12	575	1

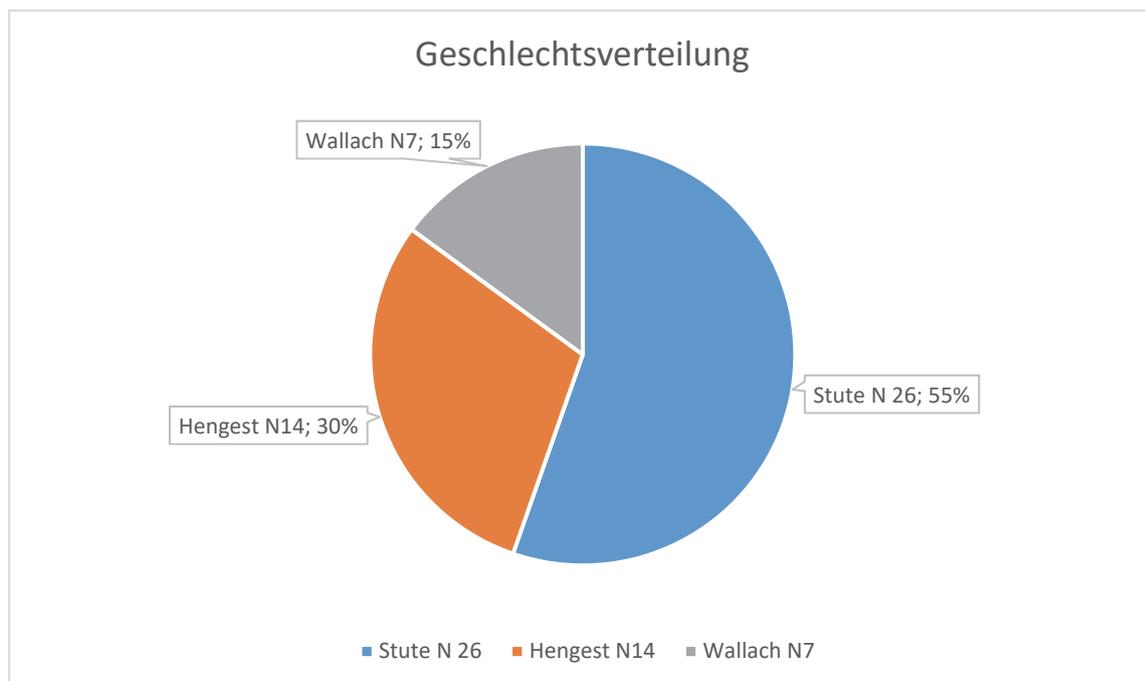


Abbildung 5: Geschlechtsverteilung der 47 Kolikpferde.

4.1 Sepsis Score

Bezogen auf den Sepsis Score wurden 32 Pferde als "negativ" klassifiziert ($\leq 6/19$ Punkte), neun als "fragwürdig" eingestuft (7-9/19 Punkte) und sechs als "positiv" ($\geq 10/19$ Punkte). Pferde mit einer „negativen“ Einstufung hatten einen durchschnittlichen Sepsis Score von $2,8 \pm 1,8$, diejenigen aus der Gruppe der "fragwürdigen" $7,6 \pm 0,7$ und die aus der "positiven"

Klassifizierung $11,3 \pm 2,0$ Punkte (Tab. 4). Eine Übersicht der einzelnen Parameter des Sepsis Scores in der „positiven“, „fragwürdigen“ und „negativen“ Sepsis Gruppe zeigt Tabelle 7 und Tabelle 11 im Anhang.

Tabelle 7: Ergebnisse des Sepsis-Scores in den Gruppen „negativ“ ($n = 32$, $\leq 6/15$ Punkte), „fragwürdig“ ($n = 9$, $7-9 / 15$ Punkte) oder „positiv“ ($n = 6$, $\geq 10/15$ Punkte), Median (unteres Quantil – oberes Quantil), signifikante Unterschiede im Vergleich zur Sepsis negativen Gruppe sind mit * markiert.

Parameter	Negativ	Fraglich	Positiv
Allgemeinzustand	0 (0 – 1)	2 (2 – 3)	3 (2 – 3) *
Herzfrequenz/min	1 (0 – 1)	1 (1 – 2)	2 (1 – 2)
Atemfrequenz/min	1 (0 – 1)	2 (1 – 2)	1 (1 – 2)
Temperatur [°C]	10 (0 – 1)	0 (0 – 1)	2 (2 – 3)
Schleimhäute	0 (0 – 0)	1 (1 – 1)	2 (2 – 3) *
Ionisiertes Calcium [mmol/l]	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)
Leukozyten [G/l]	0 (0 – 0)	2 (0 – 3)	0 (0 – 3)
Gesamtscoring	3 (2 – 4)	8 (7 – 8)	10 (10 – 12) *

Alle sechs Pferde mit einem „positiven“ Sepsis Score wurden entweder operiert (4/6) oder euthanasiert (2/6). Von den operierten Patienten wiesen alle Tiere eine ischämische Darmläsion auf. Die Diskriminanzanalyse ergab, dass alle Parameter des Sepsis Scores, außer dem ionisierten Kalzium ($P = 0,403$), zur Unterscheidung zwischen den drei verschiedenen Sepsis-Klassifizierungen beitrugen ($P = 0,001$ oder weniger). Der Wilks Lambda Test empfahl die Nutzung zweier Diskriminanzfunktionen, obgleich die erste Funktion bereits 90,6% der Gesamtvarianz erfasste.

Die Verfärbung der Maulschleimhaut stellte sich als der Parameter mit der größten Trennschärfe heraus (mittlere Diskriminanzfunktion 7,55), gefolgt von einer Leukopenie und dem Allgemeinbefinden (mittlere Diskriminanzfunktion 4,86 und 2,49). Die Farbe der Maulschleimhaut hatte demnach den größten Einfluss auf den Sepsis Score. Die ausschließliche Analyse dieses Faktors führte zu einer Fehlbewertung von lediglich vier

Pferden. Fügte man der Erhebung dieses Parameters die zwei nächst-Wichtigen hinzu (Leukopenie und Allgemeinbefinden), so gelang bei allen Patienten bis auf einem die korrekte Bewertung bezüglich einer etwaigen Sepsis (3,1 % Fehlklassifikation). Alle sechs Sepsis-„positiven“ Pferde wurden korrekt gruppiert. Leider war die Probandenanzahl mit sechs „positiven“ Tieren zu klein, um die Ermittlung verlässlicher Grenzwerte zur Abschätzung der Notwendigkeit einer chirurgischen Versorgung oder Stellung einer Prognose zum Krankheitsverlauf zu ermöglichen.

Die Diskriminanzanalyse zeigte, dass alle Parameter des Sepsis Scorings außer dem ionisierten Calcium ($P = 0,403$) gut zwischen den Sepsisgruppen unterschieden ($P = 0,001$ oder niedriger). Wilks' Lambda empfahl, zwei Diskriminanzfunktionen zu verwenden, obwohl die erste Funktion bereits 90,6% der Gesamtvarianz ausmachte. Die Verfärbung der Schleimhäute zeigte die größte Diskriminierungskraft (mittlere Diskriminanzfunktion 7,55), gefolgt von Leukopenie und Allgemeinzustand (mittlere Diskriminanzfunktion 4,86 bzw. 2,49). Die Kombination dieser drei Variablen klassifizierte alle Pferde mit einer Ausnahme (3,1% Fehlklassifizierung). Alle sieben Sepsis-positiven Pferde wurden korrekt klassifiziert. Wenn nur die Farbe der Schleimhäute eingeschlossen wird, führt dies zu einer Fehlklassifizierung von vier Pferden (12,5%). Alle Pferde in der Gruppe der Sepsis-positiven wurden korrekt klassifiziert.

4.2 Ergebnisse der Labordiagnostik

4.2.1 Ergebnisse der Bauchpunktatanalysen

Die Ergebnisse der Bauchpunktatanalysen sind im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt.

4.2.2 Ergebnisse der Blutuntersuchungen

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen sind im Anhang in Tabelle 13 aufgeführt.

4.2.3 MMP-9 im Blut und Bauchpunktat

Die Ergebnisse der MMP-9-Messungen waren wie folgt (Tab. 8): In der Sepsis-negativen Gruppe lagen die MMP-9-Konzentrationen im Plasma bei $114,9 \pm 60,8$ pg/ml und in der Peritonealflüssigkeit bei $213,3 \pm 853$ pg/ml. In der fraglichen Gruppe betragen die MMP-9-Spiegel im Plasma $86,3 \pm 30,7$ pg/ml und in der Peritonealflüssigkeit $122,7 \pm 194,8$ pg/ml. Ein signifikanter Anstieg beider Parameter wurde in der Gruppe mit einer positiven Sepsisbewertung von $439,5 \pm 472,7$ pg/ml im Plasma und $3,986,7 \pm 5,338,0$ pg/ml in der Peritonealflüssigkeit festgestellt. Eine Übersicht über die Ergebnisse der MMP-9-

Konzentrationen in Plasma und Peritonealflüssigkeit in der positiven, fragwürdigen und negativen Sepsis-Gruppe ist in Tabelle 8 gegeben. Eine signifikante Assoziation des Sepsis-Scores mit der MMP-9-Konzentration wurde für Peritonealflüssigkeit ($P=0,007$) mit einem Regressionskoeffizienten von 0,131 gefunden, während für Plasma ($P=0,078$) keine signifikante Assoziation gefunden wurde. ROC-Analysen wurden verwendet, um den optimalen Cut-off der MMP-9-Konzentrationen zu ermitteln, um Tiere mit einer positiven Sepsisbewertung ($\geq 10/15$ Punkte) zu identifizieren. Ein Cut-Off wird als optimal angesehen, wenn er eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist. Dies kann durch Berechnen der Sensitivitäten und Spezifitäten für einen Bereich von MMP-9-Konzentrationen und durch visuelle Beurteilung der Ergebnisse anhand eines ROC-Diagramms bewertet werden. Bezüglich der MMP-9-Konzentrationen in Peritonealflüssigkeit erwiesen sich 110 pg/ml als optimal, da die Sensitivität 85,7% und die Spezifität 87,5% betrug. Für MMP-9 im Plasma war der Wert 109 pg/ml mit einer Sensitivität von 100%, aber einer Spezifität von nur 59%.

Tabelle 8: Die Ergebnisse der Patienten (Sepsisgesamtscore und die MMP-9-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit (MMP 9 BHP) und im Plasma (MMP 9 Plasma)).

Patienten-Nr.	Gesamtscore	MMP 9 BHP pg/ml	MMP 9 Plasma pg/ml
1	10	125.9	110.0
2	8	286.4	96.3
3	2	40.9	129.9
4	4	247.0	366.9
5	3	198.3	112.5
6	2	70.4	70.6
7	3	73.2	148.4
8	6	66.5	104.2
9	10	18.3	154.3
10	1	4799.4	139.3
11	3	155.1	102.1
12	3	75.1	113.1
13	8	39.1	37.1
14	10	8268.5	672.0
15	3	57.9	206.2
16	6	74.4	134.3
17	3	41.8	54.9
18	6	28.1	108.0
19	8	77.8	135.4
20	3	23.3	107.8
21	7	544.2	95.5
22	2	8.5	50.4
23	1	19.8	80.3
24	0	18.1	Probe fehlt
25	10	1331.7	1168.4

26	1	45.9	114.2
27	3	22.5	68.7
28	1	63.6	80.5
29	3	128.2	158.3
30	2	8.3	159.8
31	5	14.7	75.8
32	12	119.4	Probe fehlt
33	0	77.9	73.6
34	7	13.0	68.6
35	4	70.7	171.7
36	5	64.3	79.9
37	7	8.1	76.6
38	0	14.8	119.4
39	2	7.5	132.9
40	3	4.6	106.0
41	11	13120.2	133.3
42	1	100.7	60.1
43	6	3.4	67.0
44	3	28.3	80.3
45	15	954.6	113.8
46	9	6.3	66.4
47	7	6.9	114.5

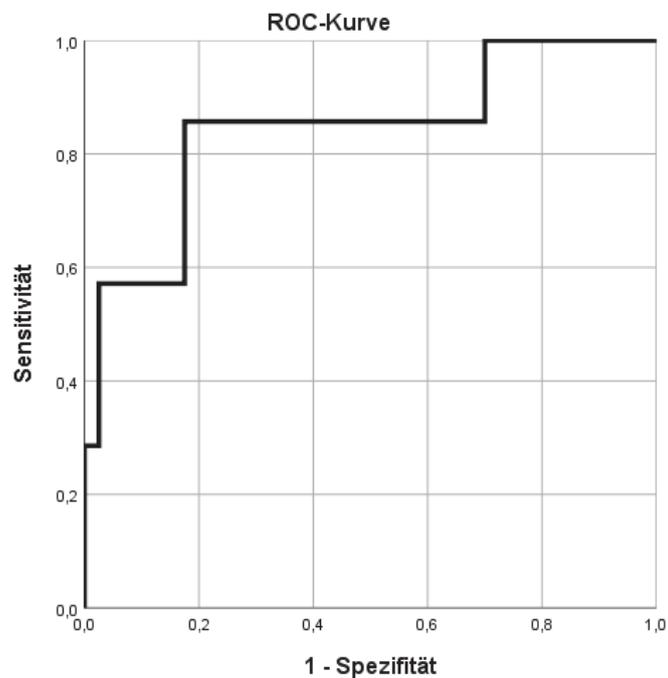


Abbildung 6: Spezifität von MMP9 im Bauchpunktat.

MMP-9 im BHP (Bauchhöhlenpunktat) zeigte sich, dass der Wert von 110,01 pg/ml am besten geeignet ist, da die Sensitivität mit 85,7 % und die Spezifität mit 87,5 % bei diesem Wert am höchsten sind (Abb. 6).

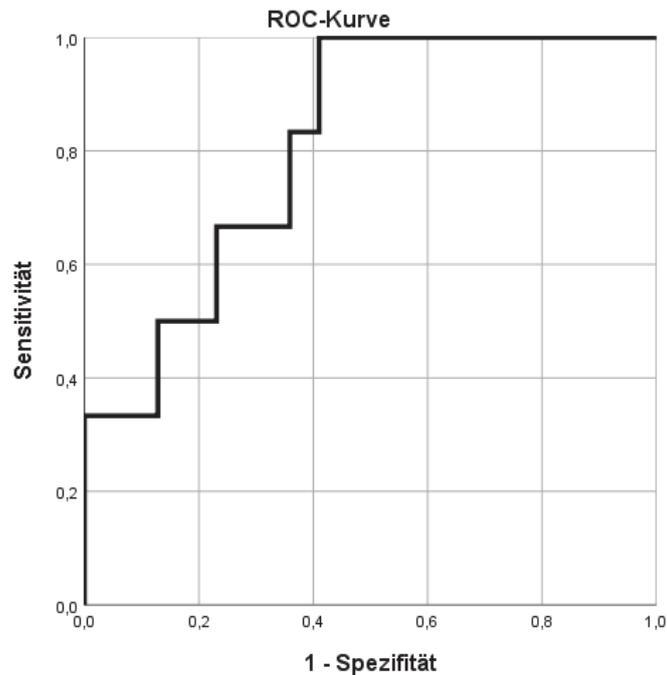


Abbildung 7: Spezifität von MMP9 im Blutplasma.

Im Plasma war ein ähnlicher Wert, nämlich 109 pg/ml mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 59% am besten geeignet. Die Spezifität war in diesem Fall jedoch nicht so hoch (Abb. 7).

Tabelle 9: MMP-9-Konzentrationen in Plasma und Peritonealflüssigkeit in den Gruppen „negativ“ ($n = 32, \leq 6/19$ Punkte), „fraglich“ ($n = 8, 7-9 / 19$ Punkte) oder „positiv“ ($n = 6, \geq 10 / 19$ Punkte) für Sepsis, angegeben als Median (unteres Quantil - oberes Quantil).

Parameter	Negativ	Fraglich	Positiv
MMP-9 [pg/ml] im Plasma	107,8 (75,8 – 134,3)	86,0 (67,5 – 105,4)	143,8 (113,8 – 672,0)
MMP-9 [pg/ml] in Peritonealflüssigkeit	51,9 (18,9 – 74,8)	26,0 (7,5 – 182,1)	954,6 (119,4 – 8268,5)

5 Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass MMP-9 ein vielsprechender Biomarker mit hohem diagnostischem Wert für Sepsis und Endotoxämie bei Koliken ist. Meine Hypothese, die besagt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Sepsis-Bewertung und den lokalen und systemischen MMP-9-Konzentrationen bei Pferden mit Kolik gibt, wurde bestätigt.

Kolik ist die häufigste Erkrankung im Bereich der Pferdemedizin, sie führt zu hohen Sterblichkeitsquoten. Endotoxämie ist die Hauptursache für diese hohe Mortalität, wobei Endotoxine im Kreislauf zirkulieren, was zu gesamt-systemischen Veränderungen führt (Sykes und Furr 2005). Daher hat die Kolik eine große klinische Bedeutung. Kolik ist hierbei keine Erkrankung an sich, sondern Symptom abdominalen Schmerzes, meistens lokalisiert im Gastrointestinaltrakt (Tinker *et al.*, 1997a; Ireland *et al.*, 2011).

In vielen Studien wurde der spezifische Biomarker sowohl im Plasma als auch im Serum gemessen. In Relation wurden höhere Konzentrationen des Biomarkers in der Peritonealflüssigkeit als im Plasma/Serum festgestellt. Man nimmt an, dass die Darmpermeabilität bei Kolik erhöht ist, diese führt zur gesteigerten Konzentration des Biomarkers in der Peritonealflüssigkeit. Für die vorliegende Studie wurde keine Vorauswahl der Tiere getroffen, es wurden alle Patienten mit entsprechender klinischer Symptomatik, die im Untersuchungszeitraum in der Klinik für Pferde vorgestellt und bei denen im Rahmen der medizinischen Diagnostik Blut und Bauchhöhlenflüssigkeit entnommen wurden, in die Studie eingeschlossen.

In der vorliegenden Studie lag der Anteil der Stuten bei 55 % und der Anteil der Hengste bei 45 %, das durchschnittliche Alter lag bei $14,3 \pm 7,9$ Jahren und mittlerem Gewicht von 512 ± 135 kg KGW. Dies entspricht der durchschnittlichen Patientenpopulation der Klinik. Die anatomische und physiologische Konstitution spielt hierbei eine wichtige Rolle. Die Rassenverteilung der 47 an Kolik erkrankten Pferde lag am häufigsten bei Quarter Horses mit 5 Tieren und an zweiter Stelle Warmblut sowie Brandenburger mit je 4 Tieren pro Rasse. Quarter Horses waren im Vergleich zu den anderen Rassen im Vergleich zur übrigen Patientenpopulation überrepräsentiert, ob dies einen Einfluss auf die Studienergebnisse hatte, ist jedoch mindestens fraglich.

Die Hauptursache der Endotoxämie bei der Kolik ist vor allem in der gestörten Durchblutung des Darms zu sehen (Epstein *et al.* 2011). Dadurch kommt es zu einem Übertritt von Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darm in die Blutbahn. Als Folgen sind Tachykardie, veränderte Schleimhautfarbe, Fieber und Laborveränderungen wie Azidose, Leukopenie und Dehydratation zu verzeichnen. Die Pferde wurden mit Hilfe des modifizierten Scores von

Breuer und Schusser (2012) als endotoxämisch eingestuft. Diese Koliken führen zu einer fortschreitenden Ischämie der betroffenen Darmwand und Bakterientoxine gelangen in den Blutkreislauf (Moore *et al.* 1981). In meiner Studie wurde die Art der Kolik nicht berücksichtigt. Im Weiteren soll nun diskutiert werden, warum welche Kriterien ausgewählt wurden. Einflussfaktoren wie Aufregung, Anstrengung oder hohe Umgebungstemperaturen können die Vitalparameter (Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körperinnentemperatur) physiologisch erhöhen. Inflammatorische Prozesse und ihr Einfluss auf den Metabolismus können zu einer pathologischen Veränderung dieser Parameter führen.

Eine Infusion mit Endotoxinen kann dosisabhängig innerhalb der ersten Stunde zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und Körpertemperatur führen (Morris *et al.*, 1992; Barton *et al.*, 1997). Dabei werden zwei Stunden nach der Infusion die Maximalwerte der Parameter beobachtet, die sich nach drei Stunden wieder im Referenzbereich befinden (Morris *et al.*, 1992; Barton *et al.*, 1997). Bei Betrachtung der Atemfrequenz zeigt sich in der Studie von Barton *et al.* (1997), dass sechs Stunden nach der Endotoxininfusion eine Frequenzerhöhung von initial 25 auf circa 34 Atemzügen pro Minute gemessen werden kann. Eine Atemfrequenz im Referenzbereich ist erst 24 Stunden nach der Infusion wieder zu beobachten (Barton *et al.*, 1997). Jedoch führt eine artifiziell erzeugte Arthritis durch eine intraartikuläre Injektion zum Anstieg der Atemfrequenz, die 24 Stunden andauert (Hulten *et al.*, 2002). Zwei Stunden nach der Infusion mit Endotoxinen ist eine Erhöhung der Körperinnentemperatur (IKT) zu beobachten, welche nach 12 Stunden wieder im Referenzbereich liegt (Morris *et al.*, 1992; Barton *et al.*, 1997; Baskett *et al.*, 1997). Eine intraartikuläre Injektion des Endotoxins führt wiederum dazu, dass die IKT erst innerhalb von 18 Stunden signifikant steigt (Hawknis *et al.*, 1993).

Die Applikationsart (intravenös oder intraartikulär) der Endotoxininjektion beeinflusst den zeitlichen Verlauf der Erhöhung der Vitalparameter (Herzfrequenz, Atemfrequenz, IKT) (Morris *et al.*, 1992; Hawknis *et al.*, 1995; Barton *et al.*, 1997; Hulten *et al.*, 2002). Klinische Anzeichen für die Störung des Allgemeinbefindens (AB) sind variabel und können leicht (Lethargie) bis sehr schwer (Kolik, Festliegen) ausfallen. Diese Symptome eines inflammatorischen Geschehens wurden bisher selten in Studien erfasst. Außer dem Anstieg der IKT und der IL-6-Konzentration bedingt eine Endotoxininfusion nach einer Stunde ebenfalls eine Veränderung des AB (Morris *et al.*, 1992).

Verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel der pH-Wert oder die Albuminbindung, haben Einfluss auf die Kalziumkonzentration im Blut (Toribio, 2011; Vrankovic *et al.*, 2015). Biologisch aktiv ist allerdings nur die freie ionisierte Form von Kalzium (Ca²⁺). Bei einem zu niedrigen Blut-pH-Wert (Azidose), wird weniger Kalzium an das Albumin gebunden und somit ist mehr freies Kalzium im Blut. Dieses ist dann in der Blutchemie messbar und kann überhalb des

Referenzbereichs liegen (Toribio, 2011). Eine erhöhte L-Laktat-Konzentration im Blut und eine anhaltende Hyperlaktatämie sind bei Pferden mit systemischer Erkrankung mit dem Tod verbunden, es fehlt jedoch ein eindeutiger Zusammenhang mit einer Bakteriämie (Castagnetti *et al.* 2010). Die Bewertung der L-Lactat-Konzentration im Blut zu einem bestimmten Zeitpunkt ist ein schlechter Prädiktor für die Sepsis (Borchers *et al.* 2012), bei Fohlen mit Meningoenzephalitis jedoch konstant erhöht (Viu *et al.* 2012). Obwohl klinisch-pathologische Befunde wie Leukopenie, Neutropenie mit degenerativer Linksverschiebung und neutrophile Toxizität mit Sepsis bei Pferden in Verbindung gebracht wurden, schränkt mangelnde Testspezifität deren Nützlichkeit für einen Beitrag zur Diagnose einer Sepsis ein (Hurcombe *et al.* 2008). In Bezug auf die Vorhersage des Überlebens sind jedoch die Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC) ($> 6,0 \times 10^9 / l$) und die Anzahl der Neutrophilen ($> 4,0 \times 10^9 / l$) signifikant mit erhöhten Überlebenschancen bei septischen Fohlen verbunden (Gayle *et al.* 1998).

Eine dritte Einschränkung dieser Studie besteht darin, dass der Anteil stabförmiger neutrophiler Granulozyten als Indikator für eine abnormale WBC-Zahl in die SIRS-Kriterien nicht aufgenommen wurde, obwohl dies in der ursprünglichen menschlichen SIRS-Definition enthalten ist. Leider werden in der Pferdepraxis bei der Aufnahme nicht routinemäßig Blutaussstriche durchgeführt, so dass nicht genügend Blutaussstriche gesammelt wurden, um Anteil stabförmiger neutrophiler Granulozyten in diese Analyse einzubeziehen. Stabförmige neutrophile Granulozyten sind jedoch Indikatoren für eine akute und schwere Entzündungsreaktion bei Pferden, und es wurde in einer früheren kleineren Studie gezeigt, dass der Anteil stabförmiger neutrophiler Granulozyten und neutrophile toxische Veränderungen mit dem Ergebnis bei Notfallaufnahmen von adulten Pferden verbunden sind (Lambert *et al.*, 2016). Abgesehen von einer Überrepräsentation von Hengsten kann die Studienpopulation als repräsentativ für unsere Klinikpopulation angesehen werden. Das modifizierte Sepsis-scoring von Breuer *et al.* wurde genutzt, um die Durchführbarkeit im Notdienst zu verbessern. Zum Beispiel ist das Anlegen von Blutkulturen derzeit nicht Teil der routinemäßigen diagnostischen Aufarbeitung von Koliknotfällen. Daher wurden diese Parameter gelöscht und die Punkte reduziert.

Viele Studien haben die Rolle von Entzündungsmarkern bei Kolik im Blut untersucht, deutlich weniger Untersuchungen gibt es allerdings an Bauchhöhlenflüssigkeit. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die MMP-9 Konzentration in gewonnener Bauchhöhlenflüssigkeit im Vergleich zur MMP-9 Konzentration im Plasma von höherem diagnostischem Wert ist. MMP-9 trägt zur Stimulation der Leukozytenmigration unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren *in vivo* bei (D'Haese *et al.*, 2000) und könnte daher auch zur Entzündung und erhöhten Permeabilität der Darmwand bei Pferden mit Kolik beitragen. Nach aktuellem Wissensstand gibt es keine definitiven Hinweise für die Rolle von MMPs bei der Erhöhung der Darmpermeabilität bei

Pferden mit Kolik. Aktuelle Studien zeigen, dass Pferde mit Kolik eine höhere MMP-2 Konzentration im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten, weshalb von den Autoren eine Rolle von MMP-2 in der Pathogenese von Koliken vorgeschlagen wurde (Arosalo *et al.*, 2007; Bela *et al.*, 2007). Pferde mit Koliken zeigten außerdem signifikant höhere MMP-9-Komplex- und ProMMP-9-Aktivitäten im Urin als Pferde in der Kontrollgruppe (Arosalo *et al.*, 2007).

Der Korrelationskoeffizient für MMP-9 im Plasma war anders als in der Bauchhöhlenflüssigkeit schwach und die Korrelation blieb unbedeutend, was im Einklang mit früheren Studien an anderen Spezies und Organsystemen steht, wo höhere Konzentrationen in lokalen Proben im Vergleich zu Plasma gefunden wurden (Ollivier *et al.*, 2004, Barton *et al.*, 2015). Daher war dies nicht unerwartet und der Grund, warum die MMP-9-Konzentration in Peritonealflüssigkeit zusätzlich zu Plasma bewertet wurde. LPS, TNF- α , Interleukin-8 und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GCSF) stimulieren unter anderem die Sekretion von MMP-9 durch Neutrophile (Pugin *et al.*, 1999). Die NO-Bildung durch iNOS wird durch immunstimulierende Zytokine, bakterielle Reize oder Infektion in Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und glatten Muskelzellen induziert (Aktan, 2004). Die massive NO-Bildung führt zu einer Schädigung der epithelialen Barriere. Im Labor nach LPS-Zugabe konnte die Hemmung von iNOS und das Zellüberleben verbessert werden (Tepperman *et al.*, 1993; Tepperman *et al.*, 1994). In einer Studie, die bei Ratten mit Endotoxinämie durch LPS durchgeführt wurde, zeigte sich, dass die Darmpermeabilität und die bakterielle Translokation durch Hemmung der iNOS vermindert werden konnten (Unno *et al.*, 1997). Nach der NO-Zugabe im Labor konnte eine erhöhte Permeabilität beobachtet werden. Es konnte festgestellt werden, dass sich die tight junctions in epithelialen Zellkulturen erweitert haben, das Aktin-Skelett wurde zerstört und das ATP war reduziert (Salzman *et al.*, 1995). Die Hemmung der iNOS führte bei Mäusen zur Verbesserung der durch LPS verursachten Änderungen der tight-junction-Proteine und der mukosalen Barrierefunktion (Han *et al.*, 2004). Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang von Darmpermeabilitätserhöhung und einen Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und IL-6 sowie Änderung der tight junction-Proteine nachweisen (Han *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2010). Während der sowohl lokalen also auch systemischen bakteriellen Entzündung spielt die inflammatorische Reaktion eine erhebliche Rolle bei der Bekämpfung der Pathogene, überschießende Entzündungsreaktionen können die entsprechenden Gewebe aber auch schädigen.

MMPs und TIMPs sind wichtig, um das Gleichgewicht der extrazellulären Matrix in verschiedenen Geweben speziell bei Sepsis aufrechtzuerhalten (Nagase *et al.*, 1999). Eine Untersuchung an Mäusen beschäftigte sich mit der Rolle von MMP-9 bei Infektionen der Bauchhöhle. Sie zeigte, dass ein Mangel an MMP-9 zu einem verstärkten Wachstum von *E. coli* am primären Infektionsort und einer verstärkten Ausbreitung der Bakterien in andere

Körperkompartimente führte. Die Folge waren schwerere Organschädigungen (Renckens *et al.*, 2006). Dies ist ein Beispiel für die wichtige Rolle von MMP-9 bei der Leukozytenmigration. Insbesondere Peroxynitrit, ein Nebenprodukt der NO-Freisetzung, konnte MMPs aktivieren und war bei LPS-behandelten Ratten zusammen mit NO erhöht (Cena *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2007; Okamoto *et al.*, 2001). In einem sublethalen und letalen *E. coli*-Sepsis-Modell an Pavianen war MMP-9 im Serum erhöht (Paemen *et al.*, 1997). Mithilfe der real-time PCR (qPCR), Gelatin-Zymographie und Durchflusszytometrie konnte eine Studie zeigen, dass die Endotoxämie zu einer Erschöpfung von MMP-9 im Knochenmark führte. Parallel dazu wurde diese MMP-9-Verschlebung durch eine systematische Hochregulierung von TIMP-1 ergänzt. Schließlich bestätigte eine immunhistochemische Analyse die Migration von MMP-9-haltigen Zellen aus dem Knochenmark in das Blut und periphere Organe (Jennifer *et al.*, 2017). MMP-9 stieg weiterhin bei Patientinnen mit Endometriose an und war hier in der Peritonealflüssigkeit signifikant höher als im Serum (Paemen *et al.*, 2016). MMP-9 ist bei Patienten mit IBD (inflammatory bowel disease) stark erhöht. IBD-Patienten haben eine beeinträchtigte intestinale Barrierefunktion der Tight junctions, die sich in einer Erhöhung der Darmpermeabilität und einer Darmentzündung äußert. Eine Studie zeigt, dass MMP-9 in klinisch erreichbaren Konzentrationen *in vitro* und *in vivo* eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität der Tight junctions verursacht. Zusätzlich wurde eine MMP-9-induzierte Erhöhung der intestinalen Permeabilität der Tight junctions durch eine Erhöhung der Myosin-leichtkettenkinase (MLCK)-Gen- und Proteinexpression über den p38-Kinaseweg vermittelt. Die MMP-9-induzierte Erhöhung der Darmpermeabilität wurde bei Mäusen mit MLCK-Mangel gehemmt (Al-Sadi *et al.*, 2019). Erhöhte MMP-9-Spiegel wurden auch bei menschlichen Sepsis-Patienten gefunden und korrelierten mit dem Schweregrad und der Mortalität der Erkrankung (Pugin *et al.*, 1999; Yassen *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 1998). Andererseits wurde festgestellt, dass ein MMP-9-Mangel Mäuse in einem endotoxischen Schockmodelle vor Mortalität schützte, weshalb die Hemmung der MMP-9 als mögliche Therapie gegen Sepsis (Dubois *et al.*, 2002) vorgeschlagen wurde.

In einer Studie von Gerlach *et al.* wurde gezeigt, dass Proben, die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulans oder Serumproben enthalten, die Pro-MMP-9- und MMP-9-Aktivität im Vergleich zu den anderen Sammelmethode(n) (in Citrat- oder Heparin-Plasmaproben) künstlich erhöhen können (Gerlach *et al.*, 2007). Deshalb ist es wichtig, Probenmaterial für die MMP-9 Bestimmung in entsprechenden Probengefäßen mit Citrat oder Heparin als Antikoagulanz zu sammeln, anstatt die in der Hämatologie des Pferdes üblichen EDTA Probenröhrchen.

Bei der Berechnung der optimalen Cut-off-Werte für die MMP-9-Konzentrationen im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit wurde in unserer Studie offensichtlich, dass diese im Vergleich zu den Mittelwerten bei Pferden, die negativ oder fraglich für Sepsis waren, relativ höher

ausfallen würden. Für MMP-9 BHP (Bauchhöhlenpunktat) zeigte sich, dass der Grenzwert von 110,01 pg/ml am besten geeignet ist, da die Sensitivität mit 85,7 % und die Spezifität mit 87,5 % bei diesem Wert am höchsten sind. Im Plasma ist ein ähnlicher Wert, nämlich 109,0 pg/ml mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 59% am besten geeignet. Die Spezifität ist in diesem Fall jedoch nicht so hoch. Der cut-off von 110 pg/ml in der Peritonealflüssigkeit hatte im Vergleich zu Plasma eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität. Da es auch keine Korrelation zwischen Sepsis-Scoring und MMP-9-Konzentrationen im Plasma gab, kann eine Plasmauntersuchung für die klinische Routine nicht empfohlen werden, um die Diagnose eines strangulierenden Ileus zu unterstützen oder bei der Entscheidung für eine entsprechende Therapie zu helfen. Die Untersuchung der MMP-9-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit ist allerdings sehr interessant, da eine Abdominozentese bei Pferden mit Kolik häufig durchgeführt wird, insbesondere bei solchen Patienten, deren klinische Befunde ein unklares Bild ergeben.

Die Ergebnisse der Diskriminanzanalyse zeigen, dass alle Parameter außer ionisiertem Kalzium zur Unterscheidung zwischen den Sepsisgruppen beigetragen haben und dass es möglich ist, die Anzahl der Variablen zu reduzieren. Die Bewertung von Schleimhautfarbe, Allgemeinzustand und Leukozytenzahl führte sehr selten zu einer Fehlklassifizierung. Da in unserem Score nur Parameter einbezogen sind, die in den meisten Kliniken im Notdienst zu bestimmen sind, ist dieser Score unter praktischen Bedingungen gut einzusetzen.

Zusammenfassend scheint MMP-9 in der vorliegenden Studie ein vielversprechender entzündlicher Biomarker bei Pferden mit Kolik zu sein. Die geringe Anzahl an Probanden kann bezüglich der Aussagekraft der Studie kritisch betrachtet werden.

In weiteren geplanten klinischen Studien sollen daher die Spezifität und Sensitivität von MMP-9 für die Sepsis-Diagnose für eine größere Anzahl von Pferden mit klar definierter Sepsis (Sepsis-Score) mit Nachweis der Infektion durch Blutkultur oder PCR bestimmt werden. Hier soll auch der Zusammenhang von MMP-9 mit dem Antibiotika-Management, der Prognose oder der Indikation zur Operation bei Pferden mit Kolik untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Diagnostischer Wert der Matrix-Metalloproteinase 9 in Plasma und Bauchhöhlenpunktat als Marker für Endotoxämie und Sepsis bei Pferden mit Kolik

Das Ziel dieser Studie war es, die Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Plasma und Peritonealflüssigkeit von Pferden mit Koliken zu untersuchen und ob der Biomark MMP-9 als Frühmarker für eine Sepsis oder eine Endotoxämie bei einer Kolik geeignet ist. Die Endotoxämie ist eine der häufigsten Todesursachen bei Pferden mit Koliken. Die Enzymmatrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) ist ein Mitglied der Matrix-Metalloproteinase-Familie, die während der Embryogenese und Wundeheilung eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung des Gewebes spielt. Das physiologische Gleichgewicht zwischen Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und ihren Gegenspielern, den tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) ist für das Wachstum und die Reparatur von Gewebe erforderlich. Die Störung des Gleichgewichts im Körper und insbesondere im Immunsystem führt zur Überexpression der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9).

Es wurden 47 Pferde mit einer Kolik einbezogen, die bei Einlieferung in die Klinik anhand eines modifizierten Sepsis-Scores als endotoxämisch eingestuft wurden. Dieser Score beinhaltete klinische und labordiagnostische Untersuchungen (Allgemeinzustand, Herz- und Atemfrequenz, innere Körpertemperatur, Schleimhautfarbe, weißes Blutbild (WBC) und ionisiertes Calcium.

Unter Verwendung dieses Bewertungssystems wurden Pferde als negativ ($n = 32, \leq 6/15$ Punkte), fraglich ($n = 8, 7-9 / 15$ Punkte) oder positiv ($n = 6, \geq 10/15$ Punkte) für Sepsis eingestuft. Die MMP-9-Konzentrationen wurden in Plasma und Peritonealflüssigkeit unter Verwendung speziesspezifischer Sandwich-ELISA-Kits (equine MMP-9 kit (USCN Life Science Inc., China)) bewertet.

Eine signifikante Assoziation der gesamten Sepsis-Bewertung wurde für MMP-9 in der Peritonealflüssigkeit ($P = 0,007$) mit einem Regressionskoeffizienten von 0,131 gefunden, während für Plasma keine Assoziation gefunden wurde ($P = 0,078$). Die Verwendung einer MMP-9-Konzentration von > 110 pg/ml in der Peritonealflüssigkeit erwies sich als idealer Grenzwert zur Identifizierung einer positiven Sepsis-Bewertung ($\geq 10/15$ Punkte) (Sensitivität von 85,7% und Spezifität von 87,5%).

Abschließend wurde festgestellt, dass MMP-9 ein vielversprechender Biomarker mit hohem diagnostischem Wert für Sepsis und Endotoxämie bei Pferdekoliken ist. Die Untersuchung der Peritonealflüssigkeit scheint im Vergleich zum Plasma vorteilhafter zu sein. Da die Abdominozentese häufig bei der diagnostischen Aufarbeitung von Pferdekoliken

durchgeführt wird, wäre ein Schnelltest nützlich, um eine diagnostische Unterstützung bei der Entscheidung für eine weitere Therapie zu haben.

7 Summary

Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 in plasma and abdominal punctate as a marker for endotoxemia and sepsis in horses with colic

The aim of this study was to investigate the concentrations of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in plasma and peritoneal fluid of horses with colic and whether the Biomark MMP-9 is useful as an early marker for sepsis or endotoxemia in colic. Endotoxemia is one of the most common causes of death in horses with colic. Enzyme matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a member of the matrix metalloproteinase family, which plays an important role in tissue remodeling during embryogenesis and wound healing. The physiological balance between matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) is required for tissue growth and repair. Disturbance of balance in the body and especially the immune system leads to the overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).

For this reason, 47 horses with colic were examined based on clinical and laboratory diagnostics (general condition, heart and respiratory rate, internal body temperature, mucous membranes, white blood count (WBC) and ionized calcium). Horses with colic were classified as endotoxemic based on a modified sepsis score. Using this scoring system of sepsis, the horses were classified negative ($n = 32, \leq 6/15$ points), questionable ($n = 8, 7-9 / 15$ points) or positive ($n = 6, \geq 10/15$ points). MMP-9 concentrations were assessed in the plasma and peritoneal fluid using species-specific sandwich ELISA kits (equine MMP-9 kit (USCN Life Science Inc., China)).

In a linear discriminant analysis, all parameters of the sepsis scoring besides calcium separated well between the severity groups of the sepsis ($P < 0.05$). An association of the sepsis score with matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was significant for peritoneal fluid ($P = 0.007$), with a regression coefficient of 0.131, while no association was found for plasma ($P = 0.078$). The matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration of >110 pg/ml in peritoneal fluid proved to be an ideal limit for identifying horses with sepsis ($\geq 10/15$ points) (sensitivity of 85.7% and specificity of 87.5%).

In conclusion, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) could be a promising biomarker with a high diagnostic value for sepsis and endotoxemia in horses with colic. Examination of peritoneal fluid appears to be more advantageous compared to plasma. Since abdominocentesis is usually performed during the diagnostic work-up of horses with colic, a pen-side assay would be useful to provide a diagnostic support regarding further treatment and prognosis.

8 Literaturverzeichnis

Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* June 25; 75(6): 639-53.

Alcott C.J., Sponseller B.A., Wong D.M., Davis J.L., Soliman A.M., Wang C. and Hsu W. (2011) Clinical and immunomodulating effects of ketamine in horses with experimental endotoxemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 934–943.

Allen D. and Tyler D.A. (1990) Pathophysiology of acute abdominal disease. In: White NA; *The equine acute abdomen*. Lea & Febiger, Philadelphia: 65-87.

Allen D.G., Pringle JK & Smith D. (1993) *Handbook of Veterinary Drugs*. JB Lippincott Company, Philadelphia (USA); 678 pp.

Al-Sadi R., Youssef M., Rawat M., Guo S., Dokladny K., Haque M., Watterson M.D., Ma T.Y. (2019) MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Feb 1; 316(2): G278-G290

Archer D.C., Freeman D.E. and Doyle A.J. (2004) Association between cribbing and entrapment of the small intestine in the epiploic foramen in horses: 68 cases (1991-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 224, p. 562.

Arosalo B.M., Raekallio M., Rajamaki M., Holopainen E., Kastevaara, T., Salonen H. and Sankari S. (2007) Detecting early kidney damage in horses with colic by measuring matrix metalloproteinase -9 and -2, other enzymes, urinary glucose and total proteins. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, 4.

Baker A.H., Edwards D.R. and Murphy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 115: 3719-3727.

Barton A., Shety T., Bondzio A., Einspanier R. and Gehlen H. (2015) Metalloproteinases and their tissue inhibitors in comparison between different chronic pneumopathies in the horse. *Med Inflamm*, <https://doi.org/10.1155/2015/569512>.

Barton A., Shety T., Bondzio A., Einspanier R. and Gehlen H. (2016) Metalloproteinases and their inhibitors are influenced by inhalative glucocorticoid therapy in equine recurrent airway obstruction. *BMC Veterinary Research* 12: 282, <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0915-1>.

Barton M.H., Ferguson D., Davis P.J. and Moore J.N. (1997a) The effects of pentoxifylline infusion on plasma 6-keto-prostaglandin F1 alpha and ex vivo endotoxin-induced tumour

necrosis factor activity in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20, 487–492.

Barton M.H., Moore J.N. and Norton N. (1997b) Effects of pentoxifylline infusion on response of horses to in vivo challenge exposure with endotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, 58, 1300–1307.

Barton M.H., Morris D.D. and Norton N. (1998) Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*, 12: 26–35.

Barton M.H., Parviainen A. and Norton N. (2004) Polymyxin B protects horses against induced endotoxemia in vivo. *Equine Vet J*, 36: 397–401.

Barton M.H., Parviainen A. and Norton N. (2004) Polymyxin B protects horses against induced endotoxemia in vivo. *Equine Vet J*, 36: 397–401.

Barton M.H., MOORE J.N. and NORTON N. (1997) Effects of pentoxifylline infusion on response of horses to in vivo challenge exposure with endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 58, 11, S. 1300 - 1307.

Baskett A., BARTON M.H., NORTON N., ANDERS B. and MOORE J.N. (1997) Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 58, 11, S. 1291 - 1299.

Borchers A., Wilkins P.A., Marsh P.M., Axon J.E., Read J., Castagnetti C., Pantaleon L., Clark C., Qura'n L., Belgrave R., Trachsel D., Levy M., Bedenice D., Saulez M.N. and Boston R.C. (2012) Association of admission L-lactate concentration in hospitalised equine neonates with presenting complaint, periparturient events, clinical diagnosis and outcome: a prospective multicentre study. *Equine Vet. J.* 44, Suppl. 41, 57- 63.

Bertin F.R., Reising A., Slovis N.M., Constable,P.D. and Taylor S.D. (2013) Clinical and clinicopathological factors associated with survival in 44 horses with equine neorickettsiosis (Potomac horse Fever). *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1528-1534.

Bohannon J.K., Hernandez A., Enkhbaatar P., Adams W.L. and Sherwood E.R. (2013) The immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to immunoadjuvants. *Shock*, 40(6): 451–462.

Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A. et al. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest*. 101: 1644–55.

- Brew K., Dinakarandian D. and Nagase H. (2000)** Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta*. 1477: 267-283.
- Bristol D.G. (1982)** The anion gap as a prognostic indicator in horses with abdominal pain. *J Am Vet Med Assoc*, 181, p. 63.
- Bryant C.E., Ouellette A. and Lohmann K. (2007)** The cellular Toll-like receptor 4 antagonist E5531 can act as an agonist in horse whole blood. *Vet Immunol Immuno-pathol*, 116: 182–9.
- Burrows G.E. (1981)** Therapeutic effect of phenylbutazone on experimental acute *Escherichia coli* endotoxemia in ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 42, 94–99.
- Cena J., Lalu M.M. and Rosenfelt C. (2008)** Endothelial dependence of matrix metalloproteinase-mediated vascular hyporeactivity caused by lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol*, 582: 116-122.
- Cochrane C.A. (1997)** Models in vivo of wound healing in the horse and the role of growth factors. *Veterinary Dermatology* 8, 259–272.
- Cohen J. (2002)** The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420 (6917): 885–891.
- Collatos C., Barton M.H. and Prasse K.W. (1995)** Intravascular and peritoneal coagulation and fibrinolysis in horses with acute gastrointestinal tract diseases. *J Am Vet Med Assoc*, 207: 465–70.
- Castagnetti C., Pirrone A., Mariella J. and Mari G. (2010)** Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care. *Theriogenol.* 73, 343- 357.
- Curtis L., Burford J.H., England G.C.W, Freeman S.L. (2019)** Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic review of the effect of management-related changes. *PLoS ONE* 14: 0219307.
- Cohen N.D., Gibbs P.G., Woods A.M. (1999)** Dietary and other management factors associated with colic in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215. 53-60.
- Cohen N.D. (1997)** Epidemiology of colic, *Surgical Management of Colic: Vet. Clin. North Am., Equine Pract.* 13. 191-201.
- Cohen N.D., Matejka P.L., Honnas C.M., Hooper R.N. (1995)** Case-control study of the association between various management factors and development of colic in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206. 667-673.
- Cudmore L.A., Muurlink T., Whittem T. and Bailey S.R. (2013)** Effects of oral clenbuterol on the clinical and inflammatory response to endotoxaemia in the horse. *Research in Veterinary Science*, 94, 682–686.

- Cui W., Li L.X., Sun C.M. et al. (2010)** Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res* April; 43(4): 330-7.
- D'Haese A., Wuyts A. and Dillen C. (2000)** In vivo neutrophil recruitment by granulocyte chemotactic protein-2 is assisted by gelatinase B/MMP-9 in the mouse. *J Interferon Cytokine Res*, 20(7): 667–674.
- Dauphinee S.M. Karsan A. (2006)** Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*, 86(1): 9–22.
- Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H. et al. (2013)** Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39: 165-228.7.
- Duncan J.L., Pirie H.M. (1972)** The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse, *Res. Vet. Sci.* 13 374-379.
- Epstein K.T., Brainard B.M., Gomez-Ibanez S.E. (2011)** Thrombelastography in horses with acute gastrointestinal disease. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 307-314.
- Forbes G., Church S., Savage C.J. and Bailey S.R. (2012)** Effects of hyperimmune equine plasma on clinical and cellular responses in a low-dose endotoxaemia model in horses. *Research in Veterinary Science*, 92, 40–44.
- Furr M.O., Lessard P. and White N.A. (1995)** Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic. *Vet Surg*, 24, pp. 97-101.
- Gayle J.M., Cohen N.D. and Chaffin M.K. (1998)** Factors associated with survival in septicemic foals: 65 cases (1988-1995). *J. Vet. Intern. Med.* 12, 140- 146.
- Gardner R.B., Nydam D.V. and Mohammed H.O. (2005)** Serum gamma glutamyl transferase activity in horses with right or left dorsal displacements of the large colon. *J Vet Intern Med*, 19, p. 761.
- Gerlach R.F., Demacq C., Jung, K. (2007)** Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*; 40: 119–123.
- GRATZL E. (1936)** Beiträge zum Kolikproblem. *Wien, Tierärztl. Mschr.* 23, 258-265.
- Grosche A. (2000)** Kolik bei Pferden - Retrospektive Studie aus dem Patientengut der Medizinischen Tierklinik Leipzig 1994-1998, *Vet. Med. Diss. Leipzig.*

- Harhaj N.S., Antonetti D.A. (2004)** Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 July; 36(7): 1206-37.
- Han X., Fink M.P., Delude R.L. (2003)** Proinflammatory cytokines cause NO* dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003 March; 19(3): 229-37.
- Han X., Fink M.P., Yang R., Delude R.L. (2004)** Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* March; 21(3): 261-70.
- Hawkins D.L., MACKAY R.J., GUM G.G., COLAHAN P.T. and MEYER J.C. (1993)** Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin E2 values in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 54, 3, S. 379 - 386.
- Hassel D.M., Langer D.L., Snyder J.R., Drake C.M., Goodell M.L., Wyle A. (1999)** Evaluation of enterolithiasis in equids: 900 cases (1973-1996), *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 233-237.
- Hina C., Juhua Z., Yin Z., Mir M.A., Franklin M., Prakash S.N. and Mitzi N. (2013)** Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo*, 27(6): 669–84.
- Hoogmoed L., Rodger L.D. and Spier S.J. (1999)** Evaluation of peritoneal fluid pH, glucose concentration, and lactate dehydrogenase activity for detection of septic peritonitis in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 214, p. 1032.
- Hoshino K., Takeuchi O. and Kawai T. (1999)** Cutting Edge: Toll-like receptor 4 deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol*, 162(7): 3749–52.
- Hulten C., GRONLUND U., HIRVONEN J., TULAMO R.M., SUOMINEN M.M., MARHAUG G. and FORSBERG M. (2002)** Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and α 2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet. J.*, 34, 7, S. 699 - 704.
- Hurcombe S.D., Toribio R.E., Slovis N., Kohn C.W., Refsal K., Saville W. and Mudge M.C. (2008)** Blood arginine vasopressin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol concentrations at admission in septic and critically ill foals and their association with survival. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 639- 647.
- Hough M.E., Steel C.M. and Bolton J.R. (1999)** Ulceration and stricture of the right dorsal colon after phenylbutazone administration in four horses. *Aust Vet J*, 77, p. 785.

Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K. et al. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005 December 19; 171(6): 939-45.

Ireland J.L., Clegg P.D., McGowan C.M., Platt L. and Pinchbeck G.L. (2011) Factors associated with mortality of geriatric horses in the United Kingdom. *Prev Vet Med.*; 101(3): 204–18.

Jacobs C.C., Holcombe S.J., Cook V.L., Gandy J.C., Hauptman J.G. and Sordillo L.M. (2013) Ethyl pyruvate diminishes the inflammatory response to lipopolysaccharide infusion in horses. *Equine Veterinary Journal*, 45, 333–339.

Johnston K., Holcombe S.J. and Hauptman J.G. (2007) Plasma lactate as a predictor of colonic viability and survival after 360° volvulus of the ascending colon in horses. *Vet Surg*, 36, p. 563.

Kelmer G., Doherty T.J., Elliott S., Saxton A., Fry M.M. and Andrews F.M. (2008) Evaluation of dimethyl sulphoxide effects on initial response to endotoxin in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 40, 358–363.

King J.N. and Gerring E.L. (1989) Antagonism of endotoxin-induced disruption of equine bowel motility by flunixin and phenylbutazone. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 21, 38–42.

Koivunen A.L., Maisi P., Konttinen Y.T. and Sandholm M. (1997b) Gelatinolytic activity in tracheal aspirates of horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Veterinaria Scandinavica* 38, 17–27.

Krizkova S., Zitka O., Masarik M., Adam V., Stiborova M., Eckschlger T., Chavis G.J. and Kizek R. (2011) Assays of determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Trends Anal Chem.* 30: 1819-1832.

Kyaw-Tanner M.T., Wattle O., Van Eps A.W. and Pollitt C.C. (2008) Equine laminitis: Membrane type matrix metalloproteinase-1 (MMP-14) is involved in acute phase onset. *Equine Vet J.* 40(5): 482-487.

Kaya G, Sommerfeldstur I., Iben C. (2009) Risk factors of colic in horses in Austria. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 93: 339-349.

Laan T.T., Bull S., Pirie R.S. & Fink-Gremmels J. (2006) The anti-inflammatory effects of IV administered clenbuterol in horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Journal*, 171, 429–437.

Lalu M.M., Csont T. and Schulz R. (2004) Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med*, 32: 1332-1337.

- Lankveld D.P.K., Driessen B., Soma L.R., Moate P.J., Rudy J., Uboh C.E., van Dijk P. and Hellebrekers L.J. (2006)** Pharmacodynamic effects and pharmacokinetic profile of a long-term continuous rate infusion of racemic ketamine in healthy conscious horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29, 477–488.
- Latson K.M., Nieto J.E. and Beldomenico P.M. (2005)** Evaluation of peritoneal fluid lactate as a marker of intestinal ischaemia in equine colic. *Equine Vet J*, 37, p. 342.
- Lambert J.L., Fernandez N.J., Roy M.F. (2016)** Association of presence of band cells and toxic neutrophils with systemic inflammatory response syndrome and outcome in horses with acute disease. *J Vet Intern Med*; 30: 1284–1292.
- Leise B.S., Faleiros R.R. and Watts M. (2011)** Lamellar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. *Equine Vet J*, 43: 54–61.
- Liska D.A., Akucewich L.H., Marsella R., Maxwell L.K., Barbara J.E. and Cole C.A. (2006)** Pharmacokinetics of pentoxifylline and its 5-hydroxyhexyl metabolite after oral and intravenous administration of pentoxifylline to healthy adult horses. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 1621–1627.
- Little D. and Blikslager A.T. (2002)** Factors associated with development of ileal impaction in horses with surgical colic: 78 cases (1986-2000). *Equine Vet J*, 34, p. 464.
- Lopes M.A., Salter C.E. and Vandenplas M.L. (2010)** Expression of inflammation-associated genes in circulating leukocytes collected from horses with gastroin-testinal tract disease. *Am J Vet Res*, 71: 915–24.
- MacKay R.J., Clark C.K., Logdberg L. and Lake P. (1999)** Effect of a conjugate of polymyxin B-dextran 70 in horses with experimentally induced endotoxemia. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 68–75.
- MacKay R.J., Daniels C.A., Bleyaert H.F., Bailey J.E., Gillis K.D., Merritt A.M., Katz T.L., Johnson J.C. and Thompson K.C. (2000)** Effect of eltenac in horses with induced endotoxaemia. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 32, 26–31.
- McCuskey R.S., Urbaschek R., Urbaschek B. (1996)** The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* October; 32(4): 752-63.
- Maskos K. and Bode W. (2003)** Structure basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biot.* 25: 241-266.
- Marsh, P.S. and Palmer, J.E. (2001)** Bacterial isolates from blood and their susceptibility patterns in critically ill foals: 543 cases (1991-1998). *J. Am. Vet. Med. Ass.* 218, 1608-1610.

Milne E. (2004) Peritoneal fluid analysis for the differentiation of medical and surgical colic in horses. In Pract, 26, p. 444.

Moore J.N., Norton N., Barton M.H., Hurley D.J., Reber A.J., Donovan D.C., Vandenplas M.L., Parker T.S. and Levine D.M. (2007) Rapid infusion of a phospholipid emulsion attenuates the effects of endotoxaemia in horses. Equine Veterinary Journal, 39, 243–248.

Moore J.N. and Barton M.H. (2003) Treatment of endotoxemia. Vet Clin Equine, 19: 681-695.

Morresey P.R. and Mackay R.J. (2006) Endotoxin-neutralizing activity of polymyxin B in blood after IV administration in horses. American Journal of Veterinary Research, 67, 642–647.

Morris D.D. (1991) Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. J Vet Intern Med 5: 167-181.

Morris D.D., MOORE J.N., CROWE N. and MOLDAWER L.L. (1992) Effect of experimentally induced endotoxemia on serum interleukin-6 activity in horses. Am. J. Vet. Res., 53, 5, S. 753 - 756.

Morton A.J. and Blikslager A.T. (2002) Surgical and postoperative factors influencing short-term survival of horses following small intestinal resection: 92 cases (1994-2001). Equine Vet J, 34, p. 450.

Mulholland B., Tuft S.J. and Khaw P.T. (2005) Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. Eye 19, 584–588.

Nakamura T., Ebihara I., Shimada N., Shoji H. and Koide H. (1998) Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. Am J Med Sci 316: 355-360.

Naylor R.J., Taylor A.H., Knowles E.J., Wilford S., Linnenkohl W., Mair T.S. and Johns I.C. (2014) Comparison of flunixin meglumine and meloxicam for post operative management of horses with strangulating small intestinal lesions. Equine Veterinary Journal, 46, 427–434.

Nagase H., Woessner J.F. JR. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999; 274: 21491–21494. pmid:10419448.

Nevalainen M., Raulo S.M., Brazil T.J., Pirie R.S., Sorsa T., McGorum B.C. and Maisi P. (2002) Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses. Equine Veterinary Journal 34, 150–155.

- Okamoto T., Akaike T. and Sawa T. (2001)** Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem*, 276: 29596-29602.
- Ollivier F.J., Brooks D.E., Van Setten G.B., Schultz G.S., Gelatt K.N., Stevens G.R., Blalock T.D., Andrew S.E., Komaromy A.M., Lassaline M.E., Kallberg M.E. and Cutler T.J. (2004)** Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 7, 397–405.
- Paemen L., Jansen P.M. and Proost P. (1997)** Induction of gelatinase B and MCP-2 in baboons during sublethal and lethal bacteraemia. *Cytokine* 9: 412-415.
- Pagenstecher A., Stalder A.K., Kincaid C.L., Volk B. and Campbell I.L. (2000)** Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. *Am J Pathol*, 157(1):197–210.
- Parviainen A.K., Barton M.H. and Norton N.N. (2001)** Evaluation of polymyxin B in an ex vivo model of endotoxemia in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 72–76.
- Peek S.F., Semrad S., McGuirk S.M., Riseberg A., Slack J.A., Marques F., Coombs D., Lien L., Keuler N. and Darien B.J. (2006)** Prognostic Value of Clinicopathologic Variables Obtained at Admission and Effect of Antiendotoxin Plasma on Survival in Septic and Critically Ill Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 569.
- Pratt S.M. and Hassel D.M. (2003)** Clinical characteristics of horses with gastrointestinal ruptures revealed during initial diagnostic evaluation: 149 cases (1990-2002). 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. New Orleans (LA): 21–25 November, p. 366–70.
- Proudman C.J., Edwards G.B. and Barnes J. (2005)** Factors affecting long-term survival of horses recovering from surgery of the small intestine. *Equine Vet J*, 37, p. 360.
- Proudman C.J., Edwards G.B. and Barnes J. (2005)** Modelling long-term survival of horses following surgery for large intestinal disease. *Equine Vet J*, 37, p. 366.
- Proudman C.J., Smith J.E. and Edwards G.B. (2002)** Long-term survival of equine surgical colic cases. Part 1: Patterns of mortality and morbidity. *Equine Vet J*, 34, p. 432.
- Proudman C.J. (1992)** A two year, prospective survey of equine colic in general practice *Equine Vet J*, 24, pp. 90-93.
- Pugin J. and Widmer M.C. (1999)** Kossodo S. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 458-464.

Pugin J., Widmer M.C., Kossodo S., Liang C.M., Preas H.L.2nd. and Suffredini A.F. (1999) Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 458-464.

Ragle C.A. (1999) *The Acute Abdomen: Diagnosis, Preoperative Management, and Surgical Approaches* A Auer, JA Stick (Eds.), *Equine Surgery* (2nd Ed.), Saunders, Philadelphia, p. 224.

Raulo S.M., Sorsa T., Tervahartiala T., Pirila E. and Maisi P. (2001a) MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Veterinary Journal* 33, 128–136.

Reeves M.J., Curtis C.R. and Salman M.D. (1989) Prognosis in equine colic patients using multivariable analysis. *Can J Vet Res*, 53, pp. 87-94.

Reeves M.J., Vansteenhouse J., Stashak T.S., Yovich J.V. and Cockerell G. (1990) Failure to demonstrate reperfusion injury following ischaemia of the equine large colon using dimethyl sulphoxide. *Equine Veterinary Journal*, 22, 126–132.

Reeves M.J., Gay J.M., Hilbert B.J., Morris R.S. (1989) Association of Age, Sex and Breed factors in Acute Equine Colic: a retrospective study of 320 cases admitted to a veterinary teaching hospital in the USA, *Prev. Vet. Med.* 7.149-160.

Robinson N.E. (1997) *Current Therapy in Equine Medicine* (NE Robinson, ed), WB Saunders Company, Philadelphia (USA); pp 753-760.

Ross M.W., Donawick W.J. and Sellers A.F. (1986) Normal motility of the cecum and right ventral colon in ponies. *Am J Vet Res*, 47, p. 1756.

Rossi H.S., Koho N.M., Ilves M., Rajamäki M.M. and Mykkänen A.K. (2017) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase-2 and -9 in horses with chronic airway inflammation. *Am J Vet Res*. Nov; 78(11): 1329-1337, <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.11.1329>.

Ross M.W. and Dyson S.J. (2010) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, Elsevier Health Sciences.

Roy M.-F., Kwong G.P.S., Lambert J., Massie S., Lockhart S. (2017) Prognostic value and development of a scoring system in horses with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Intern Med.* 31: 582–92.

Rutkowski J.A., Ross M.W. and Cullen K. (1989) Effects of xylazine and/or butorphanol or neostigmine on myoelectric activity of the cecum and right ventral colon in female ponies. *Am J Vet Res*, 50, p. 1096.

- Sanchez, L.C. (2005)** Equine neonatal sepsis. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.* 21, 273-293.
- Saulez M.N., Cebra C.K. and Dailey M. (2005)** Comparative biochemical analyses of venous blood and peritoneal fluid from horses with colic using a portable analyser and an in-house analyzer. *Vet Rec*, 157, p. 217.
- Saulez M.N., Cebra C.K. and Tornquist S.J. (2004)** The diagnostic and prognostic value of alkaline phosphatase activity in serum and peritoneal fluid from horses with acute colic. *J Vet Intern Med*, 18, 564–567.
- Salzman A.L., Menconi M.J., Unno N. et al. (1995)** Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* February; 268(2 Pt 1): G361-G373.
- Scantlebury C.E., Archer D.C., Proudman J., Pinchbeck J.L. (2015)** Management and horse-level risk factors for recurrent colic in the UK general equine practice population. *Equine Veterinary Journal* 47: 202-206
- Schroeder E.L., Holcombe S.J., Cook V.L., James M.D., Gandy J.C., Hauptman J.G. and Sordillo L.M. (2011)** Preliminary safety and biological efficacy studies of ethyl pyruvate in normal mature horses. *Equine Veterinary Journal*, 43, 341–347.
- Sair M., Etherington P.J., Curzen N.P. et al. (1996)** Tissue oxygenation and perfusion in endotoxemia. *Am J Physiol* October; 271(4 Pt 2): H1620-H1625.
- Sykes B., Furr M. (2005)** Equine endotoxaemia—a state of the art review of therapy. *Austr. Vet. J.* 83, 45-50.
- Schulz R. (2007)** Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annul Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 211-242.
- Semrad S.D., Hardee G.E., Hardee M.M. and Moore J.N. (1987)** Low dose flunixin meglumine: effects on eicosanoid production and clinical signs induced by experimental endotoxaemia in horses. *Equine Veterinary Journal*, 19, 201–206.
- Senior J.M., Proudman C.J. and Leuwer M. (2011)** Plasma endotoxin in horses pre-sented to an equine referral hospital: correlation to selected clinical parameters and outcomes. *Equine Vet J*, 43: 585–91.
- Seok J., Warren H.S. and Cuenca A.G. (2013)** Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 3507–12.

Sessions D.R., Vick M.M. and Fitzgerald B.P. (2009) Characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and their inhibitors in equine granulosa cells in vivo and in vitro. *J Anim Sci.*, 87(12): 3955-66.

Simonen-Jokinen T., Maisi P., Tervahartiala T., McGorum B. Pirie S. and Sorsa T. (2006) Direct activation of gelatinase B (MMP-9) by hay dust suspension and different components of organic dust. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109, 289–295.

Simonen-Jokinen T., Pirie R.S., McGorum B. and Maisi P. (2005a) Dose responses to inhalation of endotoxin, hay dust suspension and *Aspergillus fumigatus* extract in horses as measured by levels and activation of matrix metalloproteinase-9. *Equine Veterinary Journal* 37, 155–160.

Simonen-Jokinen T., Pirie R.S., McGorum B.C. and Maisi P. (2005b) Effect of composition and different fractions of hay dust suspension on inflammation in lungs of heaves-affected horses: MMP-9 and MMP-2 as indicators of tissue destruction. *Equine Veterinary Journal* 37, 412–417.

Southwood L.L., Gassert T. and Lindborg S. (2010) Colic in geriatric compared to mature nongeriatric horses. Part 2: Treatment, diagnosis and short-term survival. *Equine Vet J*, 42(7), 628-35.

Standage S.W. and Wong H.R. (2011) Biomarkers for paediatric sepsis and septic shock. *Expert Rev Anti-Infect Ther.*, 9(1): 71–9.

Steckel, R.R. (1992) Diagnosis and management of acute abdominal pain (colic). In: *Equine Surgery*, Ed: J.A. Auer, W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp 348-360.

Strubbe D.T., Brooks D.E., Schultz G.S., Willis-Goulet H., Gelatt K.N., Andrew S.E., Kallberg M.E., MacKay E.O. and Collante W.R. (2000) Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 3, 111–119.

Templeton C.B., Bottoms G.D., Fessler J.F., Ewert K.M., Roesel O.F., Johnson M.A. and Latshaw H.S. (1987) Endotoxin-induced hemodynamic and prostaglandin changes in ponies: effects of flunixin meglumine, dexamethasone, and prednisolone. *Circulatory Shock*, 23, 231–240.

Tepperman B.L., Brown J.F., Whittle B.J. (1993) Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* August; 265(2 Pt 1): G214-G218.

Tepperman B.L., Brown J.F., Korolkiewicz R., Whittle B.J. (1994) Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells: effect of endotoxin challenge. *J Pharmacol Exp Ther* December; 271(3): 1477-82.

- Thompson-Chagoyan O.C., Maldonado J. and Gil A. (2005)** Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* 24, 339–352.
- Theelen M.J., Wilson W.D., Edman J.M., Magdesian K.G. and Kass P.H. (2014a)** Temporal trends in in vitro antimicrobial susceptibility patterns of bacteria isolated from foals with sepsis: 1979-2010. *Equine Vet. J.* 46, 161-168.
- Toribio R.E. (2011)** Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 129-147.
- Toribio R.E., Kohn C.W., Hardy J. and Rosol T.J. (2005)** Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 223-231.
- Tinker M.K., White N.A., Lessard P., Thatcher C.D., Pelzer K.D. and Davis B. (1997a)** Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J.*; 29(6): 448–53.
- Tinker M.K., White N.A., Lessard P., Thatcher C.D., Pelzer K.D., Davis B., Carmel D.K. (1997b)** Prospective study of equine colic risk factors, *Equine Vet. J.* 29. 454-458.
- Tomlinson J.E., Wilder B.O., Young K.M. and Blikslager A.T. (2004)** Effects of flunixin meglumine or etodolac treatment on mucosal recovery of equine jejunum after ischemia. *American Journal of Veterinary Research*, 65, 761–769.
- Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J. (1986)** Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* September 1; 164(3): 777-93.
- Traub-Dargatz J.L., Koprak C.A., Seitzinger A.H., Garber L.P., Forde K. and White N.A. (2001)** Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States spring 1998 to spring 1999. *J Am Vet Med Assoc.* 2001 Jul 1; 219(1): 67-71.
- Vandooren J., Swinnen W., Ugarte-Berzal E., Boon L., Dorst D., Martens, E. and Opdenakker G. (2017)** Endotoxemia shifts neutrophils with TIMP-free gelatinase B/MMP-9 from bone marrow to the periphery and induces systematic upregulation of TIMP-1. *Haematologica* October 102: 1671-1682, <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168799>.
- Vranković L., Aladrović J., Beer-Ljubić B., Zdelar-Tuk M. and Stojević Z. (2015)** Seasonal changes in enzyme activities and mineral concentrations in Holstein stallions blood plasma. *Veterinarski Arhiv*, 85, 235-246.

- Viu J., Monreal L., Jose-Cunilleras E., Cesarini C., Anor S. and Armengou L. (2012)** Clinical findings in 10 foals with bacterial meningoencephalitis. *Equine Vet. J.* 44, Suppl. 41, 100-104.
- Visse R. and Nagase H. (2003)** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92: 827-839.
- Wang Z., Li J., Cho J., Malik A.B. (2014)** Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. *Nat Nanotechnol.* 9: 204–10.
- Wagner, Antje Elisabeth Maria (2013)** Effects of regional sympathetic blockade on gut barrier function in endotoxemia. fub188-11901, <https://doi.org/10.17169/refubium-16099>.
- Weber E.J., Sanchez L.C., Giguère S. (2015)** Re-evaluation of the sepsis score in equine neonates. *Equine Vet J.* 47:275–8.
- Wilson, W.D. and Madigan, J.E. (1989)** Comparison of bacteriologic culture of blood and necropsy specimens for determining the cause of foal septicemia: 47 cases (1978-1987). *J Am Vet Med Assoc.* 15; 195(12): 1759-63.
- Wong D.M., Wilkins P.A. (2015)** Defining the systemic inflammatory response syndrome in equine neonates. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 31: 463–81.
- Wong D.M., Ruby R.E., Dembek K.A., Barr B.S., Reuss S.M., Magdesian K.G., et al. (2018)** Evaluation of updated sepsis scoring systems and systemic inflammatory response syndrome criteria and their association with sepsis in equine neonates. *J Vet Intern Med.* 32: 1185–93.
- Weiss D.J., Evanson O.A., Green B.T. and Brown D.R. (2000)** In vitro evaluation of intraluminal factors that may alter intestinal permeability in ponies with carbohydrate-induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research* 61, 858–861.
- Werners A.H., Bull S. and Fink-Gremmels J. (2005)** Endotoxemia: a review with implications for the horse. *Equine Vet J.* 37: 371-383.
- White N.A., Lessard P. (1986)** Risk factors and clinical signs associated with cases of equine colic, *Equine Pract. Proc., 32nd Annual Conv. Am. Association*, pp. 637-644.
- White N.A. (1990)** Epidemiology and Etiology of Colic, in: White N.A. (Ed.), *Equine Acute Abdomen*, Malvern, USA, pp. 49-64.
- White N.A., Elward A. and Moga K.S. (2005)** Use of web-based data collection to evaluate analgesic administration and the decision for surgery in horses with colic. *Equine Vet J.* 37, pp. 347-350.

- Winchell W.W., Hardy J., Levine D.M., Parker T.S., Gordon B.R. and Saal S.D. (2002)** Effect of administration of a phospholipid emulsion on the initial response of horses administered endotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, 63, 1370–1378.
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S. et al. (1990)** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* September 21; 249(4975): 1431-3, <https://doi.org/10.1126/science.1698311>.
- Unno N., Wang H., Menconi M.J. et al. (1997)** Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* October; 113(4): 1246-57.
- Xie B., Dong C. and Fidler I.J. (1994)** Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol*, 152: 3637-3644.
- Xie Q., Nathan C. (1994)** The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* November; 56(5): 576-82.
- Yong V.W., Power C., Forsyth P. and Edwards D.R. (2001)** Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature*. 2: 502- 511.
- Zrimsek P., Kos V.K., Mrkun J. and Kosec M. (2007)** Diagnostic value of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in synovial fluid for identifying osteoarthritis in the distalinterphalangeal joint in horses. *Acta Vet Brno*. 76: 87-95.

9 Anhang

Tabelle 10: Allgemeine Daten, Therapie und Diagnosen der 47 untersuchten Pferde.

Das Geschlecht wurde mit S= Stute, H= Hengst und W= Wallach angegeben; Therapien wurden mit K=konservativ, C= chirurgisch, R= Resektion und E= Euthanasie betitelt.

Name	Nummer	Rasse	Alter in Jahren	Gewicht in Kg	Geschlecht (H, W, S)	Therapie (K, C, E)	Diagnose
Etos	1	Polnisches Warmblut	14	550	W	K	Magenulzera
Axel	2	Haflinger	20	550	W	K	Obstipation Ileum
Champion de Coeur	3	Mecklenburger	10	610	W	K	Magenulzera
Gaylord 320	4	Warmblut	15	600	W	C	Rechtsverlagerung Colon/Peritonitis
Avelina	5	schweres Warmblut	8	695	S	C	Torsio Coli
Alma	6	schweres Warmblut	11	695	S	K	Obstipation Colon
Lady Gold Dust	7	Quarter Horse	23	470	S	C(R)	Lipoma Pendulans
Goldschätzchen	8	Engl. Vollblut	9	k.A.	S	K	Magenüberladung
Carlito B	9	Zweibrücker	16	610	W	C	Lipoma Pendulans
Lady Gold Dust	10	Quarter Horse	23	470	S	C(R)	Lipoma Pendulans
Valdiva	11	Deutsches Reitpony	10	375	S	C	Obstipation + Torsio Coli
Torrey	12	Traber	13	400	W	K	Magenüberladung
Gaudi	13	Araber-Mix	16	k.A.	W	K	Magenüberladung
Elvis	14	Quarter Horse	0,2	140	H	C	Torsio Coli
Alina	15	Warmblut	27	500	S	E	Neoplasie Abdomen
Alice	16	Warmblut	29	510	S	K	Meteorismus Coli
Dropi Fra Vinkaergar	17	Isländer	27	k.A.	W	K	V.a. Neoplasie Abdomen
Lola	18	Shetlandpony	25	k.A.	S	K	Enterocolitis
Lina	19	Warmblut	28	630	S	C(R)	Lipoma Pendulans
Diva	20	Welsh D	7	550	S	C	Torsio Coli
Leonardo	21	Westfale	8	630	H	K	Meteorismus Coli
Elisa	22	Brandenburger	11	k.A.	S	K	Rechtsverlagerung Colon
Shannon	23	Warmblut	13	k.A.	S	K	Obstipation Cäcum
Maxi	24	Warmblut	10	k.A.	S	K	Rechtsverlagerung Colon
Quarterbacks Aurelius	25	Pony	2	200	H	C	Peritonitis

Sussy	26	Pony	17	400	S	C	Obstipation Cäcum
MJ Spanish Candyman	27	Quarter Horse	2	240	H	K	Magenulzera
Petite Fleur	28	Brandenburger	23	500	S	K	V.a. Neoplasie Abdomen
Santoval	29	Hannoveraner	18	603	W	C	Rechtsverlagerung Colon
Deep Red Devil	30	Oldenburger	8	493	W	K	Obstipation Colon
Spök	31	Isländer	15	400	S	K	Kolik unklarer Genese
Majestix	32	Traber	25	440	H	E	Lipoma Pendulans
Dorette	33	Oldenburger	9	540	S	C	Obstipation Colon
Janosch	34	Deutsches Sportpferd	11	600	W	K	Rechtsverlagerung Colon
Morla	35	Polnisches Warmblut	14	650	S	K	Obstipation Colon
Morelka	36	Polnisches Warmblut	14	700	S	K	Meteorismus Coli
Douwina	37	Barockpinto	5	650	S	C	Torsio Coli
Baden-Baden	38	Vollblut	2	420	S	K	Spastische Kolik
Sourire	39	Westfale	10	k.A.	S	K	Magenulzera
Le Niro	40	Hannoveraner	7	600	W	K	Obstipation Colon
Flake	41	Quarter Horse	25	500	W	E	Magenruptur
Weltentdecker	42	Hannoveraner	9	k.A.	H	K	Obstipation Colon
Colorado	43	Pony-Mix	10	k.A.	W	K	Kolik unbekannter Genese
Cocolina	44	Deutsches Reitpony	18	495	S	K	Meteorismus Cäci
Dine	45	Trakehner	31	k.A.	S	E	Dünndarmileus
Miss Jaq o Bel	46	Quarab	12	490	S	C	Rechtsverlagerung Colon
Rosenstolz	47	Trakehner	12	575	W	C	Meteorismus Coli

Tabelle 11: Ergebnisse der für den Sepsis-Score relevanten Parameter (Erhebung des klinischen Bildes und zweier Laborparameter (Leukozytenzahl und ionisiertes Kalzium) zur Einschätzung des Schweregrads der Endotoxämie der Patienten).

Name	AB (ungestört – hgr. reduziert)	HF (Schläge /Min)	AF (Züge /Min)	IKT (°C)	Maul-SH (blassrosa – hgr. gerötet)	Leukozyten (10 ³ /μl)	ionisiertes Kalzium (mmol/l)
Etos	mgr. reduziert	80	24	38,7	ggr. gerötet	5,45	1,508
Axel	mgr. reduziert	64	34	38,0	ggr. gerötet	2,75	1,805
Champion de Coeur	ungestört	44	12	37,7	blassrosa	8,09	1,043
Gaylord 320	ggr. gestört	52	20	37,2	mgr. gerötet	4,16	1,367
Avelina	ggr. gestört	54	18	37,0	blassrosa	5,89	1,277
Alma	ungestört	40	16	37,8	blassrosa	6,8	1,321
Lady Gold Dust	mgr. reduziert	40	18	36,5	ggr. gerötet	11,46	1,273
Goldschätzchen	mgr. reduziert	76	16	37,2	ggr. gerötet	10,97	1,368
Carlito B	hgr. reduziert	80	60	36,5	mgr. gerötet	8,25	1,456
Lady Gold Dust	mgr. reduziert	40	18	36,5	ggr. gerötet	11,46	1,273
Valdiva	ggr. reduziert	44	16	38,0	ggr. gerötet	10,57	1,314
Torrey	ggr. reduziert	44	18	37,2	blassrosa	11,15	1,461
Gaudi	ggr. reduziert	48	20	37,0	blassrosa	3,08	1,046
Elvis	mgr. reduziert	80	24	38,9	ggr. gerötet	12,46	1,313
Alina	ggr. reduziert	60	16	38,3	ggr. gerötet	14,67	1,212
Alice	ggr. reduziert	68	24	38,2	ggr. gerötet	8,08	1,221
Dropi Fra Vinkaergar	ggr. reduziert	52	16	38,0	blassrosa	11,63	1,288
Lola	ggr. reduziert	52	40	38,4	ggr. gerötet	6,58	1,341
Lina	hgr. reduziert	60	32	37,8	ggr. gerötet	13,52	1,447
Diva	ggr. reduziert	56	18	37,5	blassrosa	16,35	1,427
Leonardo	ggr. reduziert	44	18	37,8	ggr. gerötet	7,24	1,322
Elisa	ggr. reduziert	32	12	37,6	blassrosa	6,39	1,372
Shannon	ggr. reduziert	36	12	37,4	blassrosa	6,5	1,234
Maxi	ggr. reduziert	32	12	37,8	blassrosa	8,66	1,372
Quarterbacks Aurelius	mgr. reduziert	64	24	37,8	blassrosa	35,93	1,608
Sussy	mgr. reduziert	40	16	37,6	blassrosa	11,21	1,412
MJ Spanish Candyman	ggr. reduziert	40	16	37,5	blassrosa	8,22	1,534
Petite Fleur	ggr. reduziert	36	12	37,5	blassrosa	9,69	1,391
Santoval	mgr. reduziert	80	20	37,8	ggr. gerötet	12,2	0,395

Deep Red Devil	mgr. reduziert	44	16	37,8	blassrosa	6,56	1,164
Spök	ggr. reduziert	44	20	37,6	blassrosa	11,62	1,372
Majestix	hgr. reduziert	60	40	36,4	blassrosa	10,59	1,111
Dorette	hgr. reduziert	70	20	37,5	ggr. gerötet	7,12	1,432
Janosch	mgr. reduziert	48	60	37,5	blassrosa	9,21	1,236
Morla	mgr. reduziert	68	18	38,2	mgr. gerötet	5,08	1,491
Morelka	mgr. reduziert	54	12	38,5	blassrosa	11,51	1,539
Douwina	mgr. reduziert	64	20	38,2	blassrosa	6,09	1,529
Baden-Baden	ggr. reduziert	36	16	37,5	blassrosa	9,08	1,525
Sourire	ungestört	52	20	37,6	blassrosa	8,03	1,275
Le Niro	ggr. reduziert	60	16	37,6	blassrosa	10,23	1,515
Flake	mgr. reduziert	40	16	39,3	mgr. gerötet	2,61	1,486
Weltentdecker	ggr. reduziert	52	16	38,6	blassrosa	9,45	1,463
Colorado	hgr. reduziert	20	16	37,7	blassrosa	10,04	1,205
Cocolina	ggr. reduziert	48	22	37,8	ggr. gerötet	7,56	1,619
Dine	hgr. reduziert	96	36	36,0	hgr. gerötet	10,63	1,211
Miss Jaq o Bel	ggr. reduziert	40	16	37,6	blassrosa	4,34	1,689
Rosenstolz	mgr. reduziert	44	20	37,7	blassrosa	5,43	1,694

AB. Allgemeinbefund, IKT. Körpertemperatur, HF. Herzfrequenz, AF. atmfrequenz, SH. Schleimhaut.

Tabelle 12: Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen und der Laboranalysen der gewonnenen Bauchhöhlenpunkate.

Name	Menge (in ml)	Farbe	Klarheit	TP (g/dl)	Laktat (mmol/l)	Zellgehalt (10 ³ /μl)
Etos	0,4	gelblich	ggr. trüb	4,2	2,6	3,4
Axel	1,2	gelblich	mgr. trüb	4	k.A.	n.m.
Champion de Coeur	6,0	blass-gelb	klar	0,4	1	0,77
Gaylord 320	4,2	dunkelgelb	mgr. trüb	4,2	8,6	25
Avelina	1,0	gelblich	ggr. trüb.	k.A.	k.A.	k.A.
Alma	2,6	gelblich	klar	1,8	k.A.	0,69
Lady Gold Dust	6,0	gelblich	ggr. trüb	2,8	k.A.	0,41
Goldschätzchen	2,3	gelblich	klar	0,8	k.A.	1,44
Carlito B	1,8	gelblich	klar	0,8	<1	0,6
Lady Gold Dust	6,0	gelblich	ggr. trüb	4,5	k.A.	0,41
Valdiva	3,6	gelblich	ggr. trüb	3	1,3	3,89
Torrey	2,8	gelblich	klar	2,5	k.A.	3,1
Gaudi	4,0	gelblich	ggr. trüb	1	5	6,3
Elvis	1,1	dunkelgelb	mgr. trüb	k.A.	12,1	4,5
Alina	4,2	gelblich	klar	1	1,5	0,67
Alice	3,1	gelblich	klar	1,8	1	1,35
Dropi Fra Vinkaergar	4,7	gelblich	klar	1,4	1,4	1,13
Lola	2,5	gelblich	klar	0,8	k.A.	0,61
Lina	5,3	rötlich	ggr. trüb	3,2	5,7	2,39
Diva	4,2	blass-gelb	klar	1	k.A.	1,86
Leonardo	3,2	gelblich	klar	k.A.	k.A.	0,21
Elisa	6,1	gelblich	klar	0,8	1,6	0,43
Shannon	10,0	gelblich	klar	1,4	k.A.	0,51
Maxi	8,2	gelblich	klar	1,8	<1	1,2
Quarterbacks Aurelius	6,1	gelblich	ggr. trüb	2,4	1	8,34
Sussy	2,3	gelblich	klar	2	2,8	2,66

MJ Spanish Candyman	3,2	blass-gelb	klar	0,2	<1	1,26
Petite Fleur	3,1	blass-gelb	klar	1	<1	1,14
Santoval	5,0	gelb-rötlich	mgr. trüb	2	4,6	0,81
Deep Red Devil	7,2	blass-gelb	klar	0,2	k.A.	0,23
Spök	8,1	gelblich	klar	0,8	<1	0,43
Majestix	4,4	rötlich	hgr. trüb	3	5	6,52
Dorette	5,6	gelblich	klar	3	1,7	1,86
Janosch	4,3	blass-gelb	klar	1	<1	1,43
Morla	3,1	blass-gelb	klar	1,6	4,8	0,16
Morelka	4,0	blass-gelb	klar	2,4	k.A.	1,96
Douwina	10,0	blass-gelb	klar	0,7	1,8	0,92
Baden Baden	3,1	blass-gelb	klar	1,2	1,7	0,5
Sourire	5,0	blass-gelb	klar	1	2,4	0,29
Le Niro	3,2	blass-gelb	klar	1,2	2	0,95
Flake	10,1	gelblich	mgr. trüb	6	12,7	23,0
Weltentdecker	2,3	gelblich	klar	1	k.A.	5,75
Colorado	3,8	blass-gelb	klar	0,8	1	0,61
Cocolina	8,9	blass-gelb	klar	k.A.	1,5	2,24
Dine	4,5	rötlich	hgr. trüb	5	17,7	21,41
Miss Jaq o Bel	2,7	gelblich	klar	1	1,2	0,38
Rosenstolz	3,6	gelblich	klar	k.A.	1,2	0,59

Tabelle 13: *Ergebnisse der Laboranalysen der gewonnenen Blutproben.*

Name	HKT (%)	Leukozyten (10 ³ /μl)	TP (g/dl)	Laktat (mmol/l)	ionisiertes Kalzium (mmol/l)	Glukose (mg/dl)	PH
Etos	40	5,45	6,0	2,1	1,508	83	7,3
Axel	37	2,75	6	1,4	1,805	126	7,4
Champion de Coeur	40	8,09	6,4	<1	1,043	137	7,4
Gaylord 320	37	4,16	6	1,9	1,367	112	7,4
Avelina	42	5,89	5	14,3	1,277	193	7,2
Alma	43	6,8	8	2,2	1,321	124	7,4
Lady Gold Dust	27	11,46	4,1	2,1	1,273	150	7,4
Goldschätzchen	40	10,97	6	<1	1,368	81	7,4
Carlito B	35	8,25	6,2	<1	1,456	79	7,4
Lady Gold Dust	31	11,46	6	<1	1,273	150	7,4
Valdiva	30	10,57	6,4	<1	1,314	99	7,4
Torrey	43	11,15	7	<1	1,461	88	7,4
Gaudi	38	3,08	6	6	1,046	181	7,5
Elvis	35	12,46	6,8	3,9	1,313	120	7,4
Alina	27	14,67	6	1,3	1,212	91	7,4
Alice	26	8,08	7	1,2	1,221	120	7,4
Dropi Fra Vinkaergar	36	11,63	7	1,3	1,288	119	7,4
Lola	33	6,58	5,4	4,3	1,341	97	7,4
Lina	39	13,52	7	4,7	1,447	90	7,4
Diva	27	16,35	6,2	1,1	1,427	102	7,4
Leonardo	38	7,24	5,2	3	1,322	98	7,4
Elisa	30	6,39	6	1,4	1,372	99	7,4
Shannon	26	6,5	5,4	1,6	1,234	143	7,4
Maxi	32	8,66	6,6	1,2	1,372	91	7,4
Quarterbacks Aurelius	30	35,93	8	<1	1,608	84	7,4
Sussy	22	11,21	6,2	1,4	1,412	115	7,4
MJ Spanish Candyman	27	8,22	4,6	<1	1,534	118	7,4

Petite Fleur	32	9,69	7	<1	1,391	86	7,4
Santoval	40	12,2	5,8	4,1	0,395	129	7,4
Deep Red Devil	29	6,56	5	1	1,164	116	7,3
Spök	28	11,62	6,1	<1	1,372	91	7,4
Majestix	35	10,59	5,8	1,9	1,111	131	7,4
Dorette	16	7,1	5,8	1,1	1,432	221	7,3
Janosch	33	9,21	6,8	<1	1,236	77	7,4
Morla	41	5,08	8	5,6	1,491	121	7,4
Morelka	29	11,51	6,2	<1	1,539	170	7,4
Douwina	30	6,09	6,8	2	1,529	128	7,4
Baden-Baden	29	9,08	5,6	1,7	1,525	102	7,4
Sourire	38	8,03	6,6	2,8	1,275	106	7,4
Le Niro	36	10,23	6,7	1,7	1,515	108	7,4
Flake	33	2,61	6,8	1,5	1,486	105	7,4
Weltentdecker	37	9,45	7,4	<1	1,463	152	7,1
Colorado	29	10,04	6,2	<1	1,205	120	7,4
Cocolina	41	7,56	7,5	1,3	1,619	80	7,4
Dine	38	10,63	5,4	7,2	1,211	292	7,4
Miss Jaq o Bel	37	4,43	5	1,6	1,689	83	7,3
Rosenstolz	37	5,43	5	1,2	1,694	79	7,4

10 Publikationsverzeichnis (aus den Daten der Promotionsarbeit)

Barton A, Richter I G, Ahrens T, Merle R, **Alalwani A**, Lilge S, Purschke K, Barnewitz D, Gehlen H (2021): MMP-9 Concentration in Peritoneal Fluid Is a Valuable Biomarker Associated with Endotoxemia in Equine Colic. Mediators Inflamm, 2021 Jan, 3: 1-9

Barton A, Richter I G, Ahrens T, Merle R, **Alalwani A**, Lilge S, Purschke K, Barnewitz D, Gehlen H (2020): Evaluaton of Matrix-Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) as biomarkers for sepsis and endotoxemia in equine colic. Vortrag DVG Vet Congress, Berlin, 15.-17.10.2020

Barton A, Richter I G, Ahrens T, Merle R, **Alalwani A**, Lilge S, Purschke K, Barnewitz D, Gehlen H (2021): Evaluaton of Matrix-Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) as biomarkers for sepsis and endotoxemia in equine colic. Poster Innlab Tagung, Leipzig, 29.-30.01.2021

Barton A, Richter I G, Ahrens T, **Alalwani A**, Barnewitz D, Gehlen H: Is MMP-9 a valuable diagnostic marker of sepsis and endotoxemia in equine colic? Poster Jahreskongress des ECEIM, Valencia, 22-24.11.2019

11 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Professor Dr. Heidrun Gehlen für die Betreuung meiner Promotionsarbeit danken. Ihre stetige Ansprechbarkeit und zügigen Korrekturanmerkungen haben mir sehr dabei geholfen, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Meiner Betreuerin, PD.Dr. Ann-Kristin Barton danke ich vielmals für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Studie.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Judith Christine Winter.

Bei den Kollegen der Klinik für Pferde der FU Berlin bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung und die Hilfe bei der Untersuchung der Probanden.

Abschließend geht mein tiefster Dank an meine Familie und ganz besonders an meine Eltern. Ohne euch hätte ich auch dieses Ziel niemals erreichen können.

12 Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte

Die Arbeit wurden finanziell nicht unterstützt. Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 27.06.2023

Abdollah Alalwani



9 783967 292190

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-219-0